

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO**

**CONTROLE NEURAL DA LIPÓLISE INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO CENTRAL  
DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS EM POMBOS (*Columba livia*)**

**LUCIANE COUTINHO DE AZEVEDO**

**FLORIANÓPOLIS, 2000**

**LUCIANE COUTINHO DE AZEVEDO**

**CONTROLE NEURAL DA LIPÓLISE INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO CENTRAL  
DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS EM POMBOS (*Columba livia*)**

**Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina, para  
obtenção do grau de *Mestre em  
Neurociências e Comportamento***

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Aparecida Paschoalini**

**FLORIANÓPOLIS, 2000**

**“CONTROLE NEURAL DE LIPÓLISE INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO CENTRAL DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS EM POMBOS (Columba livia)”.**

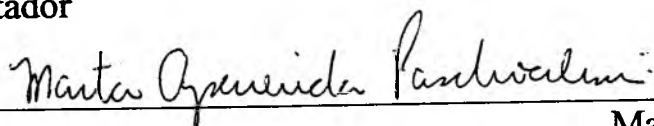
**LUCIANE COUTINHO DE AZEVEDO**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS**

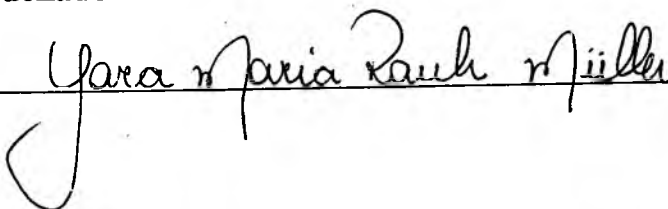
na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador



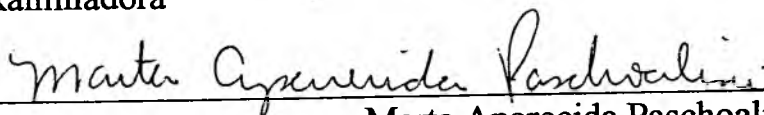
Marta Aparecida Paschoalini

Coordenador do Curso

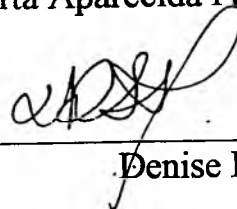


Yara Maria Rauh Müller

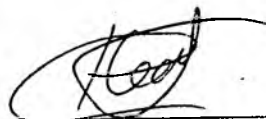
Banca Examinadora



Marta Aparecida Paschoalini (Presidente)



Denise Rangel da Silva Sartori



Rodrigo Bainy Leal

Dedico este trabalho aos meus pais, **Nilton e Osnilda**, que sempre demonstraram com carinho o seu amor, acreditando na minha capacidade de vencer.

E, em especial a **DEUS**, que me protegeu nas inúmeras idas e vindas, me deu fé para superar os momentos mais difíceis e sempre me guiou a seguir os melhores caminhos.

## AGRADEÇO ESPECIALMENTE,

Ao meu amor, **Enzo**, que, com sua capacidade e inteligência, me inspirou a ser uma pessoa melhor;

Às minhas irmãs, **Suzane e Viviane**, pela paciência, carinho e disponibilidade com que acompanharam esses momentos de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À **Profª Drª Marta Aparecida Paschoalini**, pela determinação, interesse e competência com que me orientou durante todos os momentos da realização deste trabalho.

À **Janaina das Neves**, pela paciência e disponibilidade com que me ensinou toda a parte técnica durante a fase experimental.

Ao **Nivaldo**, secretário do curso, por todo apoio prestado;

À dona **Vilma e Eliane**, pelo carinho e auxílio em momentos difíceis passados dentro do laboratório;

À **Jana**, pela grande colaboração, companheirismo e bons momentos compartilhados;

Ao **Prof. José Marino Neto**, pelo auxílio e sugestões na elaboração deste trabalho;

A todos os alunos da pós-graduação, em especial à **Silvia**, que com carinho estava sempre disposta a me ajudar;

Aos servidores, professores e colegas da fisiologia e neurociências que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Ao **Sr. João Francisco Vaz Sepetiba** pela revisão ortográfica;

À coordenadora do Curso de Nutrição da Universidade do Vale do Itajaí, pelo constante incentivo a seguir em frente;

A todos os meus amigos, em especial à **Cristiane, Eloysa e Adriana**, que me incentivaram e souberam entender minhas ausências.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	V
<b>RESUMO</b> .....	Vii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>1. Controle Periférico do Metabolismo de Lipídios em Mamíferos</b> .....	02
<b>2. Controle Periférico do Metabolismo de Glicose em Mamíferos</b> .....	07
<b>3. Controle Periférico da Disponibilidade de Substratos Energéticos em Mamíferos</b> .....	08
<b>4. Controle da Disponibilidade de Substratos Energéticos pelo Sistema Nervoso Central (SNC)</b> .....	09
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	14
<b>1. ANIMAIS</b> .....	15
<b>2. IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR</b> .....	15
<b>3. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR</b> .....	16
<b>4. IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA NA ARTÉRIA BRAQUIAL</b> .....	16
<b>5. COLETA DE AMOSTRAS SANGÜÍNEAS</b> .....	17
<b>6. SOLUÇÕES ADMINISTRADAS POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR</b> .....	17
<b>7. DETERMINAÇÃO DO AGL PLASMÁTICO</b> .....	18
<b>8. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA</b> .....	18
<b>9. REAGENTES</b> .....	18
<b>10. HISTOLOGIA</b> .....	19
<b>11. ANÁLISE DOS RESULTADOS</b> .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	20
<b>1. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de carbacol ou salina após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com salina sobre a concentração dos AGL e de glicose</b> .....	21
<b>1.1. AGL</b> .....	21
<b>1.2. GLICOSE</b> .....	21
<b>2. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de carbacol após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com escopolamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose</b> .....	24
<b>2.1. AGL</b> .....	24
<b>2.2. GLICOSE</b> .....	25

<b>3. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de salina após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com escopolamina ou salina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose. -----</b>	<b>27</b>
3.1. AGL -----	27
3.2. GLICOSE -----	28
<b>4. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de carbacol após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com metil-escopolamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose -----</b>	<b>30</b>
4.1. AGL -----	30
4.2. GLICOSE -----	31
<b>5. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de salina após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com metil-escopolamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose. -----</b>	<b>33</b>
5.1. AGL -----	33
5.2. GLICOSE -----	33
<b>6. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de carbacol após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com mecamilamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose. -----</b>	<b>36</b>
6.1. AGL -----	36
6.2. GLICOSE -----	37
<b>7. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de salina após pré-tratamento <i>i.c.v.</i> com salina ou mecamilamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose. -----</b>	<b>39</b>
7.1. AGL -----	39
7.2. GLICOSE -----	39
<b>8. Efeito da administração <i>i.c.v.</i> de neostigmina ou salina sobre a concentração plasmática dos AGL e de glicose. -----</b>	<b>41</b>
8.1. AGL -----	41
8.2. GLICOSE -----	41
<b>DISCUSSÃO -----</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>56</b>

**RESUMO**



O presente estudo teve como objetivo investigar o tipo de receptor colinérgico central envolvido com a resposta lipolítica induzida pela injeção intracerebroventricular (*i.c.v.*) de carbacol em pombos. A participação de receptores colinérgicos muscarínicos, sobre ativação da lipólise induzida pelo carbacol, foi determinada por meio da injeção *i.c.v.* de escopolamina (2,7 e 5,4 nmol), antagonista de receptores muscarínicos, ou metil-escopolamina, também antagonista de receptores muscarínicos mas que não atravessa a barreira hematoencefálica, 15 min antes da injeção *i.c.v.* de carbacol ou salina (grupo controle). A participação de receptores nicotínicos foi avaliada pela injeção *i.c.v.* de mecamilamina, antagonista de receptores nicotínicos, 15 min antes da injeção *i.c.v.* de carbacol ou salina. Em alguns animais foi realizada também a administração *i.c.v.* de neostigmina. Ao final de todos os experimentos, as alterações na concentração plasmática dos ácidos graxos livres (AGL) e glicose no plasma foram acompanhadas durante 1 h em intervalos de 15 min. Os resultados mostraram que a escopolamina na dose menor (2,7 nmol) bloqueou parcialmente o aumento dos AGL plasmático após administração de carbacol, entretanto, a administração de escopolamina na dose maior (5,4 nmol) provocou uma resposta lipolítica semelhante àquela obtida após a injeção *i.c.v.* de carbacol, precedida pela injeção *i.c.v.* de salina. A administração *i.c.v.* de escopolamina, em ambas as doses, precedida pela injeção *i.c.v.* de salina, mostrou que, na dose menor (2,7 nmol), a escopolamina não provoca um aumento nos níveis dos AGL no plasma, porém, o grupo que recebeu pré-tratamento de escopolamina na dose de 5,4 nmol, sofreu uma elevação dos AGL plasmático com início, intensidade e duração semelhante àquela observada após injeção *i.c.v.* de carbacol, precedida pela administração *i.c.v.* de salina. Esses dados sugerem que a administração central da escopolamina estimula a lipólise, independentemente da administração *i.c.v.* de carbacol. O pré-tratamento com metil-escopolamina (2,7 nmol) não alterou a resposta lipolítica induzida pelo carbacol, no

entanto, quando injetou-se por via *i.c.v.* metil-escopolamina, na dose maior (5,4 nmol), antes da injeção central de carbacol, houve um bloqueio na elevação dos AGL plasmático durante todo o período experimental. A administração central de metil-escopolamina, em ambas as doses, precedida pela injeção *i.c.v.* de salina, não provocou alterações nos níveis dos AGL no plasma. Esses resultados sugerem que a elevação dos AGL no plasma provocada pela injeção *i.c.v.* de escopolamina deva ser consequência de uma provável passagem desse antagonista pela barreira hematoencefálica. Dessa forma, a escopolamina poderia bloquear receptores muscarínicos localizados em órgãos-alvo, logo, impedindo sua ligação com a acetilcolina liberada pelas fibras pós-ganglionares do parassimpático, fato que desencadearia um predomínio da atividade simpática. O pré-tratamento com ambas as doses de mecamilamina não alterou essencialmente a resposta lipolítica induzida pelo carbacol. Além disso, verificou-se que a pré-administração de mecamilamina, seguida pela injeção de salina, também não alterou a concentração dos AGL no plasma. O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho sugere que, provavelmente, receptores colinérgicos do tipo muscarínico estejam envolvidos com a ativação da lipólise após administração central de carbacol.

A neostigmina, administrada por via *i.c.v.*, provocou uma resposta hiperglicêmica sem alterar a concentração plasmática dos AGL. Esses dados sugerem a possibilidade do carbacol, em pombos, atuar preferencialmente em receptores muscarínicos e o efeito da neostigmina ser mediado preferencialmente pela interação da acetilcolina com receptores nicotínicos centrais.

**ABSTRACT**

In the present study the central cholinergic receptor subtypes possibly involved in the lipolytic response induced by the intracerebroventricular (*i.c.v.*) injection of carbachol in adult pigeons, food-satiated, was examined. The participation of muscarinic cholinergic receptor or nicotinic cholinergic receptor was determined by *i.c.v.* injection of scopolamine (SCO) (2,7 and 5,4 nmol), a muscarinic receptor antagonist, or methyl-scopolamine (MET), also a muscarinic receptor antagonist which doesn't cross the hematoencephalic barrier, or mecamylamine (MEC), a nicotinic receptor antagonist, 15 min before the *i.c.v.* injection of carbachol or saline (control group). At the end of all the experiments, the alterations in the concentration of free fatty acids (FFA) and glucose in the plasma was accompanied during 1 h in intervals of 15 min. The results showed that SCO (2,7 nmol) partially blocked the increase in plasma FFA evoked by carbachol. In the larger dose (5,4 nmol), SCO caused a lipolytic response, similar that obtained after *i.c.v.* carbachol + *i.c.v.* saline. SCO (5,4 nmol) when preceded by the *i.c.v.* injection of saline, increase plasmatic FFA concentration with intensity and duration similar to that observed after *i.c.v.* carbachol + *i.c.v.* saline. These data suggest that *i.c.v.* SCO stimulates the lipolysis independently of the *i.c.v.* carbachol. The pretreatment with MET (2,7 nmol) didn't alter the lipolytic response induced by the carbachol, however, in the larger dose (5,4 nmol) blockade in the elevation of the FFA in the plasma during the whole experimental period. MET, in both doses, when preceded by *i.c.v.* injection of saline, didn't cause alterations in the plasmatic levels of FFA. The pretreatment with both MEC doses didn't alter the lipolytic response induced by the carbachol. Furthermore MEC pretreatment, proceeded by the injection of saline, didn't also change plasmatic FFA concentration. The presente data can indicate that, probably, cholinergic receptor of the type muscarinic is involved with the activation of the lipolysis after central administration of carbachol.

The neostigmine, anticholinesterase agents, administered *i.c.v.*, caused a hyperglycaemic response without changing plasmatic FFA concentration. These data suggest the possibility of the carbachol act preferentially in muscarinic receptor and the effect of the neostigmine to be mediated mainly by the interaction of the achetylcholine with central nicotinic receptor in pigeons.

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Controle Periférico do Metabolismo de Lipídios em Mamíferos

A manutenção da vida requer um constante suprimento de fontes nutritivas para todo o corpo. Essas fontes são usadas para gerar energia e preservar as estruturas corporais (Foster e McGarry, 1996). O combustível para produção desta energia é conseguido através dos alimentos que após consumidos são digeridos, absorvidos e transportados para as células onde serão armazenados ou catabolisados (Strubbe, 1994). A glicose derivada do glicogênio hepático e muscular, os ácidos graxos livres (AGL) liberados pelo tecido adiposo e, em menor extensão, as proteínas na forma de aminoácidos devem servir como fonte de energia para todo o corpo (Scheurink, 1994).

Nas aves, o glicogênio, apesar de sua importância metabólica em manter constante os níveis de glicose plasmática como fonte energética essencial para o sistema nervoso central, é uma forma insignificante de energia armazenada, representando somente 0,3 a 0,5% do total energético corporal, enquanto que as proteínas representam de 17 a 23 % desse total (Cherel e cols., 1988). O maior reservatório de proteína no corpo é o tecido muscular esquelético, que funciona como importante órgão homeostático em vários estados catabólicos, através da provisão de aminoácidos para a circulação (Daniel e Pratt, 1977).

No tecido adiposo (TA), tanto de aves quanto de mamíferos, está localizada a maior reserva energética corporal estocada na forma de triacilglicerol (TG) (Renold e Cahill, 1965; Coppack e cols., 1994), representando cerca de 93% do total de TG corporal (Johnston, 1970) . O tecido adiposo é o principal órgão controlador da disponibilidade dos AGL para o plasma. A minoria restante de TG encontra-se armazenada no fígado e músculo (esquelético e cardíaco) (Basso e Havel, 1970; Havel e cols., 1970; Dagenais e cols., 1976). Apesar da pequena massa, esses estoques servem

como reserva energética que compensa diferenças a curto prazo na provisão dos AGL para estas regiões (Coppack e cols., 1994). O TG hepático e muscular se mantém estável mais facilmente quando comparado ao do tecido adiposo (Wisneski e cols., 1987).

Quando a necessidade energética não consegue ser suprida pelos combustíveis circulantes ou pelos carboidratos estocados, ocorre mobilização de lipídios do TA para a circulação. Os triacilgliceróis (TGs) são mobilizados através do processo lipolítico, o qual promove a hidrólise dos TGs em AGL e glicerol (Arner, 1996). A hidrólise dos TGs em AGL e glicerol pode ocorrer no meio intracelular através da hidrólise dos TGs armazenados no adipócito ou a partir da hidrólise das lipoproteínas circulantes.

O processo lipolítico no meio intracelular é mediado por uma enzima denominada lipase hormônio sensível (LHS) (Vaughan e cols., 1964). A LHS, assim denominada devido à sua sensibilidade à ação de hormônios, tais como, catecolaminas e insulina, catalisa os TGs a monoacilgliceróis e ácidos graxos nas duas primeiras etapas da lipólise, e a enzima lipase monoacilglicerol converte o monoacilglicerol que restou em AGL e glicerol (Fredrikson e cols., 1986). Os AGL partem ligados à albumina plasmática para serem utilizados principalmente no músculo e no fígado. Nesse último, a oxidação pode ser total ou parcial, gerando os corpos cetônicos. A albumina no plasma é fator fundamental e limitante para a veiculação dos AGL liberados pela lipólise, ela tem capacidade de se ligar a aproximadamente 10 moléculas de AGL de cada vez (Chung e cols., 1995). Se não houver albumina suficiente no plasma ocorrerá uma redução da lipólise intracelular.

A hidrólise das lipoproteínas no meio extracelular, ocorre no lúmen capilar com ação de outra enzima limitante chamada lipase lipoproteica (LPL), que é a responsável pela hidrólise dos TGs das lipoproteínas circulantes (quilomicrons e lipoproteína de



muito baixa densidade) (Hamilton, 1972; Green e Glickman, 1981). A etapa inicial no catabolismo dessas lipoproteínas envolve a hidrólise da molécula de TG, resultando na liberação dos AGL e glicerol. Os AGL liberados serão transportados para dentro das células podendo ser reesterificados à TG, no tecido adiposo, ou imediatamente oxidados como fonte de energia, mais provavelmente no músculo esquelético ou cardíaco (Eckel, 1989; Bensadoun, 1990). A reesterificação depende da disponibilidade de  $\alpha$ -glicerofosfato, produto do metabolismo da glicose no tecido adiposo, para formar TG (Shapiro e cols., 1957; Leboeuf e cols., 1959). Pelo fato da gliceroquinase ter pouca atividade no tecido adiposo, o glicerol liberado pela hidrólise das lipoproteínas no meio extracelular não é utilizado na reesterificação. O glicerol livre difunde-se para o sangue, sendo utilizado pelo fígado, que possui, ao contrário do tecido adiposo, a gliceroquinase ativa (Hagen, 1961).

A LPL é mais ativa pós-prandialmente quando os AGL das lipoproteínas são captados para serem armazenados (Coppack e cols., 1990) e a atividade diminui quando o fluxo dos AGL favorece a sua saída dos TGs estocados, como é o caso do jejum (Taskinen e Nikilä, 1981)

A vida média dos AGL no plasma é de 2 a 3 minutos e a velocidade de renovação gira em torno de 30% por minuto (Birman e cols., 1957, Laurell, 1957; Fredrickson e Gordon, 1958). Em condições de repouso, os AGL no plasma representam de 2 a 5% do lipídio plasmático total, porém devido à sua rápida taxa de renovação eles devem suprir mais da metade dos substratos oxidativos consumidos pelos tecidos (Hales e cols., 1978). A concentração dos AGL no plasma pode aumentar cerca de cinco vezes em determinadas condições de maior demanda energética, tais como: jejum, exercício físico ou exposição aguda ao frio, tornando-se a principal fonte de energia responsável por

mais de 60% do total de calorias consumidas pelo organismo (Carlson e cols., 1965; Berthold, 1975; Ramenofsky, 1990). Quanto maior a concentração dos AGL no plasma, possivelmente maior será a lipomobilização gerada pelo tecido adiposo.

Fatores hormonais podem agir no TA modulando direta ou indiretamente a hidrólise dos TGs ou a sua reesterificação. Nos mamíferos, os mais importantes hormônios lipolítico e anti-lipolítico agindo agudamente são as catecolaminas e a insulina, respectivamente (Hales e cols., 1978). Evidências fisiológicas fortemente sugerem que as catecolaminas liberadas pela terminação nervosa simpática no TA sejam o principal fator determinante na regulação da lipólise (Arner, 1989; Lafontan e cols., 1983; Pecquery e cols., 1988; Barteness e Bamshad, 1998). Porém, outros hormônios como glucagon (Vaughan, 1961; Vaughan e Steinberg, 1963), glicocorticóides (Shafir e Kerpel, 1964; Linder e Migliorini, 1974), hormônio de crescimento (Fain e cols., 1965; Galton e Bray, 1967; McGorman e cols., 1987) e hormônios tireoideanos (Debons e Swartz, 1961) teriam um efeito adicional na indução da lipólise, complementares à ação das catecolaminas do sistema nervoso simpático, embora mais tardio e/ou menos intensos.

O TA é ricamente inervado por fibras nervosas simpáticas que são importantes no controle da lipólise durante situações fisiológicas que exigem grandes demandas calóricas como, exposição aguda ao frio, jejum prolongado e exercício físico. Então, a atividade simpática aumenta, e fibras simpáticas que inervam o TA liberam de suas terminações nervosas noradrenalina de suma importância para lipólise nestas condições fisiológicas. Por exemplo, em determinados tipos de exercício o nível plasmático dos AGL pode aumentar cerca de 5 vezes (Hosfstedt, 1995), tornando-se a principal fonte de energia responsável por mais de 60 % do total de calorias consumidas pelo organismo (Carlson e cols., 1965).

Muitas evidências afirmam que o sistema nervoso simpático desempenha um importante papel na lipólise. Estudos nos quais houve abolição da atividade simpática por bloqueios de neurônios ganglionares ou de fibras pós-ganglionares (Havel e Golfien, 1965), ou ainda pelo emprego da simpatectomia cirúrgica, demonstraram uma inibição do rápido aumento dos AGL em resposta ao exercício, mudança de postura, exposição ao frio ou estresse fisiológico (Hales e cols., 1978). A noradrenalina originada principalmente de terminações simpáticas existentes na parede vascular do TA branco é o neurotransmissor responsável pela lipólise nessas situações fisiológicas (Bartness e Bamshad, 1998).

A efetividade das catecolaminas estimulando a lipólise depende dos subtipos de receptores adrenérgicos presente no TA. Quatro subtipos de receptores adrenérgicos (adrenoceptores) estão envolvidos no controle da lipólise pelas catecolaminas, esses incluem  $\beta_{1-3}$  e  $\alpha_2$  (Lafontan, 1994; Hofstedt e cols., 1995; Lafontan e Berlan, 1995; Lafontan e cols., 1995). A estimulação dos adrenoceptores  $\beta$  ativa a lipólise, enquanto que a ativação do  $\alpha$ -adrenoceptor inibe esse processo (Arner, 1989; Lafontan e Berlan, 1993; Lafontan e cols., 1995).

Por outro lado, a insulina, nos mamíferos, é a principal fator fisiológico envolvido no declínio da concentração dos AGL plasmático. É, sem dúvida, o hormônio anti-lipolítico mais potente dos mamíferos (Coppack e cols., 1989; Groop e cols., 1989; Groop e cols., 1991; Hagström-Toft e cols., 1991). A ação da enzima LHS diminui já 15 minutos após a injeção de insulina (Coppack e cols., 1994), inibindo a liberação dos AGL para o plasma, e a LPL é estimulada a quebrar os TGs das lipoproteínas circulantes em AGL, aumentando sua reesterificação dentro do TA (Eckel, 1989). Além da insulina, a adenosina presente no TA (Wahrenberg e cols., 1989) e os corpos cetônicos,  $\beta$ -

hidroxibutirato e acetoacetato, aumentados na circulação são inibidores potentes da lipólise (Silverberg e Miles, 1992).

## 2. Controle Periférico do Metabolismo de Glicose em Mamíferos

A Insulina é também o principal hormônio anabólico, inibindo a neoglicogênese e glicogenólise e estimulando a estocagem de glicose no fígado. Além disso, nos tecidos sensíveis à insulina, como o músculo em repouso e o TA, ela estimula a captação, estocagem ou utilização de glicose pelas células. O principal estímulo para a secreção de insulina é a ingestão de alimento, já que esta favorece o aumento do nível de glicose plasmática (Strubbe, 1994).

Sob condições de estresse metabólico, como o gerado após exercício extenuante, há um aumento da atividade adrenérgica, e a liberação de adrenalina é acompanhada pelo aumento da viabilidade de glicose (Christensen e cols., 1975; Garber e cols., 1976). Estudos *in vitro* têm mostrado que a adrenalina pode estimular diretamente a glicogenólise (Sokal e cols., 1964; Cherrington e cols., 1974), embora seus efeitos sejam muito menos potentes que os do glucagon na produção de glicose hepática. Observa-se *in vitro* (Gray e cols., 1980) e *in vivo* (Gerich e cols., 1976; Chidekel e cols., 1977) que esta catecolamina estimula a secreção de glucagon através da ligação com receptores  $\beta$ -adrenérgicos no pâncreas, e a estimulação concomitante do adrenoceptores  $\alpha$  induz, em parte, a inibição na liberação de insulina (Cherrington e cols., 1974). Nestas circunstâncias, uma constante hiperglicemia será mantida pela diminuição na captação de glicose periférica, ocasionado pela supressão da liberação de insulina.

Parece que, em mamíferos, elevações nos níveis de adrenalina são quase sempre seguidas por aumentos paralelos na glicose sangüínea, enquanto que, mudanças na noradrenalina são geralmente acompanhadas por alterações nos níveis dos AGL

plasmático (Scheurink, 1994).

### **3. Controle Periférico da Disponibilidade de Substratos Energéticos em Aves**

Em aves, o controle hormonal do metabolismo energético parece ser muito diferente do encontrado em mamíferos. A insulina é considerada um hormônio sem ação anti-lipolítica e o tecido adiposo é pouco responsivo às catecolaminas, sendo que esta resposta varia de acordo com a idade (Freeman, 1969; Freeman e Manning, 1971), estado nutricional (Freeman e Manning, 1974), condições experimentais (Grande, 1969) e espécie de aves estudadas (Hazelwood, 1973; Pearce, 1977; Hazelwood, 1986).

O glucagon tem se mostrado glicogenolítico e altamente lipolítico em aves (Goodridge e Ball, 1965; Heald e cols., 1965), sendo considerado o principal ativador da lipólise em aves domésticas (Carlson e cols., 1964; Heald e cols., 1965; Braganza e cols., 1973) e pombos (Goodridge, 1973). Somente o glucagon estimula a lipólise em aves numa dose considerada fisiológica (Langslow e Hales, 1969).

A ave é o único animal que a síndrome de deficiência de glucagon é produzida (Hazelwood, 1971). Os animais pancreatectomizados tornam-se altamente hipoglicêmicos e morrem caso o glucagon não seja substituído (Pearce, 1977). Outras ações metabólicas do glucagon incluem o aumento da gliconeogênese e o acúmulo de TG no fígado (Oya e cols., 1971). A deposição de TG hepático é o resultado direto do aumento da captação dos AGL induzido pela elevada concentração destes no plasma (Grande e cols., 1970) e pela reduzida oxidação dos AGL na mitocôndria hepática, principalmente os AGL de cadeia longa (Ballantyne e cols., 1988). Essa resposta, a longo prazo, também difere da dos mamíferos que não apresentam depósitos de gordura quando tratados com glucagon (Ballantyne e cols., 1988).

#### 4. Controle da Disponibilidade de Substratos Energéticos pelo Sistema Nervoso Central (SNC)

Claude Bernard, no século passado, já havia colocado que o SNC estava implicado no controle da homeostase periférica de energia. Evidências apresentadas por esse investigador mostraram que havia áreas centrais que, quando estimuladas, causavam hiperglicemia e outras que estimulavam a captação de glicose pelos tecidos. Semelhante ao que acontece em mamíferos, presume-se que, em aves, a regulação da estocagem, mobilização e utilização dos diversos substratos energéticos ocorra através de fatores hormonais e neurais controlados pelo SNC.

Entre as áreas do SNC, parece que o hipotálamo seria o local mais envolvido com a regulação da disponibilidade de substratos energéticos requeridos conforme a necessidade corporal. Essa área abrange múltiplas funções: integração da ingestão alimentar e hídrica, interferência em formas de comportamento social, atividade neuroendócrina e fisiológica. Vários núcleos hipotalâmicos contribuem para regulação da ingestão de alimentos e também estão envolvidos na regulação dos níveis de glicose e AGL no plasma. Este envolvimento é ainda mais importante quando houver maior demanda de substratos energético, tais como, exposição aguda ao frio, jejum ou exercício extenuante.

Dos núcleos hipotalâmicos, tem-se postulado que o núcleo paraventricular (NPV) é o maior centro integrativo dos sinais metabólicos da periferia (Atrens e Menéndez, 1993), recebendo informações principalmente dos órgãos circunventriculares (Sawchenko e Swanson, 1983; Swanson e Sawchenko, 1983). O NPV mantém uma variedade de conexões direta e indireta com a hipófise anterior e posterior, além de manter conexão direta com ambos os núcleos pré-ganglionares do simpático e

parassimpático (Atrens e col., 1993). Embora o NPV seja considerado o núcleo com mais direta ligação do hipotálamo com o sistema nervoso autônomo, os núcleos dorsomedial (NDM), hipotálamo ventromedial (HVM) e hipotálamo lateral (HL) mantêm seus próprios canais eferentes com o tronco cerebral ou medula espinhal (Steffens e cols., 1988).

Nos mamíferos, o HVM é considerado o centro simpático e o HL o centro parassimpático hipotalâmico (Shimazu, 1981; Shimazu, 1986). A estimulação (elétrica ou química) do HVM aumenta os níveis de glicose no sangue através da inervação neural para o fígado, pâncreas e medula adrenal, aumentando a secreção de adrenalina e glucagon (Xie e Lutt, 1995; Takahashi e cols., 1996). Vários autores consideram o HVM uma das regiões que mais potencialmente afeta o metabolismo periférico da glicose (Takahashi e Shimazu, 1981; Ishikawa e cols., 1982; Vilberg e Keeseey, 1984; Shimazu, 1986; Takahashi e cols., 1992) e da gordura (Inoue e Bray, 1979; Shimazu, 1979).

Além disso, há várias evidências da existência de um centro na área pré-óptica (APO) que pode influenciar na glicemia e na mobilização dos AGL. O controle pela APO da glicemia e lipólise pode ser ativado em situações que requerem rápida mobilização de recursos metabólicos, como exposição ao frio (Hammel, 1968; Coimbra e Migliorini, 1988; Martins e cols., 1991; Santos e cols., 1991) e neurocitoglicopenia (Coimbra e Migliorini, 1983; Coimbra e Migliorini, 1986).

A estimulação química do SNC tem quase sempre sido usada para identificar qual classe de neurônios estaria envolvida com a mobilização dos estoques de energia, esta mobilização pode ser específica para um determinado substrato energético (carboidratos ou lipídios) ou comum a ambos. Trabalhos anteriores reportam que, em mamíferos, a

liberação de acetilcolina dos neurônios colinérgicos centrais acarreta em aumento na concentração de glicose plasmática (Iguchi e cols., 1990; Honmura e cols., 1992; Takahashi e cols., 1993), sem afetar os níveis dos AGL (Barbosa e Migliorini, 1982), enquanto que em aves a administração central de carbacol, agonista colinérgico, aumenta a mobilização dos AGL do TA, sem afetar a glicemia (Paschoalini, 1994; DeMello e cols., 1996).

Na maioria das regiões no SNC, o efeito na acetilcolina é gerado pela interação de uma mistura de receptores nicotínicos e muscarínicos. Em mamíferos, a transmissão colinérgica parece ser predominantemente nicotínica na medula espinhal e muscarínica e nicotínica em níveis corticais e subcorticais do cérebro (Brown e Taylor, 1995).

A distribuição dos neurônios colinérgicos no SNC dentro da classe de vertebrados é muito constante (Wächtler, 1980). Nos vertebrados inferiores a principal atividade colinérgica está localizada no tronco cerebral, onde, provavelmente, estaria relacionado com o centro motor. Com a evolução das espécies, começa a aparecer a atividade colinérgica no bulbo e diencefalo, sendo que o cerebelo tem baixa atividade na maioria das espécies. A maior mudança que ocorre das formas inferiores para as superiores é na região telencefálica. Um maior número de neurônios colinérgicos no telencefalo representa uma fase tardia do desenvolvimento filogenético (Wächtler, 1980).

Devido à grande presença de células e fibras colinérgicas no SNC, indica-se que a acetilcolina é o maior neurotransmissor no cérebro de aves. Os dois tipos de receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos) estariam envolvidos na ação da acetilcolina, liberada sinapticamente (Sorenson e Chiappinelli, 1992).

Naresh e cols., já em 1975, investigando mecanismo colinérgico na termo-regulação central em pombos, apontaram a existência de receptores muscarínicos e



nicotínicos no hipotálamo. Os receptores muscarínicos estariam espalhados pelo hipotálamo, enquanto os receptores nicotínicos agrupavam-se na porção posterior. Sorenson e Chiappinelli, em 1992, encontraram receptores nicotínicos na região lateral hipotalâmica.

No mínimo 5 subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos expressam-se no tecido de mamíferos. Desses, dois foram encontrados no cérebro de aves. (Kohler e cols., 1995). Ball e cols. (1990), investigando a presença de receptores colinérgicos muscarínicos em passarinhos e codornas, observaram que no hipotálamo eram encontrados nas áreas HVM e regiões adjacentes ao NPV. Na APO, mostrou baixos níveis de sítios ligantes comparados com áreas vizinhas (Ball e cols., 1990).

Em 1988, Dietl e cols. disseram que o telencéfalo de pombos foi também rico em receptores colinérgicos muscarínicos, enquanto que o tálamo, hipotálamo e tronco cerebral, estavam presentes em quantidades intermediárias, similarmente ao cérebro de mamíferos. Exceto o hipocampo, onde foi pobremente encontrado e o cerebelo, que apresentou alta densidade de receptores muscarínicos.

Há algum tempo, vêm sendo realizados em nosso laboratório experimentos com o objetivo de investigar a regulação do metabolismo energético e alterações do comportamento alimentar, em pombos, após a injeção central de diversos neurotransmissores.

Em 1990, Paschoalini observou que neurônios adrenérgicos podiam estar envolvidos no controle da regulação da glicose plasmática em pombos. Dando continuidade a esse trabalho, em 1994 foi constatado que o envolvimento dos neurônios adrenérgicos seria mediado à periferia por estimulação do sistema nervoso autônomo, provavelmente, por ativação simpática. Nesse mesmo trabalho, também foi demonstrada

a participação de neurônios colinérgicos e noradrenérgicos na mobilização dos AGL.

Em relação à participação de neurônios noradrenérgicos centrais na lipomobilização, Neves (1998) relatou que esta poderia ser mediada pela ativação da hipófise e liberação de hormônios hipofisários, talvez o hormônio de crescimento, e não pela ativação do sistema nervoso autônomo. Porém, a participação de neurônios colinérgicos neste processo se daria por estimulação autonômica (DeMello e cols., 1996), onde a lipólise induzida pelo carbacol poderia ser mediada pela supressão do tônus parassimpático com conseqüente predomínio ou aumento da atividade simpática. Essa ativação simpática, elevaria os níveis de catecolaminas circulantes que poderiam interagir com receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos nas células das ilhotas pancreáticas, estimulando a liberação de glucagon e/ou insulina. O glucagon e a insulina são considerados hormônios lipolíticos em aves (Carlson e cols., 1964; Braganza e cols., 1973).

Dando continuidade a esta linha de investigação, o presente trabalho tem como objetivos:

1. Observar o efeito na concentração dos AGL e glicose plasmática após administração de carbacol no ventrículo lateral de pombos;
2. Identificar qual (is) receptor (es) colinérgico (s) central (is) estaria (m) envolvido (s) com a mobilização de substratos energéticos após injeção *i.c.v.* de carbacol ;
3. Avaliar o efeito da administração *i.c.v.* de neostigmina sobre as concentrações plasmática de glicose e AGL em pombos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. ANIMAIS

Foram utilizados pombos (*Columba Livia*) de ambos os sexos, com peso corporal variando entre 320-360 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e alimento *ad libitum*, em uma sala com temperatura controlada 23°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12 h (luz a partir das 7:00 h).

## 2. IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA INTRACEREBROVENTRICULAR

Para implantação da cânula no ventrículo lateral, os animais foram anestesiados com uma solução de Equitesin (0,15 ml/100 g) por via intraperitoneal (*i.p.*), e adaptados ao aparelho estereotáxico. A cabeça foi fixada por barras posicionadas nos condutos auditivos, sendo estes expostos após aparadas as penas circundantes, e no bico, com distância entre os dois pontos ajustadas em 16 mm e formando um ângulo de 45°. Posteriormente, foi realizada assepsia com álcool iodado seguida por uma incisão longitudinal no escalpo com auxílio de um bisturi cirúrgico, expondo, dessa forma, a calota craniana. Para perfuração da mesma foi utilizada uma broca odontológica. Por esse orifício, foi introduzida uma cânula-guia feita de uma agulha hipodérmica, com 0,7 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento, posicionada no ventrículo lateral, de acordo com as coordenadas descritas por Karten e Hodos (1967): plano frontal – 6,0 mm anterior à linha interaural; plano sagital – 1,0 mm lateral à sutura sagital e plano horizontal – 6,0 mm abaixo da dura máter. O contato da cânula-guia com o ventrículo lateral foi indicado pela queda de pressão registrada em manômetro contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%). Em seguida, a cânula-guia foi envolvida com fibrinol. Após a colocação dos parafusos de joalheiro ao redor da cânula-guia, a calota craniana foi

coberta por camadas de acrílico autopolimerizável, formando um conjunto sólido capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a gaiola e permitir as manipulações necessárias para realizar as injeções por via *i.c.v.*. Em cada cânula-guia foi ajustado um mandril para evitar sua obstrução. A injeção *i.c.v.* das diferentes substâncias foi realizada em animais despertos, uma semana após a implantação da cânula-guia no ventrículo lateral.

### 3. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR

A injeção *i.c.v.* foi realizada por meio de uma agulha injetora (Mizzy-Slide-Park), com 0,3 mm de diâmetro, que foi introduzida na cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa Hamilton (10  $\mu$ ). Seu tamanho excedeu ao da cânula-guia em 1,0 mm. Com o objetivo de minimizar variações na pressão *i.c.v.*, o volume administrado foi sempre de 1  $\mu$ l, injetado durante 1 min.

### 4. IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA NA ARTÉRIA BRAQUIAL

Para a coleta de sangue, um tubo de polietileno (PE 50) foi introduzido nas artérias braquiais, dois dias antes do experimento e uma semana após a implantação da cânula-guia no ventrículo lateral. Para a implantação de cânulas nas artérias, os animais foram anestesiados com solução de Equitesin (0,15 ml/100 g) por via *i.p.*, e fixados numa mesa cirúrgica em decúbito dorsal, com as asas abertas. Em seguida, foram retiradas suas penas e, logo após, realizada assepsia com álcool no local antes da incisão na epiderme para o isolamento arterial. Após esse procedimento, foi verificada a correta localização

da cânula na artéria braquial, e o tubo de polietileno então foi preenchido com solução de polivinilpirrolidone (PVP) para evitar a coagulação sanguínea. As cânulas foram fixadas à artéria através de um fio de algodão, o mesmo foi utilizado para sutura da epiderme após o término da cirurgia.

## 5. COLETA DE AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Para a avaliação das modificações nas concentrações plasmáticas dos AGL e glicose, amostras de aproximadamente 0,6 ml de sangue foram retiradas imediatamente antes (tempo 0), 15, 30, 45, 60 min após a injeção *i.c.v.* de carbacol, neostigmina ou salina. As amostras sanguíneas coletadas foram colocadas em tubos heparinizados e centrifugadas a 2000 rotações por minuto durante 10 min. Após a separação, os plasmas foram colocados em tubos e armazenados em freezer para posteriores dosagens plasmáticas dos AGL e glicose.

## 6. SOLUÇÕES ADMINISTRADAS POR VIA INTRACEREBROVENTRICULAR.

- Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,9%) – veículo controle
- Carbacol – 2,7 nmol
- Neostigmina - 2,7 nmol

Foram administrados 1  $\mu$ l dessas soluções imediatamente após a primeira coleta de sangue.

- Escopolamina – 2,7 nmol e 5,4 nmol (antagonista de receptores muscarínicos)
- Metil-escopolamina – 2,7 nmol e 5,4 nmol (antagonista de receptores muscarínicos)
- Mecamilamina – 2,7 nmol e 5,4 nmol (antagonista de receptores nicotínicos)

Foram administrados 1  $\mu$ l dessas soluções 15 min antes da injeção *i.c.v.* de carbacol ou cloreto de sódio.

## 7. DETERMINAÇÃO DO AGL PLASMÁTICO

A concentração plasmática dos AGL foi determinada de acordo com o método descrito por Dole e Meinertz (1960), adaptado por Santoro (1967) para pequenos volumes de plasma.

## 8. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PLASMÁTICA

A concentração de glicose plasmática foi determinada em 20  $\mu$ l de plasma, utilizando-se o método de glicose oxidase. O conjunto de reagentes necessários para a realização das reações químicas foi adquirido no comércio local e proveniente da Diagnóstica Analisa, fabricado pela Labtest.

## 9. REAGENTES

Os solventes utilizados foram de pureza analítica e adquiridos no comércio local. A escopolamina, metil-escopolamina, mecamilamina e neostigmina foram oriundas da

Research Biochemicals International Natick, MA, USA. O carbacol foi proveniente da Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA

## 10. HISTOLOGIA

Ao término do experimento, os animais foram sacrificados com injeção de solução de Equitesin (2,5 ml via *i.p.*). O posicionamento correto da cânula no ventrículo lateral foi verificado após a injeção de 1  $\mu$ l de azul de Evans no local, realizada pouco antes da injeção letal e posterior observação, em microscópio óptico, dos cortes histológicos sem coloração. Os animais que possuísem a cânula posicionada fora do ventrículo lateral foram excluídos.

## 11. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos antes e após cada tratamento, em todos os intervalos de tempo estudados, foram analisados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância de fator único. As diferenças obtidas entre o valor experimental e o basal, nas diferentes condições experimentais, foram analisadas através de uma análise de variância de dois fatores (tratamento e tempo). As comparações entre os tratamentos e seu respectivo tempo de coleta foram feitas pelo teste de Duncan. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .



**RESULTADOS**

## 1. Efeito da administração *i.c.v.* de carbacol ou salina após pré-tratamento *i.c.v.* com salina sobre a concentração plasmática dos AGL e de glicose.

### 1.1. AGL

A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significantes na concentração plasmática dos AGL, quando se comparou os dados obtidos após a injeção *i.c.v.* de salina ou carbacol, precedida pela administração *i.c.v.* de salina [ $F(1,64) = 107,4$  ;  $p = 10^{-6}$  ]. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos [  $F(3,64) = 0,77$  ;  $p = 0,51$  ], e nem interação entre tratamento e tempo [  $F(3,64) = 1,18$  ;  $p = 0,32$  ].

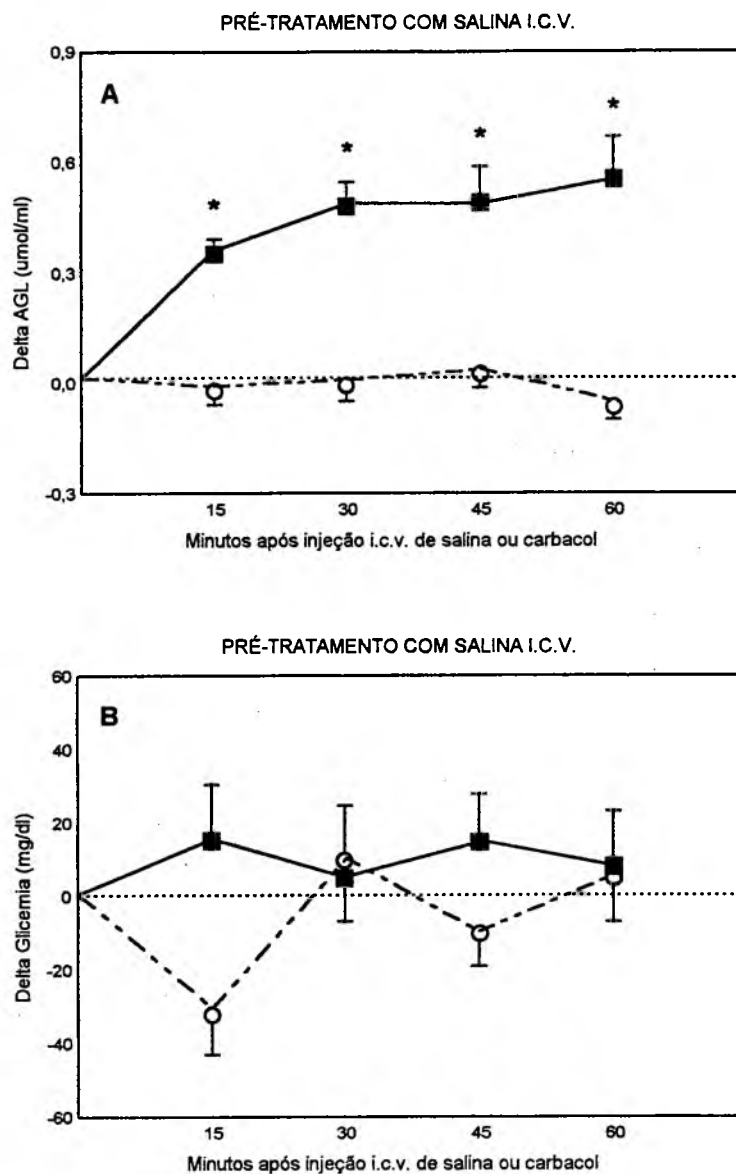
A injeção *i.c.v.* de carbacol provocou um aumento na concentração plasmática dos AGL durante todo o período experimental ( Fig. 1A). O acréscimo da quantidade dos AGL no sangue foi detectado já aos 15 min de experimento (45% acima do basal), e elevou-se de forma gradativa até atingir seu valor máximo aos 60 min (72% acima do valor basal). Por outro lado, a injeção *i.c.v.* de salina, após pré-tratamento com salina por via *i.c.v.*, não alterou a concentração plasmática dos AGL, em nenhum momento do período experimental.

Os resultados indicam que, o carbacol, quando administrado por via *i.c.v.*, promove aumento nos níveis dos AGL no sangue.

### 1.2. GLICOSE

O tratamento com salina ou carbacol por via *i.c.v.*, precedido pela injeção *i.c.v.* de salina, não provocou alterações significativas na concentração de glicose no plasma (Fig.

1B). A ANOVA de duas vias mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(1,64) = 3,73$ ;  $p = 0,06$  ], entre os tempos [  $F(3,64) = 0,60$  ;  $p = 0,61$  ], bem como, interação entre os dois fatores abordados (tempo e tratamento) [  $F(3,64) = 1,61$  ;  $p = 0,19$  ].



**Fig. 1 A**- Efeito da administração i.c.v. de carbacol (2,7 nmol, basal=  $0,77 \pm 0,13$  umol/ml) ou salina (1 ul, basal=  $0,92 \pm 0,05$  umol/ml) sobre a concentração plasmática dos AGL em pombos saciados. Carbacol ■, (n=9) ou salina ○, (n=9) foram administrados 15 min após pré-tratamento i.c.v. com salina (1 ul). **Fig. 1 B** - Efeito da administração i.c.v. de carbacol (2,7 nmol, basal =  $309 \pm 16$  mg/dl) ou salina (1 ul, basal=  $295 \pm 12$  mg/dl) sobre a concentração plasmática de glicose em pombos saciados. Carbacol ■, (n=9) ou salina ○, (n=9) foram administrados 15 min após pré-tratamento i.c.v. com salina (1 ul). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significante estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan).

## 2. Efeito da administração *i.c.v.* de carbacol após pré-tratamento *i.c.v.* com escopolamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose.

### 2.1. AGL

A análise dos dados estatísticos obtidos após o pré-tratamento por via *i.c.v.* com escopolamina (2,7 e 5,4 nmol), seguida pela administração *i.c.v.* de carbacol, mostrou diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática dos AGL entre os tratamentos [  $F(3,128) = 44,67$  ;  $p = 10^{-6}$  ] e entre os tempos [  $F(3,128) = 3,38$  ;  $p = 0,02$  ]. Contudo, não se observou interação entre os dois fatores abordados [  $F(9,128) = 0,73$  ;  $p = 0,67$  ].

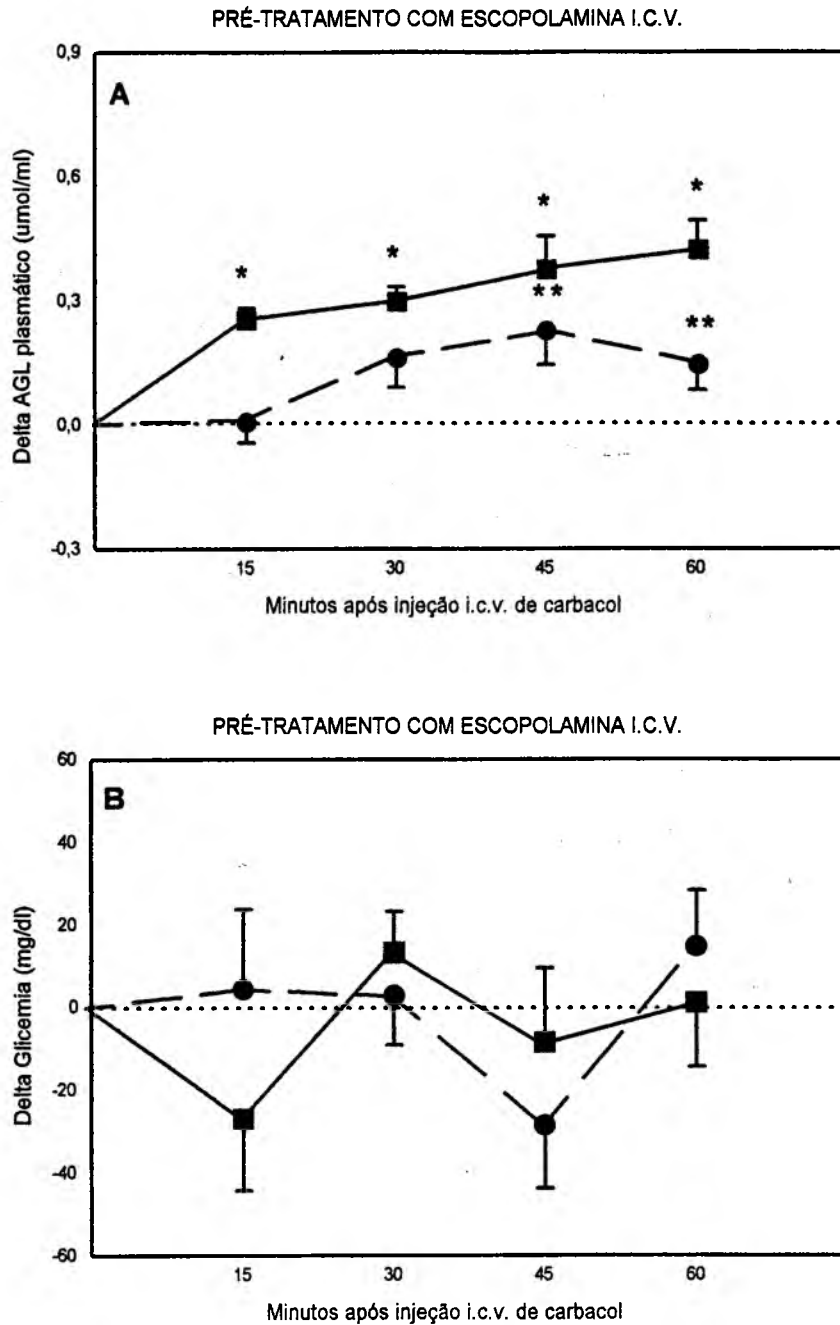
O pré-tratamento com escopolamina na dose menor (2,7 nmol), precedido pela injeção *i.c.v.* de carbacol, provocou um bloqueio total da lipólise aos 15 e 30 min, quando foi realizada a comparação com o grupo controle (salina *i.c.v.* + salina *i.c.v.*) (ver Fig. 1 A). Por outro lado, aos 45 e 60 min do período experimental, houve aumento nos níveis dos AGL plasmático estatisticamente diferente do controle. No entanto, essa elevação foi de menor intensidade àquela verificada após injeção *i.c.v.* de carbacol precedido pela injeção *i.c.v.* de salina, no mesmo intervalo de tempo. Parece que, a injeção prévia do antagonista muscarínico (escopolamina), na dose de 2,7 nmol, ocasiona uma redução na intensidade da lipomobilização induzida pelo carbacol, durante todo o período de observação.

O pré-tratamento com escopolamina na dose de 5,4 nmol, seguido pela administração *i.c.v.* com carbacol, originou um acréscimo na concentração plasmática dos AGL semelhante àquela obtido no grupo tratado com injeção de salina (*i.c.v.*) antes da injeção *i.c.v.* de carbacol. O início, a intensidade e a duração da resposta lipolítica

foram semelhantes entre os dois grupos (ver Fig. 1 A). Esses resultados mostram que o pré-tratamento com escopolamina na dose 5,4 nmol não bloqueou o aumento dos AGL plasmático provocado pelo carbacol.

## 2.2. GLICOSE

A glicemia manteve-se inalterada após tratamento com ambas as doses de escopolamina seguido pela administração de carbacol (ver Fig. 2 B). Segundo ANOVA de duas vias, não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [(3,128) = 1,28 ; p =0,28], entre os tempos [(3,128) = 1,81 ; p =0,14] ou interação entre os dois fatores [(9,128) = 1,06 ; p =0,39].



**Fig. 2 A-** Efeito do tratamento prévio i.c.v. com escopolamina ●, (2,7 nmol, basal =  $0,86 \pm 0,05$  umol/ml), (n=9) ou escopolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $0,86 \pm 0,06$  umol/ml), (n=9) sobre o aumento dos AGL no plasma induzido pela injeção i.c.v. de carbacol (2,7 nmol). **Fig. 2 B** – Efeito do tratamento prévio i.c.v. com escopolamina ●, (2,7 nmol, basal =  $293 \pm 14$  mg/dl), (n=9) ou escopolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $305 \pm 15$  mg/dl), (n=9) sobre os níveis de glicose no plasma após injeção i.c.v. de carbacol (2,7 nmol). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significantes estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan). (\*\*) diferente do controle e do carbacol no seu respectivo tempo.

### 3. Efeito da administração *i.c.v.* de salina após pré-tratamento *i.c.v.* com escopolamina ou salina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose.

#### 3.1. AGL

A análise estatística dos dados obtidos após as injeções *i.c.v.* de salina, precedida pelas injeções *i.c.v.* de salina ou escopolamina, indica que houve diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática dos AGL entre os tratamentos [  $F(2, 96) = 65,21$  ;  $p = 10^{-6}$ ]. Porém, não ocorreu diferenças significantes entre os tempos [  $F(3, 96) = 0,99$  ;  $p = 0,39$ ] e nem interação entre as duas variáveis (tratamento e tempo) [  $F(6, 96) = 0,59$ ;  $p = 0,73$ ].

O pré-tratamento com escopolamina na concentração menor (2,7 nmol) ou com salina, seguido pela injeção *i.c.v.* de salina, não alterou os níveis dos AGL no plasma durante todo o período experimental.

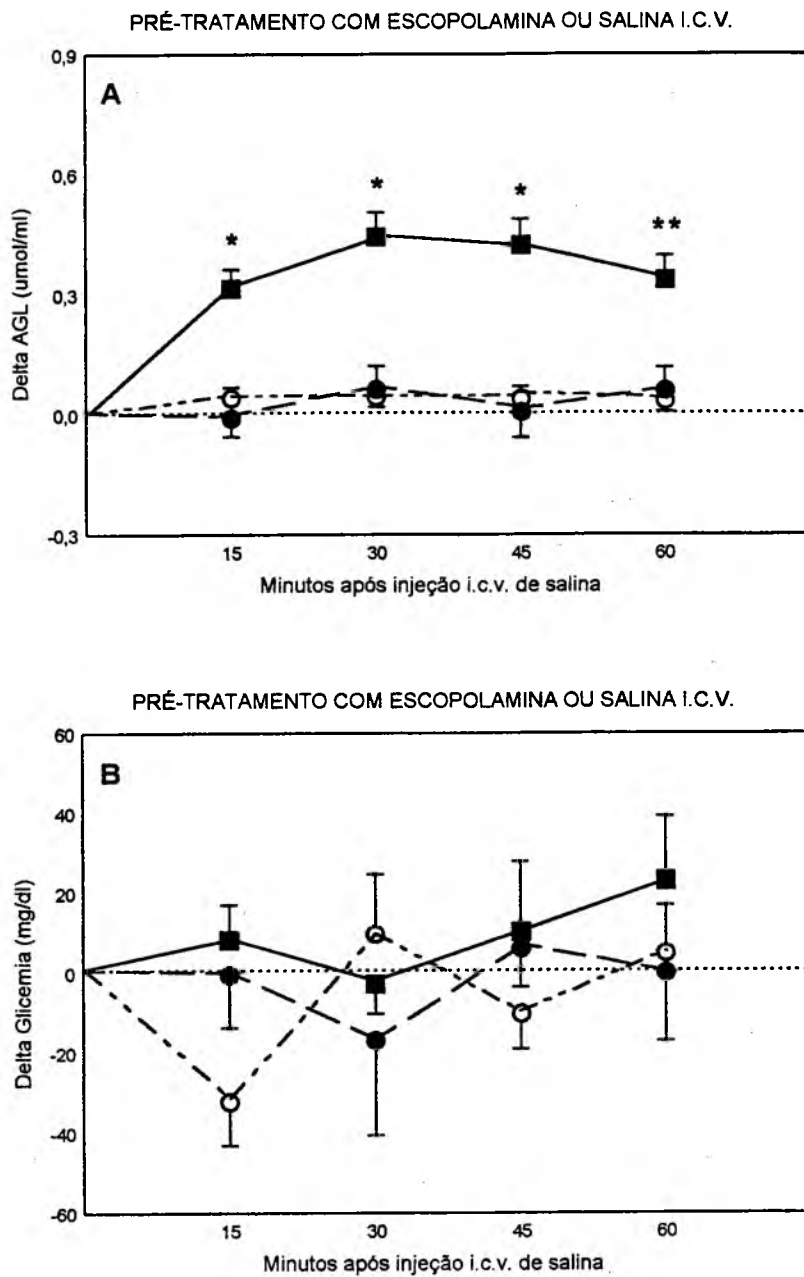
Por outro lado, o pré-tratamento com escopolamina na dose 5,4 nmol, seguido pela injeção de salina, em pombos despertos, elevou a concentração plasmática dos AGL já aos 15 min (28% acima do valor basal). O valor máximo deste aumento foi verificado aos 45 min do período experimental (39% acima do valor basal). A resposta lipolítica, observada neste grupo, não foi diferente estatisticamente daquela observada no grupo tratado com salina (*i.c.v.*) + carbacol (*i.c.v.*) (ver Fig. 1 A), exceto aos 60 min, quando o pré-tratamento com escopolamina seguido pela injeção de salina provocou uma elevação de menor intensidade na concentração dos AGL. Os dados sugerem que, o pré-tratamento com o escopolamina (antagonista de receptores muscarínicos), na dose maior,



promove o aumento dos AGL plasmático, independente da administração *i.c.v.* de carbacol

### 3.2. GLICOSE

A concentração de glicose no plasma manteve-se inalterada após o tratamento com ambas as doses de escopolamina, seguido pela administração de salina (ver Fig. 3 B). Não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(2,96) = 0,88$  ;  $p = 0,41$  ], entre os tempos [  $F(3,96) = 0,80$  ;  $p = 0,49$  ], e nem interação entre os dois fatores abordados [  $F(6,96) = 0,64$  ;  $p = 0,69$  ].



**Fig. 3 A**- Efeito do tratamento prévio i.c.v. com salina O, (1 ul, basal =  $0,85 \pm 0,03$  umol/ml), (n=9), escopolamina ●, (2,7 nmol, basal =  $0,88 \pm 0,04$  umol/ml), (n=9) ou escopolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $0,89 \pm 0,04$  umol/ml), (n=9) sobre a concentração plasmática dos AGL após injeção i.c.v. de salina (1 ul). **Fig. 3 B** - Efeito do tratamento prévio i.c.v. com salina O, (1 ul, basal =  $295 \pm 12$  mg/dl) (n=9), escopolamina ●, (2,7 nmol, basal =  $281 \pm 27$  mg/dl), (n=9) ou escopolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $277 \pm 6$  mg/dl), (n=9) sobre os níveis de glicose no plasma após injeção i.c.v. de salina (1 ul). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significante estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan). (\*\*) diferente do controle e do carbachol no seu respectivo tempo.

#### 4. Efeito da administração *i.c.v.* de carbacol após pré-tratamento *i.c.v.* com metil-escopolamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose.

##### 4.1. AGL

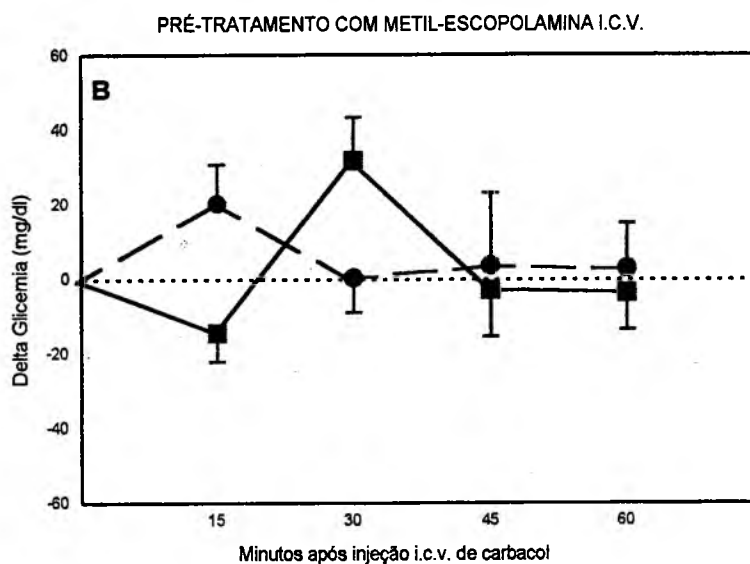
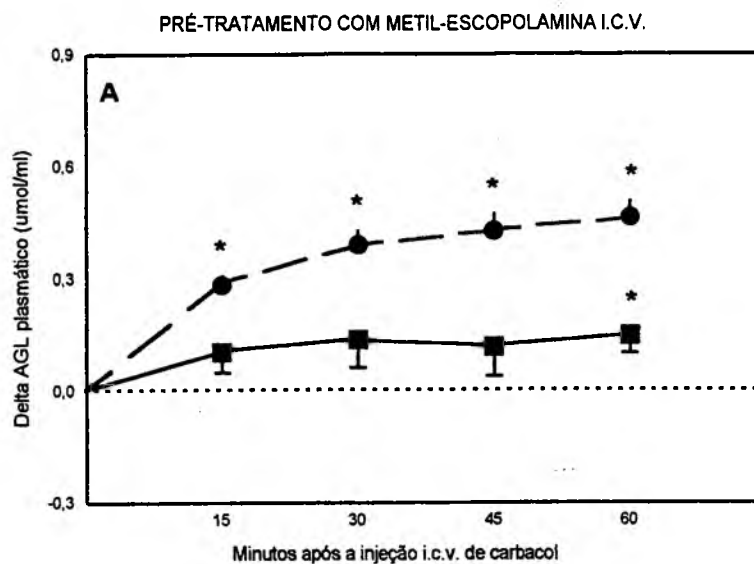
A análise dos dados estatísticos obtidos após o pré-tratamento por via *i.c.v.* com metil-escopolamina (2,7 e 5,4 nmol), seguida pela administração *i.c.v.* de carbacol, mostrou diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática dos AGL entre os tratamentos [  $F(3,128) = 52,71$  ;  $p = 10^{-6}$ ]. No entanto, não se observou diferenças significativas entre os diferentes tempos [  $F(3,128) = 1,94$  ;  $p = 0,12$ ] e nem interação entre as duas variáveis [  $F(9,128) = 0,64$ ;  $p = 0,75$ ].

O pré-tratamento com a menor dose de metil-escopolamina (2,7 nmol) não modificou a resposta lipolítica induzida pelo carbacol, durante o experimento. Essa resposta foi semelhante em intensidade, início e duração àquela observada no grupo tratado com carbacol por via *i.c.v.*, precedido de salina (ver Fig. 1 A).

Ainda que não tenha ocorrido, durante todo o período experimental, nenhuma alteração na concentração plasmática dos AGL diferente do valor basal após pré-tratamento com a dose maior (5,4nmol) de metil-escopolamina, seguido por carbacol (*i.c.v.*), aos 60 min do experimento, pode-se observar uma discreta elevação nos níveis plasmático dos AGL. Este aumento foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle (salina *i.c.v.* + salina *i.c.v.*). Parece que o tratamento prévio com metil-escopolamina (antagonista muscarínico) por via *i.c.v.*, na dose mais elevada, gerou um bloqueio quase completo na resposta lipolítica induzida pelo carbacol.

## 4.2. GLICOSE

O pré-tratamento com metil-escopolamina (2,7 e 5,4 nmol) por via *i.c.v.*, seguido pela injeção *i.c.v.* de carbacol, não provocou mudanças significativas na glicemia (ver Fig. 1B). A ANOVA de duas vias mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(3,128) = 1,48$  ;  $p = 0,22$ ], entre os tempos [  $F(3,128) = 0,93$ ;  $p = 0,42$ ] e interação entre os dois fatores abordados (tratamento e tempo) [  $F(9,128) = 1,49$  ;  $p = 0,15$ ].



**Fig. 4 A**- Efeito do tratamento prévio i.c.v. com metil-escolamina ●, (2,7 nmol, basal =  $0,89 \pm 0,06$  umol/ml), (n=9) ou metil-escolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $0,90 \pm 0,02$  umol/ml), (n=9) sobre o aumento dos AGL no plasma induzido pela injeção i.c.v. de carbacol (2,7 nmol). **Fig. 4 B** - Efeito do tratamento prévio i.c.v. com metil-escolamina ●, (2,7 nmol, basal =  $313 \pm 16$  mg/dl), (n=9) ou metil-escolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $312 \pm 6$  mg/dl), (n=9) sobre os níveis de glicose no plasma após injeção i.c.v. de carbacol (2,7 nmol). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significante estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan).

## 5. Efeito da administração *i.c.v.* de salina após pré-tratamento *i.c.v.* com metil-escopolamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose.

### 5.1. AGL

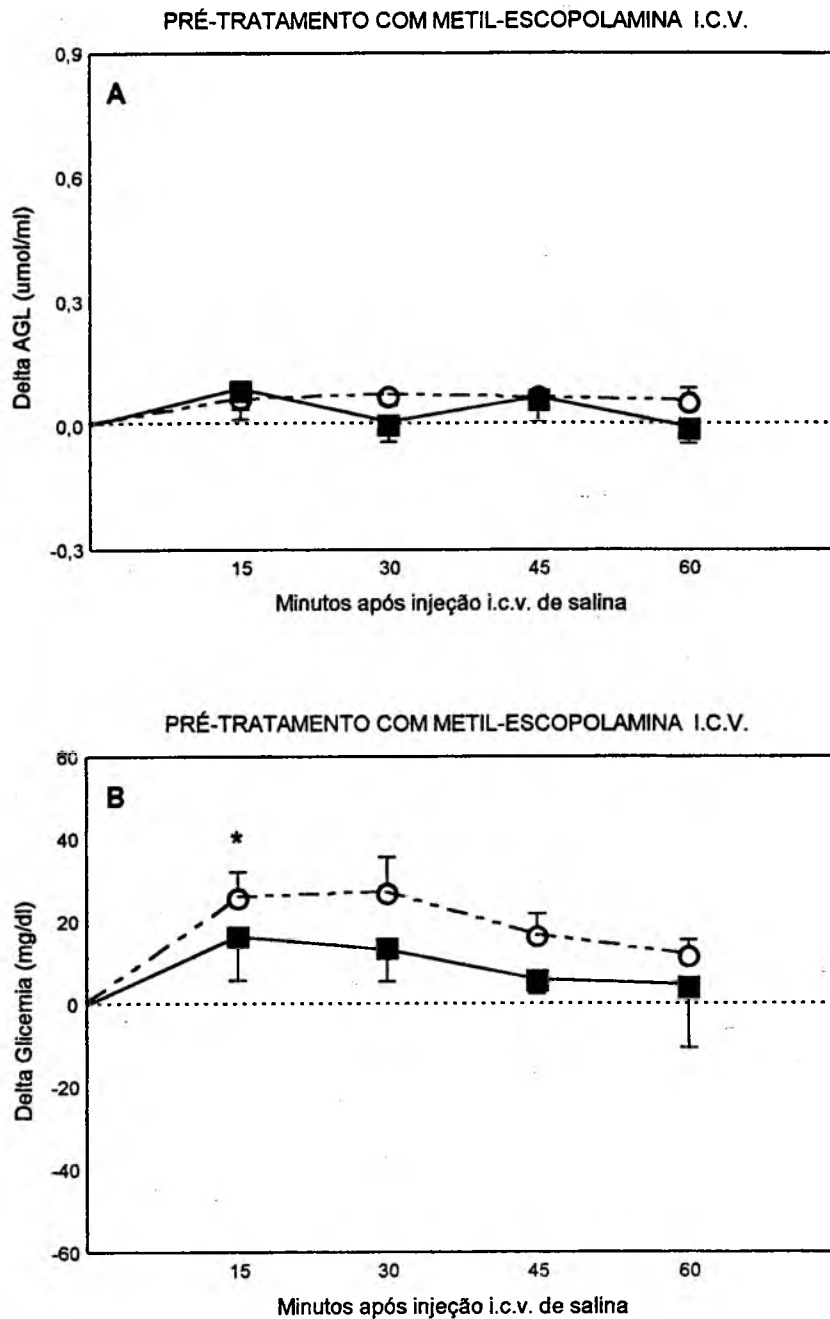
A análise estatística dos dados obtidos após as injeções *i.c.v.* de salina, precedidas pelas injeções *i.c.v.* de metil-escopolamina, nas doses 2,7 e 5,4 nmol, mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática dos AGL entre os tratamentos [  $F(2,96) = 1,16$  ;  $p = 0,31$  ], entre os tempos [  $F(3,96) = 0,91$  ;  $p = 0,43$  ] ou interação entre as duas variáveis abordadas (tratamento e tempo) [  $F(6,96) = 0,76$ ;  $p = 0,59$  ].

Pode-se observar que, durante todo o experimento, a concentração dos AGL no plasma manteve-se inalterada nos grupos previamente tratados com ambas as doses de metil-escopolamina, seguido pela injeção *i.c.v.* de salina ( Fig. 5 A). Em nenhum momento os valores diferiram daqueles verificados no grupo controle ( ver Fig. 3 A).

### 5.2. GLICOSE

Embora, aos 15min do experimento, a administração *i.c.v.* de salina, após pré-tratamento com metil-escopolamina por via *i.c.v.* ( 2,7 nmol ), tenha provocado um ligeiro aumento na glicemia, o pré-tratamento com metil-escopolamina na dose maior (5,4 nmol), não causou mudanças, estatisticamente significantes, na concentração plasmática de glicose durante todo o período experimental (ver Fig. 5 B). A ANOVA de duas vias mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes na concentração

plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(2,96) = 1,79$ ;  $p = 0,17$ ], entre os tempos [  $F(3,96) = 0,49$  ;  $p = 0,68$ ] e nem interação entre os dois fatores abordados [  $F(6,96) = 0,86$  ;  $p = 0,52$ ].



**Fig. 5A-** Efeito do tratamento prévio i.c.v. com metil-escopolamina O, (2,7 nmol, basal =  $0,92 \pm 0,04$  umol/ml), (n=9) ou metil-escopolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $0,95 \pm 0,03$  umol/ml), (n=9) sobre a concentração plasmática dos AGL após injeção i.c.v. de salina (1 ul). **Fig. 5 B** - Efeito do tratamento prévio i.c.v. com metil-escopolamina O, (2,7 nmol, basal =  $289 \pm 16$  mg/dl), (n=9) ou metil-escopolamina ■, (5,4 nmol, basal =  $298 \pm 11$  mg/dl), (n=9) sobre os níveis de glicose no plasma após injeção i.c.v. de salina (1 ul). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significante estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan).



## 6. Efeito da administração *i.c.v.* de carbacol após pré-tratamento *i.c.v.* com mecamilamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose.

### 6.1. AGL

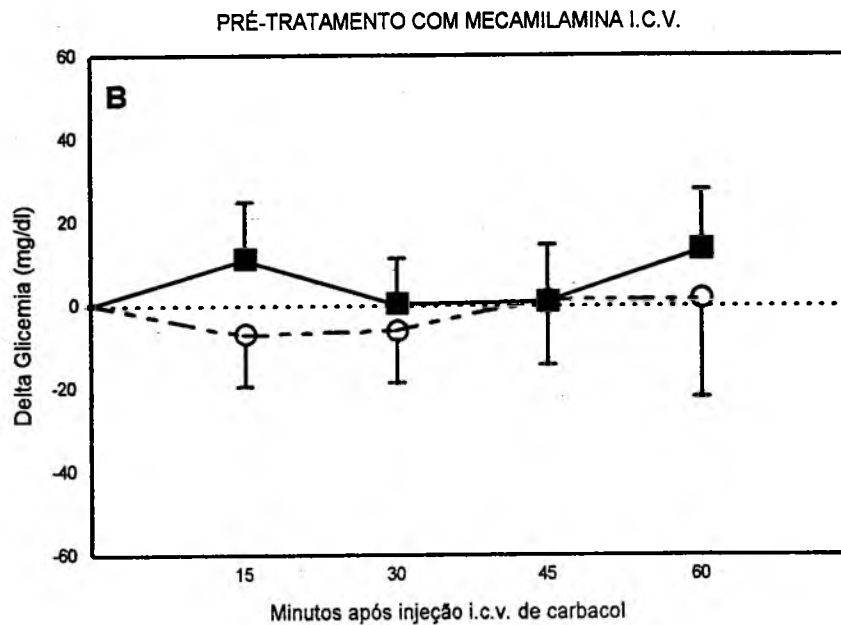
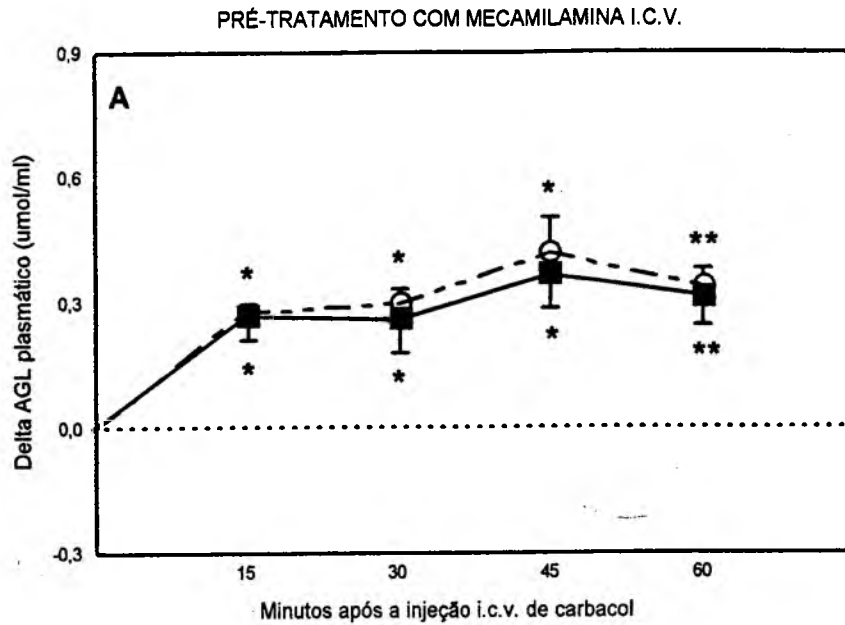
A análise estatística dos dados obtidos após as injeções *i.c.v.* de carbacol, precedidas pelas injeções *i.c.v.* de mecamilamina (2,7 e 5,4 nmol), demonstra haver diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática dos AGL entre os tratamentos [  $F(3,128) = 41,16$  ;  $p = 10^{-6}$ ]. No entanto, não houve diferença significativa entre os tempos [  $F(3,128) = 1,95$  ;  $p = 0,12$ ], nem interação entre as duas variáveis (tratamento e tempo) [  $F(9,128) = 0,57$ ;  $p = 0,81$ ].

O pré-tratamento com ambas as doses de mecamilamina não alterou, essencialmente, a resposta lipolítica induzida pelo carbacol. Essa resposta foi semelhante em início, intensidade e duração àquela obtida após a injeção *i.c.v.* de carbacol, precedida pela administração de salina ( ver Fig. 1 A). Contudo, aos 60 min do período experimental, houve uma pequena queda dos AGL nos grupos previamente tratados com mecamilamina, quando comparados com os valores obtidos no mesmo intervalo de tempo ao grupo tratado com carbacol, precedido por salina.

Parece que, o antagonista nicotínico mecamilamina, após administração por via *i.c.v.*, não exerce um bloqueio no aumento dos AGL plasmático provocado pela injeção central de carbacol.

## 6.2. GLICOSE

A glicemia manteve-se inalterada após tratamento com ambas as doses de mecamilamina seguido pela administração de carbacol *i.c.v.* ( ver Fig. 2 B). Segundo ANOVA de duas vias, não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(3,128) = 1,34$  ;  $p = 0,26$ ], entre os tempos [  $F(3,128) = 0,34$  ;  $p = 0,79$ ], e nem interação entre as duas variáveis [  $F(9,128) = 0,63$  ;  $p = 0,76$ ].



**Fig. 6 A**- Efeito do tratamento prévio i.c.v. com mecamilamina ○, (2,7 nmol, basal =  $0,84 \pm 0,06$  umol/ml), (n=9) ou mecamilamina ■, (5,4 nmol, basal =  $0,88 \pm 0,06$  umol/ml), (n=9) sobre o aumento dos AGL no plasma induzido pela injeção i.c.v. de carbacol (2,7 nmol). **Fig. 6 B** - Efeito do tratamento prévio i.c.v. com mecamilamina ○, (2,7 nmol, basal =  $329 \pm 12$  mg/dl), (n=9) ou mecamilamina ■, (5,4 nmol, basal =  $293 \pm 05$  mg/dl), (n=9) sobre os níveis de glicose no plasma após injeção i.c.v. de carbacol (2,7 nmol). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significante estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan). (\*\*) diferente do controle e do carbacol no seu respectivo tempo.

## 7. Efeito da administração *i.c.v.* de salina após pré-tratamento *i.c.v.* com salina ou mecamilamina sobre a concentração plasmática dos AGL e glicose.

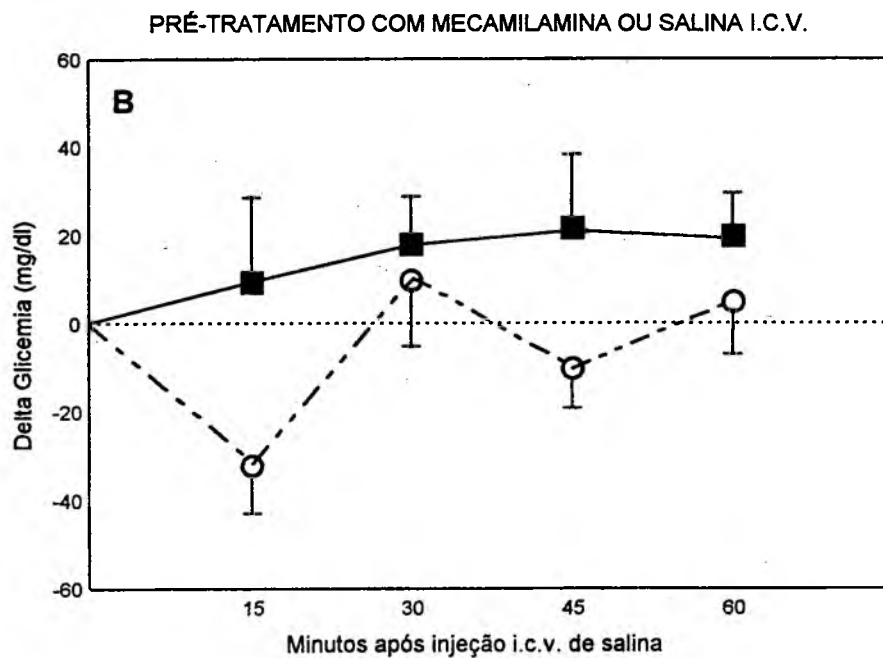
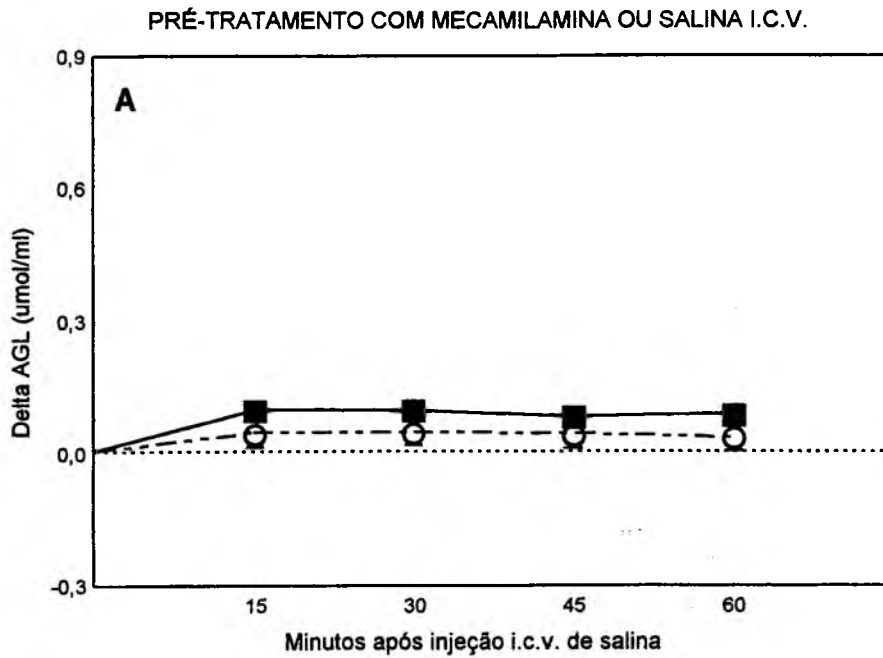
### 7.1. AGL

A análise estatística dos dados obtidos após a injeção *i.c.v.* de salina, precedida pela injeção *i.c.v.* de mecamilamina (5,4 nmol) ou salina, mostrou diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática dos AGL entre os tratamentos [  $F(1,64) = 9,27$ ;  $p = 3 \times 10^{-3}$  ], embora o teste post-hoc não tenha apontado diferenças em nenhum dos intervalos de tempo avaliados. Não houve diferenças entre os tempos [  $F(3,64) = 0,12$  ;  $p = 0,94$  ] e nem interação entre as duas variáveis [  $F(3,64) = 0,03$ ;  $p = 0,99$  ].

A administração *i.c.v.* de mecamilamina na dose 5,4 nmol, seguida da injeção *i.c.v.* de salina, não alterou a concentração plasmática dos AGL durante todo o período experimental ( Fig. 7 A).

### 7.2. GLICOSE

A Fig. 7 B demonstra o efeito da injeção *i.c.v.* de mecamilamina (5,4 nmol), seguida da injeção de salina, sobre a concentração plasmática de glicose. Nesta figura, verifica-se que a administração *i.c.v.* de mecamilamina não modificou os níveis glicêmicos. De acordo com a análise estatística, não houve diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(1,64) = 1,84$  ;  $p = 0,17$  ], entre os tempos [  $F(3,64) = 1,15$ ;  $p = 0,33$  ] ou interação entre as duas variáveis [  $F(3,64) = 0,29$  ;  $p = 0,82$  ].



**Fig. 7 A**- Efeito do tratamento prévio i.c.v. com salina O, (1 ul, basal =  $0,85 \pm 0,03$  umol/ml), (n=9) ou mecamilamina ■, (5,4 nmol, basal =  $0,87 \pm 0,06$  umol/ml), (n=9) sobre a concentração plasmática do AGL após injeção i.c.v. de salina (1 ul). **Fig. 7 B** - Efeito do tratamento prévio i.c.v. com salina O, (1 ul, basal =  $295 \pm 12$  mg/dl) (n=9) ou mecamilamina ■, (5,4 nmol, basal =  $277 \pm 6$  mg/dl), (n=9) sobre os níveis de glicose no plasma após injeção i.c.v. de salina (1 ul). Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal.

## 8. Efeito da administração *i.c.v.* de neostigmina ou salina sobre a concentração plasmática dos agl e de glicose.

### 8.1. AGL

A ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes na concentração plasmática dos AGL em relação aos tratamentos (salina e neostigmina) [  $F(1,64) = 0.80$  ;  $p = 0,37$ ] e entre os tempos [  $F(3,64) = 0.02$  ;  $p = 0,99$ ]. Não houve, também, interação significativa entre os dois fatores estudados [  $F(3,64) = 0.15$  ;  $p = 0,92$ ].

As alterações na concentração dos AGL no plasma, observadas após tratamento com neostigmina, não diferiram daquelas obtidos após injeção *i.c.v* de salina, em seus tempos respectivos ou mesmo dos valores basais (Fig. 8 A). Parece que a administração central de neostigmina não interfere nos valores plasmáticos dos AGL, em pombos saciados.

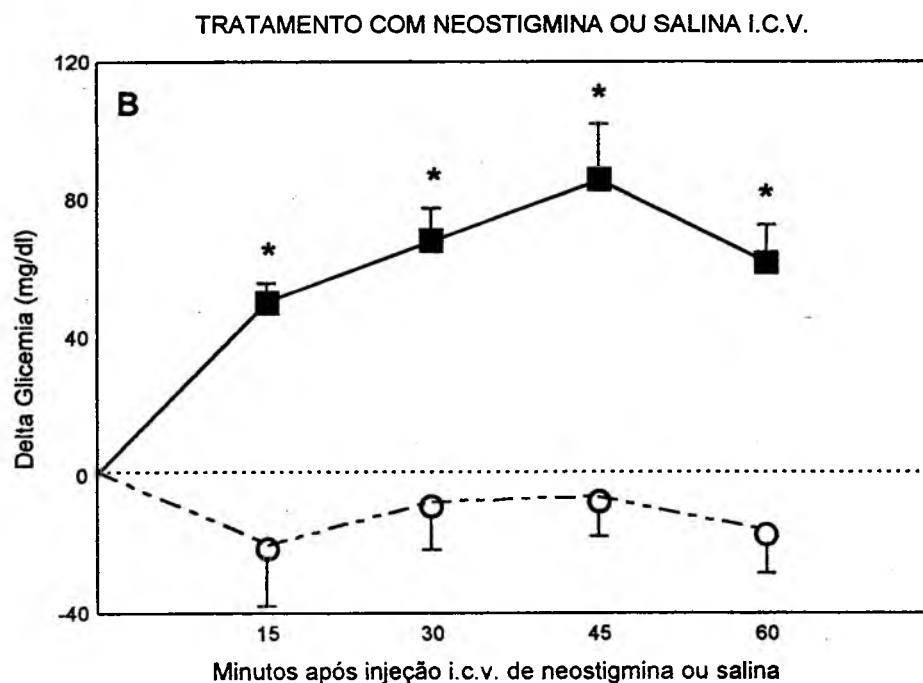
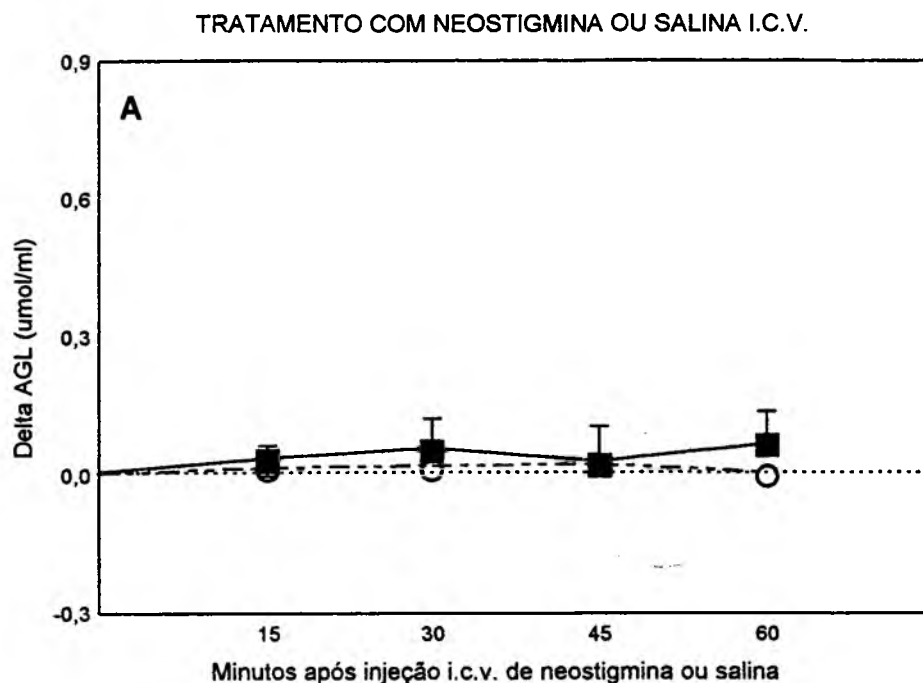
### 8.2. GLICOSE

A análise estatística apontou diferenças estatisticamente significantes na concentração plasmática de glicose entre os tratamentos [  $F(1,64) = 88,48$  ;  $p = 10^{-6}$ ]. No entanto, não houve significativa diferença entre os tempos [  $F(3,64) = 1,53$ ;  $p = 0,21$ ] e interação das duas variáveis (tempo e tratamento) [  $F(3,64) = 0.30$  ;  $p = 0,82$ ].

A administração *i.c.v.* de neostigmina provocou aumento na concentração plasmática de glicose durante todo o período experimental (Fig. 8B). Já aos 15 min do experimento, observou-se um acréscimo de 16% na concentração plasmática de glicose

em relação ao valor basal. Este aumento permaneceu de forma gradativa até atingir seu valor máximo aos 45 min (28% acima do valor basal). Aos 60 min da coleta, houve um ligeiro decréscimo na concentração plasmática de glicose. Os resultados indicam que a administração central de neostigmina promove aumento na glicemia.

A administração *i.c.v.* de salina em pombos despertos manteve a concentração plasmática de glicose inalterada durante todo o decorrer do experimento.



**Fig. 8 A**- Efeito da administração i.c.v. de neostigmina (2,7 nmol, basal =  $0,88 \pm 0,05$  umol/ml) ou salina (1 ul, basal =  $0,97 \pm 0,07$  umol/ml) sobre a concentração plasmática dos AGL em pombos saciados. Neostigmina ■, (n=9) ou salina ○, (n=9) foram administrados imediatamente após a primeira coleta de sangue. **Fig. 8 B** - Efeito da administração i.c.v. de neostigmina (2,7 nmol, basal =  $303 \pm 11$  mg/dl) ou salina (1 ul, basal =  $278 \pm 13$  mg/dl) sobre a concentração plasmática de glicose em pombos saciados. Neostigmina ■, (n=9) ou salina ○, (n=9) foram administrados imediatamente após a primeira coleta de sangue. Os dados (média  $\pm$  erro padrão da média) representam as diferenças entre o valor experimental e o basal. (\*) indicam diferenças significante estatisticamente quando comparada ao seu respectivo tempo no grupo controle ( $p < 0,05$ , testes de Duncan).



**DISCUSSÃO**

A discussão do presente trabalho será dividida em duas partes. Primeiro, serão analisados os dados obtidos a partir dos procedimentos experimentais adotados para avaliar a participação de receptores colinérgicos do tipo muscarínico e/ou nicotínico, localizados no SNC, na ativação da lipólise, após administração *i.c.v.* de carbacol. Em seguida, serão discutidas as alterações observadas na concentração dos AGL e glicose no plasma após injeção *i.c.v.* de neostigmina.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que após a injeção *i.c.v.* de carbacol, em pombos despertos, ocorreu um aumento da concentração dos AGL plasmático. Esse dado, confirma aquele observado anteriormente em nosso laboratório (DeMello, 1996), onde investigou-se a influência da ativação de sinapses colinérgicas sobre a regulação de substratos energéticos. Foi verificado, através da injeção *i.c.v.* de carbacol em pombos, que a ativação da lipólise induzida por esse agonista colinérgico, envolveria possivelmente uma supressão do tônus parassimpático, cuja consequência seria um predomínio do tônus simpático, provocando um aumento na secreção de catecolaminas da medula da adrenal. Estas, quando liberadas na corrente sanguínea, poderiam atuar sobre o pâncreas endócrino, talvez sobre as células  $\alpha$ , promovendo a liberação de glucagon. Dados na literatura apontam que o hormônio glucagon exerce um poderoso efeito lipolítico nas aves, promovendo elevação da concentração dos AGL no plasma (Langslow e Hales, 1969; Hazelwood, 1973; John e George, 1973; Ballantyne e cols., 1988), sendo este efeito mais intenso do que em mamíferos.

Evidências presentes na literatura demonstram que o agonista colinérgico carbacol, no SNC, apresenta afinidade para receptores muscarínicos (Kohler e cols., 1995), sem muita seletividade para os subtipos desta classe de receptores (Mckinney e cols., 1989; Hulme e cols., 1990). No entanto, segundo Brow e Taylor (1995), esse agonista também

atua em receptores nicotínicos na medula espinhal, níveis subcorticais e corticais do cérebro. Conseqüentemente, o envolvimento de receptores muscarínicos ou nicotínicos na lipomobilização induzida após a injeção central de carbacol seria melhor verificada se administrássemos previamente a injeção de carbacol, antagonistas para ambos os tipos de receptores colinérgicos. Os antagonistas de receptores muscarínicos ou nicotínicos apresentam melhor seletividade para os subtipos de receptores que os agonistas (Kohler e cols., 1995).

Com o objetivo de avaliar a participação de receptores muscarínicos centrais na estimulação da lipólise induzida pela injeção *i.c.v.* de carbacol, foi realizado o pré-tratamento com escopolamina *i.c.v.*, cujo emprego na dose 2,7 nmol ocasionou um bloqueio parcial no aumento dos AGL plasmático após administração de carbacol. Esse dado sugere que receptores muscarínicos centrais contribuiriam para o surgimento da resposta lipolítica induzida pelo carbacol. Entretanto, a administração de escopolamina, na dose maior (5,4 nmol), provocou um acréscimo na concentração plasmática dos AGL de início, intensidade e duração semelhante àquela obtida com injeção *i.c.v.* de carbacol realizada após o pré-tratamento com injeção *i.c.v.* de salina. Esses dados, quando comparados, são bastante contraditórios.

Com o objetivo de esclarecer ação da escopolamina quando injetada por via *i.c.v.*, independentemente da presença de carbacol, realizou-se a injeção *i.c.v.* de escopolamina nas doses 2,7 e 5,4 nmol, precedida pela injeção *i.c.v.* de salina. Os resultados obtidos mostram que a administração na dose menor (2,7 nmol) de escopolamina não provocou aumento nos níveis dos AGL no plasma, porém, o grupo que recebeu pré-tratamento de escopolamina na dose de 5,4 nmol sofreu uma elevação dos AGL plasmático com início, intensidade e duração semelhante àquela observada após injeção *i.c.v.* de carbacol, precedida pela administração *i.c.v.* de salina. Parece que administração central do

antagonista colinérgico muscarínico, escopolamina, estimula a lipólise independentemente da injeção *i.c.v.* de carbacol.

Como a escopolamina atravessa a barreira hematoencefálica, a ativação da lipólise observada após sua administração por via *i.c.v.*, na dose maior, poderia ser consequência de uma possível ação periférica, onde a passagem da escopolamina pela barreira hematoencefálica para periferia, poderia permitir sua interação com receptores muscarínicos em órgãos-alvo. Desta forma, as respostas fisiológicas aos impulsos nervosos parassimpáticos ficariam bloqueadas.

Corroborando com essa idéia, os dados obtidos a partir de experimentos realizados em nosso laboratório mostram que a administração intraperitoneal de metil-escopolamina é capaz de promover uma intensa elevação na concentração dos AGL no plasma de pombos (DeMello, 1996). Como a metil-escopolamina é uma droga que não atravessa a barreira hematoencefálica, sua capacidade em promover a lipólise, neste caso, poderia ser atribuída ao bloqueio de receptores muscarínicos localizados em órgãos-alvo periféricos.

Adicionalmente, evidências na literatura mostram que a vagotomia em pombos provoca elevação na lipomobilização, resultado que foi atribuído ao aumento do tônus simpático como consequência da redução do tônus parassimpático (John e cols., 1985, 1989). Contribuindo com esta observação, Viswanatham e cols. (1987), verificaram que, em pombos, a vagotomia cervical bilateral provoca um aumento na concentração sanguínea de noradrenalina e redução dos níveis de adrenalina. Esses dados reforçam a idéia de que a supressão do tônus parassimpático favorece a atuação do tônus simpático sobre os órgãos-alvo.

Portanto, se a vagotomia causa um aumento do tônus simpático, então a ativação da lipólise, observada após a administração periférica de metil-escopolamina (DeMello, 1996), ou após o pré-tratamento por via *i.c.v.* com escopolamina (seguido ou não pela injeção *i.c.v.* de carbacol) nos experimentos relatados no presente trabalho, poderia ser uma consequência desse efeito.

Então, após sua passagem pela barreira hematoencefálica, a escopolamina (transportada pelo sangue) iria inibir os receptores muscarínicos localizados em órgãos-alvo periféricos, reproduzindo a supressão do tônus parassimpático obtido após a vagotomia. Como resultado, ocorreria um predomínio do sistema nervoso simpático, fato que promoveria a ativação da lipólise observada após pré-tratamento com escopolamina.

Embora seja geralmente relatado na literatura que, em aves, o TA é pouco responsivo às catecolaminas (Carlson e cols., 1964; Grande, 1969; Freeman e Manning, 1971), De Mello, em 1996, mostrou que a injeção intraperitoneal de noradrenalina ou adrenalina, catecolaminas liberadas pela ativação do sistema nervoso simpático, induzem a elevação na concentração plasmática dos AGL em pombos. Esse dado, indica que as catecolaminas podem promover lipólise, reforçando a possibilidade de que o predomínio do simpático desencadearia elevação dos AGL.

Para esclarecimento e confirmação da participação de receptores muscarínicos centrais na ativação da lipólise induzida pela administração central de carbacol, foi realizado o pré-tratamento por via *i.c.v.* com metil-escopolamina, já que esta, devido à sua incapacidade em atravessar a barreira hematoencefálica, restringe sua ação ao SNC quando administrado no ventrículo lateral.

O pré-tratamento com metil-escopolamina (2,7 nmol) não alterou a resposta lipolítica induzida pelo carbacol. Porém, quando injetou-se por via *i.c.v.* metil-escopolamina na dose maior (5,4 nmol), antes da injeção central de carbacol, houve um bloqueio na elevação dos AGL plasmático durante todo o período experimental, exceto aos 60 min, quando verificou-se um discreto aumento dos AGL.

Diferindo dos resultados encontrados com a escopolamina, quando administrou-se centralmente metil-escopolamina, em ambas as doses, 15 min antes da injeção *i.c.v.* de salina, não houve alterações nos níveis dos AGL no plasma. Esse resultado confirma a hipótese de uma possível passagem da escopolamina pela barreira hematoencefálica, bloqueando receptores muscarínicos localizados em órgãos-alvo, logo, impedindo sua ligação com acetilcolina liberada pelas fibras pós-ganglionares do parassimpático. Deste modo, a supressão da influência parassimpática, promoveria um predomínio do tônus simpático.

Dando continuidade ao nosso esquema experimental, avaliou-se a participação de receptores nicotínicos na elevação da concentração dos AGL no plasma induzido pelo carbacol. Para isso, 15 min antes da injeção de carbacol por via *i.c.v.*, foi realizado o tratamento prévio por via central com mecamilamina. Os resultados deste grupo experimental indicam que o pré-tratamento com ambas as doses de mecamilamina não alterou essencialmente a resposta lipolítica induzida pelo carbacol. Nota-se que o antagonista nicotínico, mecamilamina, quando administrado centralmente, não exerce um bloqueio na lipomobilização provocada pela injeção por via *i.c.v.* de carbacol. Além disso, verificou-se que a pré-administração de mecamilamina, seguida pela injeção de salina, também não alterou a concentração dos AGL plasmático.

Resumindo os dados obtidos nos experimentos acima relatados, é provável que receptores colinérgicos do tipo muscarínico estejam envolvidos com a ativação da lipólise após administração central de carbacol, já que o tratamento prévio com o antagonista muscarínico, metil-escopolamina, por via *i.c.v.*, na dose mais elevada, gerou um bloqueio na resposta lipolítica induzida pelo carbacol, enquanto que a mecamilamina, antagonista de receptores nicotínicos, não modificou esta resposta.

Evidências relatadas na literatura demonstram que circuitos centrais regulando a atividade lipolítica do tecido adiposo em pombos incluem neurônios colinérgicos (DeMello, 1996) e noradrenérgicos (Neves, 1998). A estimulação de neurônios colinérgicos centrais promoveria a lipólise por intermédio da ativação do sistema nervoso simpato-adrenal (DeMello, 1996), enquanto que a estimulação de neurônios noradrenérgicos possivelmente ativaria a lipomobilização através da liberação de hormônios hipofisários, talvez o hormônio do crescimento (Neves, 1998).

Após a injeção das diversas substâncias no ventrículo lateral dos pombos, estas, automaticamente, dirigem-se via fluido cerebral para os demais ventrículos, podendo agir em estruturas mais caudais, onde sua ação poderia ser exercida em qualquer região cerebral por onde passa. Este fato torna difícil a identificação exata do local onde se situam elementos neurais sensíveis ao carbacol e responsáveis pelas mudanças metabólicas ocorrida.

Métodos histoquímicos para visualização dos locais onde possivelmente encontraríamos acetilcolina (Ach) e receptores colinérgicos no SNC, têm sido obtidos através de estudos bioquímicos de determinação da acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação da Ach na fenda sináptica, e, também, pela determinação

da enzima colina acil transferase, responsável pela produção de Ach pelos neurônios colinérgicos.

Medina e Reiner, em 1994, investigando a distribuição de acetilcolinesterase no cérebro de pombos, verificaram que neurônios colinérgicos aparecem no telencéfalo basal, hipotálamo, habenula, pré-tectum, tectum do mesencéfalo, istmo dorsal e núcleo do nervo motor medial, sendo a organização colinérgica no cérebro de aves muito parecida com a dos répteis e mamíferos. A maior diferença entre as espécies seria no telencéfalo, onde a quantidade de neurônios colinérgicos aumentaria com o desenvolvimento filogenético (Wächtler, 1980). Segundo Naüta e Karten, em 1970, o principal aumento no número de neurônios colinérgicos em mamíferos não ocorreu no cortex, mas na parte basal do telencéfalo, predominantemente no estriado. Sendo que essa tendência já é visível no cérebro de aves (Wächtler, 1980).

O neurotransmissor mais abundante no SNC de aves é a Ach. No cérebro, receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos estariam envolvidos com a atividade da Ach liberada sinapticamente (Sorenson e Chiappinelli, 1992). Naresh e cols., em 1975, investigando o mecanismo colinérgico na termoregulação central em pombos, observaram que sítios de receptores muscarínicos estariam espalhados pelo hipotálamo em regiões muito mais acessíveis do que sítios de receptores nicotínicos.

Sugerindo similaridades na distribuição de receptores colinérgicos centrais entre aves e mamíferos, Ball e cols. (1990) identificaram dois subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos, denominados  $M_1$  e  $M_2$ , no cérebro de pombos, assim como em mamíferos. Porém, os dois subtipos de receptores colinérgicos se organizam em duas populações de receptores, em diferentes locais, no cérebro de ratos (Spencer e cols.,



1986), enquanto que em aves esses receptores demonstram similaridade na distribuição anatômica (Dietl e cols., 1988)

De todas as áreas cerebrais citadas acima, sabe-se que a regulação da atividade autonômica que controla a disposição de substratos energéticos encontra-se, provavelmente, na região hipotalâmica (Benzo, 1983; Coimbra e Migliorini, 1983; Le Magnem, 1983; Steffens e cols., 1984; Shimazu, 1986, 1987, Shimazu e cols., 1991; Challet e cols., 1995). O hipotálamo é um local do SNC que abrange múltiplas funções, entre elas, a regulação dos níveis de glicose e AGL no plasma, controlados diretamente por via neural, ou indiretamente pelos hormônios (insulina, glucagon, adrenalina e noradrenalina) (Steffens e cols., 1988). Vários núcleos hipotalâmicos, tais como, o HVM, HL, NPV e NDM, modulando a atividade autonômica dirigida ao fígado, pâncreas endócrino e tecido adiposo, determinam a concentração dos AGL e da glicose no sangue (Shimazu e cols., 1966; Shimazu e cols., 1976; Steffens e cols., 1984; Shirokawa e Nakamura, 1987).

Nas aves, o modelo de projeções hipotalâmicas para o tronco cerebral e medula espinhal não tem sido muito estudado. Porém, em 1983, Berk e Finkelstein, através de análise autoradiográfica do hipotálamo de pombos, observaram projeções descendentes do núcleo magnocelular periventricular (NPM) para a medula espinhal. Estas cursam posteriormente através do hipotálamo lateral, mesencéfalo, ponte e medula. No nível medular, as fibras giram dorsomedialmente e projetam-se para certas regiões do núcleo do trato solitário e núcleo motor dorsal do vago. Um grupo de fibras desce também para o nível do cordão espinhal torácico. Parece que o NPM do hipotálamo de pombos, seria homólogo ao NPV em mamíferos, já que as projeções para o núcleo do trato solitário, vago e medula espinhal torácica denotam controle hipotalâmico sobre certas funções autonômicas nesta espécie. Essas projeções hipotalâmicas, entre aves e mamíferos,

diferem apenas em relação às suas terminações no núcleo motor do vago. Nas aves, as fibras no NPM seletivamente inervam o subnúcleo parvicelular do nervo vago, enquanto que em mamíferos todo o núcleo vago recebe projeções do NPV (Sofroniew e Schrell., 1981).

O núcleo paraventricular, no mamífero, é considerado um receptor hipotalâmico de aferências da periferia (Sawchenko e Swanson, 1983; Swanson e Sawchenko, 1983; Steffens e cols., 1984), além deste núcleo no hipotálamo, como já citado, apresentar importante papel na integração da atividade do sistema nervoso autônomo, através de conexões com centros do parassimpático e simpático, mantendo conexões diretas com núcleos pré-ganglionares do complexo dorsal vagal e coluna de células intermediolateral no segmento tóraco lombar da medula espinhal (Luiten e cols., 1985; Steffens e cols., 1988). O complexo dorsal vagal e a coluna de células intermediolateral são locais onde se encontram os neurônios pré-ganglionares de inervação parassimpática e simpática, respectivamente, da maioria dos órgãos viscerais (Luiten e cols., 1987)

Dessa forma, o controle da lipólise induzido pela injeção central de carbacol em pombos, talvez possa ser mediada pela estimulação do NPM, que tem como homólogo em mamíferos o NPV. No entanto, para esclarecer efetivamente a localização correta dos receptores muscarínicos centrais envolvidos na lipomobilização provocada pelo carbacol, é necessária a realização de futuros experimentos onde deveria constar o mapeamento destes receptores ou a estimulação química de áreas mais específicas no SNC.

Corroborando com resultados encontrados em experimentos anteriores (Paschoalini, 1990; DeMello, 1996), os níveis glicêmicos não sofreram alteração nos grupos discutidos acima. Assim, nos animais tratados com carbacol (*i.c.v.*) + pré-

tratamento com escopolamina ou metil-escopolamina ou mecamilamina por via *i.c.v.*, a concentração plasmática de glicose manteve-se semelhante aos seus respectivos grupos controles.

Diferentemente, em mamíferos, a estimulação central com agonistas colinérgicos eleva a concentração plasmática de glicose (Korner e Ramu, 1976; Brown e Fisher, 1980; Fisher e Brown, 1980; Barbosa e Migliorini, 1982; Iguchi e cols., 1986, 1988; Honmura e cols., 1992). Onde os neurônios colinoceptivos nas áreas HL, NPV e HVM estavam envolvidos na glico-regulação (Honmura e cols., 1992). Segundo Iguchi e cols. (1986), num estudo realizado com ratos, observaram que a resposta hiperglicêmica após injeção central do agonista colinérgico seria mediada no sistema nervoso central por receptores muscarínicos e não nicotínicos, já que a prévia administração de atropina, um antagonista muscarínico, bloqueou esta ação. Entretanto, Ishikawa e cols., em 1982, observaram em coelhos que o aumento da glicemia após estimulação central com carbacol seria mediada por receptores nicotínicos, encontrados na área hipotalâmica ventromedial. Essa resposta foi também verificada quando estimulada a área hipotalâmica lateral de ratos (Honmura e cols., 1992).

Percebe-se, em pombos, diferenças na capacidade do SNC em controlar a lipomobilização e homeostase de glicose, uma vez que o carbacol quando administrado por via *i.c.v.* provoca ativação da lipólise mas não desencadeia a hiperglicemia.

Finalizando, analisaremos a participação da neostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase que aumenta, desta forma, a disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica, sobre a utilização de substratos energéticos em pombos. Nossos resultados demonstram que não houve alteração na concentração plasmática dos AGL (Fig. 8 A)

durante todo o período experimental. Entretanto, a injeção de neostigmina *i.c.v.* resultou em resposta hiperglicêmica (Fig. 8 B).

Esses dados são aparentemente contraditórios, uma vez que a injeção *i.c.v.* de carbacol (agonista de receptores nicotínicos e muscarínicos) não modifica a glicemia em pombos. No entanto, é possível que o carbacol em pombos atue preferencialmente em receptores muscarínicos, e que o efeito da neostigmina seja mediado preferencialmente pela interação da acetilcolina com receptores nicotínicos centrais.

A liberação de Ach pelos neurônios colinérgicos centrais que alcançam esses receptores nicotínicos poderia ser constante, sugerindo uma liberação tônica de Ach nas sinapses centrais envolvidas com a regulação da glicemia, visto que o tratamento com neostigmina provocou aumento nos níveis de glicose plasmática. Por outro lado, receptores muscarínicos centrais, envolvidos com a lipomobilização induzida após administração *i.c.v.* de carbacol, liberariam Ach apenas em situações onde houvesse maior demanda energética, ou seja, essas terminações não teriam uma atividade contínua. Dessa forma, o tratamento com neostigmina não poderia afetar a concentração dos AGL no plasma, uma vez que a liberação de Ach nessas sinapses estariam aparentemente ausentes ou acontecendo em quantidades muito pequenas. Para esclarecermos efetivamente esta questão, novos experimentos devem ser realizados.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ARNER, P. Adrenergic receptor function in fat cells. *Am. J. Clin. Nutr.*, 55: 228S-236S, 1989.
- ARNER, P. Regulation of lipolysis in fat cells. *Diabetes Res.*, 4: 450-463, 1996.
- ATRENS, D.M.; MENÉNDEZ, J.A. Glucagon and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res.*, 630: 245-251, 1993.
- BALL, G.F.; NOCK, B.; WINGFIELD, J.C.; McEWEN, B.S.; BALTHAZART, J. Muscarinic cholinergic receptors in the songbird and quail brain: a quantitative autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.*, 298: 431-442, 1990.
- BALLANTYNE, J.S.; JOHN, T.M.; GEORGE, J.C. The effects of glucagon on hepatic mitochondrial metabolism in the pigeon, *Columba livia*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 72: 130-135, 1988.
- BARBOSA, M.C.; MIGLIORINI, R.H. Free fatty acid mobilization in rats following intracerebroventricular norepinephrine. *Am. J. Physiol.*, 242: E242-E252, 1982.
- BARTNESS, T.J.; BAMSHAD, M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am. J. Physiol.*, 275: R1399-R1411, 1998.
- BASSO, L.V.; HAVEL, R.J. Hepatic metabolism of free fatty acids in normal and diabetic dogs. *J. Clin. Invest.*, 49: 537-547, 1970.
- BENSADOUN, A. Lipoprotein lipase. *Annu. Nutr. Res.*, 11: 217-239, 1990.
- BENZO, C.A. The hypothalamus and glucose regulation. *Science*, 32: 2509-2515, 1983.
- BERK, M.L.; FINKELSTEIN, J.A. Long descending projections of the hypothalamus in the pigeon, *Columba livia*. *J. Comp. Neurol.*, 220: 127-136, 1983.
- BERTHOLD, P. Migration: control and metabolic physiology. In: FARNER, D.S.; KING, J.R. *Avian Biology*. New York : Academic Press, 1975. p.77-128.
- BIRMAN, E.L.; SCHWARTZ, I.L.; DOLE, V.P. Action of insulin on release of fatty acids from tissue stores. *Am. J. Physiol.*, 191: 359-362, 1957.

- BRAGANZA, A.F.; PETERSON, R.A.; CENEDELLA, R.J. The effects of heat and glucagon on the plasma glucose and free fatty acids of the domestic fowl. *Poult. Sci.*, 52: 58-63, 1973.
- BROW, J.H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. The pharmacological basis of therapeutics. Tennessee: Internacional, 1995. p. 141-160.
- BROWN, M.R.; FISHER, D.A. Glucoregulation and the sympathetic nervous system: CNS control by brain peptides. In: BLOOM, F.E. Peptide integrators of cell and tissue function. New York: Raven, 1980. p. 81-97.
- CARLSON, L.A.; LILJEDAHL, S.; VERDY, M.; WIRSEN, C. On responsiveness to the lipid mobilizing action of catecholamines *in vivo* and *in vitro* in the domestic fowl. *Metabolism*, 13: 227-231, 1964.
- CARLSON, L.A.; BOBERG, J.; HÖGSTEDT, B. Some physiology and clinical implications of lipid metabolism from adipose tissue. In: RENOLD, A.E.; CAHILL, G.F. Handbook of Physiology: adipose tissue. Washington: American Physiology Society, 1965. p.625-644.
- CHALLET, E.; LE MAHOD, Y.; MALAN, A. Locomotor activity and utilization of energy reserves during fasting after ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol. Behav.*, 58: 257-264, 1995.
- CHEREL, Y.; ROBIN, J.P.; MAHO, Y. Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds. *Can. J. Zool.*, 66: 159-166, 1988.
- CHERRINGTON, A.D.; KAWAMORI, R.; PEK, S.; VRANIC, M. Arginine infusion in dogs: model for the roles of insulin and glucagon in regulating glucose turnover and free fatty acid levels. *Diabetes*, 23: 805-815, 1974.
- CHIDEKEL, E.W.; GOODNER, C.J.; KOERKER, D.J.; JOHNSON, D.G.; ENSINCK, J.W. Role of glucagon in mediating metabolic effects of epinephrine. *Am. J. Physiol.*, 232: E464-E470, 1977.
- CHRISTENSEN, N.J.; CHRISTENSEN, S.E.; HANSEN, A.P.; LUNDER, K. The effect of somastostatin on plasma noradrenaline and plasma adrenaline concentrations during exercise and hypoglycemia. *Metabolism*, 24: 1267-1272, 1975.

- CHUNG, B.H.; TALLIS, G.A.; SIMON CHO, B.H.; SEGREST, J.P.; HENKIN, Y. Lipolysis-induced partitioning of free fatty acids to lipoproteins: effect on the biological properties of free fatty acids. *J. Lipid Res.*, 36: 1956-1970, 1995.
- COIMBRA, C.C.; MIGLIORINI, R.H. Evidence for a longitudinal pathway in rat hypothalamus that controls FFA mobilization. *Am. J. Physiol.*, 245: E332- E337, 1983.
- COIMBRA, C.C.; MIGLIORINI, R.H. Insulin-sensitive glucoreceptors in rat preoptic area that regulate FFA mobilization. *Am. J. Physiol.*, 251: E703-E706, 1986.
- COIMBRA, C.C.; MIGLIORINI, R.H. Cold-induced free fatty acid mobilization is impaired in rats with lesions in preoptic area. *Neurosci. Lett.*, 88: 1-5, 1988.
- COPPACK, S.W.; FRAYN, K.N.; HUMPHREYS, S.M.; DHAR, H.; HOCKADAY, T.D.R. Effects of insulin on human adipose tissue metabolism *in vivo*. *Clin. Sci.*, 77: 663-670, 1989.
- COPPACK, S.W.; FISHER, R.M.; GIBBONS, G.F.; HUMPHREYS, S.M.; McDONOUGH, M.J.; POTTS, J.L.; FRAYN, K.N. Postprandial substrate deposition in human forearm and adipose tissues *in vivo*. *Clin. Sci.*, 79: 339-348, 1990.
- COPPACK, S.W.; JENSEN, M.D.; MILES, J.M. *In vivo* regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid Res.*, 35: 177-193, 1994.
- DAGENAIS, G.R.; TANCREDI, R.G.; ZIERLER, K.L. Free fatty acid oxidation by forearm muscle at rest, and evidence for an intramuscular lipid pool in the human forearm. *J. Clin. Invest.*, 58: 421-431, 1976.
- DANIEL, P.M.; PRATT, O.E. The metabolic homeostatic role of muscle and its function as a store of protein. *Lancet.*, 2: 446-448, 1977.
- DEBONS, A.F.; SCWARTZ, I.L. Dependence of the lipolytic action of epinephrine *in vitro* upon the thyroid hormone. *J. Lipid Res.*, 2: 86-89, 1961.
- DeMELLO, D.M.S. Participação do sistema nervoso autônomo na ativação da lipólise induzida pela injeção intracerebroventricular de carbacol em pombos. Florianópolis, 1996. 66p. Dissertação (Mestrado em Neurociência e Comportamento), Universidade Federal de Santa Catarina.



- DeMELLO, D.M.S.; FREITAS, C.G.; MARINO NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. Participation of the autonomic nervous system in lipolysis induced by intraventricular injection of carbachol in the pigeon. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 59: 83-86, 1996.
- DIETL, M.M.; CORTÉS, R.; PALACIOS, J.M. Neurotransmitter receptors in the avian brain. II. Muscarinic cholinergic receptors. *Brain Res.*, 439: 360-365, 1988.
- DOLE, P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, 235: 2595-2599, 1960.
- ECKEL, R.H. Lipoprotein lipase: a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1060-1068, 1989.
- FAIN, J.N.; KORACEV, V.P.; SCOW, R.O. Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of rat. *J. Biol. Chem.*, 240: 3522-3529, 1965.
- FISHER, D.A.; BROWN, M.R. Somatostatin analog: plasma catecholamine suppression mediated by central nervous system. *Endocrinol.*, 107: 714-718, 1980.
- FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. Glucose, lipid and protein metabolism. In: GRIFFIN, J.E., OJEDA, S.R. Textbook of endocrine physiology. United States of America, 1996, p. 349-374.
- FREDRICKSON, D.S.; GORDON, R.S. The metabolism of albumin bound C-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects. *J. Clin. Invest.*, 37: 1504-1515, 1958.
- FREDRIKSON, G.H.; TORNQVIST, H.; BELFRAGE, P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*, 876: 288-293, 1986.
- FREEMAN, B.M. Effect of noradrenaline on the plasma free fatty acid glucose levels in *Gallus domesticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30: 993-996, 1969.
- FREEMAN, B.M.; MANNING, A.C. C. Glycogenolysis and lipolysis in *Gallus domesticus* during the perinatal period. *Comp. Gen. Pharmacol.*, 2: 198-204, 1971.
- FREEMAN, B.M.; MANNING, A.C.C. The prandial state and the glycaemic and lipolytic responses of *Gallus domesticus* to catecholamines and glucagon. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47A: 1145-1152, 1974.

- GALTON, D.J.; BRAY, G.A. Studies on lipolysis in human adipose cells. *J. Clin. Invest.*, 46: 621-629, 1967.
- GARBER, A.T.; CRYER, P.E.; SANTIAGO, J.V.; HAYMOND, M.W.; PAGLIARA, A.S.; KIPNIS, D.M. The role of adrenergic mechanisms in the substrate and hormonal response to insulin-induced hypoglycemia in man. *J. Clin. Invest.*, 58: 7-15, 1976.
- GERICH, J.E.; LORENTI, M.; ESALIKIAN, E.; KARAM, J.H. Studies on the mechanism of epinephrine-induced hyperglycemia in man: evidence for participation of pancreatic glucagon secretion. *Diabetes*, 25: 65-71, 1976.
- GOODMAN, H.; GRICHTING, G. Growth-hormone and lipolysis: a reevaluation. *Endocrinol.*, 113: 1697-1702, 1983.
- GOODRIDGE, A.G.; BALL, E.C. Studies on metabolism of adipose tissue-XVIII. *In vitro* effects of insulin, epinephrine and glucagon on lipolysis and glycolysis in pigeon adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.*, 16: 367-381, 1965.
- GOODRIDGE, A.G. Regulation of fatty acid synthesis in the of prenatal and early postnatal chicks. Hepatic concentrations of individual free fatty acids and other metabolites. *J. Biol. Chem.*, 248: 1939-1945, 1973.
- GRANDE, F. Effect of catecholamines on plasma free fatty acids and blood sugar in birds. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 131: 740-744, 1969.
- GRANDE, F.; PRIGGE, W.F.; AYA, M. Glucagon infusion, plasma FFA and triglycerides, blood sugar and liver lipids in birds. *Am. J. Physiol.*, 218: 1406-1411, 1970.
- GRAY, D.E.; LICKLEY, H.L.A.; VRANIC, M. Physiologic effects of epinephrine on glucose turnover and plasma free fatty acid concentrations mediated independently. *Diabetes*, 29: 600-609, 1980.
- GREEN, P.H.; GLICKMAN, R.M. Intestinal lipoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, 22: 1153-1171, 1981.
- GROOP, L.C.; BONADONNA, R.C.; DEL PRATO, S.; RATHEISER, K.; ZYCK, K.; FERRANNINI, E.; DEFRONZO, R.A. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for multiple sites of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*, 84: 205-213, 1989

- GROOP, L.C.; BONADONNA, R.C.; SHANK, M.; PETRIDES, A.S.; DEFRONZO, R.A. Role of free fatty acids and insulin in determining free fatty acid and lipid oxidation in man. *J. Clin. Invest.*, 87: 83-89, 1991.
- HAGEN, J.H. Effect of glucagon on the metabolism of adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 236: 1023-1027, 1961.
- HAGSTRÖM-TOFT, E.; ARNER, P.; NASLUND, B.; UNGERSTEDT, U.; BOLINDER, J. Effects of insulin deprivation and replacement on *in vivo* subcutaneous adipose tissue substrate metabolism in humans. *Diabetes*, 40: 666-672, 1991.
- HALES, C.N.; LUZIO, J.P.; SIDDLE, K. Hormonal control of adipose-tissue lipolysis. *Biochem. Soc. Symp.*, 43: 97-135, 1978.
- HAMILTON, R.L. Synthesis and secretion of plasma lipoproteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 26: 7-24, 1972.
- HAMMEL, H.T. Regulation of internal body temperature. *Annu. Rev. Physiol.*, 30: 641-710, 1968.
- HAVEL, R.J.; GOLFIEN, A. The role of the sympathetic nervous system in the metabolism of free fatty acids. *J. Lipid Res.*, 1: 102, 1959.
- HAVEL, R.J.; KANE, J.P.; BALASSE, E.O.; SEGEL, N.; BASSO, L.V. Splanchnic metabolism of free fatty acids and production of triglycerides of very low density lipoproteins in normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic humans. *J. Clin. Invest.*, 49: 2017-2035, 1970.
- HAZELWOOD, R.L. Endocrine control of avian carbohydrate metabolism. *Poult. Sci.*, 50: 9-18, 1971.
- HAZELWOOD, R.L. The avian endocrine pancreas. *Amer. Zool.*, 13: 699-709, 1973.
- HAZELWOOD, R.L. Carbohydrate metabolism. In: STURKIE, P.D. Avian physiology. New York: Springer-Verlog, 1986. p. 303-325.
- HEALD, P.J.; McLACHLAN, D.M.; ROOKLEDGE, K.A. The effects of insulin, glucagon and adrenocorticotrophic hormone on the plasma glucose and free fatty acids in the domestic fowl. *J. Endocrinol.*, 38: 83-95, 1965.

- HOSFSTEDT, J.; SHIMIZU, M.; SJÖTEDT, S.; LÖNNQVIST, F. Determination of  $\beta_3$ -adrenergic mediated lipolysis in human fat cells. *Obes. Res.*, 3: 447-457, 1995.
- HONMURA, A.; YANASE, M.; SAITO, H.; IGUCHI, A. Effect of intrahypothalamic injection of neostigmine on the secretion of epinephrine and norepinephrine and on plasma glucose level. *Endocrinol.*, 130: 2997-3002, 1992.
- HULME, E.C.; BIRDSALL, N.J.M.; BUCKLEY, N.J. Muscarinic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 633-673, 1990.
- IGUCHI, A.; GOTOH, M.; MATSUNAGA, H.; YATOMI, A.; HONMURA, A.; YANASE, M.; SAKAMOTO, N. Mechanism of central hyperglycaemic effect of cholinergic agonists in fasted rats. *Am. J. Physiol.*, 251: E431-E437, 1986.
- IGUCHI, A.; GOTOH, M.; MATSUNAGA, H.; YATOMI, A.; HONMURA, A.; YANASE, M.; SAKAMOTO, N. Relative contributions of the nervous system and hormones to CNS-mediated hyperglycaemia. *Am. J. Physiol.*, 255: E920-E927, 1988.
- IGUCHI, A.; GOTOH, M.; MATSUNAGA, H.; YATOMI, A.; UEMURA, K.; MIURA, H.; KUNOH, Y.; TAMAGAWA, T.; SAKAMOTO, N. Neither adrenergic nor cholinergic antagonists in the central nervous system affect 2-deoxy-D-glucose(2-DG)-induced hyperglycemia. *Brain Res.*, 510: 321-325, 1990.
- INOUE, S.; BRAY, G.A. An autonomic hypothesis for hypothalamic obesity. *Life Sci.*, 25: 561-566, 1979.
- ISHIKAWA, K.; SUZUKI, M.; SHIMAZU, T. Effects of acetylcholine injection into the hypothalamus of the insulin and glucagon release. *Neuroendocrinol.*, 34:310-314, 1982.
- JOHN, T.M.; GEORGE, J.C. Effect of prolonged exercise on levels on plasma glucose, free fatty acids and corticosterone and muscle free fatty acids in the pigeon. *Arch. Inter. Physiol. Biochem.*, 81: 421-425, 1973.
- JOHN, T.M.; PILO, B.; GEORGE, J.C.; SCANES, C.G. Effect of vagotomy on plasma levels of growth hormone, free fatty acids and glucose in the pigeon. *Arch. Internat. Physiol. Biochem.*, 93: 24-253, 1985.

- JOHN, T.M.; PILO, B.; HAZELWOOD, R.L.; GEORGE, J.C. Circulating levels of insulin and avian pancreatic polypeptide in pigeons under different experimental conditions. *Gen. Comp. Endocr.*, 75: 71-77, 1989.
- JOHNSTON, D.W. Caloric density of avian adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 34: 827-832, 1970.
- KARTEN, H.J.; HODOS, H. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). Baltimore, Maryland: Johns Hopkins Press, 1967.
- KOHLER, E.C.; MESSER, W.S.; BINGMAN, V.P. Evidence for muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the pigeon telencephalon. *J. Comp. Neurol.*, 362: 271-282, 1995.
- KORNER, M.; RAMU, A. Central hyperglycemic effect of carbachol in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 35: 207-210, 1976.
- LAFONTAN, M.; BERLAN, M.; VILLENEUVE, A. Preponderance of  $\alpha_2$ - over  $\beta_1$ -adrenergic receptors sites in human fat cells is not predictive of the lipolytic effect of physiological catecholamines. *J. Lipid Res.*, 24: 429-440, 1983.
- LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.*, 34: 1057-1092, 1993.
- LAFONTAN, M. Differential recruitment and differential regulation by physiological amines of fat cell  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  adrenergic receptors expressed in native fat cells and in transfected cell lines. *Cell. Signal.*, 6: 363-392, 1994.
- LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell  $\alpha_2$ -adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr. Rev.*, 16: 716-738, 1995.
- LAFONTAN, M.; BOUSQUET-MELOU, A.; GALITZKY, J.; BARBE, P.; CARPENE, D.; LANGIN, D.; VALET, P.; CASTAN, I.; BOULOUMIE, A.; SAULNIER-BLACHE, J.S. Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation. *Obesity Res.* 3: 507S-514S, 1995.
- LANGSLOW, D.R.; HALES, C.N. Lipolysis in chicken adipose tissue *in vitro*. *J. Endocrinol.*, 43: 285-294, 1969.

- LAURELL, S. Turnover rate of unesterified fatty acids in human plasma. *Acta Physiol. Scand.*, 41: 158-167, 1957.
- LE MAGNEN, J. Body energy balance and food intake: a neuroendocrine regulatory mechanism. *Physiol. Res.*, 63: 314-386, 1983.
- LEBOEUF, B.; FLINN, R.B.; CAHILL, G.F. Effect of epinephrine on glucose uptake and glycerol release by adipose tissue *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 102: 527-529, 1959.
- LINDER, C.; MIGLIORINI, R.H. Effect of adrenalectomy on adipose tissue and liver in rats with acute insulin deficiency. *Diabetes*, 23: 143-149, 1974.
- LUITEN, P.G.M.; TER HORST, G.J.; KARST, H.; STEFFENS, A.B. The course of paraventricular hypothalamic afferents to the autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res.*, 329: 374-378, 1985.
- LUITEN, P.G.M.; HORST, G.J.; STEFFENS, A.B. The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog. Neurobiol.*, 28: 1-54, 1987.
- MACGORMAN, L.R.; CONSOLI, A.; JENSEN, M.D.; MILES, J.M. Importance of growth hormone in the maintenance of basal lipolysis in normal man. *Diabetes*, 36, 1987.
- MARTINS, A.N.; BLOM, M.V.D.; REIS, A.M.; COIMBRA, C.C. Evidence for adrenal medulla involvement in cold adaptation in preoptic lesioned rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24: 1163-1167, 1991.
- MEDINA, L.; REINER, A. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. *J. Comp. Neurol.*, 342: 497-537, 1994.
- McKINNEY, M.; ANDERSON, D.; VELLA-ROUNTREE, L. Different agonist-receptor active conformations for rat brain M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> muscarinic receptors that are separately coupled to two biochemical effector systems. *Mol. Pharmacol.*, 35: 39-47, 1989.
- NARESH, C.; JOHRI, M.B.L.; SAXENA, P.N.; SINGHAL, K.C. Cholinergic mechanisms in central thermoregulation in pigeons. *Br. J. Pharmacol.*, 53: 317-322, 1975.

- NAÛTA, W.J.H.; KARTEN, H.J. A general profile of the vertebrate brain, with side lights on the anethyry of cerebral cortex. In: SCHMITT, F.O. The neurosciences: second study program. New York: Rockefeller, 1970. p. 7-26.
- NEVES, J. Mobilização dos substratos energéticos induzida pela injeção intracerebroventricular de noradrenalina e serotonina em pombos. Florianópolis, 1998. 60p. Dissertação (Mestrado em Neurociência e Comportamento), Universidade Federal de Santa Catarina.
- OYA, M.; PRIGGE, W.F.; SWENSON, D.E.; GRANDE, F. Role of glucagon on fatty liver production in birds. *Am. J. Physiol.*, 221: 25-30, 1971.
- PASCHOALINI, M.A. Central glucoregulation in the pigeon (*Columba livia*). Effects of intraventricular injections of carbachol and catecholamines on blood glucose concentration. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 23: 815-818, 1990.
- PASCHOALINI, M.A. Controle neural da glicemia e lipomobilização em pombos. *Trabalho submetido à concurso público para*. Departamento de Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina, 1994. p. 1-34.
- PEARCE, J. Some differences between avian and mammalian biochemistry. *Int. J. Biochem.*, 8: 269-275, 1977.
- PECQUERY, R.; LENEVEU, M.C.; GIUDICELLI, Y. Influence of adrogenic status on the alpha<sub>2</sub>/ beta-adrenergic control of lipolysis in white fat cells: predominant alpha<sub>2</sub>-antilipolytic response in testosterone-treated-castrated hamsters. *Endocrinol.*, 122: 2590-2596, 1988.
- RAMENOFSKY, M. Fat storage and metabolism in relation to migration. In: GWINNER, E. Bird migration – physiology and ecophysiology. Berlin Heidelberg : Springer, 1990. p.214-231.
- RENOLD, A.E.; CAHILL, G.F. Handbook of physiology. In: Adipose tissue. Washington: American Physiological Society, 1965.
- SANTORO, J.R. Tireóide e metabolismo de ácidos graxos no rato. Estudos *in vivo* e com tecido adiposo *in vitro*. São Paulo, 1967. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

- SANTOS, G.L.; LEITE, J.V.P.; COIMBRA, C.C. Metabolic adjustment during adaptation to high ambient temperature in preoptic-lesioned rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24: 1169-1172, 1991.
- SAWCHENKO, P.E.; SWANSON, L.W. The organization of forebrain efferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 218: 121-144, 1983.
- SCHEURINK, A.J.W. Neuroscience of energy substrate homeostasis. In: WESTERTERP-PLANTENGA, M.S.; FREDRIK, E.W.H.M.; ETEFFENS, B. Food intake and energy expenditure. Netherlands: CRC, 1994. p. 83-102.
- SHAFRIR, E.; KERPEL, S. Fatty acid esterification and release as related to the carbohydrate metabolism of adipose tissue: effect of epinephrine, cortisol and adrenalectomy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 105: 237-246, 1964.
- SHAPIRO, B.; CHOWERS, I.; ROSE, G. Fatty acid uptake and esterification in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Acta.*, 23: 115-120, 1957.
- SHIMAZU, T.; FUKUDA, A.; BAN, T. Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature*, 210: 1178-1179, 1966.
- SHIMAZU, T.; MATSUSHITA, H.; ISHIKAWA, K. Cholinergic stimulation of the rat hypothalamus: effects on liver glycogen synthesis. *Science*, 194: 535-536, 1976.
- SHIMAZU, T. Nervous control of peripheral metabolism. *Acta Physiol. Pol.*, 30: 1-18, 1979.
- SHIMAZU, T. Central nervous system regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetol.*, 20: 343-356, 1981.
- SHIMAZU, T. Neuronal control of intermediate metabolism. In: LIGHTMAN, S.L. Neuroendocrinology. Oxford: Blackwell Scientific, 1986. p.304-330.
- SHIMAZU, T. Neuronal regulation of hepatic glucose metabolism in mammals. *Diabetes Metab. Res.*, 3: 185-206, 1987.
- SHIMAZU, T.; SUDO, M.; MINOKOSHI, Y.; TAKAHASHI, A. Role of the hypothalamus in insulin-independent glucose uptake in peripheral tissues. *Brain Res. Bull.*, 27: 501-504, 1991.



- SHIROKAWA, T.; NAKAMURA, S. Antidromic activation of rat dorsomedial hypothalamic neurons from locus coeruleus and median eminence. *Brain Res. Bull.*, 18: 291-295, 1987.
- SILVERBERG, J.D.; MILES, J.M. Effect of ketosis on fatty acid and glucose kinetics in humans. *Clin. Res.*, 40: 166<sup>A</sup>, 1992.
- SOFRONIEW, M.V.; SCHRELL, U. Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons. *Neurosci. Lett.*, 22: 211-217, 1981.
- SOKAL, J.E.; SARCIONE, E.J.; HENDERSON, A.M. Relative potency of glucagon and epinephrine as hepatic glycogenolytic agents: studies with the isolated perfused rat liver. *Endocrinol.*, 74: 930-938, 1964.
- SORENSEN, E.M.; CHIAPPINELLI, V.A. Localization of <sup>3</sup>H-nicotine, <sup>125</sup>I-kappa-bungarotoxin, and <sup>125</sup>I-alpha-bungarotoxin binding to nicotinic sites in the chicken forebrain and midbrain. *J. Comp. Neurol.*, 323: 1-12, 1992.
- SPENCER, D.G.; HORVATH, E.; TRABER, J. Direct autoradiographic determination of M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor distribution in the rat brain: relation to cholinergic nuclei and projections. *Brain Res.*, 380: 59-68, 1986.
- STEFFENS, A.B.; DAMSMA, G.; VAN DER GUGTEN, J.; LUITEN, P.G.M. Circulating free fatty acids, insulin and glucose during chemical stimulation of hypothalamus in rats. *Am. J. Physiol.*, 247: E765-E771, 1984.
- STEFFENS, A.B.; SCHEURINK, A.J.W.; LUIITE, P.G.M.; BOHUS, B. Hypothalamic food intake regulating areas are involved in the homeostasis of blood glucose and plasma FFA levels. *Physiol. Behav.*, 44: 581-589, 1988.
- STRUBBE, J.H. Endocrine regulation of metabolism. In: WESTERTERP-PLANTENGA, M.S.; FREDRIX, E.W.H.M.; STEFFENS, A.B. Food intake and energy expenditure. Netherlands: CRC, 1994. p. 117-140.
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.*, 4: 195-205, 1983.

TAKAHASHI, A.; SHIMAZU, T. Hypothalamic regulation of lipid metabolism in the rat: effect of hypothalamic stimulation on lipolysis. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 4: 195-205, 1981.

TAKAHASHI, A.; SUDO, M.; MINOKOSHI, Y.; SHIMAZU, T. Effects of ventromedial hypothalamic stimulation on glucose transport system in rat tissues. *Am. J. Physiol.*, 263: R1228-R1234, 1992.

TAKAHASHI, A.; ISHIMARU, H.; IKARASSHI, Y.; MARUYAMA, Y. Intraventricular injection of neostigmine increase dopaminergic and noradrenergic nerve activities: hyperglycemic effects and neurotransmitters in the hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, 156: 54-56, 1993.

TAKAHASHI, A.; ISHIMARU, H.; IKARASHI, Y.; KISHI, E. MARUYAMA, Y. Hypothalamic cholinergic activity associated with  $\alpha_2$ -deoxyglucose-induced hyperglycemia. *Brain Res.*, 734: 116-122, 1996.

TASKINEN, M.R.; NIKILÄ, E.A. Lipoprotein lipase of adipose tissue and skeletal muscle in human obesity: response to glucose and to semistarvation. *Metabolism.*, 30: 810-817, 1981.

VAUGHAN, M. The metabolism of adipose tissue *in vitro*. *J. Lipid Res.*, 2: 293-316, 1961.

VAUGHAN, M.; STEINBERG, D. Effect of hormones on lipolysis and esterification of free fatty acids during incubation of adipose tissue *in vitro*. *J. Lipid Res.*, 4: 193-199, 1963.

VAUGHAN, M.; BERGER, J. E.; STEINBERG, D. Hormone-sensitive lipase and monoglycerol lipase activities in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, 239: 401-409, 1964.

VILBERG, T.R.; KEESEY, R.E. Reduced energy expenditure after ventromedial hypothalamic lesions in female rats. *Am. J. Physiol.*, 247: R183-R188, 1984.

VISWANATHAM, M.; JOHN, T.M.; GEORGE, J.C.; ETCHE, R.J. Flight effects on plasma glucose, lactate, catecholamines and corticosterone in homing pigeons. *Horm. Metabol. Res.*, 19: 400-402, 1987.

WÄCHTLER, K. The regional production of acetylcholine in the brains of lower and higher vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 65: 1-16, 1980.

WAHRENBERG, H.; LONNQVIST, F.; ARNER, P. Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 84: 458-467, 1989.

WISNESKI, J.A.; GERTZ, E.W.; NEESE, R.A.; MAYR, M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with <sup>14</sup>C-labeled substrates in humans. *J. Clin. Invest.*, 79: 359-366, 1987.

XIE, H.; LAUTT, W.W. M<sub>1</sub> muscarinic receptor blockade causes insulin resistance in the cat. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 38: 83-84, 1995.