

## El efecto anorexígeno de la grelina intra-*mesopallium* está relacionado con niveles elevados de corticosterona plasmática en pollos parrilleros durante la primera semana de vida

The anorexigenic effect of intra-*mesopallium* ghrelin is related to high plasma corticosterone levels in broiler chicks during the first week of life

María S. Gastón<sup>1,2,4</sup>, Mariana P. Cid<sup>1,2</sup>, Nancy A. Salvatierra<sup>1,2,3</sup>

### RESUMEN

La grelina es un péptido secretado principalmente en el estómago que actúa sobre el sistema nervioso central para regular el metabolismo energético y las respuestas al estrés. En el pollo disminuye la ingesta de alimentos y se ha sugerido que la hormona liberadora de corticotropina podría mediar esta respuesta. En el presente trabajo se estudia si la anorexia inducida por grelina intra-*mesopallium* podría involucrar la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal en pollos de 4-6 días de edad. Los resultados demuestran que la grelina, administrada en el *mesopallium* intermedio, disminuyó la ingesta de alimentos y aumentó los niveles plasmáticos de corticosterona. Además, se observó una relación negativa significativa entre ambas respuestas, donde mayores concentraciones de corticosterona estuvieron asociadas a una menor ingesta de alimentos. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotropa inducidos por la grelina intra-*mesopallium*. Por lo tanto, esta activa-

<sup>1</sup> Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIByT), CONICET, Córdoba, Argentina

<sup>3</sup> E-mail: [nancy.salvatierra@unc.edu.ar](mailto:nancy.salvatierra@unc.edu.ar); <https://orcid.org/0000-0001-8333-9365>

<sup>4</sup> Lugar actual de trabajo: Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), Universidad Nacional de Jujuy, CONICET, San Salvador de Jujuy, Argentina

Recibido: 21 de septiembre de 2020

Aceptado para publicación: 10 de marzo de 2021

Publicado: 23 de junio de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ción suprarrenal podría desempeñar un papel mediador en el efecto anorexigénico de la grelina central en pollos de engorde. Además, no puede descartarse que esta área del prosencéfalo y el eje hipotalámico pituitario adrenal puedan constituir una red cerebral para el control de la alimentación de pollos parrilleros.

**Palabras clave:** grelina, ingesta de alimentos, corticosterona, cerebro anterior, pollos domésticos

## ABSTRACT

Ghrelin is peptide secreted primarily in the stomach that acts on the central nervous system to regulate energy metabolism and responses to stress. In chicken, it decreases feed intake, and it has been suggested that corticotropin-releasing hormone could mediate this response. The present study investigates whether intra-mesopallium ghrelin-induced anorexia could involve the activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis in 4-6-day-old chickens. The results showed that ghrelin, administered in the intermediate mesopallium, decreased feed intake and increased plasma corticosterone levels. In addition, a significant negative relationship was observed between both responses, where higher concentrations of corticosterone were associated with lower food intake. However, no significant changes were observed in plasma levels of ACTH induced by intra-mesopallium ghrelin. Therefore, this adrenal activation could play a mediating role in the anorectic effect of central ghrelin in broilers. Furthermore, it cannot be ruled out that this area of the forebrain and the hypothalamic pituitary adrenal axis may constitute a brain network for the control of chicken feeding.

**Key words:** ghrelin, feed intake, corticosterone, forebrain, broiler

## INTRODUCCIÓN

La grelina es un péptido acilado liberado principalmente en el estómago de los mamíferos y en el proventrículo del pollo (Kaiya *et al.*, 2008); además, es un ligando endógeno del receptor del secretagogo de la hormona del crecimiento 1a (GHS-R1a) (Kojima *et al.*, 1999). Las células productoras de grelina y la expresión de ARNm del secretagogo R1 de la hormona del crecimiento también han sido detectadas en el cerebro (Kaiya *et al.*, 2008). La grelina actúa sobre el sistema nervioso central (SNC) para regular varias funciones, incluida la actividad del metabolismo y las respuestas al estrés y retención de memoria (Carlini *et al.*, 2004; Kaiya *et al.*, 2008; Spencer *et al.*, 2015).

Diversos estudios demuestran que los efectos de la grelina también podrían involucrar la activación del eje hipotalámico pituitario adrenal (HPA). En los mamíferos, la grelina aumenta los niveles de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y glucocorticoides mediante la activación indirecta de neuronas hipofisiotrópicas de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Wren *et al.*, 2002; Cabral *et al.*, 2012). Este efecto parece estar relacionado con las respuestas al estrés inducidas por el péptido, pero no con la ingesta de alimentos inducida por grelina (Cabral *et al.*, 2016). En contraste con su efecto estimulante sobre el apetito en los mamíferos, la grelina disminuye la alimentación de los pollitos (Furuse *et al.*, 2001; Gastón *et al.*, 2015, 2017; Oclon y Pietras, 2011), pero no a través de los sistemas GABA-A o NPY

(Gastón *et al.*, 2015; Jonaidi *et al.*, 2012; Saito *et al.*, 2005). Debido a que la astressina (un antagonista del receptor de CRH) atenúa el aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona inducida por la administración de grelina intracerebroventricular (gcv) (Saito *et al.*, 2005), el sistema de CRH podría mediar la anorexia inducida por grelina en pollos dentro de la primera semana de vida.

En los mamíferos, las redes que controlan la alimentación no solo incluyen el hipotálamo, sino que también pueden estar asociadas con circuitos extrahipotalámicos relacionados con funciones cerebrales superiores (Waterson y Horvath, 2015; Shojaei *et al.*, 2020). En las aves, el hipotálamo tiene un papel central en la regulación de la alimentación (Tachibana y Tsuitui, 2016), aunque hay poca evidencia de que otras áreas del cerebro o posibles circuitos estén involucradas (Singletary *et al.*, 2006). El mesopallio medio e intermedio (MMI) se ha identificado como un sitio cerebral de formación de memoria en pollos (Gibbs, 2008). En la actualidad, esta área del prosencéfalo se considera homóloga a la neocorteza de los mamíferos, y constituye un importante centro de integración que relaciona el sistema sensorial y motor y recibe aferencias de varias regiones cerebrales asociadas a los aspectos motivacionales de la conducta (Bradley *et al.*, 1985; Jarvis *et al.*, 2005; Atoji y Karim, 2014). De hecho, la memoria y la emoción juegan un papel importante en el control de la ingesta de alimentos, con evidencias que indican que una red entre el prosencéfalo e hipotalámico estaría mediando la alimentación (Petrovich, 2011; Sweeney y Yang, 2017). El presente grupo de investigación describió, por primera vez, una disminución de la ingesta de alimento cuando se administra grelina en el área de MMI (grelina intra-MMI) de pollos de 4-6 días de edad (Gastón *et al.*, 2015). Posteriormente, sugirieron que un circuito neural entre el área del prosencéfalo y el eje HPA podría mediar la respuesta al estrés inducida por la grelina intra-MMI (Gastón *et al.*, 2017).

Debido que la grelina central afecta la retención de la memoria, así como la ingesta de alimentos en pollitos dentro de la primera semana de vida (Carvajal *et al.*, 2009; Gastón *et al.*, 2015) y el MMI constituye un posible blanco del SNC para la acción de la grelina, en el presente estudio se analiza si el efecto anorexígeno de la grelina intra-MMI estará involucrando la activación del eje HPA a través del estudio de los niveles plasmáticos de dos hormonas (ACTH y corticosterona) secretadas a distintos niveles de la activación del circuito del HPA. Asimismo, se analiza la relación entre la ingesta de alimentos y los niveles plasmáticos de estas hormonas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Pollos parrilleros (Cobb) (*Gallus gallus domesticus*) de un día de edad, de ambos sexos (INDACOR, Córdoba, Argentina) se alojaron en una caja de cría de madera (90x40x60 cm), iluminada cenitalmente con una lámpara incandescente dentro de una habitación con temperatura controlada (30-32 °C) con ciclos de luz-oscuridad de 12-12 h. Los pollitos tuvieron libre disponibilidad de agua y comida con reposición diaria de alimentos (Cargill, parrilleros BB, 20% de proteína cruda mínima y 12.34 MJ/kg), condiciones que se mantuvieron hasta el inicio de los experimentos.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía del National Institute of Health (NIH), EEUU, para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y con el Marco Ético de Referencia para las Investigaciones Biomédicas en Animales de Laboratorio, de Granja y Obtenidos de la Naturaleza (CONICET Res. D N° 1047/2005), según lo aprobado por el Comité de Uso y Cuidado Animal (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. El sufrimiento

to de los animales y el número de animales fueron minimizados y reducidos al máximo por los investigadores.

### Administración del Péptido

La grelina (acil-grelina de rata, Innova-gen) fue administrada como se reportó en Gastón *et al.* (2015). Brevemente, el péptido se disolvió en la solución control compuesta por solución fisiológica 0.85% que contenía el colorante Evans-Blue 0.1%. Se inyectó bilateralmente en el MMI (intra-MMI) a una dosis hipofágica de 30 pmol (Carvajal *et al.*, 2009; Gastón *et al.*, 2015). Las inyecciones intra-MMI se realizaron a 2-3 mm hacia la izquierda y derecha de la línea media y a 3-4 mm desde la sutura entre el prosencéfalo y el cerebelo en un volumen de 3 µl por hemisferio, según el método descrito por Davis *et al.* (1979). La profundidad de inyección (2.5 mm) se controló mediante un tubo de plástico en la aguja de calibre 27 (Kuenzel y Masson, 1988). Se utilizó un dispositivo de acero para sujetar la cabeza del pollito, con una placa acrílica con orificios bilaterales sobre la cabeza para adaptar la aguja. El estrés que sufre el pollito por este método de inyección es mínimo (Gastón *et al.*, 2017).

### Diseño Experimental

Los pollitos de 4-6 días de edad con peso aproximado de 100 g se alojaron la noche previa en una caja individual sin acceso a alimento y con agua *ad libitum*. En el día de la prueba, cada pollito se colocó en una caja y se llevó a una habitación separada donde se le inyectó intra-MMI con una solución salina (n = 6, grupo control) o con 30 pmol de grelina (n = 6). Inmediatamente después, los pollitos de ambos grupos experimentales fueron expuestos a la prueba de ingesta de alimentos. Otro grupo de pollitos (grupo intacto, n = 6) fue capturado directamente de la caja de cría (sin ser administrado con salina o grelina ni expuesto a la prueba de ingesta) e inmediatamente decapitado. Se recogió la sangre

troncal para determinar posteriormente los niveles basales de ACTH y corticosterona.

### Ingesta de Alimentos

Cada pollito se colocó en una caja con comida y agua *ad libitum*. La ingesta de alimentos se midió 30 min inmediatamente después de la inyección de grelina o de la solución salina. El alimento se pesó antes y después de la prueba utilizando una balanza digital (0.01 g). El alimento derramado fuera del comedero fue incluido en los cálculos finales como parte del alimento no ingerido. Al término de la prueba, todos los pollitos fueron decapitados y se extrajo la sangre troncal.

A fin de verificar el sitio de inyección correcto, los prosencéfalos fueron extraídos y fijados en una solución de formaldehído al 4%. Se realizaron cortes coronales usando un micrótopo y se observaron en un microscopio óptico. La marca del sitio de la inyección dejada por el colorante azul de Evans en los cortes coronales sirvió como guía en la verificación. Los pollos que no fueron correctamente inyectados fueron descartados del análisis (Gastón *et al.*, 2015).

### Cuantificación Hormonal

Las muestras de sangre se tomaron entre las 09:00 y las 12:00 h para evitar la variabilidad inespecífica relacionada con las fluctuaciones diurnas en los niveles hormonales circulantes. La sangre troncal se recogió en tubos con 50 ml de EDTA. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1000 × g durante 20 min a 4 °C. El plasma resultante se recolectó en tubos de 1.5 ml que fueron almacenados a -20 °C. Las determinaciones hormonales se realizaron según Gastón *et al.* (2017) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes con algunas modificaciones para el ensayo de corticosterona (Washburn *et al.*, 2002). La concentración plasmática de ACTH se midió a través de un inmunoensayo quimioluminiscente secuencial de dos sitios

(IMMULITE2000, Siemens), con el límite de detección del ensayo de 5 pg/ml y coeficientes de variación intra- e inter-ensayo menor al 10%. Las concentraciones plasmáticas de corticosterona se determinaron mediante un kit de radioinmunoensayo de corticosterona (Corticosterone DoubleAntibody-<sup>125</sup>I RIA Kit, MP Biomedicals), siendo el límite de detección del ensayo de 5 ng/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores al 10%. Este ensayo mostró ser apropiado para la medición de la respuesta adrenocortical en aves (Gastón *et al.*, 2017; Glucs *et al.*, 2018; Washburn *et al.*, 2002). Todas las mediciones se realizaron por triplicado (Gastón *et al.*, 2017).

### Análisis Estadísticos

Los datos de la ingesta de alimentos mostraron una distribución normal con homocedasticidad y se analizaron estadísticamente mediante la prueba t de Student. Estos datos se expresan como la media aritmética  $\pm$  DE. Los datos de ACTH y corticosterona se transformaron logarítmicamente para alcanzar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, y posteriormente se analizaron usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Cuando el ANOVA indicó efectos significativos, se llevó a cabo un análisis *a posteriori* entre las medias individuales de Newman Keuls para comparar los efectos de la grelina sobre los niveles de hormonas plasmáticas. Los datos se expresaron como la media aritmética  $\pm$  DE y en algunos casos, como la mediana y cuartiles.

Se utilizó una correlación de Pearson para examinar la relación entre la ingesta de alimentos y las concentraciones log-transformadas de las hormonas. Cuando se observó una fuerte correlación entre estas dos variables, se llevó a cabo una regresión lineal utilizando la ingesta de alimentos como variable dependiente y la concentración hormonal como variable independiente. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado una diferencia significativa.

## RESULTADOS

Los resultados corroboraron que 30 pmol de grelina intra-MMI inhibieron significativamente la ingesta de alimentos 30 min después de su administración (salina =  $2.96 \pm 1.28$  g, grelina =  $1.40 \pm 0.89$  g,  $t = 2.44$ ,  $p < 0.05$ ). Se encontró un efecto significativo de los tratamientos sobre las concentraciones plasmáticas de ACTH (ANOVA  $F_{2,17} = 7.90$ ;  $p < 0.01$ ). El análisis de Newman-Keuls reveló un aumento significativo en las concentraciones plasmáticas de ACTH en los grupos expuestos a la prueba de ingesta de alimentos en comparación con el grupo intacto (intacto =  $10.64 \pm 4.82$  pg/ml, solución salina =  $274.35 \pm 315.05$  pg/ml, grelina =  $138.66 \pm 212.27$  pg/ml,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, si bien se puede observar una ligera disminución de la concentración de ACTH ocasionada por la administración central de grelina, la diferencia no fue significativa (Figura 1A).

Se encontró un efecto significativo de los tratamientos sobre las concentraciones plasmáticas de corticosterona (ANOVA  $F_{2,17} = 23.79$ ,  $p < 0.0001$ ). El análisis de Newman-Keuls mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los niveles plasmáticos de corticosterona en los grupos expuestos a la ingesta de alimento (salina =  $27.02 \pm 16.71$  ng/ml, grelina =  $78.46 \pm 51.80$  ng/ml) comparados con los no expuestos (intactos =  $5.92 \pm 1.38$  ng/ml). Además, este análisis mostró un aumento significativo en los niveles de corticosterona entre los pollitos inyectados con grelina intra-MMI en comparación con los inyectados con solución salina ( $p < 0.05$ ; Figura 1B).

Las concentraciones plasmáticas totales de ACTH no se correlacionaron con la ingesta total del alimento ( $r = 0.14$ ,  $p = 0.65$ , datos no mostrados). Sin embargo, las concentraciones plasmáticas totales de corticosterona evidenciaron una correlación con el consumo total de alimentos ( $r = -0.92$ ,

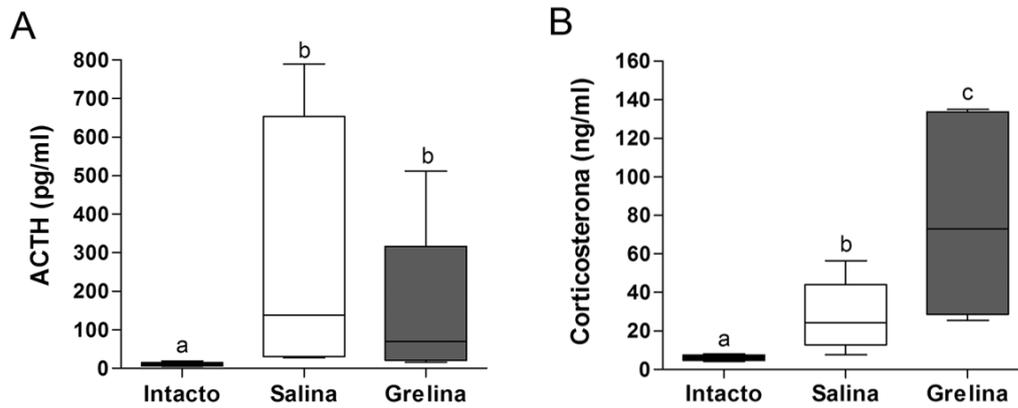


Figura 1. Efecto de la grelina intra-MMI (mesopolio medio e intermedio) sobre las concentraciones plasmáticas de ACTH (A) y corticosterona (B) durante una tarea de ingesta de alimento de pollos de 4-6 días de edad. El cuadro representa los cuartiles 25-75, la línea horizontal dentro del cuadro representa la mediana y las barras indican los valores mínimo y máximo (n=6 por grupo). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

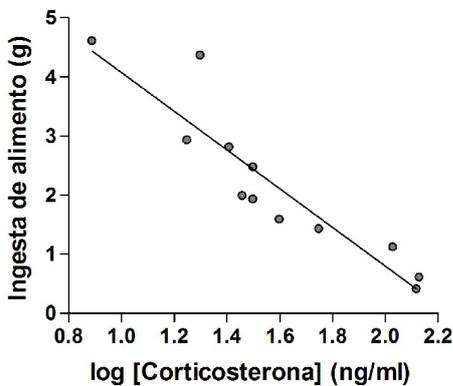


Figura 2. Relación negativa entre las concentraciones plasmáticas de corticosterona y la ingesta total de alimentos 30 min posteriores a la inyección intra-MMI de grelina (n=12). Regresión lineal,  $y = (7.34 \pm 0.70) + (-3.27 \pm 0.43) x$

$p < 0.0001$ ). La regresión lineal mostró una relación negativa significativa ( $R^2 = 0.85$ ,  $p < 0.001$ ) entre la ingesta de alimentos y los niveles plasmáticos de corticosterona (Figura 2).

## DISCUSIÓN

Se demostró que la anorexia inducida por 30 pmol de grelina intra-MMI estuvo relacionado con la activación adrenocortical a los 30 min de la inyección. Además, se observó una correlación negativa entre la ingesta de alimentos y los niveles plasmáticos de corticosterona.

Se observó un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona luego de la prueba de ingesta de alimentos respecto de aquellos no expuestos al alimento (grupo intacto). Ya se había reportado que el método de inyección intra-MMI no induce cambios significativos en los niveles basales de ACTH o corticosterona (Gastón *et al.*, 2017); resultados similares fueron publicados para el procedimiento de administración icv de grelina (Furuse *et al.*, 1999). Por lo tanto, el aumento de las concentraciones de ambas hormonas por activación del eje HPA en aves, podría estar asociado al ayuno, al cual podría adicionarse el

aislamiento y la neofobia inducidos por las condiciones de prueba de ingesta de alimentos (Jones y Merry, 1988; Salvatierra *et al.*, 2009; Lynn *et al.*, 2010; Krause *et al.*, 2017).

La neofobia, que fuera primariamente descrito en mamíferos, es la inhibición de la alimentación debido a una situación novedosa (*novelty*) que comprende la inhibición ante un alimento nuevo (neofobia alimentaria) y también la situación no familiar de la prueba comportamental (neofobia del aparato) (Stephens, 1973). La neofobia también ha sido descrita en aves domésticas (Murphy, 1997). Por lo tanto, el contexto social, ambiental y la prueba de ingesta de alimentos *per se* pueden haber inducido cambios en la reactividad emocional de los pollos, que se evidencia en las diferencias significativas de los niveles de la hormona pituitaria-suprarrenal entre pollitos expuestos y no expuestos (grupo intacto) a la tarea de ingesta de alimentos. Recientemente, Shojaei *et al.* (2020) expresaron que la regulación de la ingesta de alimentos es un proceso fisiológico complejo que está bajo el control de señales centrales y ambientales.

La grelina intra-MMI indujo una disminución significativa en la ingesta de alimentos y, a la vez, un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de corticosterona respecto al grupo inyectado con salina, sin cambios significativos en los niveles plasmáticos de ACTH. Además, los altos niveles de corticosterona en plasma afectaron negativamente la ingesta de alimentos en los pollitos. Se conoce que el SNC juega un papel fundamental en la regulación de la conducta alimentaria en las aves, siendo el hipotálamo el área central de control (Tachibana y Tsutui, 2016; Wang *et al.*, 2019). En concordancia, se observó que la administración icv de la hormona liberadora de la corticotropina aumentó los niveles de corticosterona plasmática (Furuse *et al.*, 1997) e inhibió la ingesta de alimento en pollos parrilleros y ponedoras adultas hasta 3 h pos-inyección (Denbow *et al.*, 1999).

Por otro lado, Saito *et al.* (2005) demostraron que la anorexia inducida por grelina se atenúa mediante la administración conjunta de grelina y astresina (antagonista del receptor de CRH de tipo 2) en pollitas ponedoras. Además, la administración icv de ACTH disminuye la ingesta de alimento en los pollos, lo que se asocia con una activación hipotalámica y una disminución en la expresión del ARNm hipotalámico de varios factores orexigénicos, como AgRP, orexina y R-MC1 (Shipp *et al.*, 2015). Las hormonas adrenocorticales no solo están relacionadas con los efectos centrales anorexigénicos de varios péptidos en pollos (Tachibana y Tsutui, 2016), sino también con una disminución del paso de alimentos por el tracto digestivo superior (Ogino *et al.*, 2014, 2016; Tur *et al.*, 1989). Dado que la activación suprarrenal produce una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la glándula pituitaria, los resultados del presente estudio sugieren que la grelina puede desencadenar la activación del eje HPA, provocando un efecto anorexigénico en los pollitos.

El MMI es un área de integración sensorial multimodal (equivalente a la corteza aviar) que tiene un papel bien definido en el procesamiento de la memoria en los pollos (Csillag, 1999; Gibbs, 2008). Además, el MMI podría ser un sitio importante de acción de la grelina en respuesta a un estresor agudo con una interacción funcional compleja entre la neurotransmisión GABA-A y el eje HPA (Gastón *et al.*, 2015, 2017). Los circuitos neuronales que controlan la alimentación y los comportamientos emocionales están conectados de manera intrincada y recíproca (Sweeney y Yang, 2017) y la evidencia previa ha indicado que los sistemas serotoninérgico y 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pueden ser parte de los mecanismos que modulan el efecto anorexigénico de la grelina en las aves (Zhang *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2011; Lei y Lixian, 2012; Zendejdel *et al.*, 2013). Así, se propone que los circuitos neuroendócrinos entre el MMI y el eje HPA podrían estar re-

gulado tanto la acción ansiogénica de la grelina (Gastón *et al.*, 2017) como así también su efecto hipofágico que sugiere una conectividad recíproca entre el control de la alimentación y las conductas emocionales (Sweeney y Yang, 2017).

En conclusión, el eje HPA podría constituir la última etapa del sistema que se inicia en las vías anorexigénicas neuronales superiores involucradas en la acción de la grelina en pollos de pocos días de nacidos. Sin embargo, no se puede descartar que los mecanismos subyacentes implicados en la anorexia inducida por la grelina y el comportamiento de ansiedad puedan actuar, en algunos casos, a través de diferentes vías.

#### LITERATURA CITADA

1. **Atoji Y, Karim MR. 2014.** Homology of the *mesopallium* in the adult chicken identified by gene expression of the marker chole cystokinin. *Neurosci Lett* 562: 85-89. doi: 10.1016/j.neulet.2014.-01.011
2. **Bradley P, Davies Dc, Horn G 1985.** Connections of the *hyperstriatum ventrale* of the domestic chick (*Gallus domesticus*). *J Anat* 140: 577-589.
3. **Cabral A, Suescun O, Zigman JM, Perello M. 2012.** Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PLoS One* 7: e31462. doi: 10.1371/journal.pone.0031462
4. **Cabral A, Portians E, Sánchez-Jaramillo E, Zigman JM, Perello M. 2016.** Ghrelin activates hypophysiotropic corticotropin-releasing factor neurons independently of the arcuate nucleus. *Psychoneuroendocrine* 67: 27-39. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.01.027
5. **Carlini VP, Varas MM, Cragnolini AB, Schiöch HB, Scimonelli TN, Barioglio SR. 2004.** Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 635-641. doi: 10.1016/j.bbrc.-2003.11.150
6. **Carvajal P, Carlini VP, Schiöch HB, De Barioglio SR, Salvatierra NA. 2009.** Central ghrelin increases anxiety in the Open Field test and impairs retention memory in a passive avoidance task in neonatal chicks. *Neurobiol Learn Mem* 91: 402-407. doi: 10.1016/j.nlm.-2008.12.008.
7. **Csillag A. 1999.** Striato-telencephalic and striato-tegmental circuits: relevance to learning in domestic chicks. *Behav Brain Res* 98: 227-236. doi: 10.1016/s0166-4328(98)00088-6
8. **Davis JL, Masuoka DT, Gerbrandt LK, Cherkin A. 1979.** Autoradiographic distribution of L-proline in chicks after intracerebral injection. *Physiol Behav* 22: 693-695. doi: 10.1016/0031-9384(79)-90233-6
9. **Denbow DM, Snapir N, Furuse M. 1999.** Inhibition of food intake by C RF in chickens. *Physiol Behav* 66: 645-649. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00340-0
10. **Furuse M, Ando R, Bungo T, Ao R, Shimojo M, Masuda Y. 1999.** Intracerebroventricular injection of orexins does not stimulate food intake in neonatal chicks. *Brit Poultry Sci* 40: 698-700. doi: 10.1080/00071669987115
11. **Furuse M, Matsumoto M, Saito N, Sugahara K, Hasegawa S. 1997.** The central corticotropin-releasing factor and glucagon-like peptide-1 in food intake of the neonatal chick. *Eur J Pharmacol* 339: 211-214. doi: 10.1016/s0014-2999(97)-01391-5
12. **Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, Ando R, Yoshimatsu T, Denbow DM. 2001.** Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett* 301: 123-126. doi: 10.1016/s0304-3940(01)01621-4
13. **Gastón MS, Cid MP, Salvatierra NA. 2017.** Bicuculline, a GABAA-receptor antagonist, blocked HPA axis activation

- induced by ghrelin under an acute stress. *Behav Brain Res* 320: 464-472. doi: 10.1016/j.bbr.2016.10.035
14. **Gastón MS, Schiöch HB, De Barioglio Sr, Salvatierra NA. 2015.** Gabaergic control of anxiety-like behavior, but not food intake, induced by ghrelin in the intermediate medial *mesopallium* of the neonatal chick. *Horm Behav* 67: 66-72. doi: 10.1016/j.yhbeh.2014.11.015.
  15. **Gibbs ME. 2008.** Memory systems in the chick: Regional and temporal control by noradrenaline. *Brain Res Bull* 76: 170-182. doi: 10.1016/j.brainresbull.-2008.02.021
  16. **Jarvis ED, Güntürkün O, Bruce L, Csillag A, Karten H, Kuenzel W, Medina L, et al. 2005.** Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nature Rev Neurosci* 6: 151-159. doi: 10.1038/nrn1606
  17. **Jonaidi H, Abbassi L, Yaghoobi MM, Kaiya H, Denbow DM, Kamali Y, Shojaei B. 2012.** The role of GABAergic system on the inhibitory effect of ghrelin on food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett* 520: 82-86. doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.036
  18. **Jones BR, Merry BJ. 1988.** Individual or paired exposure of domestic chicks to an open field: some behavioral and adrenocortical consequences. *Behav Processes* 16: 75-86. doi: 10.1016/0376-6357(88)90019-8
  19. **Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S. 2008.** Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A* 149: 109-128. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.12.004
  20. **Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. 1999.** Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660. doi: 10.1038/45230
  21. **Krause JS, Pérez JH, Meddle SL, Wingfield JC. 2017.** Effects of short-term fasting on stress physiology, body condition, and locomotor activity in wintering male white-crowned sparrows. *Physiol Behav* 177: 282-290. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.04.026
  22. **Kuenzel WJ, Masson MA. 1988.** Stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press. 152 p.
  23. **Lei L, Lixian Z. 2012.** Effect of 24 h fasting on gene expression of AMPK, appetite regulation peptides and lipometabolism related factors in the hypothalamus of broiler chicks. *Asian Austral J Anim Sci* 25: 1300-1308. doi: 10.5713/ajas.2012.12153
  24. **Lynn SE, Stamplis TB, Barrington WT, Weida N, Hudak CA. 2010.** Food, stress, and reproduction: short-term fasting alters endocrine physiology and reproductive behavior in the zebra finch. *Horm Behav* 58: 214-222. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.015
  25. **Murphy LB. 1997.** Responses of domestic fowl to novel food and objects. *Appl Anim Ethol* 3: 335-349. doi: 10.1016/0304-3762(77)90058-X
  26. **Oc<sup>3</sup>oñ E, Pietras M. 2011.** Peripheral ghrelin inhibits feed intake through hypothalamo-pituitary-adrenal axis-dependent mechanism in chicken. *J Anim Feed Sci* 20: 118-130. doi: 10.22358/jafs/66163/2011
  27. **Ogino M, Okumura A, Khan MS, Cline MA, Tachibana T. 2014.** Comparison of brain urocortin-3 and corticotrophin-releasing factor for physiological responses in chicks. *Physiol Behav* 125: 57-61. doi: 10.1016/j.physbeh.2013.-11.006
  28. **Ogino M, Khan MSI, Cline MA, Tachibana T. 2016.** Acute injections of corticosterone, norepinephrine and epinephrine retards food passage in the crop of chicks. *Gen Comp Endocr* 225: 155-161. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.-10.015
  29. **Petrovich GD. 2011.** Forebrain circuits and control of feeding by learned cues. *Neurobiol Learn Mem* 95: 152-158. doi: 10.1016/j.nlm.2010.10.003

30. **Saito ES., Kaiya H, Tachibana T, Tomonaga S, Denbow DM, Kangawa K, Furuse M. 2005.** Inhibitory effect of ghrelin on food intake is mediated by the corticotropin releasing factor system in neonatal chicks. *Regul Peptides* 125: 201-208. doi: 10.1016/j.regpep.-2004.09.003
31. **Salvatierra NA, Cid MP, Arce A. 2009.** Neonatal acute stress by novelty in the absence of social isolation decreases fearfulness in young chicks. *Stress* 12: 328-335. doi: 10.1080/10253890-802455433
32. **Shipp SL, Yi J., Dridi S, Gilbert ER, Cline, MA. 2015.** The central anorexigenic mechanism of adrenocorticotrophic hormone involves the caudal hypothalamus in chicks. *Neuropeptides* 53: 29-35. doi: 10.1016/j.npep.2015.-07.005
33. **Shojaei M, Yousefi RA, Zendehtdel M, Khodadadi M. 2020.** Food intake regulation in birds: the role of neurotransmitters and hormones. *Iran J Vet Med* 14: 99-114. doi: 10.22059/IJVM.2019.285059.1005006
34. **Singletary KG, Deviche P, Strand C, Delville Y. 2006.** Distribution of orexin/hypocretin immunoreactivity in the brain of a male songbird, the house finch, *Carpodacus mexicanus*. *J Chem Neuroanat* 32: 81-89. doi: 10.1016/j.jchemneu.2006.05.003
35. **Spencer SJ, Emmerzaal TL, Kozicz T, Andrews ZB. 2015.** Ghrelin's role in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress response: implications for mood disorders. *Biol Psychiat* 78: 19-27. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.10.021
36. **Stephens RJ. 1973.** Proceedings: The influence of mild stress on food consumption in untrained mice and the effect of drugs. *Brit J Pharmacol* 49: 146.
37. **Sweeney P, Yang Y. 2017.** Neural circuit mechanisms underlying emotional regulation of homeostatic feeding. *Trends Endocrin Met* 28: 437-448. doi: 10.1016/j.tem.2017.02.006
38. **Tachibana T, Tsutsui K. 2016.** Neuropeptide control of feeding behavior in birds and its difference with mammals. *Front Neurosci-Switz* 10: 485. doi: 10.3389/fnins.2016.00485
39. **Tur J, Esteban S, Rayó JM, Moreno M, Miralles A, Tur JA. 1989.** Effect of glucocorticoids on gastrointestinal emptying in young broilers. *Brit Poultry Sci* 30: 693-698. doi: 10.1080/00071668908417192
40. **Wang J, Matias J, Gilbert ER., Tachibana T, Cline MA. 2019.** Hypothalamic mechanisms associated with corticotropin-releasing factor-induced anorexia in chicks. *Neuropeptides* 74: 95-102. doi: 10.1016/j.npep.-2019.01.003
41. **Waterson MJ, Horvath TL. 2015.** Neuronal regulation of energy homeostasis: beyond the hypothalamus and feeding. *Cell Metab* 22: 962-970. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.026
42. **Wren AM, Small CJ., Fribbens CV., Neary NM., Ward HL., Seal LJ, Ghatei MA, Bloom SR. 2002.** The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* 76: 316-324. doi: 10.1159/000066629
43. **Xu P, Siegel PB., Denbow DM. 2011.** Genetic selection for body weight in chickens has altered responses of the brain's AMPK system to food intake regulation effect of ghrelin, but not obestatin. *Behav Brain Res* 22: 216-226. doi: 10.1016/j.bbr.2011.02.034
44. **Zendehtdel M, Mokhtarpouriani K, Hamidi F, Montazeri R. 2013.** Intracerebroventricular injection of ghrelin produces hypophagia through central serotonergic mechanisms in chicken. *Vet Res Commun* 37: 37-47. doi: 10.1007/s11259-012-9544-8
45. **Zhang R, Tachibana T, Takagi T, Koutoku T, Denbow DM, Furuse M. 2004.** Serotonin modifies corticotropin-releasing factor-induced behaviors of chicks. *Behav Brain Res* 151: 47-52. doi: 10.1016/j.bbr.2003.08.005