

Tiago Souza dos Santos

**O PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT1A NAS RESPOSTAS
INGESTIVAS E HIPNOGÊNICA PROVOCADAS PELA
INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE SEROTONINA
EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*): DISCRIMINAÇÃO ENTRE
RECEPTORES PRÉ E PÓS-SINÁPTICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Tiago Souza dos Santos

O papel dos receptores 5-HT1A nas respostas ingestivas e hipnogênicas provocadas pela injeção intracerebroventricular de serotonina em pombos (*Columba livia*): discriminação entre receptores pré e pós-sinápticos / Tiago Souza dos Santos ; orientador, José Marino Neto Marino Neto - Florianópolis, SC, 2014.

140 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Serotonina. 3. Aves. 4. Ingestão de alimento. 5. Receptor 5-HT1A. I. Marino Neto, José Marino Neto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

TIAGO SOUZA DOS SANTOS

**“O PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT1A NAS
RESPOSTAS INGESTIVAS E HIPNOGÊNICA
PROVOCADAS PELA INJEÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE SEROTONINA
EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*): DISCRIMINAÇÃO
ENTRE RECEPTORES PRÉ E PÓS-SINÁPTICOS”.**

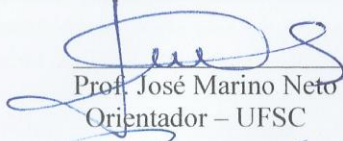
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2014.



Prof. Rodrigo Bamy Leal
Coordenador do Curso

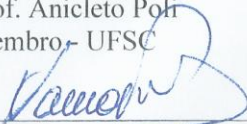
Banca Examinadora:



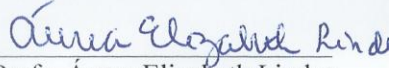
Prof. José Marino Neto
Orientador – UFSC



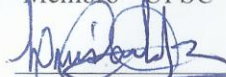
Prof. Anicleto Poli
Membro - UFSC



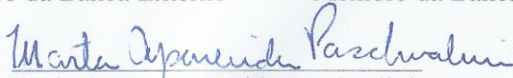
Prof. Laura Marta Vivas
Membro da Banca Externo



Prof. Áurea Elizabeth Linder
Membro - UFSC



Prof. Luis Carlos Reis
Membro da Banca Externo



Prof. Marta Aparecida Paschoalini
Membro - UFSC

*À minha esposa, Fernanda. A mulher que tanto amo, e que sempre
acreditou.*

AGRADECIMENTOS

Acredito que este seja um trabalho raro por dois motivos:

a) é difícil encontrar gente suficientemente louca para investigar os efeitos de um grupo de neurônios que ficam escondidos na base do encéfalo e que, quando não estão funcionando direito, deixam você ou gordo ou deprimido ou eufórico ou ansioso ou satisfeito. Bom, dependendo da gravidade da disfunção, estes neurônios podem te deixar somente gordo; ou eufórico; ou, na melhor das hipóteses, somente ansioso. Claro, se você não for um cara de sorte, você provavelmente já é, foi ou vai ser, gordo, depressivo, ansioso, eufórico, mas pra botar um pouco de alegria na sua vida, satisfeito.

b) não é todo dia que o filho de um pedreiro com uma diarista vira doutor. Bom, acredito que se existissem mais pais pedreiros e, mães diaristas que se dedicassem à educação dos filhos tanto quanto os meus pais se dedicaram, o fato de eu ter chegado até aqui, não seria uma raridade. Obrigado mãe, obrigado pai.

Bom, durante os sete anos que estive em Florianópolis conheci muita gente legal. Que me ajudaram bastante, trabalharam e beberam comigo e tornaram a minha vida mais palatável. A lembrança mais antiga que eu tenho do meu tempo na pós, foi quando eu estava longe dali e li a resposta do prof. Marino ao meu email. Ele dizia que me aceitava como estagiário. Bom, acredito que, nem quando eu defendi a minha tese eu fiquei tão feliz quanto naquela noite. Sabia que ali eu começava a realizar um grande sonho, ser um cientista. Tive a sorte de ser bem guiado. Professor, obrigado por tudo. Aprendi muito nestes sete anos, desde as primeiras lições no estatística (eu tentava acompanhar, juro!, mas não dava) às epifanias sobre como um fisiologista deve encarar o cérebro. Aprendi também que devo sempre pensar antes de falar e verificar a voltagem do microondas e da impressora antes de plugar na tomada. Na verdade sei que não estou saindo, mas tirando uma licença do lab., então, vou parar de agradecer por aqui, pois sei que vou pedir muito ainda.

Alexandre meu velho amigo, mentor e companheiro de tantos finais de semana de experimentos, congressos (desde a folia da primeira Fesbe em Águas de Lindóia, à nossa seção de poster regada a muita Guinness em Dublin); devo te dizer meu velho que se não fosse tua ajuda no começo de tudo, a minha vida teria sido muito mais difícil.

Fernando, meu guru para tantos assuntos, desde os (d) eclesiásticos aos mais mundanos possíveis. Tua companhia ao longo deste tempo todo sempre foi um sopro de erudição e certeza de um bom e longo (às vezes o quanto durasse o café ou um cigarro) papo sobre ciência, filosofia, unicórnios, música do demônio e intermináveis e sempre instrutivas aulas de biologia.

Todas as meninas que me ajudaram e fizeram a maior parte do serviço bruto, Marília, Marina, e por último, a insólita e destemida Jéssica, sempre assustada, atenta e pronta. Obrigado meninas!

As mulheres do lab, Natália, Myla, Michele que além de colegas se tornaram importantes amigas e me proporcionaram momentos bastante divertidos e tornaram a vida do lab mais iluminada e sei que, agora como madrinhas, estarão sempre por perto.

Meus grandes amigos e padrinhos, William, Ângeluz e Washington. Se eu fosse destacar três grandes “achados” deste tempo todo que passei em Floripa, de certeza foram vocês. Sempre por perto, seja para cervejas ou churrascos, seja para me ajudar (com casa, grana, carona, auxílio técnico especializado, etc) ou para se divertir, sempre soube que podia contar vocês e serei sempre grato.

Professora Cilene, ou simplesmente Ci, sempre atenciosa e ansiosa em discutir desde farmacologia até os papos mais inusitados em todos os momentos descontraídos pelos bares que pudemos beber umas geladas com a galera.

Nivaldo, sempre disposto e eficiente. Neste tempo todo foi de longe uma das pessoas que mais me ajudou resolvendo problemas impossíveis em tempos recordes e com aquela velha cordialidade de sempre. Ainda te devo várias cervejas.

Professor Anicleto, o cara mais paciente, dedicado e preocupado em resolver problemas dos outros que eu conheci. Obrigado

professor por toda disponibilidade e dedicação neste curto tempo que trabalhamos juntos. Foi um imenso prazer!

Obrigado também a todos os professores do curso de Neurociências, farmacologia, ao pessoal dos laboratórios, Demétrio que além de me ajudar com o microscópio de fluorescência se tornou um bom amigo; Galera da Fisiologia, Anderson, Eduardo, Rafa e muito mais gente legal que sempre me ajudaram. Seu Carlos, D. Vilma, sempre simpáticos e atenciosos. Jô e Marquinhos, sempre cuidando dos nossos pombos.

As diversas fontes de financiamento que tornaram possível todos estes meus anos de trabalho (CNPq, CAPES, REUNI, o programa Ciências sem Fronteiras), a IBRO (International Brain Research Organization), que através de suas iniciativas me permitiu conhecer grandes cientistas, países legais e ampliar o meu conceito de neurociências.

O professor Onur Güntürkün, um cara super especial e divertido que me aceitou como aluno de doutorado sanduíche e foi sempre atencioso e me ajudou bastante no tempo que eu estava em seu lab na Alemanha.

Os grandes amigos que fiz naquele país frio e com cervejas maravilhosas, o turco, Emre, o eslovaco, Martin, e o espanhol, Álvaro que dividiram comigo muitas noites regadas a cerveja e costela!

E por últimos, Fernanda, minha esposa. Durante muito tempo eu dediquei a minha tese e ao lab mais atenção do que eu dediquei a você. Desculpa por todos os momentos que fiquei longe, principalmente naqueles momentos em que estava ao seu lado e minha mente estava longe. Obrigado por toda a ajuda, todas discussões, idéias e palpites, puxões de orelha e sacudidas. Tive a sorte em te encontrar ainda no começo disso tudo e me sinto muito, muito feliz e mais seguro por saber que tenho você comigo. Te amo gatinha!

Pneumotórax

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.

A vida inteira que podia ter sido e que não foi.

Tosse, tosse, tosse.

Mandou chamar o médico:

- Diga trinta e três.

- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...

- Respire.

- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.

- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?

- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.

Manuel Bandeira

Resumo

Introdução: diversos estudos demonstram que os circuitos serotoninérgicos inibem a ingestão de alimentos e o sono em aves e mamíferos. A injeção intracerebroventricular (ICV) de 5-HT em pombos, entretanto, provoca efeitos diferentes: aumento na ingestão de água e na duração do sono. Nós associamos estas respostas à atuação de receptores 5-HT_{1A}, pois a ativação destes receptores produz respostas similares. No entanto, os receptores 5-HT_{1A} podem estar localizados no neurônio serotoninérgico (autorreceptores) ou em outros neurônios (heterorreceptores). Dependendo da sua localização, a ativação destes receptores produz efeitos diferentes. Portanto, o nosso objetivo foi avaliar a participação dos receptores 5-HT_{1A} nas respostas dipsogênica e hipnogênica provocadas pela 5-HT, na tentativa de especificar as respostas desencadeadas pela 5-HT à atuação de auto ou heterorreceptores. **Métodos:** os animais (pombos adultos, *Columba livia*, de ambos os sexos, pesando entre 400-550 g) foram divididos em 5 grupos/experimentos diferentes. Experimento 1: 16 pombos foram divididos em dois grupos de acordo com o pré-tratamento e receberam: MM77 (antagonista de heterorreceptores 5-HT_{1A}; 0, 23 ou 69 nmol), ou WAY100635 (WAY, antagonista de auto e heterorreceptores 5-HT_{1A}; 0, 0,1, 0,3 ou 1 nmol) e 20 min. após foram tratados com 5-HT (50 e 150 nmol) ou 8-OH-DPAT (30 nmol; agonista de receptores 5-HT_{1A/7}). Logo após o tratamento, o registro comportamental começou e a ingestão de alimentos foi verificada 60 min. após a última injeção. Experimento 2: 12 pombos foram divididos em 2 grupos e submetidos à cirurgia para injeção ICV (bilateral) da neurotoxina de neurônios serotoninérgicos 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT, 200µg/injeção) ou de seu veículo. Após 12 dias, os animais começaram a ser testados com 5-HT (150 nmol), 8-OH-DPAT (30 nmol) ou veículo (ácido ascórbico 1% em NaCl 0,9%) com intervalo de 7 dias entre as injeções. Estes animais foram mortos 28 dias após a cirurgia e o conteúdo encefálico de 5-HT foi analisado para verificar os efeitos da lesão. Adicionalmente, nós utilizamos outros 18 animais divididos em três grupos, a) 6 animais naïve que foram mortos para servir como controle para os níveis basais de 5-HT e outros dois grupos (N: 6/grupo) que foram submetidos à cirurgia (injeção de 5,7-DHT ou do veículo) e perfundidos 12 dias após a cirurgia para verificar os efeitos da toxina sobre a densidade de neurônios serotoninérgicos. Experimento 3: Secções do tronco e do hipotálamo de 6 animais não submetidos a qualquer manipulação

experimental foram processados pela técnica de autorradiografia para detectar a distribuição dos sítios de ligação ao agonista tritiado [3H] 8-OH-DPAT. Experimento 4: 15 pombos com cânulas guia direcionadas ao ventrículo lateral direito foram divididos em 3 grupos e tratados com: 8-OH-DPAT (30 nmol) e tiveram livre acesso (N:5) ou foram privados de água após a injeção (N:5) e veículo (N:5). 90 min. após a injeção os animais foram perfundidos e as secções do tronco encefálico processadas para detecção da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos, e secções do hipotálamo processadas para detectar somente a expressão da proteína Fos. Experimento 5: 10 pombos com cânulas guia direcionadas ao ventrículo lateral direito foram divididos em 3 grupos e tratados com: 5-HT (150 nmol) e tiveram livre acesso (N:5) ou foram privados de água após a injeção (N:5). 90 min. após, os animais foram perfundidos e secções contendo o hipotálamo foram processadas para a detecção da proteína Fos. **Resultados:** tanto a 5-HT como o 8-OH-DPAT provocaram intensa ingestão de água e aumento na duração do sono. O 8-OH-DPAT ainda aumentou a ingestão de alimento. Os efeitos ingestivos e hipnogênico dos tratamentos foram parcial ou totalmente afetados pelos antagonistas evidenciando a participação dos receptores 5-HT1A nas alterações comportamentais provocadas pela 5-HT. Entretanto, os dados farmacológicos não nos permitiram especificar entre a ação de auto ou heterorreceptores, mas indicam que a interação entre os dois receptores parece ser um importante aspecto do controle exercido pelos circuitos serotoninérgicos sobre os comportamentos ingestivos. Apesar de diminuir drasticamente a densidade de neurônios serotoninérgicos, a lesão não afetou as alterações provocadas pelos tratamentos o que sugere que em animais com a função serotoninérgica prejudicada, receptores 5-HT1A localizados em neurônios não serotoninérgicos parecem ser os responsáveis pelos efeitos dos tratamentos. Além disso, os antagonistas e a lesão dos neurônios serotoninérgicos também aumentaram o sono dos animais indicando um efeito inibitório tônico dos neurônios serotoninérgicos sobre o sono. Os tratamentos também aumentaram a atividade Fos em regiões hipotalâmicas ricas em receptores 5-HT1A e que parecem estar envolvidas com o controle da ingestão de alimento, dos fluídos corporais e do sono. **Conclusão:** As respostas dipsogênica e hipnogênica desencadeadas pela injeção de 5-HT parecem ser mediadas parcialmente tanto por auto como por heterorreceptores 5-HT1A. Aparentemente, estas respostas são mediadas por receptores 5-HT1A localizados em estruturas encefálicas (no tronco e no hipotálamo) envolvidas com o controle dos comportamentos ingestivos e de sono em aves. Nossos

resultados revelaram sutis diferenças na atividade celular produzidas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT que sugerem que outros receptores serotoninérgicos também participam das respostas comportamentais organizadas pela 5-HT. Além disso, os resultados obtidos com a lesão sugerem que os receptores 5-HT1A parecem apresentar diferenças funcionais espécie-específicas, o que pode ser reflexo de diferentes pressões seletivas experimentadas por aves e mamíferos ao longo da evolução dos vertebrados.

Palavras chave:Serotonina. Receptor 5-HT1A. Comportamentos ingestivos. Ciclo sono e vigília. Pombos.

Abstract

Introduction: several studies have demonstrated the inhibitory role of serotonergic circuits on ingestive and sleep behaviors both in mammals and birds. Intracerebroventricular (ICV) injections of serotonin (5-HT), however, evoked opposite effects: increased water intake and sleep. We associated these responses to 5-HT_{1A} receptors, because the activation of these receptors caused similar responses. However, the 5-HT_{1A} receptor is located on serotonergic neurons (as autoreceptor) as well as on different neurons (as heteroreceptor), and produces different effects based on its location. Therefore, we decided to investigate the participation of 5-HT_{1A} receptor on dipsogenic and hypnogenic 5-HT-mediated responses to try discriminate the role of auto and heteroreceptors. **Methods:** the animals (adult pigeons, *Columba livia*, both sex, 400-550g of body weight) were divided in 5 groups. Each group represented one different experiment. Experiment 1: 16 pigeons were divided in two groups according on the antagonist used as pretreatment and were injected with: MM77 (0, 23 or 69 nmol, heteroreceptor antagonist), or WAY100635 (WAY, 0, 0.1, 0.3 or 1 nmol, 5-HT_{1A} auto and heteroreceptor antagonist) and 20 min. afterwards injected with 5-HT (0, 50 or 150 nmol) or 8-OH-DPAT (30 nmol). The animals behaviors were registered during the first hour after the last injection and the food and water intake was evaluated at the end of this period. Experiment 2: 12 pigeons were divided in 2 groups and were stereotaxically implanted with an ICV cannula guide (bilateral) to receive the serotonergic neurotoxin 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT, 200µg/injection) or its vehicle. Past 12 days the tests with 5-HT (150 nmol), 8-OH-DPAT (30 nmol) or vehicle (1% ascorbic acid in 0.9 NaCl) started, with seven days apart each other. These animals were killed 28 days after the surgery and the encephalic levels of 5-HT were analysed to verify possible degenerative effects of 5,7-DHT. Moreover, we used other 18 animals divided in three groups, a) six naïve pigeons that were killed to be used as reference of the basal levels of 5-HT and another 2 groups that were inject with 5,7-DHT (N: 6) or its vehicle (N:6) and were perfused 12 days later to verify the 5,7-DHT effects on serotonergic neurons. Experiment 3: six naïve pigeons were killed and had their brains dissected and brainstem and hypothalamic sections reacted by autoradiographic approach to demonstrate the distribution of 5-HT_{1A} binding sites with the selective radioligand [³H] 8-OH-DPAT. Experiment 4: 15 pigeons with ICV cannula guide implanted were divided in three groups and treated with: 8-OH-DPAT (30 nmol) with

free (N:5) or without access to water after the injection (N:5), and vehicle (N:5). 90 min. later the animals were perfused and brainstem sections reacted to detect Fos protein expression in serotonergic and in non-serotonergic neurons, and hypothalamic sections processed to detect Fos activation. Experiment 5: 10 pigeons with ICV cannula guide implanted were divided in three groups and treated with: 5-HT (150 nmol) with free (N:5) or without access to water after the injection (N:5). 90 min. later the animals were perfused and hypothalamic sections processed to detect the Fos activation. **Results:** both 5-HT and 8-OH-DPAT evoked huge increase in water intake and sleep duration. The 8-OH-DPAT injection also produce hyperphagic responses. The ingestive and hypnogenic effects of the treatments were partially or totally inhibited by the antagonists, suggesting the participation of 5-HT_{1A} receptors on behavioral changes produced by 5-HT. However, the pharmacologic data did not permit specify between the action of 5-HT_{1A} auto or heteroreceptors, but indicate the interaction between these two receptors as an important aspect of serotonergic control upon ingestive behavior. Besides its impressive effects on serotonergic neurons density, the 5,7-DHT lesion did not affect the behavioral changes caused by the treatments, suggesting that in animals with anormal serotonergic function, 5-HT_{1A} receptors located in non-serotonergic neurons seem to be related to the treatments effects. Additionally, the antagonists and the 5,7-DHT lesion increased the sleep, indicating one tonic inhibitory effect of serotonergic circuits on sleep. The treatments also increased the Fos protein activation in hypothalamic regions with high 5-HT_{1A} binding sites density that seem to be involved with food, body fluid and sleep regulation. **Conclusion:** the dipsogenic and hypnogenic responses evoked by 5-HT seem to be mediated partially by both 5-HT_{1A} auto and heteroreceptors. Apparently, these responses are regulated by 5-HT_{1A} receptors located on encephalic (hypothalamic and brainstem) regions directly or indirectly involved with ingestive and sleep/wake cycle regulation in birds. Our results also indicate small differences in the neuronal activity evoked by 5-HT and by 8-OH-DPAT suggesting that other serotonergic receptor also participate in behavioral responses organized by 5-HT. Moreover, the results produced by 5,7-DHT lesion indicate that 5-HT_{1A} receptors seem present specie-specific functional differences that could represent different seletive pressions experimented by birds and mammal during vertebrate evolution.

Keywords: Serotonin. 5-HT_{1A} receptor. Ingestive behavior. Sleep/wake cycle. Pigeon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) fotomicrografia com os diferentes padrões de marcação analisados. B) esquema de um corte coronal demonstrando os núcleos serotoninérgicos da ponte medial onde a expressão da proteína Fos foi quantificada e, C) esquema de um corte coronal demonstrando os núcleos serotoninérgicos da região mesencefálica anterior onde a expressão da proteína Fos foi quantificada.....	61
Figura 2: esquema de cortes coronais de encéfalo de pombo demonstrando os núcleos hipotalâmicos e demais estruturas prosencefálicas onde a expressão da proteína Fos foi quantificada.....	62
Figura 3: esquema dos grupos experimentais dos animais submetidos à lesão pela 5,7-DHT e do tratamento com a 5-HT e com o 8-OH-DPAT.....	64
Figura 4: esquema de dissecação das estruturas encefálicas para a análise do conteúdo de 5-HT, NA e seus metabólitos no tronco, no hipotálamo, no hipocampo e no arcopálio.....	66
Figura 5: alterações provocadas pela 5-HT sobre a ingestão de água, ingestão de alimento e sono em pombos livremente alimentados e, os efeitos do pré-tratamento com os antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} pré e pós-sináptico (WAY100635), e pós-sináptico (MM77) sobre os efeitos da 5-HT.....	79
Figura 6: alterações provocadas pelo 8-OH-DPAT (DPAT) sobre a ingestão de água, de alimento e sobre o sono em pombos livremente alimentados e, os efeitos do pré-tratamento com os antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} pré e pós-sináptico (WAY), e pós-sináptico (MM77) sobre os efeitos do DPAT.....	81
Figura 7: fotomicrografias demonstrando o efeito da toxina 5,7-DHT sobre os neurônios a expressão de neurônios TPH+. E esquemas indicando a coordenada da secção analisada e os quadrados indicam a região do núcleo representativa da fotomicrografia.....	83
Figura 8: efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT sobre a ingestão de água, alimento e sobre o sono de animais submetidos a lesão dos neurônios serotoninérgicos pela injeção da toxina 5,7-DHT (DHT) ou sham, animais injetados com o veículo da 5,7-DHT.....	84
Figura 9: painel mostrando autorradiografias com a distribuição dos sítios de ligação ao [³ H] 8-OH-DPAT no tronco e hipotálamo de pombos. E esquemas com o nome das estruturas e as coordenadas do atlas estereotáxico do cérebro de pombos de Karten e Hodos (1969) indicando o nível de cada secção analisada.....	86
Figura 10: fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol) sobre a densidade de núcleos Fos+ e células duplamente marcadas nos núcleos serotoninérgicos: Pontino da Rafe (R), Linearis Caudalis (LC), Anularis (Anl) e Zona peri Fascículo Longitudinal Medial (ZpFLM). E gráficos apresentando os resultados das contagens dos diferentes tipos de marcação analisadas.....	90

Figura 11: fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos PVO, SFO, PVNp e PVNm. E gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado.....92

Figura 12: fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos SL, BNSTl, POM e POA. DPAT+W animais tratados com 8-OH-DPAT com livre acesso á água e DPAT animais tratados com 8-OH-DPAT e que foram privados de água após o tratamento. E gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado.....93

Figura 13: fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 5-HT (150 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos diferentes núcleos hipotalâmicos analisados. 5-HT+W animais tratados com 5-HT com livre acesso á água e 5-HT animais tratados com 5-HT e que foram privados de água após o tratamento. E gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado.....95

Figura 14: fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 5-HT (150 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos diferentes núcleos hipotalâmicos SL, BNSTl, POM e POA. 5-HT+W, animais tratados com 5-HT com livre acesso á água e 5-HT, animais tratados com 5-HT e que foram privados de água após o tratamento. E gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado.....96

Figura 15: fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 5-HT (150 nmol), de 8-OH-DPAT (30 nmol) e de veículo sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos DMN, VMN, LH_y e INF. E gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado.....98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Catálogo com a descrição de cada comportamento do pombo usado na avaliação e quantificação da análise comportamental.	57
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: efeitos do pré-tratamento com o antagonista WAY100635 (0, 0,1, 0,3 e 1 nmol) sobre os efeitos da 5-HT (0, 50 e 150 nmol) sobre a duração, latência e frequência de comer, beber, sono e explorar. (*) p<0,05 comparado aos animais 0 + Veículo. (#) p<0,05 comparado aos animais 0 + 5-HT. Dados representados como média ± erro padrão da média (EPM).	74
Tabela 2: efeitos do pré-tratamento com o antagonista MM77 (0, 23 e 69 nmol) sobre os efeitos da dose de 150 nmol de 5-HT sobre a duração, latência e frequência dos comportamentos de comer, beber, sono e explorar. (*) p<0,05 comparado aos animais 0 + Veículo. (#) p<0,05 comparado aos animais 0 + 5-HT. Dados representados como média ± EPM.	75
Tabela 3: efeitos do pré-tratamento com o antagonista WAY100635 (WAY, 0, 0,1, 0,3 e 1 nmol) sobre os efeitos das doses de 30 nmol de 8-OH-DPAT sobre a duração, latência e frequência dos comportamentos de comer, beber, sono e explorar. (*) p<0,05 comparado aos animais 0 + Veículo. (#) p<0,05 comparado aos animais 0 + 8-OH-DPAT. Dados representados como média ± EPM.	76
Tabela 4: efeitos do pré-tratamento com o MM77 (0, 23 e 69 nmol) sobre os efeitos das doses de 30 nmol de 8-OH-DPAT sobre a duração, latência e frequência dos comportamentos de comer, beber, sono e explorar. (*) p<0,05 comparado aos animais 0 + Veículo. (#) p<0,05 comparado aos animais 0 + 8-OH-DPAT. Dados representados como média ± EPM.	77
Tabela 5: valores em % indicando alterações dos níveis de 5-HT em comparação aos animais controles.....	82
Tabela 6: valores de ligação ao [3H] 8-OH-DPAT mostrados em fmol/mg de proteína. A porcentagem de ligações e a classificação qualitativa da densidade foram tomadas tendo o máximo valor de ligações (MVL), o núcleo Anularis, como 100%. +++++, muito alto; +++ , alto; ++, moderado e, +, baixo.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5,7-DHT: 5,7-dihidroxitriptamina

5-HT: serotonina

5-HTP: 5-hidroxitriptofano

8-OH-DPAT: 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina

A6 (LoC) : Locus Cerúleo parte caudal

A8 (LoC): Locus Cerúleo parte rostral

AgRP: Peptídeo relacionado ao agouti

AH: Hipotalâmico Anterior

AI: Arcopallio Intermédio

AL: Ansa Lenticular

AL: Ansa Lenticular

Anl: Anularis

Arc: Núcleo Arqueado do Hipotálamo

AVT: Área Ventral Tegmental

BC: Braquio Conjuntivo

BNST: Núcleo Intersticial da Estria Terminal

BSS: *behavioural satiety sequence*, sequência comportamental de saciedade

CA: Comissura anterior

CO: Quiasma óptico

CP: Comissura Posterior

CS: Central Superior

CTS: comportamentos típicos de sono

DMN: Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

DOI: (6)-2,5-Dimetoxi-4-iodoamfetamina

DPAT: 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina

DRN: Dorsal da Rafe

DSD: Decussação supra-óptica dorsal

DSV: Decussação supra-óptica ventral

FDB: Núcleo da Banda Diagonal de Broca

FLM: Fascículo Longitudinal Medial

GCt: Substância cinzenta central

HA: Hiperpalio apical

HD: Hiperpalio densocelular

HI: Hiperpalio intercalado

HL: Habênula Lateral

i.m.: Intramuscular

i.p.: Intraperitoneal

ICV: Intracerebroventricular

IF: Trato Hipotalâmico Inferior

IH: Núcleo Hipotalâmico Inferior

Inf: Infundíbulo

IP: Núcleo Interpeduncular

ISRS: Inibidores seletivos da recaptação da 5-HT

LC: Linear caudal

LoC: Locus Cerúleo

LHy: Área Hipotalâmica Lateral

M: Mesopálio

MC: Melanocortina

MC4R: receptor 4 da MC

MrN: Mediano da Rafe

N: Nidopálio

NC: Nidopálio caudal

Ndc: Nidopálio dorsocaudal E: Entopálio

NI: Nidopálio intermédio

NIV: Quarto par craneano, nervo Troclear

NRM: Rafe Mágno

NRO: Rafe Obscuro

NRPa: Rafe Pálido

NTS: Núcleo do Trato Solitário

NV: Quinto par craneano, nervo Trigêmeo

OM: trato ocliptomesencefálico

OM: Trato Ocliptomesencefálico

PD: Núcleo Pré-óptico Dorsal

PLH: Núcleo Lateral Posterior do Hipotálamo

PMH: Núcleo Medial Posterior do Hipotálamo

PMM: Pré-Mamilar

PnO: Ponte Oral

PoA: Núcleo Pré-óptico Anterior

POM: Pré-óptico Medial

POR: Reticularis Pontis Oral

PPM: Pré-óptico Magnocelular

PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

PVO: Órgão Paraventricular

QF: Trato Quinto Frontal

RBd: Bulbar da Rafe parte dorsal

RBv: Bulbar da Rafe parte ventral

REM: *rapid eye movement*, movimento rápido dos olhos

RL: Reticular Lateral

ROb: Rafe Obscuro, parte dorso lateral

RPd: Pontino da Rafe parte dorsal

RPv: Pontino da Rafe parte ventral

Rt: Núcleo Rotundus

s.c.: Subcutânea

SCd: Núcleo Subcerúleo dorsal

SCN: Núcleo Supraquiasmático

SFO: Órgão Subfornical

SL: Núcleo Septal Lateral

Soe: Núcleo Supra-Óptico externo

SWS: *slow wave sleep*, sono de ondas lentas

TnA: Núcleo Taenia da Amígdala

TPH: Triptofano Hidroxilase

TSM: Trato Septo Mesencefálico

V: Ventrículo

VMN: Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

WAY: WAY100635

Zp-FLM: Zona Peri-Fascículo Longitudinal Medial

α MSH: hormônio estimulador de melanócito alfa

SUMÁRIO

1 Introdução

1.1 A serotonina e o controle da ingestão de alimentos em mamíferos.....	33
1.2 A serotonina e o controle dos estados de sono e vigília em mamíferos.....	37
1.3 A serotonina e o controle da ingestão de alimentos em aves.....	38
1.4 A serotonina e o controle dos estados de sono e vigília em aves.....	41
1.5 Neuroanatomia dos circuitos serotoninérgicos em mamíferos.....	42
1.6 Neuroanatomia dos circuitos serotoninérgicos em aves.....	44
1.7 Receptores serotoninérgicos.....	47
1.8 Os receptores 5-HT _{1A}	48
1.9 A serotonina e a sequência comportamental de saciedade.....	50
1.10 Objetivo geral.....	52
1.10.1Objetivos específicos.....	53
2Métodos.....	53
2.1 Animais e condições de alojamento.....	53
2.2 Drogas e injeções.....	54
2.3 Cirurgia e perfusão.....	55
2.4 Análise comportamental.....	56
2.5Procedimentos imunistoquímicos.....	57
2.6 Análise e contagem celular.....	59
2.7 Análise estatística.....	60

2.8 Procedimentos experimentais.....	60
2.8.1 Experimento 1: avaliação dos efeitos de antagonistas de receptores 5-HT1A sobre as respostas ingestivas e hipnagênica provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT.....	60
2.8.2 Experimento 2: análise dos efeitos da lesão dos neurônios serotoninérgicos sobre as respostas ingestivas e hipnagênica provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT.....	63
2.8.3 Experimento 3: descrição da distribuição dos receptores 5-HT1A através da análise dos sítios de ligação ao agonista [³ H] 8-OH-DPAT no tronco encefálico e no hipotálamo de pombos.....	68
2.8.4 Experimento 4: análise da injeção ICV de 8-OH-DPAT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico e em distritos hipotalâmicos e outras estruturas prosencefálicas relacionadas com o controle da ingestão de alimentos e sono.....	70
2.8.5 Experimento 5: análise da injeção ICV de 5-HT sobre a expressão da proteína Fos em distritos hipotalâmicos e outras estruturas prosencefálicas relacionadas com o controle da ingestão de alimentos e sono.....	70
3 Resultados.....	71
Experimento 1.....	71
Experimento 2.....	80
Experimento 3.....	84
Experimento 4.....	88
Experimento 5.....	94
4 Discussão.....	100
5 Conclusões.....	116
Referências.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1 A SEROTONINA (5-HT) E O CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTOS EM MAMÍFEROS

Diversos estudos neuroanatômicos, genéticos e farmacológicos apontam o papel dos circuitos serotoninérgicos no controle da ingestão de água, de sódio e alimento em mamíferos (SCHREIBER *et al.*, 2000; DE VRY E SHREIBER, 2000; TAKASE E NOGUEIRA, 2008; SIMANSKY E NICKLOUS, 2002; CASTRO *et al.*, 2002 a; CASTRO *et al.*, 2002 b; FRANCHINI *et al.*, 2002; GODINO *et al.*, 2007; REIS, 2007; LAM *et al.*, 2010). Mais do que isso, esta monoamina que é encontrada em todos os animais que possuem sistema nervoso (para revisão ver WEIGER *et al.*, 1995), orquestra variáveis comportamentais e fisiológicas essenciais para o controle do metabolismo energético em espécies tão distantes filogeneticamente como, por exemplo, os nematódeos (SAWIN *et al.*, 2000) e os humanos (McGUIRK *et al.*, 1991) (para revisão ver TECOTT, 2007).

De uma maneira geral, estudos farmacológicos demonstram que agentes que aumentam a atividade pós-sináptica da 5-HT diminuem a ingestão de alimento e, em contraste, drogas que diminuem a atividade serotoninérgica, aumentam a ingestão (para revisão ver SIMANSKY, 1996 e DE VRY E SCHREIBER, 2000). A ação inibitória de circuitos serotoninérgicos centrais sobre a ingestão de alimento parece decorrer tanto de ações tônicas (o que mantém baixa a probabilidade de um episódio ingestivo ser iniciado durante o estado de saciedade) quanto de ações fásicas (ou dependentes de estímulos transientes originados pela própria ingestão de alimentos).

Como evidências da função inibitória tônica, a injeção de metergolina (um antagonista não-seletivo de receptores 5-HT_{1/2/7}) no núcleo basolateral posterior da amígdala ou a ativação de receptores 5-HT_{1A} (que diminui a atividade de neurônios serotoninérgicos), desencadeiam aumento na ingestão de alimentos em ratos saciados (CURRIE E COSCINA, 1996; PARKER E COSCINA, 2001; PARKER *et al.*, 2001). Além disso, camundongos *knockout* para os receptores 5-HT_{2C} apresentam hiperfagia e sobrepeso durante a vida toda (HEISLER *et al.*, 1998). Quanto à ação fásica, a ativação de receptores 5-HT_{2C} diminuiu a ingestão de alimento em camundongos obesos (obesidade induzida por dieta hipercalórica, LAM *et al.*, 2008), e

em ratos privados de alimento por 24 h (SIMANSKY E VAIDYA, 1990).

Grande atenção tem se dado aos efeitos da manipulação da atividade serotoninérgica em diferentes distritos hipotalâmicos (para revisão ver LEIBOWITZ E ALEXANDER, 1998). Por exemplo, a administração sistêmica de fluoxetina aumenta a liberação de 5-HT no núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) e diminui a ingestão de alimentos em ratos (PAEZ E LEIBOWITZ, 1993). Além disso, a injeção de 5-HT no PVN (SHOR-POSNER *et al.*, 1986), no núcleo Ventromedial do hipotálamo (VMN) e no núcleo Supraquiasmático (SCN) também suprime a ingestão (LEIBOWITZ *et al.*, 1990).

Os efeitos da 5-HT se devem a sua interação com outros neurotransmissores que estão diretamente envolvidos com o controle da ingestão de alimento. O circuito mais bem caracterizado de interação é o que envolve os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} e o receptor do neuropeptídeo anorexigênico melanocortina (MC), MC4R (receptor 4 da MC) no núcleo Arqueado do Hipotálamo (Arc) (HEISLER *et al.*, 2006). A injeção intracerebroventricular (ICV) do agonista seletivo do MC4R, o Ro27-3225, provocou redução da ingestão de alimento em ratos e camundongos (BENOIT *et al.*, 2000) e o tratamento crônico (com mini bombas Alzet[®] implantadas subcutaneamente liberando doses diárias durante 4 semanas) com outro agonista seletivo destes receptores, o BIM-22493, em macacos Rhesus obesos submetidos a dieta hipercalórica, reduziu a ingestão de alimento e o peso corporal destes animais já a partir da segunda semana de tratamento (KIEVIT *et al.*, 2013). Adicionalmente, foi observado severa obesidade em camundongos *knockout* (HUSZAR *et al.*, 1997) para o receptor MC4R e em humanos com mutações genéticas neste receptor (VAISSE *et al.*, 1998; YEO *et al.*, 1998).

Tanto o inibidor da recaptação/estimulador da liberação de 5-HT, a d-fenfluramina, e o agonista de receptores 5-HT_{2C}/1B, o 1-(3-clorofenil) piperazina (mCPP), aumentaram a expressão da proteína Fos em neurônios que também expressavam o agonista endógeno do receptor MC4R, o hormônio estimulador de melanócito alfa (α MSH) (HEISLER *et al.*, 2002). Além disso, a ativação dos receptores 5-HT_{2C} ou 5-HT_{1B} produziram hipofagia por inibir a liberação do antagonista endógeno do receptor MC4R, o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP) (HEISLER *et al.*, 2006) (para revisão sobre a relação entre circuitos serotoninérgicos x melanocortinérgicos e o controle da ingestão de alimento ver ZHOU *et al.*, 2005).

Além do núcleo Arc, evidências farmacológicas demonstram que outros distritos hipotalâmicos, por exemplo, o núcleo PVN, e os núcleos VMN, Dorsomedial (DMN) e Lateral do Hipotálamo (LHy) (HOFFMAN E MEZEY, 1989; PASQUALETTI *et al.*, 1999) e extra-hipotalâmicos, como o núcleo Acumbens (FRANCIS *et al.*, 2011; PRATT *et al.*, 2012), o complexo dorsal do vago, que contém o núcleo Motor Dorsal do Vago e o núcleo do Trato Solitário (NTS), e o núcleo Parabraquial que recebem densa inervação serotonérgica (STEINBUSCH E NIEUWENHUYS, 1981), também colaboram para o papel dos circuitos serotonérgicos no controle da ingestão de alimento (para revisão ver TECOTT, 2007).

Desde a década de 60, experimentos farmacológicos já demonstravam a participação dos circuitos serotonérgicos no controle da ingestão de água (JOYCE E MROSOVSKY, 1964). A injeção intraperitoneal (i.p.) do aminoácido precursor da 5-HT, o 5-hidroxitriptofano (5-HTP), produziu leve aumento na ingestão de água em animais saciados (JOYCE E MROSOVSKY, 1964). Cerca de 20 anos mais tarde foi demonstrado que a própria 5-HT quando aplicada periféricamente também aumentava a ingestão de água (KIKTA *et al.*, 1983; FLETCHER E BURTON, 1984) e que o efeito da 5-HT sobre a ingestão de água parecia ser mediado periféricamente pelo sistema renina-angiotensina, uma vez que a remoção dos rins (onde a renina é produzida) (ROWLAND *et al.*, 1987) e o pré-tratamento com captopril (um inibidor da enzima conversora da angiotensina I em angiotensina II), bloqueou a resposta dipsogênica da 5-HT (KIKTA *et al.*, 1983). O efeito dipsogênico da 5-HT administrada periféricamente parece depender tanto do nervo vago (SIMANSKY *et al.*, 1982) quanto do Órgão Subfornical (SFO) (HUBBARD *et al.*, 1989), pois a lesão destas estruturas interrompeu a resposta provocada pela 5-HT.

A primeira evidência sobre o efeito inibitório dos circuitos serotonérgicos centrais sobre a ingestão de água surgiu por acaso, quando, Coscina e colaboradores avaliando o efeito de lesão dos núcleos da rafe sobre o limiar a choques na pata suportado por ratos, perceberam que ao final dos experimentos o bebedouro dos animais lesados estava praticamente vazio, ao contrário do bebedouro dos animais controles. Eles decidiram então avaliar sistematicamente o efeito da lesão eletrolítica dos neurônios da rafe (que resultou em diminuição do conteúdo de 5-HT prosencefálica), e observaram que os animais lesados ingeriam mais água que os animais falso lesados, o que sugeria um possível efeito inibitório dos neurônios serotonérgicos (COSCINA *et al.*, 1972). Tal efeito inibitório foi mimetizado mais tarde por outra técnica

de lesão mais seletiva dos neurônios serotonérgicos. Ratos que receberam uma injeção da neurotoxina de neurônios serotonérgicos, a 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), diretamente no núcleo MrN apresentaram maior ingestão hídrica entre o segundo e sexto dia após a lesão quando comparado aos animais falso lesados (BAROFSKY *et al.*, 1980).

Já nos anos 2000, testes farmacológicos com o objetivo de descrever os receptores serotonérgicos envolvidos no papel da 5-HT no controle da ingestão de água, observaram que a ativação de receptores 5-HT_{2B/2C} (CASTRO *et al.*, 2002 a) ou de receptores 5-HT₃ (CASTRO *et al.*, 2002 b) por via ICV em ratos, reduziu a ingestão de água induzida por diferentes estímulos fisiológicos. Além disso, a injeção direta do agonista de receptores 5-HT_{1A}, 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) no PVN (DE SOUZA VILLA *et al.*, 2008), no núcleo Septal Lateral (SL, de ARRUDA CAMARGO *et al.*, 2010) ou na região medial do núcleo Acumbens de ratos (CLISSOLD *et al.*, 2013), reduziu a ingestão de água produzida por privação hídrica de 24 horas. Nesta última estrutura, a ativação dos receptores 5-HT_{1B}, também provocou o mesmo efeito supressor sobre a ingestão alimento (CLISSOLD *et al.*, 2013), entretanto a ativação de receptores 5-HT₇ pelo agonista seletivo destes receptores, o AS 19, não afetou nem a ingestão de água, nem a ingestão de alimento (CLISSOLD *et al.*, 2013). Em contrapartida, a lesão eletrolítica do núcleo dorsal da rafe (DRN) aumentou a ingestão de água em ratos com livre acesso à água e alimento (REIS *et al.*, 1994). Para revisão sobre os efeitos dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ sobre a ingestão de água ver DE VRY E SCHREIBER, 2000.

Estudos com diferentes tipos de lesão dos neurônios do DRN de ratos também evidenciaram a influência inibitória dos circuitos serotonérgicos sobre a ingestão de sódio. A lesão eletrolítica do DRN ou a provocada pelo ácido ibotênico aumentaram a ingestão de sódio induzida, respectivamente, por privação de fluídos de 16 horas (OLIVARESE *et al.*, 2003) ou pela administração do diurético furosemida (CAVALCANTE-LIMA *et al.*, 2005b). Além disso, a administração sistêmica de 8-OH-DPAT (que diminui a atividade serotonérgica em ratos Bonvento *et al.*, 1992), aumentou o consumo de salina hipertônica (COOPER E CICCOCIOPPO, 1993; COOPER E BARBER, 1993). Adicionalmente, reesultados de testes imunoistoquímicos de dupla marcação para a proteína Fos (usada como marcador de atividade neuronal) e neurônios serotonérgicos, sugerem que os neurônios serotonérgicos do DRN servem como possíveis marcadores dos níveis de sódio corporal, principalmente quando a ingestão de sódio é devido à

depleção prévia deste mineral (FRANCHINI et al., 2002; GODINO *et al.*, 2007; BADAUÊ-PASSOS JR *et al.*, 2007).

1.2 A SEROTONINA E O CONTROLE DOS ESTADOS DE SONO E VIGÍLIA EM MAMÍFEROS

Além de controlar a ingestão de alimentos, os circuitos serotoninérgicos também participam do controle do ciclo sono-vigília em mamíferos. Ao contrário do que se pensou inicialmente, os neurônios serotoninérgicos exercem um controle inibitório sobre o sono. A ideia inicial de que a 5-HT era o neurotransmissor responsável pelo aparecimento do sono, levantada pelo grupo do professor Jouvet na década de 70 (JOUVET, 1969; JOUVET, 1972; para revisão ver MONTI, 2011), foi abandonada quando estudos eletrofisiológicos demonstraram que a atividade dos neurônios serotoninérgicos em mamíferos que era alta durante a vigília, ia caindo ao longo do ciclo e ficava quase que totalmente em silêncio durante o sono paradoxal (ou sono REM, do inglês *rapid eye movement*, movimento rápido dos olhos; FORNAL *et al.*, 1985; para revisão ver JACOBS E FORNAL, 1991 e JACOBS E FORNAL, 1999). Esta progressiva queda da atividade dos neurônios serotoninérgicos parece afetar o padrão de liberação de 5-HT. Estudos com microdiálise para avaliar o conteúdo desta monoamina no núcleo Locus Cerúleo (LoC) e na amígdala de gatos demonstraram alto conteúdo serotoninérgico nestas estruturas durante a vigília que ia decaindo à medida que o sono fica mais profundo (SHOUSE *et al.*, 2000).

Resultados farmacológicos, principalmente baseados nos estudos dos receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e alguns poucos estudos com o receptor 5-HT₃, confirmam o caráter inibitório da influência serotoninérgica sobre o sono. A injeção direta do 8-OH-DPAT no DRN aumentou a duração do sono paradoxal em gatos (BJORVATN *et al.*, 1997) e em ratos (PORTAS *et al.*, 1996). Já a administração sistêmica do 8-OH-DPAT aumentou a vigília, e reduziu o sono de ondas lentas (SWS, do inglês *slow wave sleep*) e o sono paradoxal em ratos (BJORVATN *et al.*, 1997). Estes efeitos foram possivelmente promovidos por heterorreceptores 5-HT_{1A}. A ativação dos receptores 5-HT_{2A/2C} além de aumentar a vigília, também diminuiu o SWS e o sono paradoxal (DUGOVIC *et al.*, 1989; DUGOVIC, 1992). Já o bloqueio dos receptores 5-HT₂ pelo antagonista ritanserina aumentou o SWS tanto em humanos (IDZIKOWSKI *et al.*, 1986) quanto em ratos (DUGOVIC E

WAUQUIER, 1987; DUGOVIC *et al.*, 1989; MONTI *et al.*, 1990; BJORVATN E URSIN, 1990; SILHOL *et al.*, 1991). A ativação dos receptores 5-HT₃ pelo agonista m-cloro-fenilbiguanida provocou os mesmos efeitos que a ativação dos receptores 5-HT_{2A/2C} em ratos: aumentou a vigília, diminuiu o SWS e o sono paradoxal (PONZONI *et al.*, 1993).

1.3 A SEROTONINA E O CONTROLE DA INGESTÃO DE ALIMENTOS EM AVES

Os circuitos serotoninérgicos também desempenham um importante papel no controle dos comportamentos ingestivos em aves, entretanto, a literatura científica que trata deste assunto é bastante escassa comparada à existente para mamíferos. Os primeiros estudos a respeito dos efeitos da 5-HT sobre a ingestão de alimento foram realizados em galinhas (*Gallus gallus domesticus*), e os resultados pareceram depender da linhagem para a qual o animal é selecionado. A injeção ICV de 5-HT em galinhas selecionadas para crescimento rápido (frangos de corte) diminuiu a ingestão de alimento em animais livremente alimentados, mas não teve efeito sobre a ingestão de alimentos em animais submetidos a jejum de 24 horas (DENBOW *et al.*, 1982). Já em galinhas selecionadas para reprodução ou produção de ovos (poedeiras), a 5-HT provocou redução da ingestão tanto em galinhas submetidas à privação como naquelas livremente alimentadas (DENBOW, 1983). O efeito da administração periférica da 5-HT foi estudado em frangos de corte recém-nascidos, livremente alimentados, e foi observada redução na ingestão de alimento. Entretanto, esta resposta foi somente significativo em galinhas com mais de três dias de vida, sugerindo que os componentes do sistema serotoninérgico de aves relacionados a ingestão de alimento continuam em formação após o nascimento (BARANYIOVÁ, 1990).

Resultados mais recentes têm demonstrado que o efeito hipofágico provocado pela 5-HT em frangos de corte parece envolver tanto os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e, assim como em mamíferos (BENOIT *et al.*, 2000), o circuito melanocortinérgico. O tratamento sistêmico, com o 8-OH-DPAT diminuiu a ingestão de alimento em frangos de corte após jejum de 16 horas (SAADOUN E CABRERA, 2002; SAADOUN E CABRERA, 2008), e também em codornas (*Coturnix japonica*) sob privação ou livremente alimentadas (REIS *et al.*, 2005). E o pré-tratamento com antagonistas dos receptores MC3R e

MC4R, bloqueou a resposta provocada pela injeção ICV de 5-HT em frangos de corte privados de alimento por 24 horas (ZENDEHDEL *et al.*, 2012).

Ao longo das últimas duas décadas, nosso laboratório vem acumulando evidências sobre os efeitos ingestivos da 5-HT em pombos (STEFFENSet *et al.*, 1997; BRUNet *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; HÄCKL *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2009; CAMPANELLAet *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLERet *et al.*, 2013). O pombo (*Columba livia*) é uma espécie de ave destituída de qualquer tipo de seleção artificial seja para crescimento rápido ou reprodução. Além disso, é amplamente utilizada como sujeito experimental em testes farmacológicos/comportamentais (para revisão ver MCMILLAN, 1990), inclusive em testes para verificação dos potenciais efeitos ansiolíticos e antidepressivos do receptor serotoninérgico, 5-HT_{1A} (para revisão ver BARRET *et al.*, 1994).

Nossos resultados demonstram que, assim como em mamíferos, a 5-HT exerce um efeito inibitório sobre a ingestão de alimento em pombos (STEFFENSet *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLERet *et al.*, 2013). A injeção ICV ou subcutânea (s.c.) de 5-HT provocou redução na ingestão de alimento induzida por privação alimentar de 24 horas e pela injeção ICV de uma dose hiperfágica de adrenalina (STEFFENSet *et al.*, 1997). O efeito hipofágico da 5-HT em animais privados de alimento parece ser mediado por receptores 5-HT_{2A/2C}, uma vez que a administração ICV do agonista destes receptores, o DOI [(6)-2,5-Dimetoxi-4-iodoamfetamina], produziu a mesma resposta (STEFFENSet *et al.*, 1997).

Adicionalmente, com agentes farmacológicos que bloqueiam ou diminuem a atividade serotoninérgica, nós observamos aumento da ingestão de alimento: a injeção de metergolina no núcleo TnA (CAMPANELLAet *et al.*, 2009) ou a injeção ICV do 8-OH-DPAT (HOELLERet *et al.*, 2013), agente que também diminui a atividade serotoninérgica no pombo (GLEESONet *et al.*, 1992), aumentou a ingestão de alimento em pombos com livre acesso a alimentos. O efeito do 8-OH-DPAT em pombos parece mesmo ser devido à diminuição da atividade serotoninérgica, já que a injeção deste agonista na região medial da rafe mesencefálica (rica em neurônios serotoninérgicos, MENEGHELLIet *et al.*, 2009) foi capaz de aumentar a ingestão de alimento, o que não foi observado após o mesmo tratamento com injeções nas regiões mais laterais da rafe (HÄCKL *et al.*, 2005). Resultados que apoiam com os encontrados por nosso laboratório já haviam sido demonstrados por Güntürkün e colaboradores na década de 80 (GÜNTÜRKÜNet *et al.*,

1989). Em animais privados de alimentos por 24 horas, a injeção intramuscular (i.m.) de zimelidina, um bloqueador da recaptação da 5-HT, diminuiu a ingestão de alimento. Já em pombos livremente alimentados, a injeção i.m. de ciproeptadina, um antagonista dos receptores 5-HT_{2A/2C}, produziu aumento da ingestão de alimento (GÜNTÜRKÜN *et al.*, 1989). Estes resultados demonstram que, assim como o observado em mamíferos, existe uma relação inversa entre a atividade serotoninérgica e a ingestão de alimento em pombos.

Além de afetar a ingestão de alimento, nossos resultados também demonstram que os circuitos serotoninérgicos também influenciam de forma dramática a ingestão de água. Em pombos submetidos a jejum de 24 horas (com água disponível) (STEFFENS *et al.*, 1997) ou com livre acesso a alimento (STEFFENS *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLER *et al.*, 2013), a injeção ICV de 5-HT provocou intensa ingestão de água, com os animais ingerindo aproximadamente 10% de seu peso corporal durante a primeira hora de registro. Esta intensa resposta dipsogênica foi acompanhada por diminuição da latência e aumento da duração e da frequência dos episódios de beber (STEFFENS *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLER *et al.*, 2013). Aumento na ingestão hídrica, embora não tão intensa quanto a provocada por injeção ICV, também foi observada após a injeção de GR46611 (agonista de receptores 1A/1B/1D) no Arcopallio Intermédio (AI) e o TnA, e de metergolina no AI (CAMPANELLA *et al.*, 2009). Já a injeção destes mesmos agentes no PVN não provocou alteração na ingestão de água (DA SILVA *et al.*, 2007).

Assim como em mamíferos, a resposta dipsogênica da injeção ICV de 5-HT em pombos parece ser mediada pela angiotensina, entretanto, por um receptor até então desconhecido: o efeito da 5-HT sobre a ingestão de água foi bloqueado pelo antagonista de receptores angiotensinérgicos não seletivo Saralasin, mas tanto o antagonista dos receptores AT₁, o Losartan, e o antagonista de receptores AT₂, o PD 123,319, não foram capazes de afetar as modificações na ingestão de água provocadas pela 5-HT (BRUN *et al.*, 2001). Além disso, diferentemente do observado em mamíferos (ROWLAND *et al.*, 1987), a injeção sistêmica de 5-HT não afeta a ingestão de água (STEFFENS *et al.*, 1997), o que sugere que possam existir características espécie-específicas que diferem as relações entre os sistemas serotoninérgicos e angiotensinérgicos observadas em aves e mamíferos.

1.4 A SEROTONINA E O CONTROLE DOS ESTADOS DE SONO E VIGÍLIA EM AVES

Trabalhos específicos das alterações dos estados de vigília provocadas por manipulações na atividade serotoninérgica em aves são ainda mais escassos que aquelas tratam dos efeitos ingestivos da 5-HT. Na maioria das vezes, os efeitos hipnogênicos dos tratamentos não são descritos ou são confundidos com alterações inespecíficas da atividade geral dos animais. Por exemplo, Güntürkün e colaboradores (GÜNTÜRKÜN *et al.*, 1989) observaram intensa alteração na atividade geral dos seus pombos após injeção sistêmica de diferentes doses de ciproeptadina: com 180µg os pombos ficavam imóveis dentro da gaiola, já com uma dose somente 10µg maior, as aves apresentavam-se imóveis e geralmente com a cabeça retrusa entre ombros, com os olhos fechados e permaneciam nesta posição mesmo após serem gentilmente estimuladas (GÜNTÜRKÜN *et al.*, 1989). Apesar desta elaborada descrição comportamental, nenhuma análise quantitativa foi realizada sobre estas alterações, mas elas já representavam um bom indício sobre o efeito inibitório dos circuitos serotoninérgicos sobre o sono.

Os primeiros relatos sobre os efeitos da 5-HT sobre o sono em pombos feita por nosso laboratório apareceu no trabalho de Steffens e colaboradores em 1997 (STEFFENS *et al.*, 1997), com o simples relato de que a intensa ingestão de água provocada por diferentes doses de 5-HT injetada ICV era geralmente seguida por períodos de comportamentos típicos de sono (CTS) e que inclusive, após a administração da dose 300 nmol de 5-HT, o surgimento dos CTS apareciam logo nos primeiros minutos de registro e chegavam a interromper os episódios de ingestão hídrica (STEFFENS *et al.*, 1997). Mais tarde, a análise mais detalhada dos CTS provocados pela injeção ICV de 150 nmol de 5-HT (DOS SANTOS *et al.*, 2011) demonstrou que estas respostas provocadas pela 5-HT começam a surgir após 30 minutos de registro, atingem o pico aproximadamente aos 45 minutos e decaem logo em seguida, mas aos 60 minutos ainda são maiores que o observado nos animais controles (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

Outros trabalhos mais recentes do nosso laboratório trataram em discriminar, através de registro eletroencefalográfico, a resposta hipnogênica provocada pela 5-HT, e ficou demonstrado que o que chamávamos de CTS era realmente sono, mais especificamente SWS com episódios de até 2 minutos de duração surgindo a partir dos 10 minutos de registro e distribuídos ao longo de toda a primeira hora após

a injeção, intermeados por curtos e poucos episódios de sono paradoxal esparsamente distribuídos ao longo de todo o período de registro (HOELLER *et al.*, 2013). O efeito da 5-HT sobre o sono foi mimetizado pela ativação do receptor 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, tanto via ICV (HOELLER *et al.*, 2013), quanto sistêmica (DOS SANTOS *et al.*, 2009), o que sugere que o efeito hipnagógico observado após a injeção de 5-HT pode ter sido efeito da quebra da inibição serotoninérgica (possivelmente mediada pela ativação de autorreceptores 5-HT_{1A}) que tonicamente inibe distritos hipotalâmicos promotores de sono. Entretanto, o efeito da ativação de receptores 5-HT_{1A} não parece seguir uma regra geral para todas as espécies de aves, uma vez que o tratamento sistêmico com o 8-OH-DPAT em rolinhas (*Streptopelia risoria*) aumentou a vigília e diminuiu tanto o SWS quanto o sono paradoxal (TEJADA *et al.*, 2010), o que demonstra que diferenças da ativação de receptores 5-HT_{1A} pode ocorrer até mesmo em espécies muito próximas filogeneticamente.

Outra evidência que suporta a nossa teoria, pelo menos em pombos, foi o que encontramos com um estudo da expressão proteína Fos em neurônios imunorreativos a enzima triptofano hidroxilase (TPH) após injeção ICV de 5-HT. Nós observamos correlação negativa entre a atividade de neurônios serotoninérgicos do núcleo Linear Caudal (LC) e da região rostral do núcleo Locus Cerúleo (LoC, A8) e a duração de sono (DOS SANTOS *et al.*, 2011), o que mostra que a diminuição da atividade serotoninérgica pode ser um fator importante para o surgimento do sono em pombos.

1.5 NEUROANATOMIA DOS CIRCUITOS SEROTONÉRGICOS EM MAMÍFEROS

A primeira vez que os neurônios serotoninérgicos foram visualizados no cérebro de mamíferos, foi quando Fuxe e Dahlström, usando o método de histoquímica fluorescente de Falck-Hillarp, foram capazes de determinar a distribuição dos neurônios (DAHLSTRÖM E FUXE, 1964) e projeções serotoninérgicas (FUXE, 1965) na década de 60.

Desde lá, estudos imunoistoquímicos e autorradiográficos mais refinados têm demonstrado e presença de neurônios serotoninérgicos em cérebros tão complexos como o de primatas (AZMITIA E GANNON, 1986) incluindo humanos (HORNUNG, 2003) a seres tão antigos como o cnidário *Renilla koellikeri* (UMBRIACO *et al.*, 1990). O que parece ter se mantido estável ao longo da evolução dos circuitos serotoninérgicos

é a topografia das células que expressão 5-HT: desde a lampréia, um membro do mais primitivo grupo de vertebrados existentes, os agnatos (ABALO *et al.*, 2007) ao humano (HORNUNG, 2003), praticamente todos os neurônios serotonérgicos são encontrados no tronco encefálico, na ou próximo à linha média. Esta manutenção da distribuição dos neurônios serotonérgicos ao longo da filogenia dos vertebrados sugere que o sistema serotonérgico pode participar do controle de funções similares entre peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (para revisão ver PARENT, 1981; JACOBS E AZMITIA, 1992).

Em mamíferos, os agrupamentos de neurônios serotonérgicos foram inicialmente classificados por Dahlstrom e Fuxe em 9 núcleos, de B1 a B9 (DAHLSTROM E FUXE, 1964). Os nove núcleos serotonérgicos são comumente separados em um grupo caudal, localizado no bulbo e que inerva o tronco encefálico e a medula espinhal e, em um grupo rostral, com corpos celulares localizados na ponte e no mesencéfalo e que envia projeções para o próprio mesencéfalo, diencéfalo e para o prosencéfalo (DAHLSTRÖM E FUXE, 1964; STEINBUSCH, 1981; TÖRK, 1990).

A maior coleção de neurônios serotonérgicos no encéfalo de mamíferos é a parte rostral do DRN (B7). O DRN se estende até o pequeno grupo de células serotonérgicas que formam a sua parte caudal, o grupo identificado como B6. Estas duas porções do DRN frequentemente são referidos como o mesmo núcleo, com o B6 sendo considerado a extensão caudal do B7. Outro núcleo importante é o MrN (B5 e B8). Este núcleo é formado por um agrupamento de neurônios serotonérgicos que também engloba o núcleo LC que, não raramente, também é referenciado como Central Superior (CS) (STEINBUSCH, 1981).

Os neurônios serotonérgicos inervam praticamente todo o encéfalo. Projeções serotonérgicas ascendentes para o córtex e para outras estruturas prosencefálicas emergem principalmente dos núcleos rostrais DRN e MnR. O MnR projeta principalmente para o hipocampo dorsal, septo e hipotálamo (VERTESE *et al.*, 1999), enquanto o DRN inerva principalmente o hipocampo ventral, a amígdala e o estriado (AZMITIAE SEGAL, 1978). Além disso, tanto o DRN quanto o MnR enviam projeções para o córtex (MAMOUNAS E MOLLIVER, 1988; LIDOV *et al.*, 1980) e inervam praticamente todos os núcleos do tronco encefálico, o que inclui conexões recíprocas entre eles (VERTESE *et al.*, 1994; VERTESE *et al.*, 1999).

Dos núcleos do grupo caudal saem projeções para a medula espinhal e também para outros núcleos do tronco encefálico (JONES E

LIGHT, 1992). Os núcleos deste grupo estão principalmente envolvidos com o controle da respiração por apresentarem neurônios serotonérgicos que funcionam como quimiorreceptores aos diferentes níveis de CO₂ presentes no sangue (CORCORAN *et al.*, 2009).

Os núcleos do grupo rostral recebem aferências de várias regiões encefálicas. Em relação ao MnR, Behzadi e colaboradores (BEHZADI *et al.*, 1990) demonstraram que as regiões com o maior nível de projeções para o MnR são a Habênula Lateral (HL) e o Núcleo Interpeduncular (IP). Adicionalmente, o estudo destes autores apontou que as regiões lateral e medial da área pré-óptica, as regiões lateral e dorsal do hipotálamo medial, o núcleo parabraquial medial também enviam projeções para o MnR (BEHZADI *et al.*, 1990).

Assim como o MnR, o DRN também recebe projeções provenientes principalmente da HL e também das regiões lateral e medial da área pré-óptica, das regiões lateral, ventral e medial do núcleo Intersticial da Estria Terminal (BNST, do inglês, Bed Nucleus of Stria Terminalis), nas regiões lateral, dorsal, ventromedial e posterior do hipotálamo, do núcleo Arqueado, e da amígdala (PEYRON *et al.*, 1998).

1.6 NEUROANATOMIA DOS CIRCUITOS SEROTONÉRGICOS EM AVES

Uma das primeiras tentativas para se estudar a distribuição dos neurônios serotonérgicos no encéfalo de aves contou com a participação de um dos pioneiros na descrição do sistema serotonérgico em mamíferos, Kjell Fuxe (FUXE E LJUNGGREN, 1965). Junto com Lars Ljunggren, utilizando novamente a técnica de Falck-Hillarp (FALCK *et al.*, 1962), Fuxe foi capaz de descrever a distribuição de neurônios e terminais monoaminérgicos no pombo, entretanto, não foi capaz de diferenciar com clareza as diferentes marcações em catecolaminérgicas ou serotonérgicas. Com o avanço no desenvolvimento de anticorpos na década de 80, o que impulsionou a caracterização neuroquímica de diferentes circuitos neuroanatômicos em mamíferos, surgiram também diversos estudos sobre a descrição do sistema serotonérgico em diferentes espécies de aves: na galinha (*Gallus domesticus*, SANO *et al.*, 1983; YAMADA *et al.*, 1984; YAMADA E SANO, 1985; METZGER *et al.*, 2002), na codorna (*Coturnix japonica*, COZZI *et al.*, 1991), e no pombo (*Columbia livia*, CHALLET *et al.*, 1996; MENEGHELLI *et al.*, 2009). Estes estudos demonstraram a presença de grupos serotonérgicos na linha média do tronco encefálico, e também a existência de outros

grupos de neurônios imunorreativos a 5-HT e/ou a enzima triptofano hidroxilase (TPH) em regiões mais laterais do tronco (YAMADA *et al.*, 1984; COZZI *et al.*, 1991; CHALLET *et al.*, 1996; MENEGHELLI *et al.*, 2009). Além dos grupos serotoninérgicos encontrados no tronco encefálico, neurônios imunorreativos a 5-HT também foram encontrados em um dos órgãos circumventriculares da região posterior do hipotálamo de aves, o Órgão Paraventricular (PVO), nas três espécies mencionadas anteriormente (SANO *et al.*, 1983; HIRUNAGI *et al.*, 1992; HAIDA *et al.*, 2004; MENEGHELLI *et al.*, 2009).

Apesar de todos estes trabalhos apresentarem resultados consistentes sobre a localização dos núcleos serotoninérgicos no tronco encefálico de aves, não existe um consenso em relação à nomenclatura destes grupos como a exemplo da que existe para mamíferos, nove grupos de B1 a B9, definida por Dahlstrom e Fuxe em 1964 (DAHLSTROM E FUXE, 1964). Pouco se sabe também sobre a homologia dos núcleos serotoninérgicos entre o encefálico de aves e mamíferos. Somente um atlas de encefálico de aves, editado pelo pesquisador espanhol Luis Puelles adota a nomenclatura utilizada para mamíferos para nomear os diferentes núcleos serotoninérgicos da galinha com base na distribuição neuroanatômica destes núcleos (PUELLES *et al.*, 2007), entretanto, não apresenta outras evidências sobre a homologia destas estruturas.

Recentemente, nosso laboratório publicou um trabalho sobre a distribuição de neurônios do tronco encefálico imunorreativos tanto a 5-HT quanto à TPH no encefálico de pombos (MENEGHELLI *et al.*, 2009). Neste trabalho, a descrição dos grupos de neurônios serotoninérgicos distribuídos pelo tronco encefálico apresenta 10 diferentes núcleos serotoninérgicos que podem ser agrupados em 3 grandes regiões: núcleos da linha média, Anularis (Anl), Caudal Linear (CL), Zona Peri-Fascículo Longitudinal Medial (Zp-FLM), Bulbar da Rafe parte dorsal (RBd), Bulbar da Rafe parte ventral (RBv), Pontino da Rafe parte dorsal (RPd), Pontino da Rafe parte ventral (RPv); núcleos da região ventrolateral, Reticular Lateral (RL) e Reticularis Pontis Oral (RPO) e da região dorsolateral, Locus Cerúleo parte caudal ou A6 (A6), Locus Cerúleo parte rostral ou A8 (A8) e Subcerúleo dorsal (SCd).

A maior concentração de corpos celulares serotoninérgicos da parte caudal é o núcleo RB, com a maior parte dos neurônios constituindo a base do núcleo (RBv) e alguns neurônios localizados dorsalmente alinhados verticalmente na linha média (RBd). Na linha média, duas fileiras verticais de neurônios dispostas paralelas uma a outra caracterizam o núcleo CL, que situa-se ventral aos neurônios do

núcleo AnI, que juntos com os neurônios da ZpFLM, constituem o maior aglomerado de células da região dorsal da linha média do tronco encefálico e que constituem o assoalho e as paredes do IV ventrículo. Na parte dorsolateral ainda se encontra o núcleo LoC, com a sua parte caudal, o A6 caracterizado por neurônios serotoninérgicos com processos curtos e densamente agrupados, em contraste à sua parte rostral, o A8, com neurônios serotoninérgicos esparsamente distribuídos e com processos mais longos (MENEGUELLI *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2011).

Estudos sobre a inervação serotoninérgica do encéfalo de aves são relativamente escassos. Entretanto, testes imunoistoquímicos para detecção de fibras imunorreativas à 5-HT foram realizados em três diferentes espécies de aves e dão uma boa noção do padrão de projeções serotoninérgicas pelo encéfalo do pombo (CHALLET *et al.*, 1996), da codorna (COZZI *et al.*, 1991) e pelo telencéfalo da galinha (METZGER *et al.*, 2002).

Fibras e terminais serotoninérgicos apresentam-se difusamente distribuídos por todo o encéfalo tanto do pombo (CHALLET *et al.*, 1996) quanto da codorna (COZZI *et al.*, 1991) e também pelo telencéfalo da galinha (METZGER *et al.*, 2002). No telencéfalo da galinha, densa presença de processos imunorreativos a 5-HT foram observados no Hiperpalio apical (HA), no Hiperpalio intercalado (HI), no Hiperpalio densocelular (HD), e no Mesopalio (M) (METZGER *et al.*, 2002). Estes autores também observaram alto nível de marcação no Nidopalio (N), onde foi observado maior densidade de processos 5-HT+ na região mediodorsal que na região do Nidopalio intermédio (NI), e no Nidopalio caudal (NC), principalmente na região do Nidopalio dorsocaudal (Ndc). Baixa densidade de fibras foi observada em áreas sensoriais primárias como a região visual do Entopalio (E) e a Lâmina 2 do Campo L que recebe informações auditivas provenientes do tálamo (METZGER *et al.*, 2002).

Outra região do telencéfalo das aves que recebe densa inervação serotoninérgica é o Arcopalio. As subdivisões que recebem o maior número de fibras são o Arcopalio intermédio (AI) e o núcleo Taenia (TnA) nas três diferentes espécies investigadas (CHALLET *et al.*, 1996; COZZI *et al.*, 1991; METZGER *et al.*, 2002). Moderada densidade de processos serotoninérgicos também foram observados na região do hipocampo, dos núcleos da base, do BNST e na área septal (CHALLET *et al.*, 1996; COZZI *et al.*, 1991; METZGER *et al.*, 2002). Na região do diencéfalo, os estudos no pombo (CHALLET *et al.*, 1996) e na codorna (COZZI *et al.*, 1991) apontaram fibras serotoninérgicas

distribuídas pela região periventricular tanto do hipotálamo quanto do tálamo. Dentro do hipotálamo, destaque para as regiões pré-óptica (núcleos dorsolateral, medial e magnocelular), paraventricular e também para duas estruturas da região caudal, o Órgão Paraventricular (PVO) e o infundíbulo (COZZI *et al.*, 1991; CHALLET *et al.*, 1996). Já no tálamo, destaque para os núcleos dorsomedial e dorsolateral, além de moderada presença de processos no complexo habenular (COZZI *et al.*, 1991; CHALLET *et al.*, 1996).

1.7. RECEPTORES SEROTONÉRGICOS

Os sistemas serotoninérgicos participam da modulação de diversos processos fisiológicos e comportamentais, tais como o sono (JOUVET, 1999), termoregulação (LIN *et al.*, 1998), neurogênese (BANASR *et al.*, 2004), resposta ao estresse (MEIJER E DE KLOET 1998), comportamento social (POPOVA, 2006), controle do peso corporal (LAM *et al.*, 2010), controle da ingestão de alimentos (para revisões ver DE VRY, SCHREIBER, 2000; SIMANSKY, 1996; TECOTT, 2007) escolha e tomada de decisões (LONG *et al.*, 2009), cognição (SCHIMITT *et al.*, 2006), comportamento sexual (UPHOUSE E GUPTARAK, 2010) e de várias outras importantes funções cerebrais.

Uma das razões pela ação da 5-HT ser tão abrangente é o seu grande número de receptores que estão distribuídos praticamente por todo o encéfalo (HOYER *et al.*, 1994; HOYER *et al.*, 2002). A classificação mais atual dos receptores serotoninérgicos, apresenta 7 diferentes tipos de receptores, do 5-HT1 ao 5-HT7 (HOYER *et al.*, 1994). Alguns destes tipos são ainda divididos em subtipos, como o 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-ht1E e 5-ht1F (HOYER *et al.*, 1994; HOYER *et al.*, 2002). Dos sete receptores, seis tipos são acoplados à proteína G e, somente o 5-HT3 é um receptor de canal de Na^+/K^+ controlado por ligante (HOYER, 1990); a ativação do canal de Na^+/K^+ associado a este receptor provoca a despolarização da membrana celular. Os receptores 5-HT1 e 5-HT5 são negativamente acoplados à adenilato ciclase, conseqüentemente, a ativação destes receptores diminui a expressão de AMP cíclico. O 5-HT2 aumenta a expressão de inositol trifosfato e diacilglicerol, o que resulta em influxo de Ca^{2+} , e a ativação dos receptores 5-HT4 e 7 aumenta a atividade do AMP cíclico (para revisão ver BOCKAERT *et al.*, 2010).

1.8. OS RECEPTORES 5-HT1A

Dentre os receptores que são capazes de modular a atividade da célula serotonérgica, o receptor 5-HT1A é o mais conhecido deles, devido ao fato de ter sido um dos primeiros receptores a terem seus genes codificados e à disponibilidade de ligantes seletivos desde 31 anos atrás (HJORTH *et al.*, 1982; para revisão ver BARNES E SHARP, 1999). O gene para o receptor 5-HT1A humano foi clonado em 1987 (KOBILKA *et al.*, 1987), e ele foi inicialmente identificado como um receptor acoplado à proteína G (GPCR, do inglês G protein-coupled receptor), baseado na homologia de sua sequência com o gene do receptor adrenérgico β_2 . No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores conseguiu reconhecer que o gene que parecia ser a sequência do receptor adrenérgico β_2 , na verdade, codificava o receptor 5-HT1A (FARGIN *et al.*, 1988).

No cérebro de vertebrados, o receptor 5-HT1A é dividido em duas classes distintas dependendo de sua localização: autoreceptores, que estão localizados no corpo e em dendritos dos neurônios serotonérgicos (SOTELO *et al.*, 1990) e heteroreceptores, que estão localizados em neurônios não serotonérgicos (SPROUSE E AGHAJANIAN, 1988). A ativação de ambos os receptores, auto ou heteroreceptores, resulta na abertura de canais de K, o que leva a hiperpolarização neuronal (KATAYAMA *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2008). Devido a isso, tanto a 5-HT como agonistas do receptor 5-HT1A apresentam efeitos diferentes dependendo da localização do receptor 5-HT1A ativado. Atuando nos autoreceptores, os agonistas 5-HT1A inibem a atividade elétrica do neurônio serotonérgico e conseqüentemente diminuem a liberação de 5-HT (SPROUSE E AGHAJANIAN, 1987; CRAVEN *et al.*, 1994). Já, quando os heteroreceptores são ativados, os agonistas mimetizam o efeito da 5-HT sobre os tecidos alvos (KENNETT *et al.*, 1987; HAMON *et al.*, 1988; BOHMAKER *et al.*, 1993).

Pouco se sabe sobre as diferenças entre os auto e heteroreceptores 5-HT1A. Alguns estudos farmacológicos com agonistas e antagonistas destes receptores mostram que diferentes agentes apresentam maior afinidade para um ou para outro receptor (RAURICH *et al.*, 1999) e trabalhos com inibidores seletivos da recaptação da 5-HT (ISRS) mostram que os autorreceptores apresentam maior facilidade para desensibilizarem diante os elevados níveis de 5-HT em comparação aos heterorreceptores (HENZLER, 2002). As razões

para estas diferenças continuam obscuras, mas uma possibilidade pode ser devido aos diferentes tipos de proteína G às quais o receptor 5-HT_{1A} se acoplar. Os autorreceptores da rafe estão preferencialmente acoplados à proteína Gi₃, enquanto os heteroreceptores do hipocampo e do córtex se acoplam tanto à proteína Gi₃ quanto à proteína G_o (MANNOURY *et al.*, 2006) e os receptores 5-HT_{1A} do hipotálamo podem se acoplar tanto à proteína Gi₁ (RAAP *et al.*, 2000) como à G_z (SERRES *et al.*, 2000).

Em mamíferos, os receptores 5-HT_{1A} estão distribuídos por quase todo o encéfalo (LANFUMEY E HAMON, 2000). As primeiras tentativas de mapeamento destes receptores surgiram tão logo os primeiros radioligantes seletivos foram desenvolvidos (GOZLAN *et al.*, 1983). Estes estudos autoradiográficos demonstraram que o receptor 5-HT_{1A} é especialmente abundante no giro denteado e na área CA1 do hipocampo, septo lateral, córtex entorrinal e frontal e nos núcleos dorsal e mediano da rafe tanto em ratos (CHALMERS E WATSON, 1991) como em humanos (VARNÁS *et al.*, 2004). Baixa, mas significativa expressão do receptor também foi detectado em regiões talâmicas e hipotalâmicas, com níveis muito baixos ou quase inexistentes do receptor 5-HT_{1A} no estriado e no cerebelo (MARCINKIEWICZ *et al.*, 1984. GOZLAN *et al.*, 1983; MIQUEL *et al.*, 1991).

Com o desenvolvimento de anticorpos para o receptor 5-HT_{1A} (EL MESTIKAWY *et al.*, 1990) foi possível descrever com maior definição a distribuição e morfologia dos neurônios que continham o receptor 5-HT_{1A}. Estes estudos confirmaram os achados autoradiográficos e ainda revelaram alta densidade dos receptores 5-HT_{1A} em regiões caudais da rafe (núcleo RO_b), no Núcleo da Banda Diagonal de Broca (FDB), nas lâminas IV - VI do córtex cerebral, regiões CA2 do hipocampo, e baixa presença destes receptores nas regiões amigdalóides, na substância cinzenta periqueadotal, e nada nem na substância nigra, nem nos núcleos da base (MIQUEL *et al.*, 1991). Um estudo mais recente tratando da distribuição e morfologia dos receptores 5-HT_{1A} na região diencefálica apontou grande presença destes receptores em todo o hipotálamo, com neurônios multipolares imunorreativos ao receptor 5-HT_{1A} nos núcleos Pré-óptico Magnocelular (PPM) e no FDB, neurônios fusiformes no núcleo Supra-óptico, e neurônios triangulares ou circulares de tamanho médio populando a zona incerta, a Área Hipotalâmica Lateral (LHy), os núcleos Hipotalâmico Anterior (AH), Paraventricular do Hipotálamo (PVN), Dormedial (DMN), Pré-Mamilar (PMM) e BNST (MARVIN *et al.*, 2010).

1.9 A SEROTONINA E A SEQUÊNCIA COMPORTAMENTAL DE SACIEDADE

Além de participar da modulação destes três diferentes comportamentos, comer, beber e sono, os circuitos serotoninérgicos parecem orquestrar estas respostas comportamentais em torno de um cenário fisiológico que caracteriza um episódio ingestivo. Em roedores, um episódio de ingestão de alimento é acompanhado por uma sequência temporalmente organizada de ingestão de água, comportamentos de autolimpeza e então, por posturas de repouso e sono (HALFORD, *et al.*, 1998; RODGERS *et al.*, 2010). Esta sequência cronologicamente organizada dos comportamentos de comer e beber, seguidos pelo surgimento de posturas de repouso/sono, é conhecida como sequência comportamental de saciedade (do inglês *behavioural satiety sequence*, BSS) e foi formalmente descrita pela primeira vez por Antin e colaboradores em 1975 (ANTIN *et al.*, 1975) e representa o reflexo comportamental de um conjunto de alterações térmicas e metabólicas que ocorrem em decorrência da ingestão de alimento e, aparentemente, foi conservado ao longo da evolução dos vertebrados (MCCUE, 2006; SECOR, 2009; SPUDEIT *et al.*, 2013; para revisão sobre a BSS ver HALFORD *et al.*, 1998 e RODGERS *et al.*, 2010).

A análise dos níveis hipotalâmicos de 5-HT durante um episódio ingestivo em ratos, mostra que o padrão de liberação desse neurotransmissor acompanha o perfil da ingestão: aumenta gradualmente com a ingestão, os picos ingestivos e de liberação de 5-HT coincidem aproximadamente aos 20 minutos da refeição e, em seguida, começam a cair simultânea e paralelamente (SCHWARTZ, *et al.*, 1989). Além disso, a administração sistêmica de 5-HT adianta e produz completa BSS em ratos privados de alimento por 24 horas (Edwards e Stevens, 1991). A nossa teoria, é de que as alterações nos níveis centrais de 5-HT ao longo do episódio ingestivo organizam o aparecimento (ou interrupção) dos principais componentes da BSS: os altos níveis de 5-HT colaboram para o término da ingestão de alimento e, através de mecanismos de retroalimentação negativa, diminuem a liberação de 5-HT, o que favorece o surgimento do beber e do sono.

De todos os receptores serotoninérgicos, o receptor 5-HT_{1A} é o mais conhecido dentre aqueles que controlam negativamente a atividade serotoninérgica (para revisão ver MCDEVITT E NEUMAIER, 2011). A diminuição da atividade serotoninérgica pela ativação dos autorreceptores 5-HT_{1A} (localizados nos neurônios serotoninérgicos) foi a explicação

encontrada por diversos autores para explicar os efeitos hiperfágicos (BENDOTTI E SAMANIN, 1986) e hipnogênicos (BJORVATN *et al.*, 1998) do 8-OH-DPAT. Já a ativação dos heterorreceptores 5-HT_{1A}, foi usada para explicar os efeitos inibitórios deste agonista sobre a ingestão de água após injeção local nos núcleos PVN, (DE SOUZA VILLA *et al.*, 2008), Acumbens (CLISSOLD *et al.*, 2013) e septal lateral (SL, DE ARRUDA CAMARGO *et al.*, 2010), e sobre o sono, após injeção sistêmica em ratos (BJORVATN *et al.*, 1998).

Já os efeitos da ativação de receptores 5-HT_{1A} sobre a ingestão de alimentos em mamíferos precisam ser interpretados com mais cuidado, uma vez que as respostas ingestivas desencadeadas pela ativação destes receptores parecem depender mais do estado nutricional basal do animal do que da localização dos receptores: em ratos saciados, o 8-OH-DPAT aumentou a ingestão de alimentos tanto quando aplicado sistemicamente, como quando aplicado diretamente nos núcleos dorsal ou mediano da rafe (BENDOTTI E SAMANIN, 1986); já em porcos privados ou livremente alimentados, a ativação dos receptores 5-HT_{1A} pela injeção sistêmica de 8-OH-DPAT respectivamente, diminuiu e aumentou a ingestão de alimentos (EBENEZER *et al.*, 2001).

Estes estudos destacam a importância dos receptores 5-HT_{1A} na modulação dos efeitos da 5-HT sobre os comportamentos ingestivos e de sono em mamíferos. Mas, além disso, ratificam a importância de se investigar possíveis diferenças comportamentais que possam ser dependentes da localização dos receptores 5-HT_{1A}, uma vez que o uso de agentes farmacológicos capazes de discriminar entre um e outro receptor é crucial para a eficácia do tratamento de diversos transtornos neurológicos (ROMERO *et al.*, 1996; ARTIGAS *et al.*, 1996). Neste sentido, diferentes espécies de animais já foram testadas para analisar a participação dos receptores 5-HT_{1A} nos efeitos controlados pela 5-HT. Dentre as espécies utilizadas, testes de conflito em pombo têm apontado esta ave como um organismo bastante eficaz para identificar potenciais efeitos ansiolíticos e antidepressivos de agentes que atuam através de receptores 5-HT_{1A} (para revisão ver BARRETT *et al.*, 1994).

Como mencionado anteriormente, tanto em pombos privados de alimento (STEFFENS *et al.*, 1997) quanto em animais saciados (DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLHER *et al.*, 2013), os efeitos mais evidentes da injeção ICV de 5-HT foram sobre a ingestão de água e sobre o sono: doses variando de 50 a 300 nmol de 5-HT provocaram intenso aumento na ingestão de água dentro dos 15 primeiros minutos pós injeção, seguido por longos períodos de repouso/sono entre 45 a 60 minutos de registro (STEFFENS *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*,

2011; HOELLER *et al.*, 2013). Nós associamos as respostas dipsogênica e hipnogênica da 5-HT à ativação de receptores 5-HT1A, uma vez que a injeção de 8-OH-DPAT provocou a mesma sequência de respostas comportamentais: intensa ingestão hídrica logo após as injeções (STEFFENSE *et al.*, 1997; HOELLER *et al.*, 2013) seguida por prolongados períodos de sono (HOELLER *et al.*, 2013).

Os efeitos da 5-HT mimetizam a sequência de comportamentos pós-prandiais observada em pombos privados de alimento. Esta sequência de comportamentos foi recentemente descrita no pombo pelo nosso laboratório (SPUDEIT *et al.*, 2013). Assim como em ratos (EBENEZER *et al.*, 2001), os efeitos que observamos em pombos após a ativação de receptores 5-HT1A com injeção ICV do 8-OH-DPAT (HOELLER *et al.*, 2013) foram bloqueados pelo pré-tratamento com o antagonista de auto e heterorreceptores 5-HT1A, WAY100635 (WAY). Estes dados sugerem que as respostas da 5-HT e do 8-OH-DPAT se devem à diminuição da atividade serotoninérgica possivelmente provocada pela ativação de autorreceptores 5-HT1A. No entanto, como o WAY atua tanto em receptores pré quanto pós-sinápticos, não podemos afirmar qual a localização do receptor 5-HT1A responsável pelos efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT.

Nossa hipótese, portanto, é de que a 5-HT liberada após um episódio ingestivo está envolvida diretamente na organização das respostas dipsogênica e hipnogênica que acompanham a ingestão de alimento. A nossa teoria prediz que a 5-HT liberada durante um episódio ingestivo (possivelmente no espaço intraventricular) atua em autorreceptores 5-HT1A. A ativação destes receptores, consequentemente, interrompe a influência inibitória tônica exercida pelos terminais serotoninérgicos sobre alvos hipotalâmicos envolvidos com o controle da ingestão hídrica e sono. Desta forma, a intensa ingestão de água e sono que observamos após a injeção de 5-HT em pombos, é causada pela inibição dos circuitos serotoninérgicos centrais provocada pela própria 5-HT.

1.10 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos receptores 5-HT1A nas respostas dipsogênica e hipnogênica provocadas pela 5-HT em pombos na tentativa de especificar as respostas provocadas pela injeção intracerebroventricular de 5-HT à atuação de auto ou heterorreceptores 5-HT1A.

1.10.1 Objetivos Específicos

- 1- Investigar o papel dos receptores 5-HT_{1A} sobre as respostas ingestivas (água e alimento) e hipnagênica provocadas pela administração ICV de 5-HT e de 8-OH-DPAT.
- 2- Avaliar os efeitos da lesão dos neurônios serotoninérgicos sobre os efeitos ingestivos (água e alimento) e hipnagênicos provocados pela administração ICV de 5-HT e de 8-OH-DPAT.
- 3- Descrever a distribuição dos receptores 5-HT_{1A} no tronco encefálico e no hipotálamo de pombos.
- 4- Analisar os efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico.
- 5- Analisar os efeitos da injeção ICV de 5-HT e do 8-OH-DPAT sobre a expressão da proteína Fos em distritos hipotalâmicos e outras estruturas prosencefálicas possivelmente relacionadas com as respostas provocadas pelos tratamentos.

2. MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram conduzidos em aderência às diretrizes para utilização de animais em experimentos prescritas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, normas editadas em 1991) e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina sob os protocolos: 23080.0383262/2008-65. Além disso, os experimentos realizados na Alemanha foram aprovados pela CEUA da Universidade do Ruhr, Bochum, com a permissão n.º 8.87-50.10.37. Em todos os experimentos deste trabalho foram utilizados pombos adultos de ambos os sexos (*Columba livia*, 400 - 550 g), mantidos em gaiolas individuais em ambiente climatizado (22 - 24 °C), com ciclo claro/escuro de 12: 12h (luzes acessas às 7h) e com livre acesso à água e ração.

2.2 DROGAS E INJEÇÕES

- Serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina hidrocloreto), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Doses de 50 e 150 nmol; dissolvida em ácido ascórbico (AA) 1% em NaCl 0,9% e injetada ICV.
- 8-OH-DPAT [8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina], Sigma-Aldrich. Agonista 5-HT_{1A}/7; dose de 30 nmol; dissolvido em AA 1% em NaCl 0,9% e injetado ICV.
- WAY100635 (maleato de ciclohexano carboxamida n-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-n-(2-piridinil), Sigma-Aldrich. Antagonista 5-HT_{1A} pré e pós sináptico; doses 0,1, 0,3 e 1 nmol; dissolvido em AA 1% em NaCl 0,9%, e injetado ICV.
- MM77 [1-(2-Methoxyphenil)-4-(4-succinimida-butyl) piperazina dihidrocloreto], Tocris Bioscience, Bristol, UK. Antagonista 5-HT_{1A} pós-sináptico; doses 23 e 69 nmol. Dissolvido em DMSO 0,3% em PBS 0,1M, e injetado ICV.
- 5,7-Dihidroxitriptamina (3-(2-aminoethyl)-1H-indole-5,7-diol). Sigma-Aldrich. Dose de 400 µg/animal, dissolvida em AA 0,1% em NaCl 0,9%, e injetada ICV.
- Desipramina hidrocloreto [3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[b,f]azepina-5-il)-N-metilpropano-1- amina]. Sigma-Aldrich. Inibidor da recaptação de noradrenalina (usada para prevenir os neurônios noradrenérgicos de possíveis lesões ocasionadas pela 5,7-DHT), utilizada na dose de 25mg/kg, dissolvida em solução NaCl 0,9%, e administrada intraperitonealmente.

As doses para os agentes foram escolhidas baseadas em trabalhos anteriores do laboratório onde estas doses (5-HT e 8-OH-DPAT) foram capazes de provocar alterações nos comportamentos ingestivos e de sono em pombos privados (STEFFENSet *et al.*, 1997) ou livremente alimentados (STEFFENSet *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLERet *et al.*, 2013), ou capazes de bloquear os efeitos ingestivos, tanto da 5-HT quanto do 8-OH-DPAT (WAY110635, DOS SANTOS *et al.*, 2009; HOELLERet *et al.*, 2013).

As injeções ICV foram feitas através de uma cânula injetora (agulha gengival de 33G) conectada por um tubo de polietileno P10 à uma microseringa de Hamilton e que se estendeu em 1mm a ponta da

cânula guia. O volume injetado (2 µl) foi administrado ao longo de 2 minutos e a cânula injetora permaneceu no local por 2 minutos adicionais para melhor difusão da droga para o espaço ventricular e para prevenção de possíveis refluxos.

A dose selecionada para a 5,7-DHT foi escolhida tendo como base o trabalho de ALESCI E BAGNOLI (1988) em que uma dose semelhante à que adotamos provocou diminuição dos níveis de 5-HT em várias áreas encefálicas do pombo. Já as doses do MM77, conhecido como um potente antagonista de heterorreceptores 5-HT_{1A} (MOKROSZ *et al.*, 1994) foram escolhidas baseadas em um estudo em camundongos onde uma doses equimolare administrada sistemicamente foi capaz de bloquear os efeitos antidepressivos do 8-OH-DPAT observados no teste do nado forçado (ALFREDO E OFIR, 2005).

2.3 CIRURGIA E PERFUSÃO

Ao menos 14 dias antes dos experimentos, cada animal foi anestesiado com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.m.) e xilazina (10 mg/kg, i.m.) e estereotaxicamente implantado com uma cânula guia de aço inoxidável (26G) direcionada ao ventrículo lateral direito de acordo com as coordenadas (1,0 mm lateral à linha média, 6,0 mm anterior à linha interaural e entre 5 a 6 mm abaixo da superfície dorsal do cérebro) derivadas do atlas do encéfalo de pombo (KARTEN E HODOS, 1967). O posicionamento da cânula guia no espaço intracerebroventricular foi verificado com o auxílio de uma lupa cirurgica, através da observação do “brotamento” de líquido cefalorraquidiano na abertura superior da cânula. Em seguida, a cânula foi ancorada ao crânio com o auxílio de 2 parafusos de joalheiros diagonalmente posicionados, fixada com cimento odontológico e sua luz mantida íntegra por um mandril interno removível feito de agulha odontológica.

Durante a cirurgia os animais foram mantidos aquecidos (40 - 41 °C) por meio de uma manta térmica e imediatamente após a cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular (i.m.) do antibiótico Enrofloxacina (Baytril®, Bayer, 5% injetado no volume de 1 ml/kg) com intuito profilático para possíveis infecções decorrentes da cirurgia, e duas injeções i.m. (24 h de intervalo entre elas) de cetoprofeno (Ketofen® 1%, Merial, analgésico com ação antipirética e anti-inflamatória; 1ml/Kg;).

Para a perfusão, os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos transcárdialmente com uma solução de sacarose 9,25% em

tampão fosfato (PB, 0,2M, pH 7,2) [contendo 0,3 ml de heparina (1500 UI), e mantida entre 37 a 40°C], seguida por paraformaldeído 4% (PFA, em PB). Os cérebros foram dissecados e mantidos por 4 h em PFA 4% (a 4 °C), até serem transferidos para uma solução de tampão salina fosfato 0,1M (PBS) e mantidos a 4 °C por 18 h. Em seguida, foram seccionados a 40µm em um vibrátomo (Vibratome 1500 Plus, Vibratome Company, St. Louis, MO, USA) e armazenados em anticongelante (18% de PB 0,2M; 22% de água destilada; 35% de propilenoglicol e 25% de sacarose) a -20°C até serem processados.

2.4 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Durante a primeira hora após as injeções foram feitos registros dos pombos através de uma câmera (Orbit QuickCam, V-UCC22, Logitech, Newark, CA, USA) acoplada a um microcomputador, e a latência para o primeiro evento, a duração total e a frequência dos comportamentos de beber, comer, exploração e de comportamentos típicos de sono (Quadro 1) foram gravadas. Estes vídeos foram posteriormente avaliados e classificados usando um software (EthoWatcher®, Crispim *et al.*, 2010; e disponível em ethowatcher.ufsc.br) e um catálogo comportamental desenvolvidos pelo nosso laboratório. A definição e o uso destas unidades comportamentais foram descritas em trabalhos anteriores de nosso laboratório (Steffens *et al.*, 1997; Häckl *et al.*, 2005; Da Silva, 2007; Da Silva *et al.*, 2009; Dos Santos *et al.*, 2009; para vídeo ver Da Silva *et al.*, 2008).

Quadro 1: Catálogo com a descrição de cada comportamento do pombo usado na avaliação e quantificação da análise comportamental.

Comer	A ave bica a ração, esteja ela no comedouro ou no chão da gaiola, apresentando necessariamente movimentos de deglutição acompanhados por movimentos de extensão do pescoço.
Beber	A ave insere o bico dentro do bebedouro e suga a água.
Comportamentos típicos de sono	A ave permanece com os olhos fechados, cabeça retrusa entre os ombros e apoiada sobre o peito, apresenta eriçamento das penas, eventualmente apoiada sobre apenas uma das patas ou com a parte ventral totalmente apoiada sobre o chão da gaiola.
Explorar	A ave explora a gaiola com as patas ou com o bico, sem apresentar locomoção, movimentando constantemente a cabeça em várias direções.

A ração foi disponibilizada em comedouros feitos com garrafas plásticas (500 ml) com um orifício de 6,0 x 8,0 cm em seu terço médio e a água foi providenciada em bebedouro padrão (para aves). Ao final do período de registro, os péletes de ração que eventualmente caíram do comedouro foram recuperados e pesados juntos com a ração que restava no comedouro.

2.5 PROCEDIMENTO IMUNOISTOQUÍMICO

Todas as lavagens e incubações aconteceram em PBS 0,1M com 0,25% de Triton X100 (PBST) sob suave agitação em temperatura ambiente (exceto as incubações com os anticorpos primários que foram realizadas em câmara úmida entre 4 a 8°C). Todas as lavagens consistiram de 4 trocas em PBST (5 min cada). Para descrição dos núcleos imunorreativos a proteína Fos, as seções foram lavadas e incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente (TA) em uma solução contendo 2% soro albumina bovina (BSA) em PBST, e logo após foram incubadas com o anticorpo primário anti-Fos (K-25 (Sc-253) Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA; produzido em coelho, diluição 1:2000) em 2% de BSA em PBST durante 18 horas. Este anticorpo anti-

Fos tem sido usado em pombos para avaliar a capacidade de magnetorecepção (WU AND DICKMAN, 2011) e também vem sendo utilizado em outras espécies de aves para estudar os sistemas de controle vocal, como o pardal doméstico (*Passer domesticus*) e o estorninho-comum (*Sturnus vulgaris*) (RITERS *et al.*, 2004). Em seguida, as secções foram lavadas e a peroxidase endógena foi bloqueada em uma solução contendo 0,3% de H₂O₂ em metanol 100% durante 40 minutos, lavadas novamente e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (feito em cabra, do Kit Vectastain Elite ABC Kit - Coelho IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; diluição 1:1000) em PBST durante 120 minutos em TA. Após novas lavagens, as secções foram incubadas com uma solução de avidina-biotina (soluções A e B do Kit Vectastain Elite ABC Kit - Sheep IgG; diluição 1:1000) em PBST em TA. Finalmente as secções foram lavadas e a expressão da proteína Fos foi visualizada por meio da DAB (3,3 - diaminobenzidina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0,05% em PBS, contendo 0,015% de H₂O₂, intensificada com 0,05% de sulfato de níquel amônio durante 4 minutos. A reação da DAB foi interrompida com uma lavagem em água destilada a 4° C, e as secções lavadas em PBS. Esta marcação resultou em uma coloração preta/cinza escuro. As secções do tronco encefálico foram então processadas com a técnica de dupla marcação para a detecção dos neurônios imunorreativos à enzima triptofano hidroxilase (TPH). Para isso, as secções foram lavadas e incubadas durante 60 minutos em uma solução com 2% de BSA e 2% de soro normal de coelho, e em seguida incubadas com o anticorpo primário anti-TPH (AB 1541, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA; produzido em ovelha, diluição 1:1000) em uma solução contendo 1% de soro e 1% de BSA durante 20 horas. Em seguida as secções foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário por 120 minutos (coelho anti-ovelha, 1:1000; anticorpo do Kit Vectastain Elite ABC Kit - Sheep IgG) em TA. Após novas lavagens, as secções foram incubadas com uma solução de avidina-biotina (soluções A e B do Kit Vectastain Elite ABC Kit - Sheep IgG; diluição 1:250) em PBST por 90 minutos em TA. Finalmente as secções foram lavadas e os neurônios serotoninérgicos foram visualizados por meio da 0,05% de DAB e 0,0075% de H₂O₂ em PBS durante 9 minutos. A reação da DAB foi interrompida com uma lavagem em água destilada a 4° C, e as secções lavadas em PBS 0,01M, montadas em lâminas gelatinizadas, secas ao ar livre durante 48 horas, desidratadas em uma bateria graduada de etanol e xilol, e finalmente cobertas com laminula com o DPX (uma mistura de distireno, plastificante e xilol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como meio de montagem. A

marcação da TPH resultou em uma coloração citoplasmática marrom claro.

2.6 ANÁLISE E CONTAGEM CELULAR

As secções foram analisadas em microscópio óptico (Olympus, BH-2) e fotografadas com uma câmera (PixeLINK, Ontário, Canadá) para identificação dos diferentes tipos de marcações. Os neurônios imunorreativos à enzima TPH foram analisados no tronco encefálico tendo como referências para localização e nomenclatura neuroanatômica trabalhos anteriores do laboratório (MENEGHELLI *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2011) e o atlas do encéfalo de pombo de KARTEN E HODOS (1967). Para a identificação neuroanatômica das estruturas hipotalâmicas usamos como referência o estudo de Kuenzel e Van Tienhoven sobre a nomenclatura e descrição dos núcleos hipotalâmicos e circumventriculares do cérebro da galinha (KUENZEL E TIENHOVEN, 1982). Para padronização na identificação do nível anteroposterior das secções, utilizamos o atlas do cérebro de pombo de Karten e Hodos (KARTEN E HODOS, 1967). Tanto para a quantificação da proteína Fos em neurônios imunorreativos à TPH do tronco encefálico, quanto dos núcleos Fos positivos nas regiões hipotalâmicas e prosencefálicas, três secções representativas de cada núcleo, de cada animal, de cada grupo experimental foram quantificadas. Para eliminar efeitos da variação entre as secções, o número de marcações observadas entre as secções foi somado e a média tomada como o valor para um animal para cada núcleo analisado. Para assegurar que as secções escolhidas para as contagens pertenciam a níveis anteroposteriores semelhantes entre os diferentes animais, as mesmas foram selecionadas de acordo com marcos neuroanatômicos específicos para cada nível (verificar um exemplo dos diferentes padrões de marcações e coordenadas dos núcleos analisados nas figuras 1 e 2). As marcações foram quantificadas através do software ImageJ (www.rsbweb.nih.gov/ij/) por uma única pessoa cega às condições experimentais. Para os núcleos serotoninérgicos, a contagem foi feita em 1 a 2 campos (0,47 x 0,36 mm; o número de campos variou de acordo com a área de cada núcleo; figura 1). Para os núcleos hipotalâmicos e prosencefálicos, a área de contagem foi circunscrita dentro de um polígono adaptado à área de cada núcleo (representada como um quadrado na figura 2). A área deste polígono não variou entre os diferentes animais.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferentes densidades (número de células marcadas por mm²) de núcleos imunorreativos à proteína Fos (Fos+), neurônios imunorreativos à enzima TPH (TPH+) ou duplamente marcados (TPH+Fos+) foram inicialmente analisados pelo teste Shapiro-Willks para teste de normalidade da distribuição e em seguida, analisados separadamente para cada núcleo por testes paramétricos ou não paramétricos dependendo da sua distribuição. Como teste paramétrico foi utilizado a Anova de uma via e como teste não paramétrico, o teste de Kruskal-Wallis. Quando necessário, foram utilizados os testes pós-hoc para dados paramétricos (Sheffé) ou para dados não-paramétricos (Mann-Whitney) para verificar diferenças entre grupos específicos. Todos os testes estatísticos utilizados neste trabalho foram realizados com o programa Statisca (Stasoft, versão 8.0; Tulsa, OK, USA).

2.8 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.8.1 Experimento 1: avaliação dos efeitos de antagonistas de receptores 5-HT_{1A} sobre as respostas ingestivas e hipnagênicas provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT.

Dezesseis pombos adultos machos (450 a 530g, de ambos os sexos) implantados com cânulas guias direcionadas ao ventrículo lateral direito foram divididos aleatoriamente em dois grupos dependendo do antagonista que iriam receber: WAY ou MM77. Os experimentos foram realizados entre às 10 e 16 h. Durante este período, o comportamento ingestivo é estável e baixo (veja a ingestão de alimento e água dos animais tratados com veículo durante três horas consecutivas em Dos Santos *et al.*, 2011). Os animais foram mantidos em um mesmo biotério e sem contato visual durante todo o período de experimento. No momento do tratamento eles eram retirados da gaiola, contidos suavemente e levados à outra sala onde eram administrados os tratamentos. Inicialmente os animais foram tratados com o antagonista (WAY100635 ou MM77) ou veículo, devolvidos à gaiola e, 15 minutos depois recebiam a segunda injeção: 5-HT, 8-OH-DPAT ou veículo. Após a segunda injeção os animais eram devolvidos às suas respectivas gaiolas e o registro experimental começava.

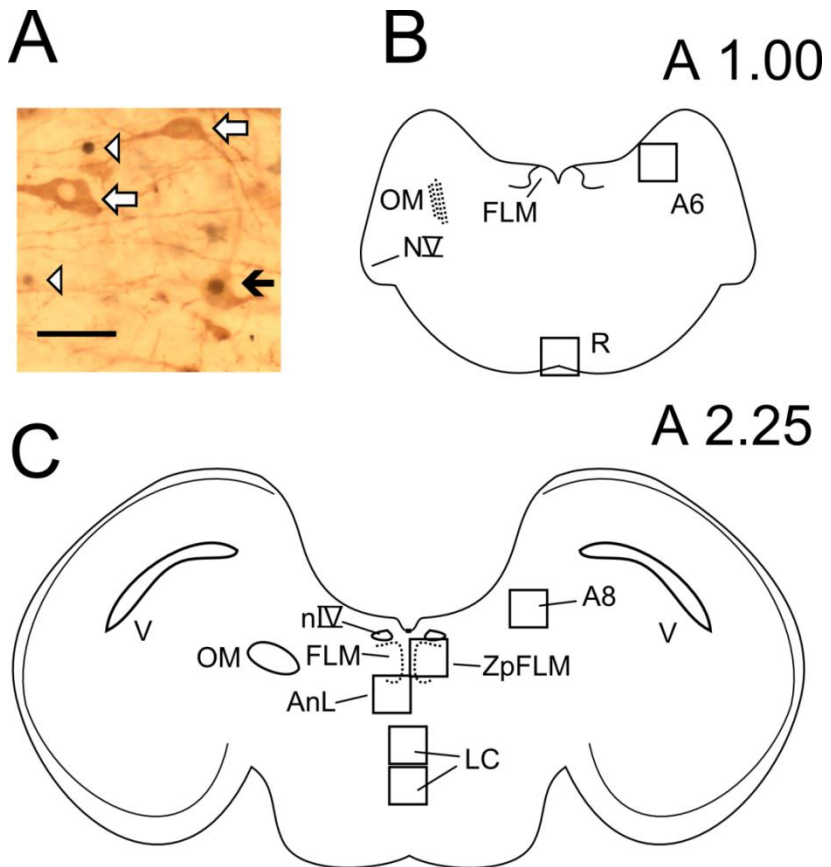


Figura 1: A) fotomicrografia com os diferentes padrões de marcação analisados: flecha preta, neurônios duplamente marcados, Fos+TPH+; flecha branca, célula TPH+ e, cabeça de seta branca, núcleo Fos+. Barra de escala 50 μ m. B) esquema de um corte coronal demonstrando os núcleos serotoninérgicos da ponte medial onde a expressão da proteína Fos foi quantificada e, C) esquema de um corte coronal demonstrando os núcleos serotoninérgicos da região mesencefálica anterior onde a expressão da proteína Fos foi quantificada. Para nomenclatura, verificar lista de abreviações. Figura adaptada de DOS SANTOS *et al.*, 2011.

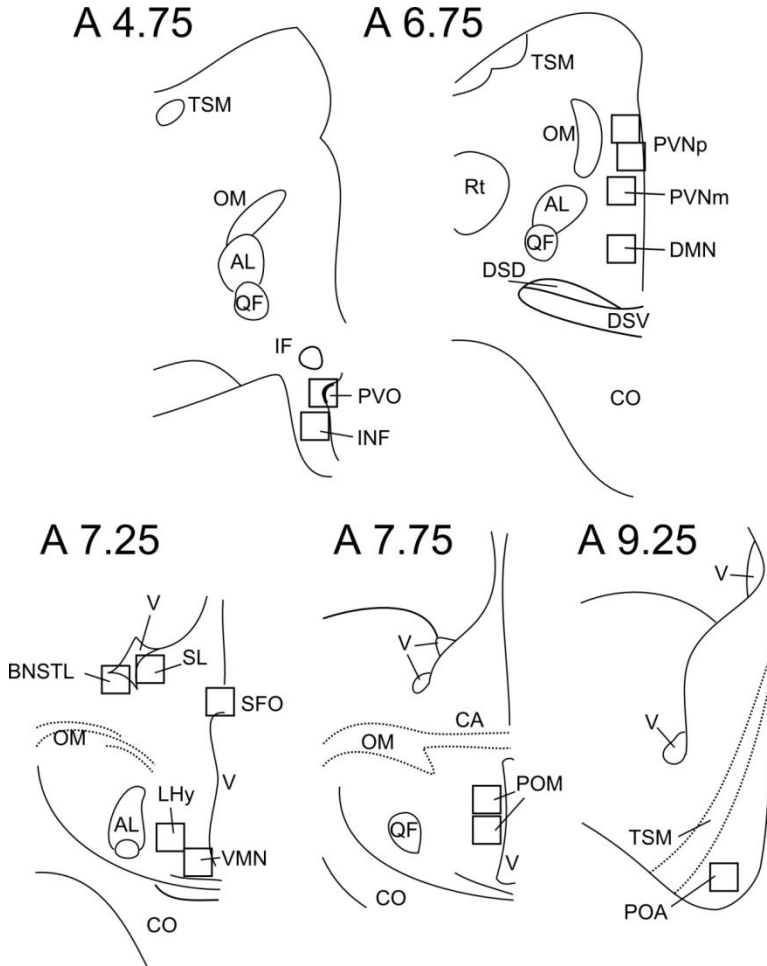


Figura 2: esquema de cortes coronais (do mais posterior A 4.75 para o nível mais anterior do hipotálamo A 9.25) demonstrando os núcleos hipotalâmicos e demais estruturas prosencefálicas onde a expressão da proteína Fos foi quantificada. Para nomenclatura, checar lista de abreviações.

2.8.1.1 Análise estatística

Inicialmente, os dados foram analisados pelo teste Shapiro-Willks para teste de normalidade da distribuição e a seguir foram analisados com testes paramétricos ou não paramétricos de acordo com a sua distribuição. Os dados comportamentais e ingestivos foram analisados pelo teste de Anova de duas vias tendo o pré-tratamento (antagonistas) e o tratamento (5-HT ou 8-OH-DPAT) como fatores. Em certos casos, os dados ingestivos não apresentaram distribuição normal, então se adotou o protocolo sugerido por Sokal e Rohlf (2012, p444) para adaptar os dados às condições exigidas pelos testes paramétricos. Resumidamente, os dados foram ranqueados automaticamente pelo software Statistica, apresentado assim, distribuição normal. Em seguida foram analisados normalmente pela Anova de duas vias. Em todos os testes, valores de $p \leq 0,05$ foram aceitos como estatisticamente significantes.

2.8.2 Experimento 2: análise dos efeitos da lesão dos neurônios serotoninérgicos sobre as respostas ingestivas e hipnôgênica provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT.

2.8.2.1 Os animais foram divididos em três grupos experimentais

Grupo 1: pombos naïve, sacrificados sem nenhuma manipulação.

Este grupo contou com seis animais e serviu para determinarmos os níveis encefálicos basais de 5-HT e do seu metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), da Noradrenalina e de seu metabólito o ácido homovanílico em animais intactos, isto é, que não foram submetidos à cirurgia e nem a nenhuma manipulação (Figura 3). Os níveis de noradrenalina e de seu metabólito, o ácido homovanílico (HVA), também foram analisados com o objetivo de verificar se houve ou não lesão dos neurônios noradrenérgicos. Os níveis destas substâncias serviram como controle para as possíveis alterações provocadas pela 5,7-DHT nos animais dos outros grupos.

Grupo 2: pombos injetados com a 5,7-DHT ou com seu veículo e sacrificados 12 dias após a lesão.

Este grupo contou com 12 animais e serviu para verificar os efeitos da neurotoxina sobre os neurônios serotoninérgicos. Seis animais foram injetados com a 5,7-DHT e outros 6, injetados com o veículo (Sham 12 dias) (Figura 3). Os efeitos da lesão foram verificados comparando os níveis de 5-HT entre os animais destes dois grupos, e pela comparação entre os índices destes animais com os valores observados nos animais do grupo 1.

Grupo 3: pombos injetados com a 5,7-DHT ou com seu veículo e tratados com 8-OH-DPAT (30 nmol), 5-HT (150 nmol) ou veículo e sacrificados 28 dias após a lesão.

Este grupo contou com 6 animais lesados com a 5,7-DHT (Grupo 5,7-DHT) e outros 6 animais com lesão fictícia (Grupo Sham) (Figura 3). Com estes grupos pretendíamos verificar se os efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT eram dependentes dos autoreceptores 5-HT_{1A}. Doze dias após a cirurgia, começaram a ser testados com 5-HT, 8-OH-DPAT ou veículo. Dentro de cada grupo (Sham ou 5,7-DHT) todos os animais receberam todos os tratamentos em um desenho experimental tipo quadrado latino. Os animais foram testados com uma única injeção de cada agente e tiveram seus comportamentos registrados na primeira hora após a injeção. O consumo de ração e água foi verificado ao fim deste período. Foi respeitado um intervalo de 7 dias entre as injeções, e os animais foram sacrificados 1 dia após a última injeção, exatamente 28 dias após a lesão.

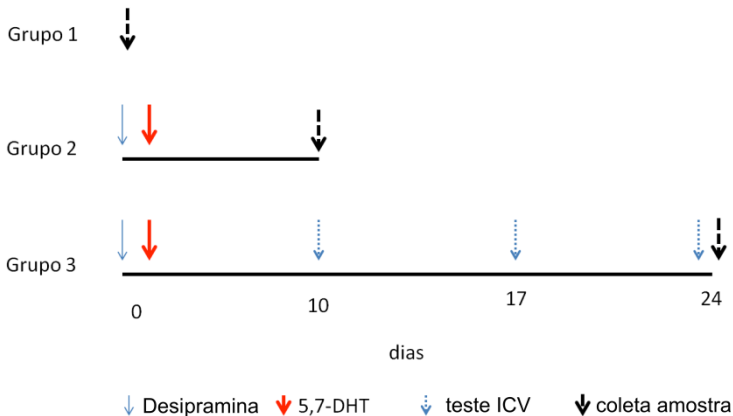


Figura 3: esquema dos grupos experimentais dos animais submetidos à lesão pela 5,7-DHT e do tratamento com a 5-HT e com o 8-OH-DPAT.

2.8.2.2 Lesão dos neurônios serotoninérgicos com a neurotoxina 5,7-DHT

O protocolo de injeção que nós utilizamos foi baseado, com algumas alterações, nos trabalhos de ALESCI E BAGNOLI (1988) e ISON E COLABORADORES (1996) que avaliaram, respectivamente, o efeito da 5,7-DHT sobre os níveis encefálicos de 5-HT e sobre o comportamento social de pombos. No dia da injeção da 5,7-DHT, os animais receberam uma injeção intra cavidade celomática de desipramina (25mg/kg, em 1ml de NaCl 0,9%) para proteger os neurônios noradrenérgicos dos efeitos da 5,7-DHT. 45 minutos após, os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de cloridrato de cetamina e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (i.m.) e adaptados ao aparelho estereotáxico. Após a exposição do crânio, os locais de inserção da cânula guia foram demarcados: 6 mm anterior à linha interaural e 1,5mm lateral ao seio venoso (bilateralmente) e foi realizada a perfuração dos orifícios para a inserção da cânula guia e para fixação dos parafusos. Inicialmente a cânula foi direcionada ao ventrículo lateral esquerdo e lentamente introduzida no cérebro do animal. Uma vez verificado o correto posicionamento da cânula guia no espaço intraventricular, a 5,7-DHT foi administrada na taxa de 1 μ l/minuto. A injeção foi realizada através de uma agulha injetora (agulha gengival 30G, que excedeu 1mm a ponta da cânula guia) conectada através de um tubo de polietileno (P10) a uma microseringa Hamilton de 10 μ l.

A cânula guia e a agulha injetora permaneceram no local por 5 minutos após a injeção e em seguida foram direcionadas ao ventrículo lateral direito. Os procedimentos de inserção da cânula guia e injeção foram os mesmos que para a primeira injeção. A cada injeção foram administrados 200 μ g de 5,7-DHT dissolvidos em 5 μ l ácido ascórbico (0,1% em salina 0,9%) apenas 10 minutos antes da injeção. Nos animais dos grupos 2 e 3, logo após as injeções foi feita a obturação do orifício do ventrículo lateral esquerdo com esponja hemostática (Hemospon, Technew, RJ, Brasil), a cânula guia foi direcionada ao ventrículo lateral direito e ancorada ao crânio do animal como descrito anteriormente. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam o tratamento profilático para infecção e dor pós cirúrgica como descrito anteriormente e retornaram às suas gaiolas. Durante o período de recuperação, o consumo de alimentos (ração padrão e água) e o peso corporal dos animais foi acompanhado diariamente e, 12 dias após a cirurgia, começaram os primeiros testes comportamentais.

2.8.2.3 Coleta do tecido encefálico

No dia da coleta do material encefálico, os animais foram mortos por sobredose anestésica (injeção intra cavidade celomática de uretana 45%), decapitados, e as partes de interesse (tronco cerebral, hipotálamo, arcopálio e hipocampo) foram dissecadas (ver esquema figura 4) e rapidamente congeladas a -80°C em uma solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina (DHBA, como padrão interno), para subsequente análise dos níveis de 5-HT e noradrenalina (NA) e de seus metabólitos, o 5-HIAA e o HVA, respectivamente. A dissecação das estruturas analisadas foi baseado em Alesci e Bagnoli (1988), com o auxílio de uma matriz para o cérebro de pombos (*pigeonbrain slicer*) desenvolvida pelo nosso laboratório para padronizar o nível antero-posterior das estruturas entre os diferentes animais avaliados.

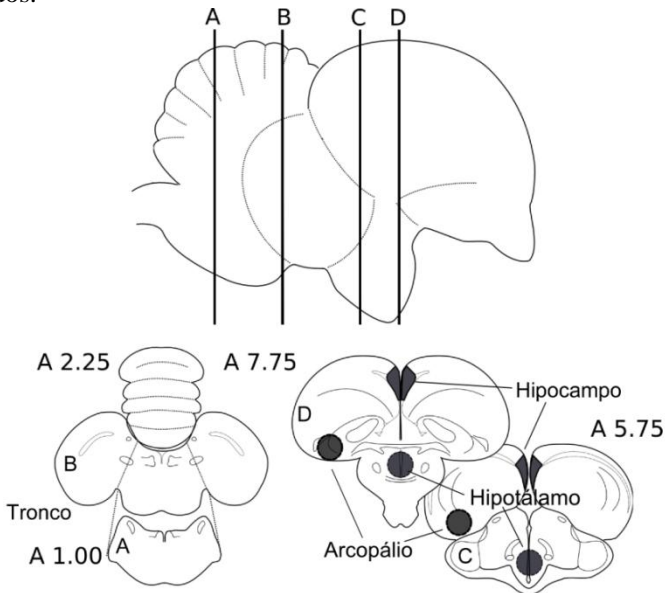


Figura 4: esquema de dissecção das estruturas encefálicas para a análise do conteúdo de 5-HT, NA e seus metabólitos. A) esquema de um corte coronal da face medial da ponte; B) esquema de um corte coronal da face rostral do mesencéfalo; C) esquema de um corte coronal com a face caudal do hipotálamo medial, face caudal do arcopálio e face medial do hipocampo e , D) esquema de

um corte coronal com a face rostral do hipotálamo medial, do arcopállo e do hipocampo. Para nomenclatura, checar lista de abreviações.

2.8.2.4 Determinação dos níveis cerebrais de monoaminas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O conteúdo encefálico de 5-HT, NA, 5-HIAA e HVA foram analisados utilizando-se um método adaptado de Linder e colaboradores (Linder, 2008). O equipamento utilizado para quantificação foi um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Waters, modelo Alliance 2695, composto por uma bomba quaternária, um desgaseificador, um injetor automático refrigerado, além de um aquecedor de coluna, sendo o módulo acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, MA, USA). A célula analítica de fluxo é composta de um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro e, operado em corrente contínua ajustada a um potencial de oxidação de +400 mV versus a um eletrodo de referência de Ag/AgCl in situ (ISAAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável. O programa computacional utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados foi o Empower 2 ® (Waters Co.).

A fase móvel foi composta por 90 mM de fosfato de sódio monobásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,7 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 50 µM de EDTA dissódico, 10% de Acetonitrila (CH₃CN) e H₂O ultrapura (Milli-Q, Millipore). A fase móvel teve o pH ajustado para 3,0 com hidróxido de sódio e, em seguida, a fase móvel foi filtrada através de uma membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 µM (Millipore) e desgaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos.

O fluxo foi bombeado de modo isocrático a 0,30 mL por minuto, através de uma coluna de fase reversa (C18) modelo Synergi Hydro-RP, 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com partículas octadecilsilano (C18) de 4µM de diâmetro (Phenomenex, Torrance, USA). A coluna foi protegida por uma guarda coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, USA), ambas utilizadas na temperatura de 35°C. Para equilíbrio completo da coluna cromatográfica a fase móvel foi bombeada a um fluxo de 0,1 ml/min. durante 12 horas antes de iniciar as análises. As amostras de tecido foram masseradas, submetidas a um banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos e, em seguida, foram centrifugadas a 15.000 RPMs durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos do autoinjeter e mantidos a temperatura de

4°C e uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 20 minutos.

As amostras foram quantificadas através das curvas de calibração construídas como os padrões dos analitos dissolvidos em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio. As concentrações das curvas foram de 20, 50, 100, 250, 500, 1.000, 2.000 ng/mL de cada analito. A partir da análise das amostras de calibração, a equação da curva de calibração foi determinada por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A curva de calibração foi traçada lançando-se no eixo “x” as diferentes concentrações das soluções padrões versus a área dos picos de cada analito que foi lançada no eixo “y”. Para o cálculo das concentrações dos analitos, empregou-se a equação $y = ax + b$, onde “y” é a área extraída dos picos do analito nos cromatogramas, “x” é a concentração do analito na amostra (ng/mL), “a” é a inclinação da reta e “b” é o valor do intercepto. Finalmente, os valores obtidos foram expressos em nanogramas por miligrama de tecido úmido.

2.8.3. Experimento 3: descrição da distribuição dos receptores 5-HT1A através da análise dos sítios de ligação ao agonista [³H] 8-OH-DPAT no tronco encefálico e no hipotálamo de pombos.

2.8.3.1 Procedimentos experimentais

Seis pombos adultos (450 a 495g, de ambos os sexos) foram utilizados para este experimento. Os animais foram decapitados, os cérebros removidos do crânio e imediatamente congelados a -40 °C em isopentano e armazenados em freezer a -70°C. Posteriormente, os cérebros foram seccionados em secções coronais de 10µm em criostato de congelamento (2800 Frigocut E, Viena, Áustria), e montadas em lâminas gelatinizadas e secas em freezer antes de serem utilizadas para a autorradiografia ou coloração histológica para visualização dos corpos celulares.

2.8.3.1 Autorradiografia

Os sítios de ligação dos receptores 5-HT1A foram marcados com o ligante tritiado [³H] 8-OH-DPAT de acordo com protocolo previamente publicado (HEROLD *et al.*, 2011), que consistiu em três

passos: 1) uma pré-incubação de 30 min à temperatura ambiente (TA) em tampão (Tris-HCl 170 mM com CaCl₂ 4 mM e 0,01% ácido ascórbico, pH 7,6) para remover os ligantes endógenos do tecido, 2) incubação principal, onde os sítios de ligação foram marcados com 1 nM [³H]8-OH-DPAT em tampão por 60 minutos à TA com ou sem a presença de 1 μM de 5-HT como desacoplador para diferenciar entre ligações não específicas (na presença de 5-HT) da densidade total de ligações (sem 5-HT). Uma vez que o número de ligações não específicas foi menor que 10% do valor total de ligações, o valor total de ligações foi considerado como equivalente ao valor de ligações específicas, 3) e como último passo, as secções foram enxaguadas por 5 minutos a 4 °C em tampão para eliminar os ligantes que não se ligaram ao receptor. As secções foram montadas, secas ao ar livre sob proteção, e subsequentemente expostas contra um filme sensível ao trítio (Hyperfilm, Amersham, Germany) com plástico [³H]-padrão (Microscales, Amersham) de conhecido padrão de radioatividade durante 8 semanas.

2.8.3.3 Análise de imagens

As autorradiografias foram digitalizadas por meio de um sistema de análise KS-400 (Kontron, Alemanha) conectado a uma câmera CCD equipada com uma lente Macro S-Ortoplanar 60mm (Zeiss, Alemanha). As imagens foram adquiridas em resolução 512 x 512 pixels e valores de cinza de 8 bits. Imagens de micro-escalas coexpostas foram usadas para calcular uma curva de calibração por estimação não linear dos mínimos quadrados, que definiu a relação entre os valores de cinza nas autorradiografias e as concentrações de radioatividade. Isto permitiu a conversão dos valores dos tons de cinza de uma autorradiografia em valores de radioatividade correspondentes. Estas concentrações dos sítios de ligação ocupados pelo ligante sob as condições de incubação foram transformadas em densidade de sítios de ligação a condições de saturação por meio da equação $(K_D + L)/A_S \times L$, onde K_D é a constante de dissociação da cinética ligante - sítios de ligação, L é a concentração de incubação do ligante e, A_S é a atividade específica do ligante.

2.8.3.4 Identificação neuroanatômica

As bordas das estruturas definidas pelo atlas de KARTEN E HODOS (1967) foram microscopicamente identificadas em secções

processadas para visualização de corpos celulares e traçadas sobre impressões de autorradiografias digitalizadas. A média dos valores de cinza nas regiões anatomicamente identificadas (uma a cinco secções por região/animal) foi transformada em concentração de sítios de ligação (fmol/mg de proteína).

2.8.4 Experimento 4: análise da injeção ICV de 8-OH-DPAT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico e em distritos hipotalâmicos e outras estruturas prosencefálicas relacionadas com o controle da ingestão de alimentos e sono.

Para este experimento, foram utilizados 15 pombos naïve de ambos os sexos (480 - 540 g; 5 animais/grupo) previamente canulados. Estes animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais e foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo 1: uma injeção ICV de veículo (ácido ascórbico 5%), e foram devolvidos às suas gaiolas logo após a injeção, onde tinham livre acesso à água e ração.

Grupo 2: uma injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol), foram devolvidos às suas gaiolas logo após a injeção, onde tinham livre acesso à água e ração.

Grupo 3: uma injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol), foram devolvidos às suas gaiolas, no entanto, foram privados de água (ração disponível) durante os primeiros 90 minutos após a injeção.

2.8.5 Experimento 5: análise da injeção ICV de 5-HT sobre a expressão da proteína Fos em distritos hipotalâmicos e outras estruturas prosencefálicas relacionadas com o controle da ingestão de alimentos e sono.

Os procedimentos adotados para este grupo foram os mesmos que aqueles utilizados no experimento anterior. Dez pombos naïve de ambos os sexos (455 - 510 g; 5 animais/grupo) previamente canulados

foram divididos em três grupos experimentais e foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Grupo 1: uma injeção ICV de 5-HT (150 nmol), foram devolvidos às suas gaiolas logo após a injeção, onde tinham livre acesso à água e ração.

Grupo 2: uma injeção ICV de 5-HT (150 nmol), foram devolvidos às suas gaiolas, no entanto, foram privados de água (ração disponível) durante os primeiros 90 minutos após a injeção.

Para avaliar os efeitos da 5-HT neste grupo, os animais tratados foram comparados aos animais injetados com veículo do grupo de animais tratados com 8-OH-DPAT.

3 RESULTADOS

3.1 Experimento 1: avaliação dos efeitos do bloqueio dos receptores 5-HT_{1A} sobre as respostas ingestivas e hipnagênicas provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT.

O tratamento com 5-HT afetou de forma significativa a ingestão de água em todos os animais testados (ANOVA de 2 vias: WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 175$, $p < 0,0001$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 149$, $p < 0,0001$). Tanto a dose de 50 quanto a dose de 150 nmol de 5-HT produziram intensa resposta dipsogênica. A dose de 150 nmol foi a que apresentou a maior resposta, aumentando o consumo de água em aproximadamente 8 vezes (5-HT, $4,49 \pm 0,3$ x $0,62 \pm 0,15$ ml/100g peso corporal dos animais controles). O efeito da 5-HT foi afetado pelos dois antagonistas utilizados: todas as doses de WAY bloquearam os efeitos da dose de 50 nmol (interação WAY x 5-HT: $F_{6, 84} = 3,35$, $p = 0,005$), mas não afetaram o efeito da dose de 150 nmol de 5-HT (Figura 5). O MM77 reduziu a ingestão de água produzida pela dose de 150 nmol, mas ainda assim, os animais tratados com 5-HT, continuaram bebendo mais que os animais controles (interação MM77 x 5-HT: $F_{2, 42} = 8,35$, $p = 0,0008$) (Figura 5).

A intensa ingestão de água provocada pela 5-HT foi acompanhada pelo aumento da duração (WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 234$, $p < 0,0001$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 32$, $p < 0,0001$) e da frequência do beber (WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 9,2$, $p = 0,004$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 149$, $p < 0,0001$) e pela diminuição da latência para primeiro episódio (WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 43$, $p < 0,0001$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 7,5$, $p = 0,008$) (Tabela 1). O pré-tratamento com o WAY bloqueou todas as alterações do comportamento de beber provocadas pela dose de 50 nmol de 5-HT (duração: interação WAY x 5-HT: $F_{6, 84} = 8,9$, $p < 0,0005$; latência:

interação WAY x 5-HT: $F_{6, 84} = 3,6$, $p=0,002$; e frequência: interação WAY x 5-HT: $F_{6, 84} = 5,7$, $p<0,0005$), mas reduziu apenas parcialmente o efeito da dose de 150 nmol sobre duração do beber (Tabela 1). As duas doses de MM77 reduziram os efeitos da 5-HT sobre a duração do beber (interação MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 9,2$, $p=0,0004$), a dose de 23 nmol diminuiu o efeito da 5-HT sobre a latência (interação MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 9,8$, $p=0,003$) e a dose de 69 nmol bloqueou os efeitos da 5-HT sobre a frequência do beber (Tabela 2). Quando administrado previamente ao veículo da 5-HT, a dose de 0,3 nmol de WAY diminuiu a duração do beber e a maior dose, 1 nmol, além de também diminuir a duração, ainda aumentou a latência do beber (Tabela 1). O MM77 não provocou, *per se*, alterações na ingestão de água ou no comportamento de beber (Tabela 2). A 5-HT não foi capaz de afetar a ingestão de alimentos ou qualquer variável do comportamento de comer. O mesmo aconteceu com os antagonistas.

Em resumo, a injeção de 5-HT provoca intenso aumento na ingestão de água que é caracterizado por dramáticas alterações no comportamento de beber. O WAY foi capaz de bloquear tanto a ingestão de água quanto as alterações comportamentais provocadas pela dose de 50 nmol de 5-HT, mas não afetou as alterações provocadas pela dose de 150 nmol sobre a ingestão de água. O MM77, por sua vez, reduziu os efeitos da dose de 150 nmol de 5-HT tanto sobre a ingestão de água, quanto sobre a duração e a latência do beber.

A 5-HT também afetou de forma significativa o comportamento de sono e o comportamento exploratório. A 5-HT aumentou a duração (WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 24,4$, $p<0,0001$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 12,4$, $p=0,0004$) (Figura 5), a frequência (WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 4,02$, $p=0,02$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 6,2$, $p=0,01$) e diminuiu a latência para o primeiro episódio de sono (WAY x 5-HT: $F_{2, 84} = 12,8$, $p<0,0001$; MM77 x 5-HT: $F_{1, 42} = 5,9$, $p=0,02$) (Tabela 1). A menor dose de WAY (0,1 nmol) diminuiu o efeito da dose de 50 nmol de 5-HT sobre a duração do sono, e ao contrário, a maior dose (1 nmol) potencializou o efeito hipnogênico da dose de 150 nmol de 5-HT (interação WAY x 5-HT: $F_{6, 84} = 2,9$, $p=0,01$) (Figura 5). Em relação ao pré-tratamento com MM77, a dose de 23 nmol bloqueou o efeito da 5-HT sobre a duração do sono (interação MM77 x 5-HT: $F_{2, 42} = 3,6$, $p=0,0004$) (Figura 5) e as duas doses bloquearam os efeitos da 5-HT sobre a frequência (interação MM77 x 5-HT: $F_{2, 42} = 3,2$, $p=0,05$) (Tabela 2). Tanto o WAY quanto o MM77 também foram capazes de alterar o comportamento de sono quando injetados previamente ao veículo da 5-HT. Todas as doses de WAY aumentaram a duração (WAY: $F_{3, 84} = 11,6$, $p<0,0001$) (Figura 5 e

tabela 1) e as duas maiores doses ainda aumentaram a frequência (WAY: F, 3, 84, 4,7, $p<0,004$) e diminuíram a latência do sono (WAY: F, 3, 84, 18,08, $p<0,0001$) (Tabela 1). Já com MM77, somente a de 23 nmol foi capaz de aumentar a duração do sono (MM77: F, 2, 42, 3,7, $p=0,04$) (Figura 5 e tabela 2). Adicionalmente, a 5-HT diminuiu a duração (WAY x 5-HT: F, 2, 84, 36,5, $p<0,0001$; MM77 x 5-HT: F, 1, 42, 12,4, $p=0,0004$) (Tabela 1), e a frequência do explorar (WAY x 5-HT: F, 2, 84, 58,9, $p<0,0001$), mas não foi capaz de alterar a latência para este comportamento (Tabela 1). Os antagonistas também afetaram o comportamento exploratório: todas as doses de WAY diminuíram a frequência e a maior dose, 1 nmol, ainda diminuiu a sua duração (Tabela 1). Já com o MM77, o único efeito foi alcançado pela dose de 23 nmol que conseguiu diminuir a duração do explorar (Tabela 2).

Em resumo, a 5-HT aumentou drasticamente a duração do sono e, em contraste, diminuiu a duração do comportamento exploratório. O animal tratado com 5-HT dorme mais cedo e de forma mais frequente que o animal controle. Com exceção da dose de 0,1 nmol de WAY que bloqueou o efeito da dose de 50 nmol, nenhuma outra dose de WAY diminuiu o efeito da 5-HT. Pelo contrário, a maior dose de WAY potencializou o efeito hipnogênico da 5-HT. Já com o MM77, os efeitos foram inconsistentes: a maior dose não afetou o efeito da 5-HT nem alterou o sono *per se*. Já a menor dose, além de bloquear o efeito da 5-HT, também aumentou o sono quando injetado previamente ao veículo.

O tratamento com 8-OH-DPAT também afetou de forma significativa a ingestão de água (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 23,4, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 40,4, $p<0,0001$). O 8-OH-DPAT aumentou aproximadamente 6 vezes o volume de água ingerido em comparação aos animais tratados com veículo (Figura 6). Este aumento na ingestão de água foi caracterizado pelo aumento na duração (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 37,4, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 34,4, $p<0,0001$), na frequência (MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 6,86, $p=0,01$) e pela diminuição da latência do beber (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 16,8, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 14,12, $p<0,0001$) (Tabela 3). O pré-tratamento com o WAY bloqueou os efeitos do 8-OH-DPAT sobre a ingestão (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 5,06, $p=0,003$) (Figura 6), sobre a duração (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 4,92, $p=0,004$) e sobre a latência do beber (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 15,5, $p<0,0001$) (Tabela 3). O pré-tratamento com MM77 não foi capaz de afetar nenhuma das alterações sobre a ingestão de água ou sobre o comportamento de beber provocadas pelo 8-OH-DPAT (Figura 6 e tabela 4).

Tabela 1: efeitos do pré-tratamento com o antagonista WAY100635 (0, 0,1, 0,3 e 1 nmol) sobre os efeitos da 5-HT (0, 50 e 150 nmol) sobre a duração, latência e frequência de comer, beber, sono e explorar. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + Veículo. (#) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + 5-HT. Dados representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

W-5-HT	0-0	0,1-0	0,3-0	1-0	0-50	0,1-50	0,3-50	1-50	0-150	0,1-150	0,3-150	1-150
Comer												
Duração	19 \pm 1,5	32 \pm 2	18,6 \pm 1	10 \pm 0,8	21 \pm 2,4	20 \pm 1	22 \pm 2	19 \pm 1,9	17,5 \pm 1,6	14,5 \pm 2	14 \pm 1,5	18,6 \pm 2
Latência	1561 \pm 45	1607 \pm 177	1156 \pm 106	2350 \pm 253*	1622 \pm 187	1120 \pm 223	1259 \pm 225	1680 \pm 306	1773 \pm 136	1381 \pm 351	1340 \pm 176	2152 \pm 309
Frequência	3 \pm 0,3	5,5 \pm 1	4,1 \pm 0,8	3 \pm 0,4	4,7 \pm 0,7	5 \pm 0,4	4 \pm 0,6	3 \pm 0,3	2,3 \pm 0,2	4,8 \pm 1	3,4 \pm 0,7	4 \pm 0,8
Beber												
Duração	17 \pm 0,8	18 \pm 1,4	8 \pm 1,7*	3 \pm 0,5*	58 \pm 5*	18 \pm 1,6#	13 \pm 2#	20 \pm 3,8#	93,6 \pm 6,8*	68 \pm 8*#	61 \pm 3,8*#	74 \pm 3,4*#
Latência	1607 \pm 84	1634 \pm 305	1686 \pm 326	2014 \pm 317	282 \pm 56	1742 \pm 334	1522 \pm 327	1175 \pm 242	301 \pm 49	155 \pm 39	498 \pm 30,3	751 \pm 65,5
Frequência	3 \pm 0,3	3,5 \pm 0,8	2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	8 \pm 1,2	2,7 \pm 0,2	2 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3	9,9 \pm 0,5	7,2 \pm 0,6	8 \pm 0,3	9,6 \pm 0,9
Sono												
Duração	64 \pm 12	312 \pm 25*	445 \pm 40*	466 \pm 54*	395 \pm 46	216 \pm 39	317 \pm 68	431 \pm 82	555 \pm 25*	614 \pm 54*	570 \pm 64*	724 \pm 102*#
Latência	2575 \pm 123	2066 \pm 415	694 \pm 95*	1404 \pm 283*	1914 \pm 232	1860 \pm 225	1640 \pm 196	2092 \pm 351	961 \pm 49*	1347 \pm 563*	1077 \pm 59*	1030 \pm 184*
Frequência	1,8 \pm 0,3	5,6 \pm 1,7	7 \pm 1,4	7,5 \pm 1,2	6,5 \pm 1	6,8 \pm 1	5,8 \pm 0,8	5,7 \pm 0,9	7,1 \pm 1,1*	6,7 \pm 1,7*	9,6 \pm 0,8*	9,4 \pm 2,8*
Explorar												
Duração	1232 \pm 127	1038 \pm 166	1013 \pm 191	610 \pm 176*	780 \pm 86*	503 \pm 30*	369 \pm 52*	470 \pm 33*	567 \pm 54*	496 \pm 56*	555 \pm 56*	436 \pm 67*
Latência	228 \pm 168	127 \pm 15	344 \pm 69	243 \pm 63	198 \pm 34	115 \pm 12	217 \pm 28	309 \pm 34	89 \pm 14	125 \pm 12	289 \pm 39	217 \pm 32
Frequência	43 \pm 5,8	20 \pm 5*	30 \pm 6,3*	20 \pm 4,9*	73 \pm 13	30 \pm 8,5	97 \pm 50	56 \pm 13	162 \pm 6*	13,5 \pm 4*	122 \pm 2*	7,5 \pm 3,3*

Tabela 2: efeitos do pré-tratamento com o antagonista MM77 (0, 23 e 69 nmol) sobre os efeitos da dose de 150 nmol de 5-HT sobre a duração, latência e frequência dos comportamentos de comer, beber, sono e explorar. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + Veículo. (#) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + 5-HT. Dados representados como média \pm EPM.

MM77+5-HT	0+0	23+0	69+0	0+150	23+150	69+150
Comer						
Duração	19,8 \pm 3,1	25,4 \pm 3,4	26,3 \pm 3,3	20,1 \pm 2,8	13,9 \pm 2,6	18 \pm 3
Latência	1240 \pm 255	1492 \pm 222	1203 \pm 89	1515 \pm 378	1946 \pm 319	1617 \pm 211
Frequência	3,2 \pm 1,3	3,1 \pm 0,8	2,7 \pm 0,5	1,9 \pm 0,3	2 \pm 0,4	1,9 \pm 0,3
Beber						
Duração	11 \pm 1,8	16 \pm 2,2	15 \pm 2,8	62 \pm 3,4*	21,7 \pm 2,4#	21 \pm 3,3#
Latência	1178 \pm 142	471 \pm 109	585 \pm 161	256 \pm 29*	706 \pm 123**	384 \pm 174*
Frequência	1,6 \pm 0,4	2,5 \pm 0,6	2,7 \pm 0,6	4 \pm 0,5*	4 \pm 0,6*	2,9 \pm 0,6#
Sono						
Duração	274 \pm 97	686 \pm 85*	303 \pm 122	843 \pm 141*	229 \pm 99#	566 \pm 165
Latência	1534 \pm 210	1507 \pm 246	1678 \pm 198	789 \pm 134	1397 \pm 282	1283 \pm 138
Frequência	5,5 \pm 0,9	5,4 \pm 1	7,9 \pm 2,2	15,7 \pm 3,4*	9,2 \pm 1,8#	5,6 \pm 0,7
Exploração						
Duração	562 \pm 88	297 \pm 54*	411 \pm 43	218 \pm 12*	215 \pm 6,6*	272 \pm 29*
Latência	1966 \pm 621	1499 \pm 608	641 \pm 424	2257 \pm 524	1826 \pm 541	1724 \pm 589
Frequência	11 \pm 1,9	6,7 \pm 3,4	14 \pm 2,7	2,3 \pm 1,5	2,6 \pm 1,2	5,5 \pm 3

Tabela 3: efeitos do pré-tratamento com o antagonista WAY100635 (WAY, 0, 0,1, 0,3 e 1 nmol) sobre os efeitos das doses de 30 nmol de 8-OH-DPAT sobre a duração, latência e frequência dos comportamentos de comer, beber, sono e explorar. (*) p<0,05 comparado aos animais 0 + Veículo. (#) p<0,05 comparado aos animais 0 + 8-OH-DPAT. Dados representados como média ± EPM.

WAY+DPAT	0+0	0,1+0	0,3+0	1+0	0+30	0,1+30	0,3+30	1+30
Comer								
Duração	19±1,5	32±2	18,6±1	10±0,8	134±10*	26±3,7#	28±3,2#	117±21*
Latência	1561±45	1607±177	1156±106	2350±253	546±282*	1528±455#	631±172*	465±58*
Frequência	3±0,3	5,5±1	4,1±0,8	3±0,4	8,3±2*	2±0,5#	5±1#	2,7±0,4#
Beber								
Duração	17±0,8	18±1,4	8±1,7*	3±0,5*	36±5*	22±3,8#	14±1,6#	19,5±2#
Latência	1607±84	1634±305	1686±326	2014±317	181±35*	847±79#	2779±164#	1197±106#
Frequência	3±0,3	3,5±0,8	2±0,2	1,3±0,2	5±1,4	3,6±1,2	2,3±0,5	3,9±0,9
Sono								
Duração	64±12	312±25*	445±40*	466±54*	927±158*	474±55**	551±68*#	734±132*
Latência	2575±123	2066±415	694±95*	1404±283*	1043±388*	2156±172**	1398±267*#	1376±127*#
Frequência	1,8±0,3	5,6±1,7	7±1,4	7,5±1,2	10±1*	7,3±2	7,6±1,6	9,6±1,4*
Exploração								
Duração	1232±127	1038±166	1013±191	610±176*	108±46,8*	30±11*	75±9*	203±31*
Latência	228±168	127±15	344±69	243±63	1068±136*	667±206*	165±23#	515±39#
Frequência	43±5,8	20±5*	30±6,3*	20±4,9*	8±2*	2,7±0,8*	6±2*	3,5±4,3#

Tabela 4: efeitos do pré-tratamento com o MM77 (0, 23 e 69 nmol) sobre os efeitos das doses de 30 nmol de 8-OH-DPAT sobre a duração, latência e frequência dos comportamentos de comer, beber, sono e explorar. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + Veículo. (#) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + 8-OH-DPAT. Dados representados como média + EPM

MM77+DPAT	0+0	69+0	0+30	69+30
Comer				
Duração	29±4,6	25±3,5	133±16*	109±16
Latência	1235±374	1126±79	248±63*	351±79
Frequência	5,1±1,7	3±0,4	16±5,4*	9,5±3,8
Beber				
Duração	14±2,6	15±3,2	38±4*	32,8±4
Latência	823±148	586±216	149±24*	216±88
Frequência	3,1±0,9	3±0,7	11±1,5*	6,6±3,8
Sono				
Duração	221±28	353±161	618±195*	232±181#
Latência	1946±405	1664±270	1160±116*	2215±654#
Frequência	4,5±1	8±3	3,6±0,8	5±3,7
Exploração				
Duração	668±104	410±59	286±84*	515±161
Latência	1822±389	741±524	1578±91	756±554
Frequência	16±9,3	13,5±3,6	25±10	33,8±13

Em resumo, o 8-OH-DPAT provocou intensa ingestão de água caracterizada por alterações comportamentais que fizeram o animal beber mais cedo e por mais tempo. Dos antagonistas utilizados, somente o WAY foi capaz de bloquear os efeitos do 8-OH-DPAT.

Os testes de Anova de duas vias também demonstraram que o tratamento com 8-OH-DPAT aumentou a ingestão de alimento (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 13,9, $p=0,0004$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 42,7, $p<0,0001$) (Figura 6). O efeito hiperfágico do 8-OH-DPAT foi acompanhado pelo aumento na duração (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 132,4, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 63,2, $p<0,0001$), na frequência (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 5,01, $p=0,02$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 6,7, $p=0,01$) e pela diminuição na latência do comer (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 31,6, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 19,8, $p=0,0002$) (Tabela 3). O WAY foi o único antagonista a afetar as alterações causadas pelo 8-OH-DPAT. Todas as doses de WAY bloquearam o efeito do 8-OH-DPAT sobre a ingestão (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 13,2, $p<0,0001$) (Figura 6) e frequência do comer (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 9,7, $p<0,002$) (Tabela 3). As duas menores doses (0,1 e 0,3 nmol) bloquearam o efeito do 8-OH-DPAT sobre a duração (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 42,9, $p<0,0001$), e a dose de 0,1 nmol ainda bloqueou o efeito do 8-OH-DPAT sobre a latência do comer (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 5,8, $p=0,01$) (Tabela 3).

Em resumo, o tratamento com 8-OH-DPAT aumentou a ingestão de alimentos. O efeito hiperfágico do 8-OH-DPAT, acompanhado pelo aumento da duração, frequência e diminuição da latência do beber, assim como aconteceu com a intensa resposta dipsênica provocada pelo 8-OH-DPAT, foram afetadas somente pelo WAY.

Assim como a 5-HT, o 8-OH-DPAT também aumentou a duração (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 35,2, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 8,6, $p=0,008$) (Figura 6 e tabela 3), a frequência (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 10,3, $p=0,03$) e diminuiu a latência do sono (WAY x 8-OH: F, 1, 56, 25,03, $p<0,0001$; MM77 x 8-OH: F, 1, 20, 5,6, $p<0,0001$) (Tabela 3). As maiores doses de WAY diminuíram o efeito do 8-OH-DPAT sobre a duração (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 8,72, $p<0,0001$) (Figura 6 e tabela 3), e todas as doses diminuíram o efeito sobre a latência (interação WAY x 8-OH: F, 3, 56, 9,5, $p<0,0001$) (Tabela 3). O MM77 bloqueou o efeito do 8-OH-DPAT sobre a duração (interação MM77 x 8-OH: F, 1,20, 8,5, $p=0,008$) (Figura 6) e sobre a latência do sono (interação MM77 x 8-OH: F, 1,20, 6,6, $p=0,008$) (Tabela 4). Além de afetar as respostas do 8-OH-DPAT, todas as doses de WAY também

aumentaram a duração do sono (Figura 6) e as duas maiores doses ainda diminuíram a latência deste comportamento. A dose de MM77 utilizada nestes testes, *per se*, não alterou nenhuma variável do sono.

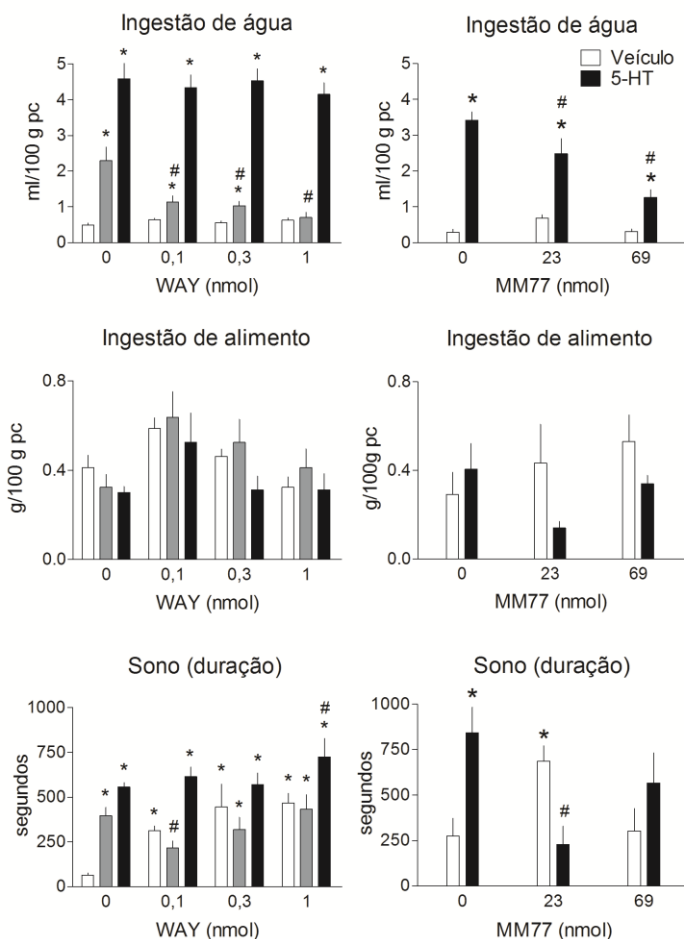


Figura 5: alterações provocadas pela 5-HT sobre a ingestão de água, ingestão de alimento e sono pombos livremente alimentados e, os efeitos do pré-tratamento com os antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} pré e pós-sináptico (WAY100635), e pós-sináptico (MM77) sobre os efeitos da 5-HT. N: 6 animais por grupo. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + Veículo. (#) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + 5-HT. Dados representados como média \pm erro padrão da média (EPM).

O 8-OH-DPAT também afetou o comportamento exploratório, diminuindo a duração (WAY x 8-OH: $F_{1, 56} = 18$, $p < 0,0001$) (Figura 6) e frequência (WAY x 8-OH: $F_{1, 56} = 19$, $p < 0,0001$) e aumentando a latência para este comportamento (WAY x 8-OH: $F_{1, 56} = 31$, $p < 0,0001$) (Tabela 3). O WAY não afetou o efeito do 8-OH-DPAT sobre a duração, mas todas as doses de WAY diminuíram o efeito sobre a latência (interação WAY x 8-OH: $F_{3, 56} = 20,9$, $p = 0,007$) (Tabela 3) e a dose de 1 nmol diminuiu o efeito sobre a frequência da exploração (interação WAY x 8-OH: $F_{3, 56} = 4,3$, $p = 0,007$) (Tabela 3). Nos grupos de animais que receberam o MM77 como pré-tratamento, não foi observado nenhum efeito nem do 8-OH-DPAT, nem do MM77 sobre o comportamento exploratório (Tabela 4).

Em resumo, assim como a 5-HT, o 8-OH-DPAT provocou intensa resposta hipnogênica e redução da atividade exploratória. O efeito hipnogênico do 8-OH-DPAT foi apenas parcialmente bloqueado pelas doses mais baixas de WAY e totalmente bloqueado pela única dose de MM77 utilizada. Os efeitos do 8-OH-DPAT sobre a exploração, não foram afetados pelo pré-tratamento.

3.2 Experimento 2: análise dos efeitos da lesão dos neurônios serotoninérgicos sobre as respostas ingestivas e hipnogênica provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT.

A 5,7-DHT provocou alterações significantes dos níveis de 5-HT no tronco ($H_{4, 29} = 17,24$, $p = 0,0017$), no hipotálamo ($H_{4, 29} = 14,57$, $p = 0,0057$), e no hipocampo ($H_{4, 29} = 11,88$, $p = 0,01$). Entretanto, não afetou os níveis de 5-HT no arcopálio. Os testes demonstraram que não houve alteração nos níveis de 5-HT em nenhuma das estruturas analisadas dos animais sham quando comparados aos animais controle. Já para os animais lesados, os testes apontaram redução significativa dos níveis de 5-HT: no tronco encefálico, houve queda de aproximadamente 56% nos animais DHT 12 dias ($p = 0,02$) e 65% nos animais DHT 28 dias ($p = 0,013$) (Tabela 5). No hipotálamo dos animais do grupo DHT 12 dias foi observado 80% ($p = 0,003$) de redução dos níveis de 5-HT e no grupo DHT 28 dias, a redução ficou em torno de 70% ($p = 0,012$) (Tabela 5). Em relação aos níveis de 5-HT no hipocampo, os animais DHT 12 dias apresentaram aproximadamente 66% de redução ($p = 0,019$) e os animais DHT 28 dias, 40% ($p = 0,04$) (Tabela 5).

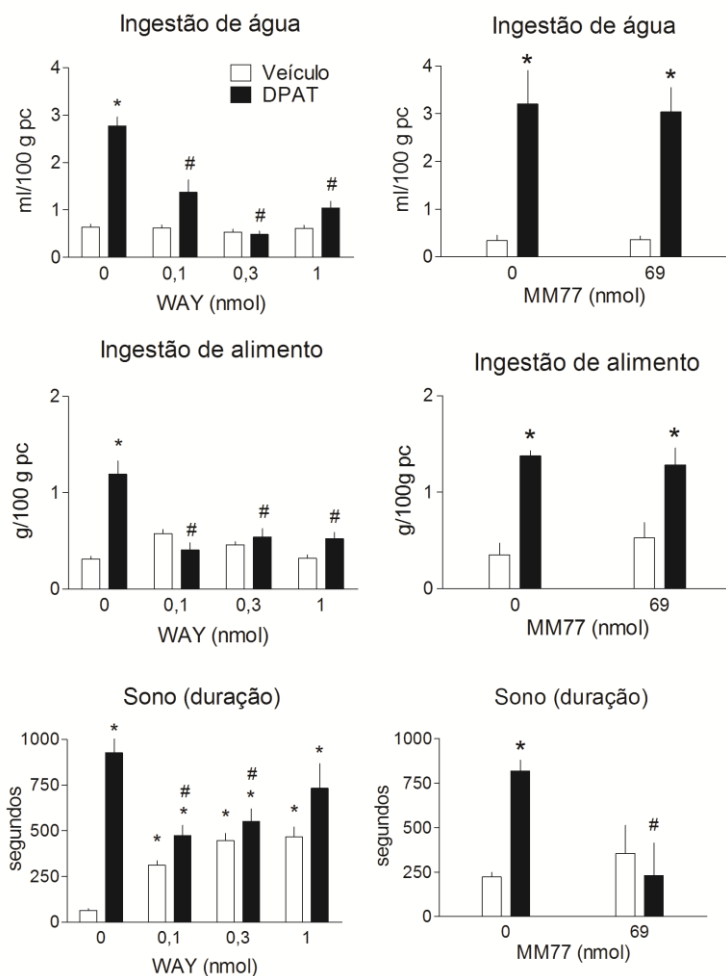


Figura 6: alterações provocadas pelo 8-OH-DPAT (DPAT) sobre a ingestão de água, de alimento e sobre o sono em pombos livremente alimentados e, os efeitos do pré-tratamento com os antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} pré e pós-sináptico (WAY), e pós-sináptico (MM77) sobre os efeitos do DPAT. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + Veículo. (#) $p < 0,05$ comparado aos animais 0 + 5-HT. Dados apresentados como média \pm EPM.

Tabela 5: valores em % indicando alterações dos níveis de 5-HT em comparação aos animais controles. O símbolo (-) Representa queda. Dados apresentados em mediana \pm intervalo interquartil. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais controles.

Grupos	Tronco	Hipotálamo	Hipocampo	Arcopalio
Sham 12	-3,9 \pm 14,2	-2,1 \pm 53,1	-1,4 \pm 38,8	-2,5 \pm 24,5
Sham 28	-1,8 \pm 13,3	-2,6 \pm 86,8	18,3 \pm 39,4	-0,5 \pm 58,6
DHT 12	-56,6 \pm 10,5 *	-80,08 \pm 43,2 *	-66,4 \pm 55,6 *	-0,18 \pm 45,4
DHT 28	-64,8 \pm 7,2 *	-70,1 \pm 72,4 *	-40,4 \pm 20,6 *	36,7 \pm 75,2

A lesão também diminuiu os níveis do 5-HIAA no hipotálamo ($H_{4, 29, 10,2}$, $p = 0,01$) e no hipocampo ($H_{4, 29, 7,4}$, $p = 0,001$) de ambos os grupos de animais submetidos à lesão, DHT 12 e 28 dias. Em relação às estruturas do tronco e do arcopálio, foi observada grande variação dos dados entre os animais, mas não observamos diferença entre os grupos. Os testes também não apontaram diferença nos níveis de NA e HVA em nenhuma das estruturas analisadas.

A lesão também afetou drasticamente o número de neurônios TPH+ em todos os núcleos serotoninérgicos avaliados. Desde o núcleo mais caudal, Núcleo Pontino da Rafe, até o mais rostral, o A8, a redução do número de neurônios foi de aproximadamente 75% em todos os núcleos. Não realizamos análise estatística destas contagens, mas na [figura 7](#), o efeito degenerativo da 5,7-DHT pode ser conferido.

Os testes de Anova de uma via apontaram efeitos dos tratamentos sobre a ingestão de água ($F_{2, 24, 88,18}$, $p < 0,0001$). A 5-HT e o 8-OH-DPAT aumentaram a ingestão de água tanto no animal sham quanto no animal lesado ($p < 0,001$ para todas as comparações em relação aos animais tratados com veículo). Os testes também apontaram efeito significativo da lesão ($F_{1, 24, 10,22}$, $p = 0,003$) e dos tratamentos ($F_{2, 24, 20,57}$, $p = 0,0001$) sobre o sono. A 5-HT e o 8-OH-DPAT aumentaram a duração do sono tanto nos animais sham, como nos animais lesados ($p < 0,01$ para todas as comparações) (Figura 8). A injeção de 8-OH-DPAT ainda aumentou a ingestão de alimento tanto no animal sham ($p < 0,0001$) quanto no animal lesado ($p < 0,0001$) ($F_{2, 24, 52,9}$, $p < 0,0001$) (Figura 8). Os testes estatísticos também apontaram que a lesão aumentou a duração do sono *per se* ($p < 0,05$) e potencializou o efeito hipnagênico da 5-HT. Entretanto, não foi observado nenhuma alteração significativa nos comportamentos ingestivos dos animais lesados (Figura 8).

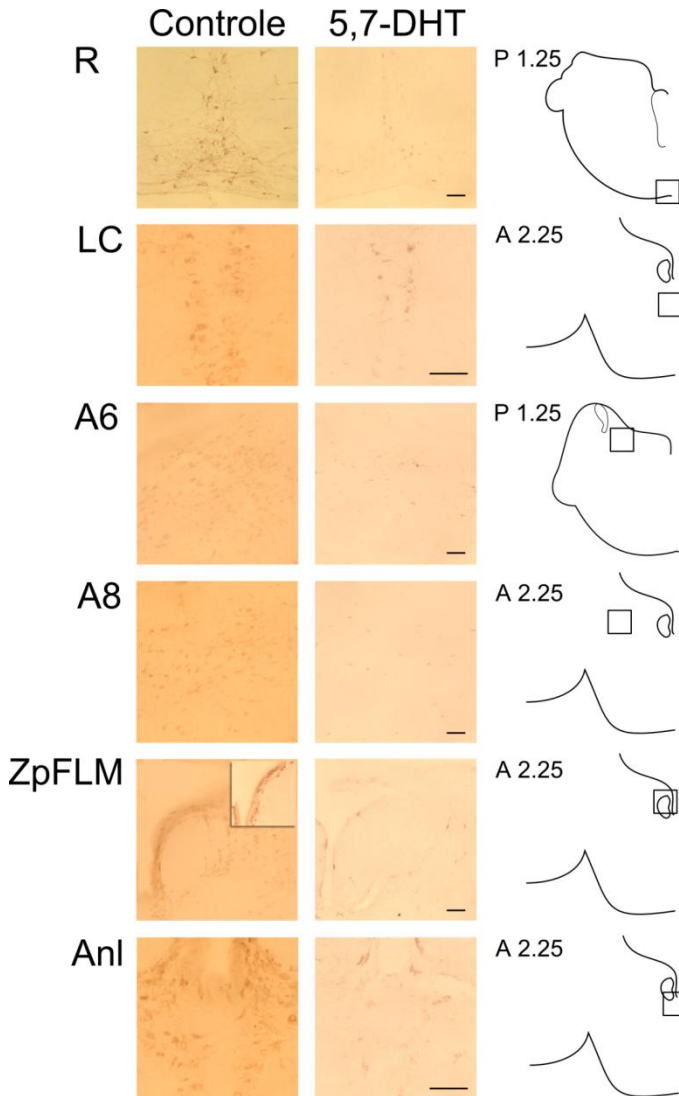


Figura 7: à esquerda, fotomicrografias demonstrando o efeito da toxina 5,7-DHT sobre os neurônios a expressão de neurônios TPH+. Área destacada no ZpFLM é para mostrar os neurônios TPH+ na região periventricular (foto de outro animal). Esquemas à direita indicam a coordenada da secção analisada e os quadrados indicam a região do núcleo representativa da fotomicrografia. Barras de escala 100 μ m. Para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas.

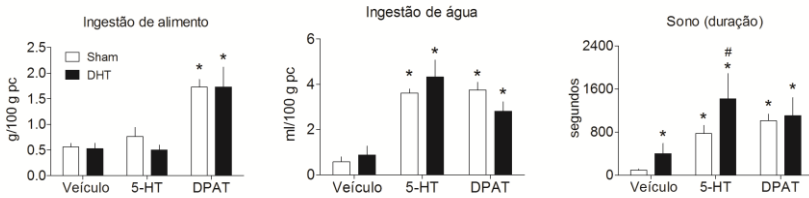


Figura 8: efeitos da 5-HT e do 8-OH-DPAT sobre a ingestão de água, alimento e sobre o sono de animais submetidos a lesão dos neurônios serotoninérgicos pela injeção da toxina 5,7-DHT (DHT) ou sham, animais injetados com o veículo da 5,7-DHT. Dados apresentados em média \pm EPM. (*) $p < 0,05$ comparado aos animais tratados com veículo e (#) $p < 0,05$ comparado aos animais sham tratados com 5-HT. N: 6 animais/grupo.

Em resumo, a neurotoxina 5,7-DHT provocou dramática redução da imunorreatividade à enzima TPH, o que culminou na redução dos níveis de 5-HT no tronco, no hipotálamo e no hipocampo. A perda dos neurônios serotoninérgicos, entretanto, não afetou nem os efeitos do 8-OH-DPAT nem os efeitos da 5-HT sobre a ingestão de alimentos (água e ração) e sobre o sono. O único efeito comportamental provocado pela lesão foi o aumento da duração do sono.

3.3 Experimento 3: descrição da distribuição dos receptores 5-HT_{1A} através da análise dos sítios de ligação ao agonista [³H] 8-OH-DPAT no tronco encefálico e no hipotálamo de pombos.

A técnica de autorradiografia revelou intensa presença de receptores 5-HT_{1A} tanto na parte anterior do tronco encefálico (ponte rostral e mesencéfalo) como por toda a extensão do hipotálamo. No tronco, observamos densa distribuição destes receptores em distritos serotoninérgicos tanto os que estão localizados na linha média, como aqueles em regiões mais laterais do tronco encefálico. Com nível de densidade variando de baixo (+) a muito alto (++++), todos os núcleos serotoninérgicos apresentaram presença de receptores 5-HT_{1A}.

Os destaques foram os núcleos que o Anl e a ZpFLM (Figura 9 e tabela 6). O núcleo Anl foi a região onde observamos a maior densidade de receptores e foi escolhido como padrão 100% de ligações servindo de referência para a classificação dos demais núcleos (Figura 9 e tabela 6). Na ZpFLM observamos intensa presença de receptores tanto na sua face medial, quanto na face dorsal em toda sua extensão rostro-caudal ao longo do mesencéfalo (Figura 9 e tabela 6).

Outras duas regiões de destaque com alta densidade de receptores (+++) foram o núcleo LC e a parte caudal do núcleo LoC (o A6) (Figura 9 e tabela 6). O LC é um aglomerado de células serotonérgicas alinhadas verticalmente na região da rafe mesencefálica e o A6 está localizado lateralmente ao FLM e ventralmente ao GCt (Figura 9 e tabela 6). O grupo de células serotonérgicas localizadas na base da rafe, e que formam o núcleo Pontino da Rafe, apresentou moderado nível de receptores, tanto na sua parte ventral quanto na sua porção dorsal (Figura 9 e tabela 6). Já a parte rostral do núcleo LoC, a chamada área A8, e duas regiões onde também se encontram alguns neurônios serotonérgicos esparsamente distribuídos, os núcleos ScD e ScV, apresentaram apenas baixo nível de marcação (Figura 9 e tabela 6). Das regiões presentes no tronco e que não contém neurônios serotonérgicos, destaque para a GCt, onde observamos alta presença de receptores na sua parte caudal e moderada densidade na parte rostral (Figura 9 e tabela 6).

Quanto à distribuição de receptores 5-HT_{1A} no hipotálamo, pudemos observar a presença destes receptores desde a região hipotalâmica mais caudal, a região infundibular, até a região da área pré-óptica, que é conhecida como o limite anterior do hipotálamo. Nesta última região os destaques foram os núcleos POA, FDB, SOe e PD que apresentaram alta densidade de ligações ao [³H]8-OH-DPAT (de 50 a 69%, +++) (Figura 9 e tabela 6). Os núcleos da região medial do hipotálamo, PVN, PMH e PLH apresentaram nível moderado de densidade (Figura 9 e tabela 6), e na região infundibular, o PVO foi o núcleo com nível mais alto de receptores (86%, +++) , seguido pelos núcleos MM e PMM que apresentaram densidade moderada (Figura 9 e tabela 6).

Em resumo, os receptores 5-HT_{1A} estão localizados em regiões próximas aos ventrículos encefálicos, tanto no tronco quanto no hipotálamo. No tronco destaque para a ZpFLM e para o AnI, justamente núcleos com alta densidade de neurônios serotonérgicos e situados próximos (AnI) ou em regiões periventriculares (ZpFLM). No hipotálamo destaque para a estrutura circunventricular, o órgão paraventricular, PVO, que apresentou alta densidade de receptores e os núcleos da área pré-óptica e medial do hipotálamo.

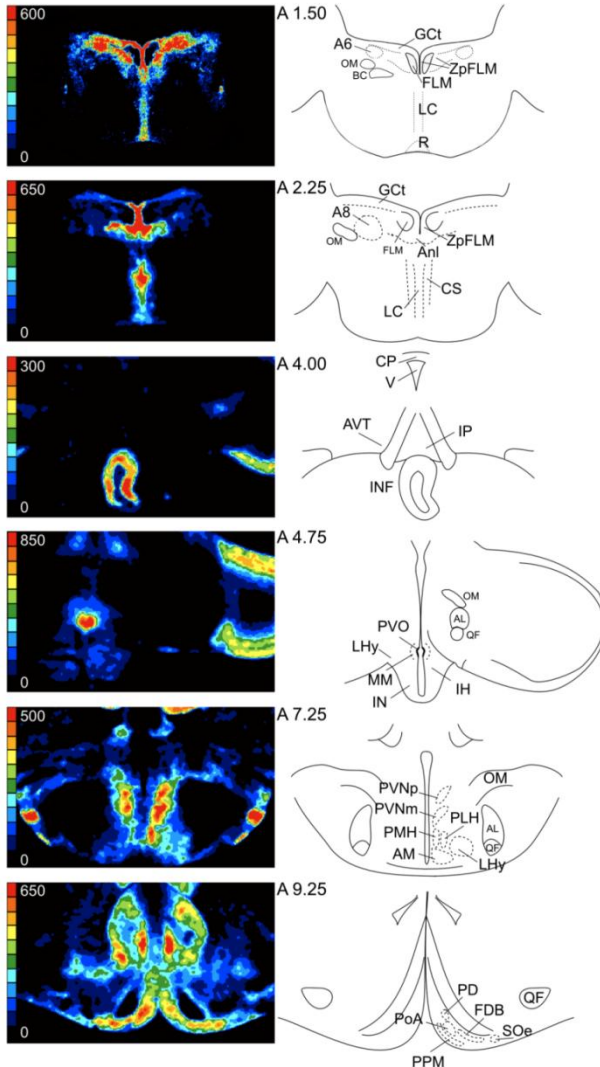


Figura 9: painel à esquerda mostrando autorradiografias com a distribuição dos sítios de ligação ao $[^3\text{H}]$ 8-OH-DPAT no tronco e hipotálamo de pombos. Painel da direita, esquemas com o nome das estruturas e as coordenadas do atlas estereotáxico do cérebro de pombos de KARTEN E HODOS (1969) indicando o nível de cada secção analisada. As diferentes cores indicam diferentes densidades de ligações ao $[^3\text{H}]$ 8-OH-DPAT em fmol/mg de proteína. Notar que o nível de cor/densidade é adaptado individualmente para cada micrografia. Para nomes verificar lista de abreviaturas.

Tabela 6: Os valores de ligação ao [³H] 8-OH-DPAT mostrados em fmol/mg de proteína. Dados apresentados em média ± desvio padrão. A porcentagem de ligações e a classificação qualitativa da densidade foram tomadas tendo o máximo valor de ligações (MVL), o núcleo Anularis, como 100%. +++++, muito alto; ++++, alto; ++, moderado e, +, baixo.

Área	Fmol/mg proteína	Densidade comparada ao MVL (%)	relativa
R (Pontino da Rafe)	180 ± 133	34	++
A6 (Locus Cerúleo caudal)	351 ± 238	68	+++
A8 (Locus Cerúleo rostral)	41 ± 19	8	+
ScD (Subcerúleo dorsal)	46 ± 19	9	+
ScV (Subcerúleo ventral)	33 ± 15	6	+
LC (Linear Caudal)	345 ± 161	66	+++
CS (Central Superior)	138 ± 144	26	++
ZpFLM (Zona peri Fascículo Longitudinal Medial)	510 ± 289	98	++++
Anl (Anularis)	517 ± 222	100	MVL +++++
GCt caudal (Substantia Gricea Central caudal)	315 ± 166	61	+++
GCt rostral (Substantia Gricea Central rostral)	128 ± 63	25	++
ICO (Intercollicular)	260 ± 122	50	+++
INF (Infundíbulo Hipotalâmico)	177 ± 44	22	++
PVO (Orgão Pavaventricular)	444 ± 179	86	+++
MM (Mamilar Medial)	250 ± 137	48	++
ML (Mamilar Lateral)	36 ± 13	7	+
PMM (Premamilar)	179 ± 64	34	++
VMN (Ventromedial do hipotálamo)	102 ± 24	20	+
LHy (Área hipotalâmica lateral)	98 ± 29	19	+
SCI (Strato Celular Interno)	31 ± 26	6	+
SCE (Strato Celular Externo)	25 ± 3	5	+
PHN (Periventricular do hipotálamo)	106 ± 27	20	+
PMI (Paramediano interno do tálamo)	95 ± 14	18	+
HM (Habenuar)	75 ± 12	15	+

DMA (Dorso medial do tálamo)	25 ± 2	5	+
PVNm (PVN magnocelular)	171 ± 35	33	++
PVNp (PVN parvocelular)	82 ± 51	16	+
DMN (Dorsomedial hipotalâmico)	229 ± 164	44	++
BNTSm (BSTN parte medial)	245 ± 182	47	++
AM (Anterior medial do hipotálamo)	48 ± 61	9	+
POM (Pre-óptico Medial do hipotálamo)	103 ± 35	20	+
POA (Pre-óptico Anterior)	357 ± 115	69	+++
PPM (Pre-óptico Magnocelular)	143 ± 77	27	++
FDB (Fascículo Diagonal de Broca)	273 ± 133	53	+++
Soe (Supra-óptico externo)	258 ± 85	50	+++
PD (Pre-óptico Dorsal)	274 ± 90	53	+++

3.4 Experimento 4: efeitos da administração ICV de 8-OH-DPAT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos do tronco encefálico e em neurônios de estruturas hipotalâmicas e prosencefálicas

O teste Anova de uma via aplicado separadamente para cada núcleo, não apontou diferença entre a densidade de neurônios serotoninérgicos entre os diferentes grupos experimentais. Em relação aos dados de contagens dos núcleos Fos+ ou das células duplamente marcadas (Fos+TPH+) o teste de Shapiro-Wilks apontou diferentes padrões de distribuição entre os núcleos serotoninérgicos. Todos os núcleos apresentaram distribuição não normal das células duplamente marcadas. E quanto aos índices de núcleos Fos+, a distribuição dos dados nos núcleos An1 e ZpFLM, também não obedeceu os princípios de normalidade. Estes dados foram analisados com o teste de análise não paramétrico de Kruskal-Wallis. Já os dados que apresentaram se distribuídos normalmente, foram analisados pelo teste Anova de uma via.

O tratamento com 8-OH-DPAT alterou de forma significativa o número de núcleos Fos+ no núcleo R ($F_{2, 12, 11,6}$, $p= 0,001$). Os animais tratados com 8-OH-DPAT e que beberam após as injeções apresentaram maior densidade de núcleos Fos+ quando comparados tanto aos animais

controles ($p=0,009$) quanto aos animais tratados com 8-OH sem acesso ($p=0,002$) (Figura 10). Não foi observada diferença entre os valores de células duplamente marcadas entre os diferentes grupos.

O tratamento com 8-OH-DPAT também produziu alterações no número de núcleos Fos+ ($F_{2,12}, 4,25$ $p=0,02$) e de células duplamente marcadas ($H_{2,15}, 9,8$, $p=0,007$) no núcleo LC. Os animais tratados com 8-OH-DPAT e que beberam após as injeções apresentaram atividade Fos mais intensa que os animais tratados com 8-OH-DPAT e que ficaram sem acesso à água ($p=0,02$) (Figura 10). Tanto os animais que beberam ($p=0,004$) quanto àqueles que não beberam ($p=0,04$) após o tratamento com 8-OH-DPAT, apresentaram valores de células Fos+TPH+, mais elevados que os animais controles (Figura 10).

A ativação dos receptores 5-HT1A pelo 8-OH-DPAT também produziu alterações tanto na densidade de núcleos Fos+ ($H_{2,15}, 10,1$ $p=0,006$) como na densidade de células duplamente marcadas ($H_{2,15}, 7,33$, $p=0,02$) no núcleo Anl. Os animais tratados com 8-OH-DPAT e que não tiveram acesso à água após as injeções apresentaram aumento no número de núcleos Fos+ quando comparados aos animais controles ($p=0,009$) (Figura 10). O teste post-hoc de Scheffe também apontou que os animais que foram privados de água após as injeções alcançaram valores de expressão Fos muito acima dos animais que beberam após o tratamento ($p=0,009$).

Quanto às células Fos+TPH+, o teste post-hoc não paramétrico de Mann-Whitney apontou que ambos os grupos tratados com 8-OH-DPAT, independente se beberam ou não, apresentaram valores mais altos que os animais tratados com veículo ($p=0,02$).

Na área da ZpFLM, o 8-OH-DPAT afetou tanto a densidade de núcleos Fos+ ($H_{2,15}, 12,9$ $p=0,001$) quanto o número de células duplamente marcadas ($H_{2,15}, 9,2$ $p=0,01$). Segundo o teste de Mann-Whitney, tanto os animais que beberam ($p=0,0053$), assim como os animais privados de água ($p=0,0051$) após as injeções apresentaram maior número de núcleos Fos+ que os animais controles. O teste post-hoc ainda apontou diferença entre os animais tratados com 8-OH-DPAT: os animais que não beberam apresentaram atividade Fos muito mais intensa que os animais que beberam após o tratamento ($p=0,005$). Em relação às células Fos+TPH+, o teste de Mann-Whitney apontou que tanto os animais tratados com 8-OH-DPAT, independente se beberam ($p=0,018$) ou não beberam ($p=0,005$) após as injeções, apresentaram valores mais altos que os animais controles. Em relação aos núcleos A6 e A8, os testes estatísticos não apontaram diferença entre os grupos.

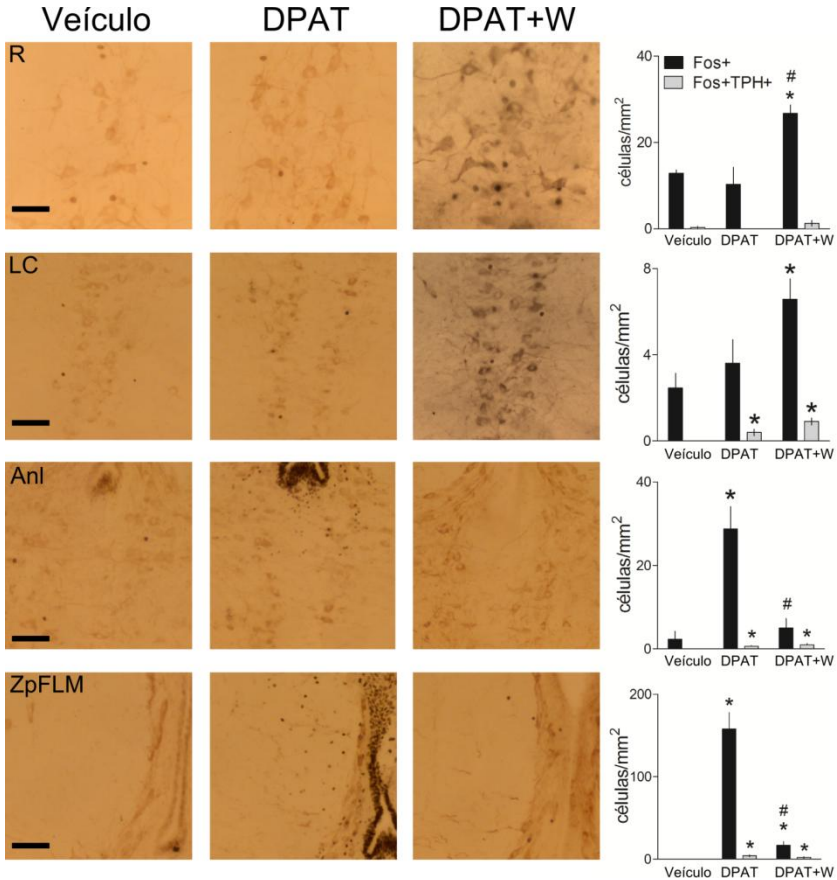


Figura 10: a esquerda fotomicrograficas representativas dos efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol) sobre a densidade de núcleos Fos+ e células duplamente marcadas nos núcleos: Pontino da Rafe (R), Linearis Caudalis (LC), Anularis (Anl) e Zona peri Fascículo Longitudinal Medial (ZpFLM). Barra de escala em 100µm para todas as fotomicrografias. Para verificar as diferentes marcações ver padrão de marcações na figura 1 e para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas. À direita, gráficos apresentando os resultados das contagens dos diferentes tipos de marcação analisadas: Fos+ ou Fos+TPH+. Não teve diferença entre a densidade de células TPH+ entre os diferentes grupos, por isso, não apresentamos os dados das contagens. DPAT+W animais tratados com 8-OH-DPAT com livre acesso à água e, DPAT animais tratados com 8-OH-DPAT sem acesso água após o tratamento. (*) p < 0,05 em relação ao veículo. (#) p < 0,05 comparados ao grupo DPAT. Resultados apresentados em média ± EPM para todos os dados de Fos+ dos núcleos R e LC. Os dados Fos+ do Anl e da ZpFLM, e todos os dados de Fos+TPH+ são apresentados em mediana ± intervalo interquartil.

Em resumo, a injeção de 8-OH-DPAT produziu diferentes efeitos na atividade Fos dentro os diferentes núcleos serotoninérgicos. Nos núcleos situados na linha média da rafe, o LC e o R, o 8-OH-DPAT aumentou a atividade Fos nos animais que beberam após as injeções. Já nos núcleos da região dorsal da rafe situados próximos ao IV ventrículo, a atividade Fos está muito alta nos animais tratados com 8-OH-DPAT que não tiveram acesso à água.

Os dados dos diferentes padrões de densidade de núcleos Fos+ para os diferentes núcleos hipotalâmicos e prosencefálicos foram inicialmente avaliados quanto ao caráter de sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilks. Os núcleos que apresentaram distribuição normal de seus dados foram analisados pelo teste paramétrico Anova de uma via. Já os dados cuja distribuição não estava dentro da normalidade, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os testes de análise post-hoc Sheffé e Mann-Whitney foram usados para testar possíveis diferenças entre os grupos para os dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente.

O 8-OH-DPAT afetou de forma significativa a densidade de núcleos Fos+ no núcleo no POM ($H_{2,15}, 12,5, p=0,002$) (Figura 12). O teste post-hoc de Mann-Whitney demonstrou que o 8-OH-DPAT aumentou a atividade Fos tanto nos animais que beberam ($p < 0,01$) quanto nos animais que não beberam após o tratamento. Além disso, o teste de Mann-Whitney também especificou que os animais que beberam apresentaram atividade Fos mais intensa que os animais que não tiveram acesso à água ($p < 0,01$) (Figura 12). O 8-OH-DPAT também afetou a densidade de núcleos Fos+ na região magnocelular do PVN (PVNm; $H_{2,15}, 7,94, p=0,001$) e no núcleo Subfornical (SFO; $H_{2,15}, 9,38, p=0,009$). Para estes distritos, o teste de Mann-Whitney indicou que os grupos tratados com 8-OH-DPAT apresentaram valores de núcleos Fos+ mais altos que os animais controles ($p < 0,01$), independente se beberam ou não após as injeções (Figura 11).

A densidade de núcleos Fos+ na região lateral núcleo BNST (BNSTl) também foi afetada pelo 8-OH-DPAT ($H_{2,15}, 12,5, p=0,002$). O teste de Mann-Whitney apontou que tanto os animais que beberam ($p < 0,001$) quanto os que não beberam ($p < 0,001$) apresentaram atividade Fos maior que os animais injetados com veículo (Figura 12).

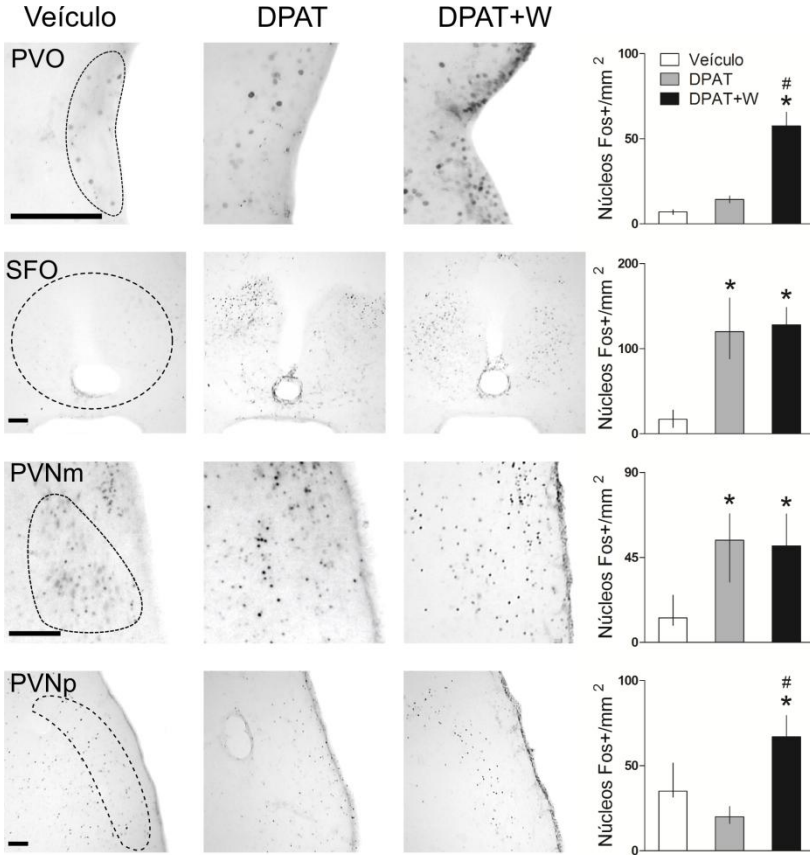


Figura 11: à esquerda, fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos PVO, SFO, PVNp e PVNm. DPAT+W, animais tratados com 8-OH-DPAT com livre acesso à água e DPAT, animais tratados com 8-OH-DPAT privados de água após o tratamento. Barra de escala 50 μ m. Para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas. À direita, gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado. (*) $p < 0,05$ em relação ao veículo. (#) $p < 0,05$ comparados ao grupo DPAT.

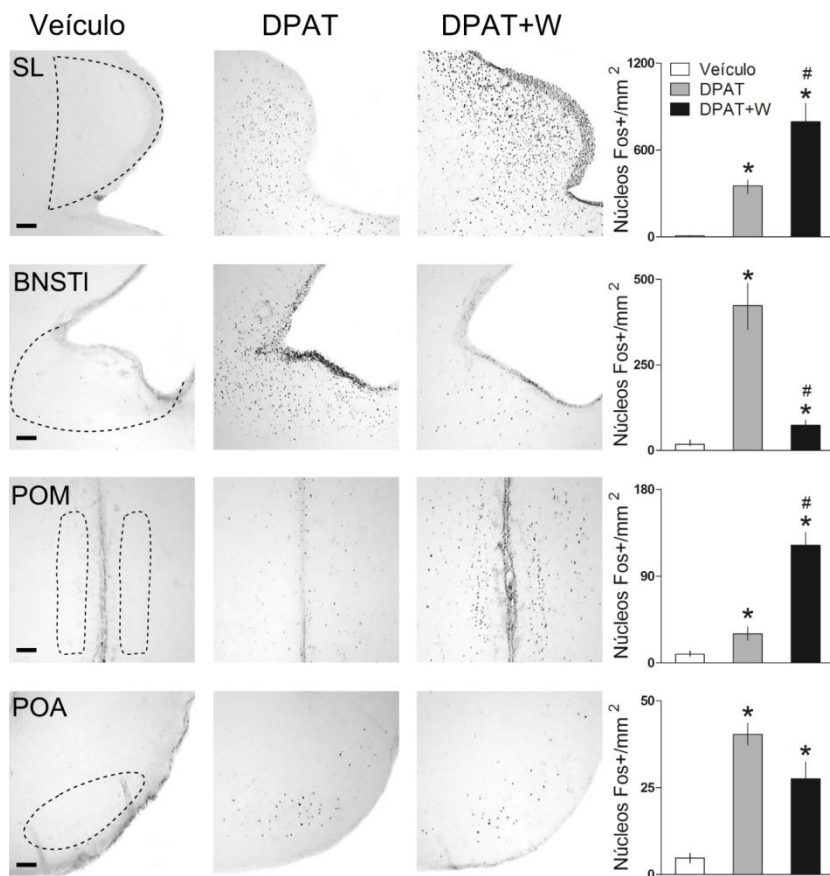


Figura 12: à esquerda, fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 8-OH-DPAT (30 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos SL, BNSTI, POM e POA. DPAT+W animais tratados com 8-OH-DPAT com livre acesso à água e DPAT animais tratados com 8-OH-DPAT e que foram privados de água após o tratamento. Barra de escala 50 μ m. Para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas. À direita, gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado. (*) $p < 0,05$ em relação ao veículo. (#) $p < 0,05$ comparados ao grupo DPAT.

Além disso, o teste post-hoc de Mann-Whitney apontou que os animais privados de água apresentaram densidade de núcleos Fos+ aproximadamente 6 vezes mais alta que os animais com livre acesso à água ($p = 0,009$) (Figura 12).

Em relação aos dados dos núcleos analisados pelos testes de Anova de uma via, os testes apontaram efeito significativo do 8-OH-DPAT sobre a densidade de núcleos Fos+ para o Órgão Paraventricular (PVO; $F_{2, 12}, 48,03$ $p < 0,0001$), e o núcleo SL ($F_{2, 12}, 92,9$ $p < 0,0001$). Nestes dois núcleos os animais tratados com 8-OH-DPAT, independente se beberam ou não, apresentaram maior atividade Fos que os animais controles (teste post-hoc de Sheffé $p < 0,005$) (Figura 12). Adicionalmente, entre os animais tratados com 8-OH-DPAT, os animais que não tiveram acesso à água apresentaram atividade Fos+ mais intensa que os animais que beberam ($p < 0,001$). O 8-OH-DPAT ainda aumentou a densidade de núcleos Fos+ no núcleo Pré-óptico Anterior (POA; $F_{2, 12}, 27,7$ $p < 0,0003$), independente se os animais beberam ou não após as injeções ($p < 0,002$) (Figura 12).

Em resumo, o tratamento com 8-OH-DPAT afetou de forma significativa a atividade Fos em todos os núcleos hipotalâmicos investigados. Além disso, também alterou a expressão da proteína Fos nos núcleos SL e BNSTl. Na maioria dos núcleos, os animais tratados com 8-OH-DPAT e que beberam após as injeções apresentaram intensa atividade Fos quando comparada aos animais tratados com veículo. Em alguns núcleos, especialmente o SL e o POM, os animais que beberam, também apresentam atividade Fos mais intensa que os animais privados de água. No caso do núcleo BNSTl os animais que não beberam, foram os que apresentam maior atividade celular, como por exemplo, o núcleo BNTSl.

3.5 Experimento 5: análise da injeção ICV de 5-HT sobre a expressão da proteína Fos em distritos hipotalâmicos e outras estruturas prosencefálicas relacionadas com o controle da ingestão de alimentos e sono.

O teste Shapiro-Wilks apontou que somente o PVO e o SL apresentaram dados com distribuição não-normal, por isso foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Mann-Whitney. Os demais núcleos SFO, PNNm, PVNp, BNSTl, POM e POA apresentaram distribuição normal dos dados de contagem e foram, portanto, analisados pelo teste Anova de uma via, com o teste de Sheffé usado para avaliar possíveis diferenças entre os grupos.

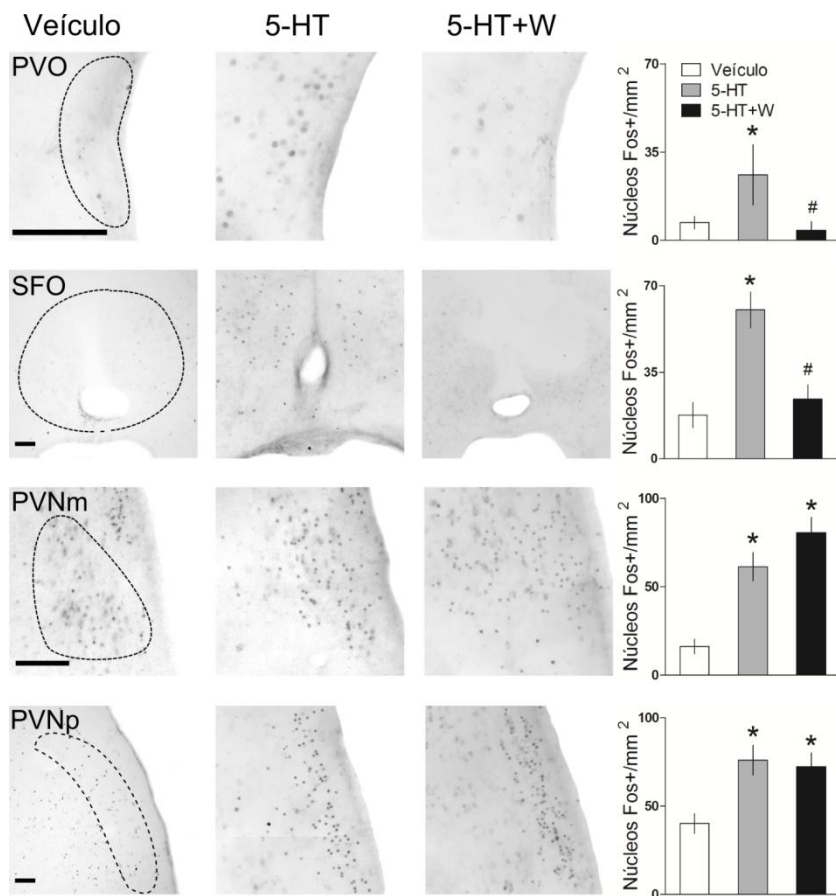


Figura 13: à esquerda, fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 5-HT (150 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos diferentes núcleos hipotalâmicos analisados. 5-HT+W animais tratados com 5-HT com livre acesso à água e 5-HT animais tratados com 5-HT e que foram privados de água após o tratamento. Barra de escala 50 μ m. Para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas. À direita, gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado. (*) $p < 0,05$ em relação ao veículo. (#) $p < 0,05$ comparados ao grupo 5-HT.

O teste de Kruskal-Wallis apontou efeito significativo dos tratamentos sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos PVO ($H_{2, 15}, 9,4, p = 0,02$) e SL ($H_{2, 15}, 12,5, p = 0,002$). No PVO, os animais tratados

com 5-HT privados de água após a injeção apresentaram atividade Fos mais intensa tanto em relação aos animais controles ($p= 0,008$) como quando comparados aos animais

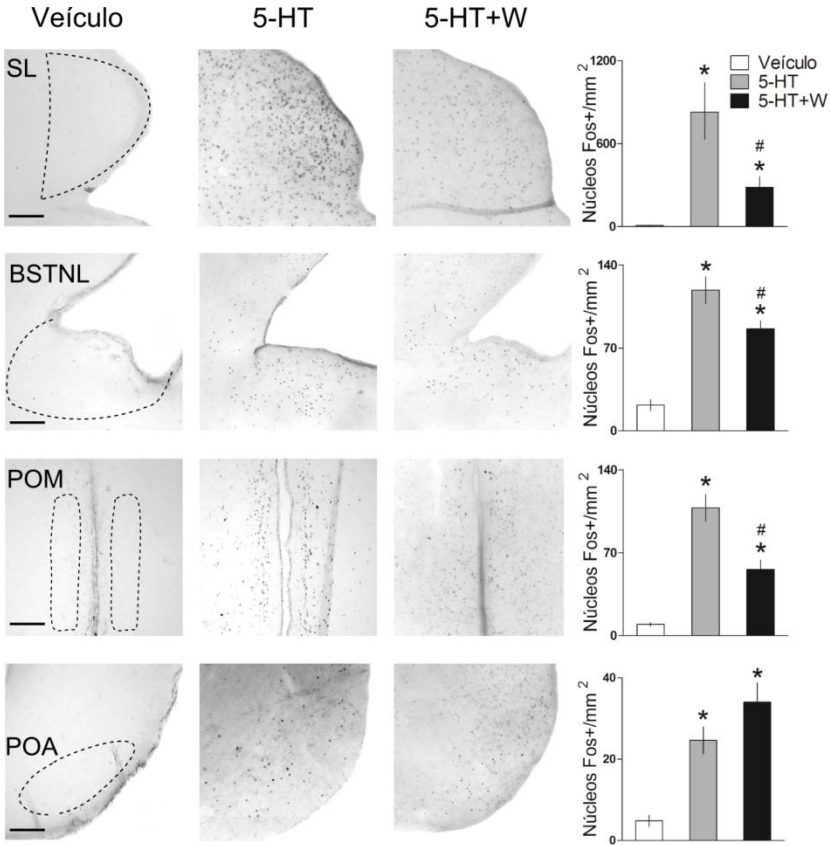


Figura 14: à esquerda, fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 5-HT (150 nmol) sobre a expressão da proteína Fos nos diferentes núcleos hipotalâmicos SL, BNSTI, POM e POA. 5-HT+W, animais tratados com 5-HT com livre acesso á água e 5-HT, animais tratados com 5-HT e que foram privados de água após o tratamento. Barra de escala 50 μ m. Para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas. À direita, gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado. (*) $p < 0,05$ em relação ao veículo. (#) $p < 0,05$ comparados ao grupo 5-HT.

que receberam 5-HT e que beberam após as injeções ($p= 0,03$) (Figura 13). Em relação ao núcleo SL, ambos os grupos tratados com 5-HT apresentaram níveis de atividade Fos mais altos que os animais controles ($p < 0,008$). O teste de Mann-Whitney também apontou ainda que os animais tratados com 5-HT e que beberam em seguida, apresentaram maior expressão da proteína Fos que aqueles que não beberam ($p= 0,009$) (Figura 14).

Os testes de Anova de uma via apontaram efeitos dos tratamentos sobre a expressão Fos nos núcleos SFO ($F_{2, 12, 14,15}$, $p= 0,0006$), nas regiões parvo ($F_{2, 12, 7,14}$, $p= 0,009$) e magnocelular do núcleo PVN ($F_{2, 12, 21,35}$, $p= 0,0001$), no BNSTl ($F_{2, 12, 37,3}$, $p < 0,0001$), no POM ($F_{2, 12, 37,4}$, $p < 0,0001$) e no núcleo POA ($F_{2, 12, 18,5}$, $p= 0,0002$). No núcleo PVN (ambas as regiões, figura 13) e no POA (Figura 14), foi observado aumento na expressão Fos em ambos os grupos tratados com 5-HT (PVN, 5-HT x veículo: $p < 0,02$ para as duas regiões; POM, 5-HT x veículo: $p < 0,0001$). Assim como os resultados observados no núcleo PVO, a injeção de 5-HT provocou aumento na expressão da proteína Fos no núcleo SFO somente nos animais que não tiveram acesso à água após os tratamentos ($p= 0,001$ comparada ao veículo) (Figura 14). Nos núcleos BNSTl e POM, ambos os grupos de animais tratados com 5-HT apresentaram índices de atividade Fos mais elevado que os animais tratados com veículo, entretanto, os animais que beberam apresentaram índices de atividade mais baixo que os animais privados de água após as injeções ($p= 0,01$) (Figura 14).

Em resumo, a injeção ICV de 5-HT aumentou a atividade Fos em todos os núcleos investigados. Em alguns deles, este efeito foi observado tanto nos animais que beberam como naqueles animais que não beberam. Já em outros núcleos, a ingestão de água reduziu parcial ou totalmente a intensa atividade Fos produzida pela 5-HT.

Nos animais tratados com 8-OH-DPAT que tiveram livre acesso à água após a injeção, além da intensa ingestão hídrica, nós observamos também grande aumento no consumo de alimento (Figura 6). Por isso, nós decidimos avaliar o padrão de atividade da proteína Fos em regiões classicamente conhecidas por participarem no controle da ingestão de alimentos em mamíferos, os núcleos Dorsomedial (DMN) e Ventromedial do Hipotálamo (VMN), a Área Hipotalâmica Lateral (LHy) e o núcleo Infundibular (INF) que no encéfalo de mamíferos é mais conhecido como núcleo Arqueado. A análise da atividade Fos nestes núcleos foi realizada somente naqueles animais que receberam água após as injeções. Nós comparamos os efeitos do 8-OH-DPAT sobre a atividade Fos nestas áreas com os animais tratados com 5-HT

(com água disponível após o tratamento) e com os animais injetados com veículo.

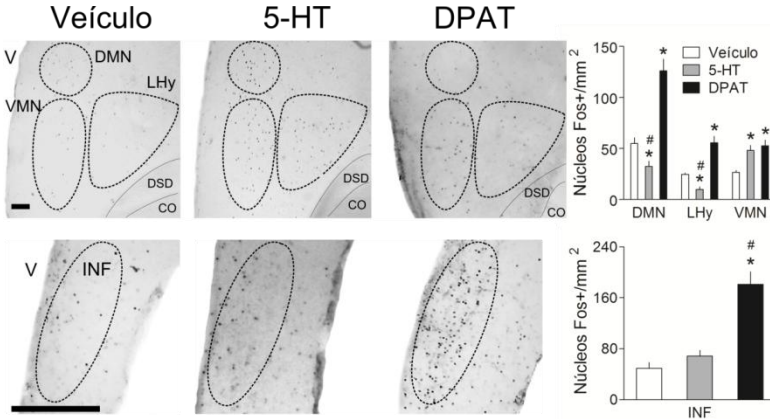


Figura 15: à esquerda, fotomicrografias representativas dos efeitos da injeção ICV de 5-HT (150 nmol), de 8-OH-DPAT (30 nmol) e de veículo sobre a expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos DMN, VMN, LHy (painel superior) e INF (painel inferior). Os animais apresentados nesta figura pertenciam aos grupos que tiveram livre acesso à água após os tratamentos. Barra de escala 50 μ m. Para nomes das estruturas, verificar lista de abreviaturas. À direita, gráficos apresentando os resultados das contagens dos núcleos Fos+ para cada núcleo investigado. (*) p < 0,05 comparados ao veículo. (#) p < 0,05 comparados ao grupo 5-HT.

Nos animais tratados com 8-OH-DPAT que tiveram livre acesso à água após a injeção, além da intensa ingestão hídrica, nós observamos também grande aumento no consumo de alimento (Figura 6). Por isso, nós decidimos avaliar o padrão de atividade da proteína Fos em regiões classicamente conhecidas por participarem no controle da ingestão de alimentos em mamíferos, os núcleos Dorsomedial (DMN) e Ventromedial do Hipotálamo (VMN), a Área Hipotalâmica Lateral (LHy) e o núcleo Infundibular (INF) que no encéfalo de mamíferos é mais conhecido como núcleo Arqueado. A análise da atividade Fos nestes núcleos foi realizada somente naqueles animais que receberam água após as injeções. Nós comparamos os efeitos do 8-OH-DPAT sobre a atividade Fos nestas áreas com os animais tratados com 5-HT

(com água disponível após o tratamento) e com os animais injetados com veículo.

Os testes estatísticos de Anova de uma via apontaram efeitos significativos dos tratamentos sobre a expressão da proteína Fos em todos os núcleos investigados: DMN ($F_{2, 12}, 36,7, p < 0,0001$), LH_y ($F_{2, 12}, 34,4, p < 0,0001$), INF ($F_{2, 12}, 39,3, p < 0,0001$) e VMN ($F_{2, 12}, 34,4, p < 0,0001$). O 8-OH-DPAT aumentou a atividade Fos em todos os núcleos ($p < 0,0004$, para 8-OH-DPAT x veículo, em todos os núcleos). Já a injeção de 5-HT, diminuiu a atividade Fos nos núcleos DMN ($p < 0,0005$) e LH_y ($p < 0,0001$), aumentou a atividade dos neurônios do núcleo VMN ($p = 0,01$), mas não alterou a expressão Fos no INF.

Em resumo, estes dados sugerem que a ativação de receptores 5-HT_{1A} nos núcleos hipotalâmicos DMN, LH_y, INF e VMN parecem participar do controle da ingestão de alimento organizado pelos circuitos serotoninérgicos. Adicionalmente, as alterações na atividade Fos observadas nos núcleos VMN e LH_y após a injeção de 5-HT não exclui a participação de outros receptores.

4. DISCUSSÃO

Conforme previamente demonstrado por trabalhos do nosso laboratório (STEFFENSet *al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2011; HOELLER*et al.*, 2013), tanto a 5-HT quanto o 8-OH-DPAT aumentaram de forma intensa ingestão de água e o sono de pombos livremente alimentados. As alterações comportamentais provocadas pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT tem um perfil muito similar e parecem seguir uma sequência bem caracterizada de intensa ingestão de água nos 15 primeiros minutos após o tratamento, seguida pela diminuição dos comportamentos exploratórios que ao longo do registro vão sendo substituídos pelo surgimento de posturas típicas de sono, que se tornam o comportamento predominante entre os 45 e 60 minutos de registro. A sequência de respostas provocadas pelo 8-OH-DPAT ainda inclui aumento da ingestão de alimento observada nos primeiros minutos de registro.

O efeito hiperfágico do 8-OH-DPAT foi bloqueado pelo pré-tratamento com o antagonista de auto e heterorreceptores 5-HT_{1A}, WAY100635 (WAY), mas não foi afetado pelo antagonista de heterorreceptores 5-HT_{1A}, MM77. Estes resultados farmacológicos sugerem que o efeito do 8-OH-DPAT sobre a ingestão de alimento seja mediado pela ação de autorreceptores 5-HT_{1A}. No entanto, a lesão dos neurônios serotoninérgicos pela 5,7-DHT não afetou o efeito do 8-OH-DPAT. A contra-coloração das secções contendo os núcleos do tronco encefálico, onde a densidade dos neurônios serotoninérgicos foi analisada, com o corante de corpo celular Gienmsa, demonstrou que a densidade de neurônios observada em cada núcleo não foi afetada pela 5,7-DHT. Isto demonstra que a toxina 5,7-DHT afeta a maquinaria necessária para produzir a 5-HT, uma vez que o teste imunistoquímico para detectar neurônios imunorreativos à enzima TPH, revelou diminuição no número de neurônios TPH+ em todos os núcleos serotoninérgicos analisados. Estes resultados parecem ser contraditórios. Foi descoberto há certo tempo que o WAY também pode atuar como antagonista de receptores dopaminérgicos (CHEME*Let al.*, 2006). Além disso, estudos farmacológicos/comportamentais em mamíferos tem demonstrado que a resposta hiperfágica do 8-OH-DPAT pode ser bloqueada por antagonistas de receptores D₂ (MUSCAT*et al.*, 1989; FLETCHER, 1991). Estes dados sugerem que, ao menos em mamíferos, os efeitos do 8-OH-DPAT sobre a ingestão de alimento podem ser devido também a uma ação indireta através de outros circuitos. Se isso é verdade para pombos, não sabemos. Nossos dados farmacológicos apontam para os

autorreceptores; já os dados da lesão indicam a participação dos heterorreceptores 5-HT1A. O que podemos concluir destas evidências, aparentemente contraditórias, é que parece haver uma adaptação da função entre auto e heterorreceptores 5-HT1A que parece depender da integridade do neurônio serotonérgico. No animal que tem os circuitos serotonérgicos funcionando normalmente, aparentemente, o efeito hiperfágico do 8-OH-DPAT pode ser devido à ativação de autorreceptores. Já no animal que foi submetido à lesão dos neurônios serotonérgicos, o efeito do 8-OH-DPAT pode ter sido mediado por heterorreceptores 5-HT1A. Em ratos injetados com a 5,7-DHT, o efeito hiperfágico do 8-OH-DPAT é apenas diminuído parcialmente (BENDOTTI E SAMANIN, 1986), o que sugere que assim como em aves, o efeito do 8-OH-DPAT sobre a ingestão de alimento pode ser devido à participação de auto e heterorreceptores. Um teste que poderia produzir evidências mais claras sobre a participação dos heterorreceptores nos efeitos produzidos pela 5-HT e pelo 8-OH-DPAT nos animais submetidos à lesão pela 5,7-DHT, seria testar o pré-tratamento com o antagonista destes receptores, o MM77. Estes experimentos já constam em projetos futuros e em breve serão realizados em nosso laboratório.

Nossos resultados obtidos com os pré-tratamentos e com a lesão dos neurônios serotonérgicos sugerem que o papel dos receptores 5-HT1A no controle da ingestão de alimento em pombos, pode ser diferente do papel desempenhado por estes receptores em mamíferos. Em aves, nós observamos aumento da ingestão de alimento causado pela injeção ICV de 8-OH-DPAT em pombos livremente alimentados. Outro trabalho recente do nosso laboratório encontrou efeito inverso após injeção sistêmica do 8-OH-DPAT: diminuição da ingestão de alimento tanto em animais avaliados no meio da manhã, quando o consumo de alimentos é baixo, como em animais avaliados no meio da tarde, quando o consumo é mais alto (DOS SANTOS *et al.*, 2009). O mesmo efeito foi encontrado em outras espécies de aves. Após tratamento sistêmico, o 8-OH-DPAT diminuiu a ingestão de alimento tanto em galinhas de corte (*Gallus gallus domesticus*) submetidas a jejum prévio de 16 horas (SAADOUN E CABRERA, 2008), como em codornas (*Coturnix japonica*) sob privação ou livremente alimentadas (REIS *et al.*, 2005). Em mamíferos, tanto a administração sistêmica (PORTA *et al.*, 1996) quanto local (ROBERTS *et al.*, 2001) de 8-OH-DPAT diminuem a atividade serotonérgica. Entretanto, as alterações no comportamento ingestivo ocasionadas pelo 8-OH-DPAT parecem depender, sobretudo, do estado nutricional do animal. Em mamíferos saciados, a

administração sistêmica de 8-OH-DPAT aumentou a ingestão de alimentos em ratos (VOIGHT *et al.*, 2000), camundongos, (EBENEZER *et al.*, 2007) e porcos (BALDWIN *et al.*, 1995). A injeção local de 8-OH-DPAT nos núcleos MnR ou DRN também aumentou a ingestão de alimentos em ratos saciados (BENDOTTI E SAMANIN, 1986; FLETCHER, 1991). Já em animais privados de alimento, a ativação de receptores 5-HT1A por via sistêmica produziu efeito contrário, isto é, diminuiu a ingestão de alimento no porco (EBENEZER *et al.*, 2001) e no rato (VOIGHT *et al.*, 2000). Adicionalmente, a lesão com a toxina 5,7-DHT aumentou o consumo de alimentos em ratos (Bendotti e Samanin, 1986), mas não alterou a ingestão de alimento em pombos. Estes dados demonstram que em aves, a atividade dos receptores 5-HT1A parece não ser tão suscetível às variações do tônus serotoninérgico dependente do estado nutricional do animal e sugerem que esta característica dos receptores 5-HT1A parece ter sofrido diferentes arranjos ao longo da evolução dos vertebrados.

Em mamíferos, núcleos da região medial do hipotálamo, DMN, VMN, LH_y e Arqueado são classicamente conhecidos por participarem do controle da ingestão de alimentos (para revisão ver WILLIAMS *et al.*, 2000; HILLEBRAND *et al.*, 2002; LEIBOWITS E WORTLEY, 2004; KING, 2006). A análise da atividade Fos nos animais tratados com 8-OH-DPAT que tiveram acesso à água após a injeção revelou um padrão de expressão Fos que indicou que estes distritos hipotalâmicos também parecerem ser importantes para a modulação serotoninérgica da ingestão de alimentos em aves. A injeção de 8-OH-DPAT provocou, além do aumento da ingestão de água, intensa resposta hiperfágica logo nos primeiros minutos após a injeção. Nestes animais observamos intensa atividade Fos nos núcleos DMN, LH_y e INF, e moderado aumento da atividade Fos no núcleo VMN. A injeção de 5-HT causou aumento do número de núcleos Fos+ no VMN e diminuição da atividade dos núcleos DMN e LH_y.

Aumento na atividade Fos nos núcleos DMN e LH_y ocasionado pela ingestão de alimento também foi observado em ratos (ANGELES-CASTELLANO *et al.*, 2004). Em mamíferos, os núcleos DMN e, principalmente o LH_y, são conhecidos por seus efeitos estimulatórios sobre a ingestão de alimento (JOHNSTONE *et al.*, 2006). O núcleo LH_y já foi conhecido como o centro da fome, contém peptídeos orexigênicos e sua lesão leva a anorexia (para revisão ver BERNARDIS E BELLINGER, 1996). O núcleo DMN também contém neurônios que expressão peptídeos orexigênicos e a lesão desta estrutura elimina conjuntos de atividade motora relacionadas especialmente à ingestão de

alimento (GOOLEY *et al.*, 2006). Além disso, tanto o LH_y e o DMN parecem funcionar como importantes centros integrativos de processamento e transmissão de informações metabólicas e circadianas que orquestram o comportamento alimentar (ANGELES-CASTELLANO *et al.*, 2004).

O tratamento com 8-OH-DPAT também aumentou a expressão da proteína Fos no núcleo INF. O núcleo Arqueado (Arc) em mamíferos também faz parte dos circuitos que controlam a ingestão de alimento e peso corporal (para revisão ver ELMQUIST *et al.*, 1999). O núcleo Arc de mamíferos parece ser quimicamente comparável ao núcleo INF de aves. O núcleo Arc contém neurônios que expressam tanto o neuropeptídeo Y (NPY), que aumenta a ingestão de alimentos e neurônios produtores do neurotransmissor Proopiomelanocortina (POMC), que inibe a ingestão (ROSEBERRY *et al.*, 2004). No núcleo INF de aves, neurônios imunorreativos ao NPY já foram observados na codorna (BOSWELL *et al.*, 2002), e na rolinha (DEN BOER-VISSER E DUBBELDAM, 2002) e neurônios que expressam POMC já foram vistos na galinha (GERETS *et al.*, 2000) e na codorna (PHILLIPS-SINGH *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que os circuitos serotoninérgicos parecem regular a ingestão de alimento através destes dois circuitos (HEISLER *et al.*, 2006). Experimentos imunistoquímicos demonstraram a presença de receptores 5-HT_{1A} nestas duas populações neuronais em ratos (COLLIN *et al.*, 2002), além disso, a injeção de 8-OH-DPAT aplicada diretamente no Arc diminuiu a ingestão de alimento em ratos adaptados a comer ração enriquecida com sacarose 10% (STEFFENS *et al.*, 2008), demonstrando a participação de heterorreceptores 5-HT_{1A} locais no controle serotoninérgico da ingestão de alimento em mamíferos. Em pombos, nossos resultados demonstraram moderada presença de receptores 5-HT_{1A} principalmente na parte caudal no núcleo INF. Não pudemos identificar, entretanto, a característica neuroquímica dos neurônios que expressam estes receptores, mas a análise da atividade Fos nesta região após a intensa ingestão de alimento provocada pelo 8-OH-DPAT, mostra que o INF também parece participar do controle da ingestão de alimento em aves.

Em resumo, a injeção de 8-OH-DPAT aumentou a ingestão de alimento e a atividade neuronal em regiões conhecidas pelo seu papel estimulatório da ingestão de alimentos. Como a ativação do receptor 5-HT_{1A} é conhecida por produzir hiperpolarização neuronal (para revisão ver NICOLL *et al.*, 1990; AGHAJANIAN, 1995), é provável que o aumento do número de neurônios Fos+ nestas regiões se deva ao bloqueio de informações serotoninérgicas que estavam inibindo neurônios

que quando ativos estimulam a ingestão de alimento. Desta forma, com a liberação da inibição (desinibição), estes neurônios podem ter sido os responsáveis pelo aumento da ingestão que vimos após a injeção de 8-OH-DPAT.

O aumento na atividade Fos no núcleo VMN que observamos após a injeção de 5-HT pode estar relacionado com processo de saciedade, que mantém baixa a probabilidade de ingestão de grande quantidade de alimento em um animal livremente alimentado, e o efeito do 8-OH-DPAT sobre a atividade do VMN pode estar relacionado com o processo de saciação, que leva ao término de um episódio ingestivo após intensa ingestão de alimento. Aumento na expressão da proteína Fos no núcleo VMN também foi observado em ratos devido ao aumento da concentração de 5-HT hipotalâmica após o tratamento conjunto com o inibidor seletivo da recaptção de 5-HT, citalopran, e com o WAY100635 (JONGSMA *et al.*, 2002). Além disso, a injeção de 5-HT diretamente no VMN de ratos diminuiu a ingestão de alimento, demonstrando que este núcleo pode estar envolvido no efeito inibitório da 5-HT (LEIBOWITZ *et al.*, 1990). Em aves, estudos com lesão também demonstraram que o VMN parece ser uma área relacionada com a saciedade. A lesão desta estrutura no pardal (*Zonotrichia albicollis*) (KUENZEL, 1974), em galinhas poedeiras (JACCOBY *et al.*, 1994) aumentou a ingestão de alimento e as aves, principalmente as galinhas, acabaram desenvolvendo obesidade.

Nossos dados demonstram que os núcleos da região medial do hipotálamo, DMN, VMN, LH_y e INF, parecem ser regiões cerebrais importantes para o controle serotoninérgico da ingestão de alimentos em pombos. Nossos resultados com a proteína Fos reforçam a literatura que sugere que estas regiões hipotalâmicas parecem desempenhar funções fisiológicas comparáveis entre aves e mamíferos.

Assim como a 5-HT, o 8-OH-DPAT provocou intensa ingestão de água caracterizada por alterações comportamentais que fizeram o animal beber mais cedo e por mais tempo. O pré-tratamento com o WAY, bloqueou o efeito do 8-OH-DPAT e da dose de 50 nmol de 5-HT, mas não afetou o intenso efeito dipsogênico provocado pela dose de 150 nmol de 5-HT. O MM77 reduziu o efeito da dose de 150 nmol pela metade, mas não afetou o efeito do 8-OH-DPAT. Estes dados sugerem que a 5-HT e o 8-OH-DPAT parecem afetar a ingestão de água por mecanismos diferentes: o efeito do 8-OH-DPAT através da ativação dos autorreceptores e o efeito da 5-HT parece ser devido à ação conjunta entre auto e heterorreceptores.

Nossa outra tentativa de especificar os efeitos da 5-HT e o 8-OH-DPAT aos auto ou heterorreceptores, entretanto, apontou somente a participação dos heterorreceptores. A injeção da 5,7-DHT produziu diminuição da densidade de neurônios imunorreativos à enzima TPH e diminuiu drasticamente a liberação de 5-HT no hipotálamo. No entanto, não alterou o comportamento de beber *per se* e nem afetou o efeito dipsogênico dos tratamentos. Dados de autorradiografia para o receptor 5-HT_{1A} após lesão com a 5,7-DHT em ratos, demonstraram que apesar de grande perda dos neurônios serotoninérgicos, ainda restaram cerca de 40% dos receptores 5-HT_{1A} (VERGÉ *et al.*, 1986). Não temos evidências sobre a densidade de receptores 5-HT_{1A} após lesão com a 5,7-DHT no pombo, mas após a lesão ainda é possível detectar a presença de neurônios TPH+ em todos os núcleos serotoninérgicos. Portanto, não podemos excluir a possibilidade destes neurônios conterem receptores 5-HT_{1A}, e estes receptores ainda serem responsáveis, ao menos em parte, pelos efeitos que observamos com os tratamentos. Esta possibilidade já tinha sido aventada para explicar a falta de efeito da lesão sobre a resposta hiperfágica provocada pelo 8-OH-DPAT. Além disso, em camundongos com alteração funcional dos circuitos produtores de 5-HT (animais knockout para Tph2, Tph2^{-/-}, com prejuízo na síntese; e knockout para o transportador de 5-HT, SERT^{-/-}, prejuízo na recaptação) foi vista diminuição da sensibilidade dos receptores 5-HT_{1A}, mas não foi observada alteração na capacidade de autoinibição destes receptores (ARARAGI *et al.*, 2013).

A técnica imunoistoquímica de dupla marcação que utilizamos para descrever a atividade de neurônios serotoninérgicos (neurônios TPH+Fos+), não nos permitiu comprovar o princípio essencial da nossa hipótese: a diminuição da atividade serotoninérgica mediada pela injeção ICV de 5-HT ou de 8-OH-DPAT. O número de células duplamente marcadas foi muito baixo em todos os núcleos serotoninérgicos avaliados. Nas regiões em que observamos efeito significativo do 8-OH-DPAT sobre a atividade de neurônios serotoninérgicos, observamos aproximadamente entre 3 a 7 células Fos+TPH+ nos animais tratados, contra nenhuma célula duplamente marcada nos animais controles. O uso dos genes de resposta imediata, dentre eles o produto do gene c-Fos, a proteína Fos, para a análise de funções neuroendócrinas, é uma ferramenta amplamente utilizada para verificar efeitos de diferentes estímulos sobre a atividade celular de diversos sistemas cerebrais (para revisão HOFFMAN *et al.*, 1993; e também, HOFFMAN E LIU, 2002). A expressão da proteína Fos é muito alta após estímulos agudos, como por exemplo, um estímulo osmótico (D'HONDT *et al.*, 1999) ou uma

crise epiléptica induzida (MORGAN *et al.*, 1987), mas é muito baixa ou inexistente em animais controles ou em neurônios tonicamente ativados (HERRERA E ROBERTSON, 1996). Este pode ser um dos motivos pelos quais a atividade em neurônios serotoninérgicos é praticamente inexistente nos nossos animais controles e muito baixa (mas ainda assim significativamente mais elevada) em animais tratados com o 8-OH-DPAT. Assim, não conseguimos confirmar a nossa hipótese principal, de que era a diminuição da atividade serotoninérgica que desencadeava todas as respostas causadas pela injeção ICV da 5-HT e do 8-OH-DPAT. Entretanto, os achados farmacológicos que encontramos ainda apontam para a diminuição da atividade serotoninérgica como causa dos efeitos dos tratamentos que encontramos. Testes em andamento no nosso laboratório demonstraram aumento na expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos após injeção de salina isotônica (NaCl 0,9% em água destilada) no interior da cavidade celomática de pombos, demonstrando que em uma situação de estresse o nível de atividade serotoninérgica está mais elevada (DOS SANTOS *et al.*, em preparação). Isto nos mostra que talvez o melhor caminho para testar nossa hipótese novamente seria realizar os experimentos quando o nível de atividade basal dos neurônios serotoninérgicos estiver elevado, como no período pós-prandial, por exemplo.

As contagens de núcleos Fos+, entretanto, revelaram um padrão de ativação celular bastante interessante e que parece depender da ingestão de água após os tratamentos, tanto no tronco encefálico como nas regiões hipotalâmicas e prosencefálicas.

Nas regiões serotoninérgicas, observamos aumento na atividade Fos no núcleo R e no núcleo LC somente em animais tratados com 8-OH-DPAT que beberam após a injeção. Já nos núcleos AnI e ZpFLM, observamos intenso aumento da expressão da proteína Fos nos animais tratados com 8-OH-DPAT, mas que foram impedidos de beber. Estes dados revelam que a ativação de receptores 5-HT_{1A} provoca padrões de atividade celular específicos a cada núcleo (ou região) serotoninérgico e, aparentemente, estes diferentes padrões de atividade parecem refletir diferentes estados homeostáticos. Por exemplo, o aumento de atividade de núcleos Fos+ na região dos núcleos AnI e ZpFLM pertencem a neurônios não serotoninérgicos ativados pela injeção de 8-OH-DPAT. Nestes núcleos, a ingestão de água diminui a atividade Fos gerada pelo 8-OH-DPAT praticamente a níveis basais. Os animais que ficaram sem acesso à água após o tratamento apresentaram aumento no comportamento exploratório especificamente na região onde ficava o bebedouro. Este aumento na atividade Fos em neurônios não

serotonérgicos pode representar a atividade de circuitos envolvidos com o desencadeamento de comportamentos motivacionais direcionados à busca pela água. O aumento na atividade Fos nos núcleos AnI e ZpFLM, parecem ser devido à ativação especialmente de receptores 5-HT_{1A}, pois um trabalho que publicamos recentemente demonstrou que a injeção ICV de 150 nmol de 5-HT não provocou alterações na expressão da proteína Fos nem em neurônios serotonérgicos nem em outros tipos de neurônios presentes nestas áreas (DOS SANTOS *et al.*, 2011). Já nos núcleos R e LC, a expressão da proteína Fos foi aumentada pela intensa ingestão de água, uma vez que os animais que receberam a injeção de 8-OH-DPAT, mas que não beberam após o tratamento, o nível de atividade Fos foi similar ao observado nos animais tratados com veículo.

Em resumo, estes resultados apontam a existência de populações neuronais heterogêneas localizadas entre as regiões serotonérgicas do tronco encefálico do pombo. Núcleos da região da rafe ventromedial aparentemente estão relacionados com circuitos que estimulam a ingestão hídrica, enquanto núcleos da região dorsomedial parecem estar envolvidos com a mediação de sinais fisiológicos desencadeados por um possível desequilíbrio na homeostase dos fluidos corporais que é reestabelecido após a ingestão de água.

Somente os animais tratados com 8-OH-DPAT com água disponível após o tratamento apresentaram aumento na ingestão de alimento. Os diferentes padrões de atividade Fos que observamos entre os núcleos serotonérgicos podem, portanto, também estar relacionado à ingestão de alimento. Experimentos do nosso laboratório que avaliaram a expressão da proteína Fos em neurônios imunorreativos a enzima tirosina hidroxilase (que marca neurônios catecolaminérgicos) em cortes do tronco encefálico de pombos, apontaram que o aumento na ingestão de alimentos, provocado por uma dieta palatável, aumentou o número de células duplamente marcadas (SULZBACH *et al.*, em preparação). Além disso, nós já havíamos demonstrado aumento na ingestão de alimento em pombos após o tratamento com noradrenalina (STEFFENS *et al.*, 1997). Portanto, o aumento de núcleos Fos+ naquelas regiões onde observamos aumento de atividade após a ingestão de água, também pode estar relacionado ao efeito hiperfágico do 8-OH-DPAT.

Em resumo, nossos dados sugerem que neurônios não serotonérgicos do tronco encefálico de pombos podem estar envolvidos com a intensa ingestão de alimento causada pelo 8-OH-DPAT em pombos com livre acesso à água após a injeção. Esta ingestão de alimento parece estar diretamente envolvida com a ingestão de água,

uma vez que somente os animais que com livre acesso à água, ingeriam após os tratamentos.

Cabe lembrar que os animais tratados com 8-OH-DPAT apresentaram aumento na duração do sono independente se beberam ou não após a injeção. Desta forma, as alterações provocadas pelo 8-OH-DPAT na densidade de núcleos Fos+ das regiões dos núcleos serotoninérgicos, aparentemente, não tem relação com o sono apresentado pelos nossos animais. Aparentemente, os efeitos da 5-HT sobre a atividade de neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos do tronco encefálico de pombos possivelmente relacionados com o controle dos estados de sono e vigília, parecem ser dependentes da ativação de outros tipos de receptores. Após a injeção ICV de 5-HT em pombos livremente alimentados, nós observamos que a duração de sono foi negativamente correlacionada com a atividade de neurônios serotoninérgicos do núcleo A8 e positivamente correlacionado com a atividade de neurônios não serotoninérgicos do núcleo R (DOS SANTOS *et al.*, 2011). Estes resultados mostram que as diferentes respostas observadas nos animais tratados com 5-HT, aumento na ingestão de água e na duração do sono, apesar de ser bastante similar aos efeitos causados pelo 8-OH-DPAT, dependem também de outros subtipos de receptores serotoninérgicos.

A análise do padrão de atividade Fos observado nos animais que receberam a injeção de 5-HT e que foram privados de água após a injeção, mostra que o aumento da 5-HT intraventricular (pela injeção ICV) desencadeia uma resposta de ativação celular nos circuitos hipotalâmicos relacionados à ingestão de água e controle dos fluídos corporais na tentativa de manter a homeostase corporal. A injeção de 5-HT aumentou a atividade celular nos núcleos SFO e POM, que são duas das estruturas que compõem a região da lâmina terminal em mamíferos, nas regiões magno e parvo celular do PVN, que contém neurônios que expressam o hormônio antidiurético vasopressina, e também nos núcleos SL e BNSTl, regiões envolvidas com o controle da ingestão de água em mamíferos.

O órgão subfornical (em aves, alguns autores sugerem o nome de Órgão Sub-septal, como mais apropriado, pois aves não possuem fórnix. Mantivemos SFO por se tratar do nome mais usado em estudos sobre o controle do equilíbrio osmótico tanto em mamíferos como em aves), é uma estrutura chave no controle do equilíbrio osmótico em vertebrados e é uma das principais estruturas sensíveis a alterações osmóticas no fluido cérebro espinhal em mamíferos (SMITH E DAY, 1995). Junto com o SFO, o POM envia projeções para os núcleos PVN e Supra-óptico e estimula a liberação de vasopressina em mamíferos

(MCKINLEY *et al.*, 1992; para revisão ver MCKINLEY *et al.*, 2004). No pombo, experimentos em andamento em nosso laboratório vêm demonstrando que os núcleos SFO, POM e PVN também parecem contribuir para o controle dos fluídos corporais em aves. Pombos que receberam uma injeção de salina hipertônica (NaCl 3% em água destilada) intra cavidade celomática e que foram privados de água após a injeção, apresentaram alta densidade de núcleos Fos+ nas três regiões mencionadas anteriormente. A atividade Fos nestas áreas voltou a valores basais após a ingestão de água (DOS SANTOS *et al.*, em preparação). Na galinha, a injeção de salina hipertônica também produziu intensa atividade no SFO e aumento na atividade Fos de células produtoras de vasotocina (peptídeo presente em vertebrados não mamíferos homólogo à vasopressina do mamífero) do PVN (D'HONDT *et al.*, 1999). Em ratos, desidratação crônica aumenta a expressão da proteína Fos em neurônios vasopressinérgicos das regiões magno e parvocelular do núcleo PVN (WOTUS *et al.*, 2007). A ingestão de água causada em decorrência da desidratação restabelece os índices de atividade Fos a valores basais (WOTUS *et al.*, 2007) e diminui a liberação de vasopressina (STRICKER E HOFFMANN, 2005). Nos pombos tratados com 5-HT nós observamos aumento na atividade Fos nos núcleos SFO e POM, que cai após a ingestão de água, e aumento nas regiões parvo e magnocelular do núcleo PVN, que não foi afetado pela ingestão de água.

A persistência da alta atividade dos neurônios do PVN mesmo após a ingestão de água em pombos pode envolver uma possível comunicação direta entre de neurônios serotonérgicos e o PVN. Em ratos, foi demonstrado que a 5-HT aumenta a excitabilidade de neurônios magnocelulares do PVN (HO *et al.*, 2007) e que a sertralina, um inibidor seletivo da recaptação de 5-HT estimula a liberação de vasopressina e ocitocina, que está envolvida com o controle dos níveis corporais de sódio (MAGALHÃES-NUNES *et al.*, 2007). Estudos em ratos demonstraram que a liberação da vasopressina induzida pela 5-HT é primariamente mediada pelos receptores 5-HT_{2C}, 5-HT₄ e 5-HT₇; já o efeito estimulante sobre a liberação de ocitocina é promovido pelos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₄ (JØRGENSEN *et al.*, 2003). Nossos resultados após a injeção de 8-OH-DPAT mostram que pelo menos para a região parvocelular do PVN, o receptor 5-HT_{1A} parece estar envolvido com o efeito da 5-HT. Pois após a injeção do 8-OH-DPAT, o aumento na expressão da proteína Fos não foi afetado pela ingestão de água, assim como o que ocorreu após a injeção de 5-HT. Já para a região magnocelular, outros receptores podem estar envolvidos, já

que aumento na atividade Fos foi observado somente nos animais que tiveram acesso à água. Portanto, é possível que mesmo após a ingestão de água, neurônios serotoninérgicos continuem estimulando o PVN, mesmo após os sinais que vinham do SFO e POM terem diminuído (o que foi representado pela queda dos níveis Fos após a ingestão de água). Em um cenário fisiológico, é possível que os circuitos serotoninérgicos (que também estão envolvidos com mecanismos de defesa) ao inibirem a ingestão de água na presença de um predador, por exemplo, estimule a atividade de regiões hipotalâmicas envolvidas justamente com a manutenção dos fluídos corporais, o que torna possível ao animal esperar a ameaça ir embora ou então se dirigir a outro sítio para aliviar a sua sede.

O PVO parece ser outra região importante para o controle da ingestão de água em pombos. O PVO é uma estrutura da região posterior do hipotálamo de vertebrados não-mamíferos que contém neurônios bipolares que estão em contato direto com o espaço ventricular e são altamente sensíveis à composição do fluido cérebro espinhal (GEORGE E MESSL, 1987). Recentemente, nosso laboratório demonstrou a presença de neurônios serotoninérgicos nesta estrutura (MENEGUELLI *et al.*, 2009), e nossos resultados autorradiográficos demonstraram que o PVO apresenta alto número de receptores 5-HT_{1A}. Nos animais tratados com 5-HT sem acesso à água, observamos aumento da atividade Fos no PVO. A ingestão de água restaura o nível de atividade Fos a níveis controles. O resultado da injeção de 8-OH-DPAT sugere que os efeitos da 5-HT sobre a atividade do PVO seja por outros receptores que não o 5-HT_{1A}. A densidade de núcleos Fos⁺ no PVO foi aumentada somente naqueles animais que beberam após a injeção. Aparentemente, é possível que neurônios serotoninérgicos do PVO contribuam para a inibição da ingestão de água, uma vez que nos animais tratados com 5-HT e que tinham água disponível, a atividade Fos no PVO é tão baixa quanto nos animais controles. Isso parece ser verdade, pois nos animais tratados com 8-OH-DPAT que beberam após a injeção o nível de atividade está muito alto. A grande presença de receptores 5-HT_{1A} aliado a presença de neuronios serotoninérgicos no PVO (MENEGHELLI *et al.*, 2009), é possível que estes receptores 5-HT_{1A} sejam autorreceptores, o que levaria a inibição dos neurônios serotoninérgicos. Logo, a intensa atividade Fos que observamos após a ingestão de água no animal tratado com 8-OH-DPAT, parece refletir a atividade de outros neurônios que podem estar envolvidos com a estimulação da ingestão de água.

A injeção de 5-HT também aumentou a atividade Fos na região dos núcleos SL e BNSTI independente se os animais beberam ou não após a injeção. Em ratos, a área septal está envolvida com o controle da ingestão hídrica e, aparentemente, diferentes núcleos dentro desta região parecem possuir diferentes papéis: lesão do núcleo SL aumenta a ingestão de água produzida pela injeção de angiotensina II (SAAD*et al.*, 1998), já lesão do SM produz o efeito contrário, diminui a ingestão (COLOMBARI*et al.*, 1994). Em ratos, a injeção bilateral de 8-OH-DPAT no SL produziu efeitos diferentes dependendo da concentração de sódio extracelular: em animais normais, o 8-OH-DPAT diminuiu a ingestão de água, já em animais pré-tratados com a veratridina, um modulador dos canais de sódio que aumenta a concentração de sódio extracelular, o 8-OH-DPAT aumentou a ingestão de água (DE ARRUDA CAMARGO *et al.*, 2010). Em pombos, foi observada intensa presença de receptores 5-HT_{1A} nesta região (HEROLD*et al.*, 2011), e nossos dados indicaram que tanto a 5-HT como o 8-OH-DPAT aumentaram a atividade do SL, independente se os animais beberam ou não após as injeções. A única diferença entre os animais tratados com 5-HT e os tratados com 8-OH-DPAT é que após a ingestão de água, o nível de atividade Fos nos animais tratados com 5-HT diminui e nos animais tratados com 8-OH-DPAT aumenta em relação aos animais que não tiveram acesso à água. Não observamos marcação Fos no núcleo SM, o que sugere, que assim como em mamíferos, diferentes regiões da área septal de pombos possuem diferentes papéis no que diz respeito ao controle da ingestão de água. Isto parece ser verdade para outras espécies de aves também. D'Hondt e colaboradores injetaram salina hipertônica intra cavidade celomática de galinhas e observaram intenso aumento da expressão Fos no núcleo SL, mas não detectaram atividade Fos no SM (D'HONDT*et al.*, 1999).

Na região lateral do núcleo BNST observamos intenso aumento na atividade Fos tanto nos animais tratados com 5-HT como naqueles tratados com 8-OH-DPAT. A ingestão de água reduz parcialmente o efeito da 5-HT e quase que totalmente o efeito do 8-OH-DPAT. O núcleo BNST parece fazer parte do sistema que controla o balanço hidroeletrólítico tanto em mamíferos como em aves. Em mamíferos, foi verificado que esta região possui conexões com o SFO e com o órgão vascular da lâmina terminal (FRY E FERGUSON, 2007) e apresenta intensa atividade Fos após injeção ICV de angiotensina II (XU E HERBERT, 1994). Em pombos, evidências do nosso laboratório demonstraram que os neurônios do BNST envolvidos com o controle da ingestão de água estão sob influência inibitória tônica exercida por

circuitos glutamatérgicos, uma vez que a injeção local de MK-801, um antagonista de receptor NMDA, em pombos livremente alimentados, ocasionou elevação do consumo de água, aumentou a duração e a frequência do beber, e diminuiu a latência para iniciar ingestão (DA SILVA, 2010). Nossos resultados indicam que os receptores 5-HT_{1A} parecem mediar o controle exercido pela 5-HT sobre circuitos envolvidos com o controle da ingestão de água localizados no BNSTI.

Em resumo, nossos resultados demonstraram que a injeção de 5-HT e de 8-OH-DPAT desencadearam intensas alterações na atividade de células localizadas em regiões periventriculares, circunventriculares e em regiões que contém neurônios magnocelulares. Em algumas destas regiões, as alterações provocadas pela 5-HT parecem ser mediadas pela ativação de receptores 5-HT_{1A}, mas em outras, a 5-HT provoca padrões de atividade Fos completamente diferente do observado após a injeção do 8-OH-DPAT, indicando que o efeito da 5-HT sobre o controle da ingestão de água depende também da ativação de outros receptores.

A 5-HT alterou drasticamente o comportamento de sono: animal tratado com 5-HT dormiu mais cedo, por mais tempo e de forma mais frequente que o animal controle. O efeito da 5-HT foi afetado pelo pré-tratamento com o WAY: a dose de 0,1 nmol bloqueou o efeito da dose de 50 nmol de 5-HT e, ao contrário, a dose de 1 nmol de WAY potencializou o efeito hipnagênico da dose de 150 nmol de 5-HT. O WAY também aumentou o sono quando injetado antes do veículo da 5-HT. Com o MM77 os efeitos foram inconsistentes: a maior dose não afetou o efeito da 5-HT nem alterou o sono *per se*; já a menor dose, além de ter bloqueado o efeito da 5-HT, também aumentou o sono quando injetado previamente ao veículo. Assim como a 5-HT, o 8-OH-DPAT provocou intensa resposta hipnagênica. O efeito do 8-OH-DPAT foi parcialmente bloqueado pelas doses mais baixas de WAY e totalmente bloqueado pela única dose de MM77 testada. A lesão dos neurônios serotoninérgicos não afetou os efeitos causados pela 5-HT ou pelo 8-OH-DPAT sobre o sono, mas os animais que foram injetados com a 5,7-DHT apresentaram nível de sono basal maior que os animais falsamente operados.

O aumento na duração do sono provocado pelos antagonistas WAY e MM77 pode ter sido causado pelo bloqueio da atividade serotoninérgica em regiões prosencefálicas responsáveis pelo controle do sono. As principais estruturas relacionadas ao controle do sono em mamíferos estão situadas na área pré-óptica hipotalâmica (para revisão ver SZYMUSIAK et al., 2007), que em mamíferos é innervada por terminais serotoninérgicos provenientes do núcleo MnR (VERTES et al.,

1999), e contém um tipo de célula que é ativado principalmente durante o sono (SZYMUSIAK *et al.*, 1998; SUNTSOVA *et al.*, 2002). Após o tratamento tanto com 5-HT como com 8-OH-DPAT, nós observamos aumento na duração do sono e aumento da expressão da proteína Fos no núcleo POA. Este aumento de atividade parece estar relacionado especificamente ao sono, uma vez tanto os animais que beberam quanto aqueles que não beberam após os tratamentos, apresentaram intensa atividade nesta região.

Outra evidência que reforça a possibilidade dos antagonistas terem bloqueado a atividade serotoninérgica no POA, é que neste núcleo observamos grande presença de receptores 5-HT_{1A}. Somando se a isso, resultados de experimentos hodológicos que realizamos em parceria com o Laboratório de Biopsicologia da Universidade do Ruhr (Bochum, Alemanha) sob a supervisão do professor Dr. Onur Güntürkün, mostraram que a região pré-óptica do hipotálamo de pombos recebe moderada densidade de projeções serotoninérgicas (DOS SANTOS *et al.*, em preparação). Estes resultados sugerem que o bloqueio de receptores 5-HT_{1A} localizados no núcleo POA parece inibir a informação serotoninérgica proveniente dos núcleos da rafe, e indicam que a região pré-óptica do hipotálamo parece ser uma estrutura importante para o controle dos estados de alerta em aves.

Não podemos deixar de lembrar, entretanto, que o WAY que é reconhecido como um antagonista silencioso de receptores 5-HT_{1A} (FORSTER *et al.*, 1995), quando administrado em altas doses pode atuar como agonista parcial destes receptores e provocar a diminuição da atividade dos neurônios serotoninérgicos (CRAVEN *et al.*, 1994). Um estudo sobre os efeitos do MM77 sobre a ingestão de alimentos, tanto em ratos privados como em ratos saciados, demonstrou que o efeito do MM77 sobre a ingestão é similar ao efeito do 8-OH-DPAT: diminui a ingestão em animais privados e aumenta em animais saciados (Arkle e Ebenezer, 2004). Estes dados sugerem que o efeito hipnogênico dos antagonistas também pode ter sido mediado pela atuação dos mesmos como agonistas parciais dos autorreceptores 5-HT_{1A}.

Devemos salientar também que outros sistemas de neurotransmissores podem estar envolvidos nos efeitos sobre o sono provocado pelos antagonistas. Tanto o WAY como o MM77 podem bloquear receptores adrenérgicos α_1 (ARKLE *et al.*, 2005). A inibição destes receptores pelo antagonista prazosina reduziu a atividade de neurônios serotoninérgicos do núcleo DRN (HJORTH *et al.*, 1995) e prolongou o sono de ondas lentas em ratos (KLEINLOGEL, 1989) e aumentou o número de episódios de sono paradoxal em gatos

(HILAKIVI E LEPPAVUORI, 1984) e em macacos (LEINONEN E STENBERG, 1986). Experimentos em andamento no nosso laboratório (DOS SANTOS *et al.*, em preparação) apontaram que a prazosina também foi capaz de afetar o sono provocado pela 5-HT. Estes dados sugerem que os efeitos hipnogênicos da 5-HT, do WAY e do MM77 podem envolver a participação de outros receptores além dos serotoninérgicos 5-HT1A.

Os resultados obtidos com a lesão dos neurônios serotoninérgicos e o efeito bloqueador do MM77 sobre a resposta hipnogênica da 5-HT e do 8-OH-DPAT, sugerem que o efeito destes agentes sobre o sono se deve a ativação de heterorreceptores 5-HT1A. A única forma de explicar estes resultados seria imaginar que estes receptores pós-sinápticos também modulam negativamente a atividade serotoninérgica. Esta possibilidade da existência de uma alça de retroalimentação longa envolvendo os heterorreceptores 5-HT1A foi aventada pela primeira vez em estudos que mostraram que os efeitos inibitórios do tratamento sistêmico com 8-OH-DPAT sobre a atividade serotoninérgica foram abolidos pela lesão do córtex pré-frontal em ratos (CECI *et al.*, 1994; HAJÓS *et al.*, 1999; para revisão ver SHARP *et al.*, 2007). Além disso, a inibição da atividade de neurônios serotoninérgicos provocada pela injeção sistêmica de 8-OH-DPAT não foi afetada pelo bloqueio dos autorreceptores 5-HT1A após injeção de WAY diretamente no DRN (MARTIN-RUIZ E UGEDO, 2001).

Diferentemente dos resultados que encontramos nos pombos submetidos à lesão dos neurônios serotoninérgicos com a 5,7-DHT, isto é, a manutenção do efeito hipnogênico da 5-HT e do 8-OH-DPAT, o tratamento sistêmico com três diferentes agonistas parciais dos receptores 5-HT1A (ipsapirona, buspirona e gepirona), em ratos submetidos ao mesmo tipo de lesão, provocou aumento da vigília e diminuição da duração do sono de ondas lentas e do sono paradoxal (MONTI *et al.*, 1990). Estes dados sugerem que os heterorreceptores 5-HT1A parecem contribuir para a modulação exercida pelos circuitos serotoninérgicos sobre estados de vigília em aves, mas aparentemente, não compartilham as mesmas funções dos receptores 5-HT1A que participam do controle do sono em mamíferos.

A única alteração comportamental que observamos nos animais submetidos à lesão dos neurônios serotoninérgicos com a 5,7-DHT estavam relacionadas ao controle do ciclo sono/vigília. Comparados aos animais falsamente operados, os animais tratados com a 5,7-DHT apresentaram aumento na duração do sono. Tal efeito hipnogênico da 5,7-DHT pode ser explicado pela diminuição das informações inibitórias

carreadas por aferentes serotonérgicos a distritos hipotalâmicos relacionados com a geração do sono. A injeção de 5,7-DHT diminuiu o conteúdo de 5-HT no hipotálamo e no hipocampo e, pelo menos em mamíferos, a quantidade de 5-HT nestas regiões é menor durante o sono e maior durante a vigília (no hipotálamo, WILKINSON *et al.*, 1991; AUERBACH *et al.*, 1989; OROSCO *et al.*, 1995; no hipocampo, RUETER, JACOB, 1996). Entretanto, apesar de provocar diminuição dos níveis de 5-HT no hipocampo de ratos, a 5,7-DHT não provocou alterações significativas no comportamento de sono destes animais (MONTI *et al.*, 1995). Ainda em mamíferos, alguns trabalhos relatam aumento (FRANKFURT *et al.*, 1993) ou nenhuma alteração (MIQUEL *et al.*, 1992; VANDE KAR *et al.*, 1998) na densidade dos receptores 5-HT_{1A} após a lesão com a 5,7-DHT. Portanto, é possível que os efeitos da lesão dos neurônios serotonérgicos provoque diferentes efeitos plásticos entre os cérebros de aves e mamíferos que explique o contraste nas respostas que encontramos.

Em resumo, a 5-HT e o 8-OH-DPAT provocaram intenso resposta hipnagênica que parece ser modulada parcialmente por ambos os receptores 5-HT_{1A}. Os dados obtidos com os antagonistas e com a lesão dos neurônios serotonérgicos mostrou ainda que os circuitos serotonérgicos exercem um efeito inibitório tônico sobre o sono. Os dados obtidos com a análise da proteína Fos e com os traçadores (dados em preparação) reforçam a possibilidade de assim como em mamíferos, a área pré-óptica hipotalâmica, especialmente o núcleo POM, possa ser um importante componente do papel dos circuitos serotonérgicos no controle dos estados de alerta em aves.

5. CONCLUSÕES

Os receptores 5-HT_{1A} parecem estar diretamente envolvidos com a participação dos circuitos serotoninérgicos na modulação do comportamento ingestivo. Nossos dados não nos permitem discriminar as alterações comportamentais provocadas pela 5-HT aos auto ou heterorreceptores, mas ao invés disso, mostram que a atuação de ambos os receptores é necessária para explicar os efeitos da 5-HT sobre a ingestão de alimento, de água e do sono.

A lesão dos neurônios serotoninérgicos não afetou os efeitos ingestivos e comportamentais provocados pela 5-HT ou pela ativação dos receptores 5-HT_{1A}, sugerindo que os heterorreceptores desempenham o papel mais importante no controle das respostas provocadas pelos tratamentos. Os resultados demonstraram ainda que o sono parece ser inibido tonicamente pelos circuitos serotoninérgicos. A falta de efeito da lesão sobre a ingestão de alimentos sugere que possa haver uma adaptação da função serotoninérgica e dos receptores 5-HT_{1A} no animal lesado que mantém estes comportamentos funcionando normalmente.

Os autorreceptores 5-HT_{1A} estão distribuídos difusamente pelo tronco encefálico populando todas as regiões onde se encontram neurônios serotoninérgicos. No hipotálamo, os receptores 5-HT_{1A} ocupam principalmente as regiões circunventriculares, periventriculares e do hipotálamo. Este padrão de distribuição sugere que os receptores 5-HT_{1A} estão situados em regiões estratégicas para o controle das respostas comportamentais organizadas pela 5-HT.

A ativação dos receptores 5-HT_{1A} não provocou alterações detectáveis no padrão de atividade dos neurônios serotoninérgicos. Entretanto, produziu modificações no padrão de atividade celular de neurônios não serotoninérgicos que parecem ser específicas a cada núcleo e relacionadas com a ingestão de água.

O padrão de atividade celular provocado pela injeção de 5-HT e 8-OH-DPAT em regiões hipotalâmicas demonstrou que os receptores 5-HT_{1A} estão envolvidos com o papel dos circuitos serotoninérgicos no controle da ingestão de alimento, de água e sono em pombos. As principais alterações observadas após os tratamentos foram em estruturas chave para a manutenção dos fluidos corporais (as regiões periventricular, circunventricular e magnocelular), da ingestão de alimento (núcleos da região medial do hipotálamo) e do sono (área pré-óptica hipotalâmica). Diferenças específicas a cada região avaliada, relacionadas ou não com a ingestão de água, mostraram que outros

receptores serotoninérgicos também podem estar envolvidos com o papel dos circuitos serotoninérgicos em orquestrar os comportamentos ingestivos e respostas pós-prandiais em pombos.

REFERÊNCIAS

ABALO, X.M.; VILLAR-CHEDA, B.; MELÉNDEZ-FERRO, M.; PÉREZ-COSTAS, E.; ANADÓN, R.; RODICIO, M.C. Development of the serotonergic system in the central nervous system of the sea lamprey. *J Chem Neuroanat*, 34: 29-46, 2007.

AGHAJANIAN, G.K. Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: Bloom, F.R., Kupfer, D.J. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven, New York, pp. 1451-1459, 1995.

ALESCI, R.; BAGNOLI, P. Endogenous levels of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in specific areas of the pigeon CNS: effects of serotonin neurotoxins. *Brain Res*, 450: 259-271, 1988.

ALFREDO, B.A. Ofir P. Effect of the postsynaptic 5-HT_{1A} receptor antagonist MM-77 on stressed mice treated with 5-HT_{1A} receptor agents. *Eur J Pharmacol*, 508(1-3): 155-8, 2005.

ANGELES-CASTELLANOS, M.; AGUILAR-ROBLERO, R.; ESCOBAR, C. c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286: R158-R165, 2004.

ANTIN, J.; GIBBS, J.; HOLT, J.; YOUNG, R.C.; SMITH, G.P. Cholecystokinin elicits the complete behavioural sequence of satiety in rats. *J Comput Physiol Psychol*, 89: 748-60, 1975.

ARARAGI, N.; MLINAR, B.; BACCINI, G.; GUTKNECHT, L.; LESCH, K-P, CORRADETTI R. Conservation of 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition of serotonin (5-HT) neurons in mice with altered 5-HT homeostasis. *Front Pharmacol*, 4: 1-11, 2013.

ARKLE, M.L.; ARKLE, S.; EBENEZER, I.S. A comparison of the effects of the 5HT_{1A} antagonists MM-77 and WAY-100635 on the mouse isolated vasa deferentia. *Auton Autacoid Pharmacol*, 25(3): 121-8, 2005.

ARKLE, M.L.; EBENEZER, I.S. Effects of the putative 5-HT_{1A} agonist MM77 on feeding in rats. Proceedings of the British Pharmacological Society. Disponível em: <http://pA2online.org/Vol2Issue1abst017P.html>, 2004.

ARTIGAS, F.; ROMERO, L.; MONTIGNY, C.; BLIER, P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *TINS*, 19 (9): 378-83, 1996.

AUERBACH, S.B.; MINZENBERG, M.J.; WILKINSON, L.O. Extracellular serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid in hypothalamus of the unanesthetized rat measured by in vivo dialysis coupled to high performance liquid chromatography with electrochemical detection: dialysate serotonin reflects neuronal release. *Brain Res*, 499: 281-5, 1989.

AZMITIA, E.C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 179: 641-68, 1978.

AZMITIA, E.; GANNON, P. The primate serotonergic system: A review of human and animal studies and a report on *Macaca fascicularis*. *Adv Neurol*, 43: 407-67, 1986.

BADAUÊ-PASSOS, JR. D.; GODINO, A.; JOHNSON, A.K.; VIVAS, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by depletion-induced sodium ingestion. *Exp Neurol*, 206: 86-94, 2007.

BALDWIN, B.A.; DE LA RIVA, C. Effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT on operant feeding in pigs. *Physiol Behav*, 58 (3): 601-13, 1995.

BANASR, M.; HERY, M.; PRINTEMPS, R.; DASZUTA, A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacol*, 29: 450-60, 2004.

BARANYIOVÁ, E. Effects of serotonin on the food intake in chickens in the post-hatching period. *Acta Vet Brno*, 59: 23-33, 1990.

BARNES, N.M.; SHARP, T.A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol*, 38: 1083-1152, 1999.

BAROFSKY, A.L.; GRIER, H.C.; PRADHAN, T.K. Evidence for Regulation of Water Intake by Median Raphe Serotonergic Neurons. *Physiol Behav*, 24: 951-5, 1980.

BARRETT, G.E.; ZHANG, L.; GLEESON, S.; GAMBLE, E.H. Anxiolytic and antidepressant mechanisms of 5-HT_{1A} drugs in the pigeon: contributions from behavioral studies. *Neurosci Biobehav R*, 18 (1): 73-83, 1994.

BEHZADI, G.; KALEN, P.; PARVOPASSU, F. AND WIKLUND L. Afferents to the median raphe nucleus of the rat: Retrograde cholera toxin and wheat germ conjugated horseradish peroxidase tracing and selective D-[³H] aspartate labeling of possible excitatory amino acid inputs. *Neuroscience*, 37: 77-100, 1990.

BENDOTTI, C.; SAMANIN, R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur J Pharmacol*, 121: 147-150, 1986.

BENOIT, S.C.; SCHWARTZ, M.W.; LACHEY, J.L.; HAGAN, M.M.; RUSHING, P.A.; BLAKE, K.A.; YAGALOFF, K.A.; KURYLKO, G.; FRANCO, L.; DANHOO, W.; SEELEY, R.J. A Novel Selective Melanocortin-4 Receptor Agonist Reduces Food Intake in Rats and Mice without Producing Aversive Consequences Diabetes. *J Neurosci*, 20 (9): 3442-8, 2000.

BERNARDIS, L.L.; BELLINGER, L.L. The Lateral Hypothalamic Area Revisited: Ingestive Behavior. *Neurosci Biobehav Re*, 20 (2): 189-287, 1996.

BJORVATN, B.; FAGERLAND, S.; EID, T.; URSIN, R. Sleep/waking effects of a selective 5-HT_{1A} receptor agonist given systemically as well as perfused in the dorsal raphe nucleus in rats. *Brain Res*, 770: 81-88, 1997.

BJORVATN, B.; URSIN, R. Changes in sleep and wakefulness following 5-HT_{1A} ligands given systemically and locally in different brain regions. *Rev Neurosci*, 9: 265-73, 1998.

BJORVATN, B.; URSIN, R. Effects of zimeldine, a selective 5-HT reuptake inhibitor, and ritanserin, a selective 5-HT₂ antagonist, on waking and sleep stages in rats. *Behav Brain Res*, 40 (3): 239-46, 1990.

BOCKAERT, J.; CLAEYSEN, S.; DUMUIS, A.; MARIN, P. Classification and signaling characteristics of 5-HT receptors. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin* Edited by Christian P. Müller and Barry L. Jacobs. Academic Press is an imprint of Elsevier, London, UK, 2010

BOHMAKER, K.; EISON, A.S.; YOCCA, F.D.; MELLER, E. Comparative effects of chronic 8-OH-DPAT, gepirone and ipsapirone treatment on the sensitivity of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors. *Neuropharmacol*, 32:527-534, 1993.

BONVENTO, G.; SCATTON, B.; CLAUSTRE, Y.; ROUQUIER, L. Effect of local injection of 8-OH-DPAT into the dorsal or median raphe nuclei on extracellular levels of serotonin in serotonergic projection areas in the rat brain. *Neurosci Lett*, 137: 101-104, 1992.

BOSWELL, T.; LI, Q.; TAKEUCHI, S. Neurons expressing neuropeptide Y mRNA in the infundibular hypothalamus of Japanese quail are activated by fasting and co-express agouti-related protein mRNA. *Brain Res Mol Brain Res*, 100 (1-2): 31-42, 2002.

BRUN, S.R.M.; LUZ, V.; FERNANDEZ, M.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. *Regul Peptides*, 98: 127-35, 2001.

CAMPANELLA, L.C.; DA SILVA, A.A.; GELLERT, D.S.; PARREIRA, C.; RAMOS, M.C.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Tonic serotonergic control of ingestive behaviours in the pigeon (*Columba livia*): the role of the arcopallium. *Behav Brain Res*, 205 (2): 396-405, 2009.

CASTRO, L.; MALDONADO, I.; CAMPOS, I.; VARJÃO, B.; ANGELO, A.L.; ATHANAZIO, R.A.; BARBETTA, M.C.; RAMOS, A.C.; FREGONEZE, J.B.; DE CASTRO E SILVA, E. Central administration of mCPP, a serotonin 5-HT_{2B/2C} agonist, decreases water intake in rats. *Pharmacol Biochem Be*, 72: 891-8, 2002.

CASTRO, L.; VARJÃO, B.; MALDONADO, I.; CAMPOS, I.; DUQUE, B.; FREGONEZE, J.B.; REIS DE OLIVEIRA, I.; DE CASTRO-E-SILVA, E. Central 5-HT₃ receptors and water intake in rats. *Physiol Behav*, 77: 349-359, 2002.

CASTRO, M.E.; DIAZ, A.; OLMO, E.; PAZOS, A. Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Neuropharmacol*, 44: 93-101, 2003.

CAVALCANTE-LIMA, H.R.; BADAUÊ-PASSOS, D. JR.; DE-LUCCA, W. JR.; LIMA, H.R.; COSTA-E-SOUSA, R.H.; OLIVARES, E.L.; CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; REIS, R.O.; MEDEIROS, M.A.; CÔRTEZ, W.S.; REIS L.C. Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. *Braz J Med Biol Res*, 38 (11): 1669-75, 2005.

CECI, A.; BASCHIROTTI, A.; BORSINI, F. the inhibitory effect of 8-OH-DPAT on the firing activity of dorsal raphe serotonergic neurons in rats is attenuated by lesion of the frontal cortex. *Neuropharmacol*, 33 (5): 709-113, 1994.

CHALETT, E.; MICELI, D.; PIERRE, J.; REPARANT, J.; MASICOTTE, G.; HERBIN, M.; VESSELKIN, N.P. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pigeon (*Columba livia*). *Anat Embryol*, 193: 209-227, 1996.

CHALMERS, D.T.; WATSON, S.J. Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain—a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res*, 561:51-60, 1991.

CHEMEL, B.R.; ROTH, B.L.; ARMBRUSTER, B.; WATTS, V.J.; NICHOL, D.E. WAY-100635 is a potent dopamine D₄ receptor agonist. *Psychopharmacology*, 188: 244-251, 2006.

CLISSOLD, K.A.; CHOI, E.; PRATT, W.E. Serotonin 1A, 1B, and 7 receptors of the rat medial nucleus accumbens differentially regulate feeding, water intake, and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav*, 112: 96-103, 2013.

COLLIN, M.; BÄCKBERG, M.; ONNESTAM, K.; MEISTER, B. 5-HT1A receptor immunoreactivity in hypothalamic neurons involved in body weight control. *Neuroreport*, 13(7): 945-951, 2002.

COLOMBARI, D.S.A.; HAIBARA, A.S.; DE ARRUDA CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A.; RENZI, A.; DELUCA, JR L.A.; MENANI, J.V. Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin ii and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. *Brain Res Bull*, 33 (3): 249-254, 1994.

COOPER, S.J.; BARBER, D.J. Effects of d-fenfluramine, MK-212, and ondansetron on saline drinking in two-choice tests in the rehydrating rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 45: 593-596, 1993.

COOPER, S.J.; CICCOCIOPPO, R. Effects of selective 5-HT 1C agonist in water-deprived rats on salt intake in two-choice tests. *Pharmacol Biochem Behav*, 45: 513-518, 1993.

CORCORAN, A.E.; HODGES, M.R.; WU, Y.; WANG, W.; WYLIE, C.J.; DENERIS, E.S.; RICHERSON, G.B. Medullary serotonin neurons and central CO(2) chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol*, 168 (1-2): 49-58, 2009.

COSCINA, D.V.; GRANT, L.D.; BALAGURA, S.; GROSSMAN, S.P. Hyperdipsia after serotonin-depletin midbrain lesions. *Nature*, 35: 63-64, 1972.

COZZI, B.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; ASTE, N.; PANZICA, G.C. The serotonergic system in the brain of the Japanese quail. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 263: 271-284, 1991.

CRAVEN, R.; GRAHAME-SMITH, D.; NEWBERRY, N. WAY-100635 and GR127935 effects on 5-hydroxytryptamine-containing neurons. *Eur J Pharmacol*, 271: R1-R3, 1994.

CRISPIM JUNIOR, C.F.; PEDERIVA, C.N.; BOSE, R.C.; GARCIA, V.A.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput Biol Med*, 42:257-64, 2002.

CURRIE, P.J, COSCINA, D.V. Diurnal variation in the feeding response to 8-OH-DPAT injected in the dorsal or median raphe. *Neuroreport*, 4: 1023-28, 1996.

D'HONDT, E.; VERMEIREN, J.; PEETERS, K.; BALTHAZART, J.; TLEMÇANI, O.; BALL, G.F. Validation of a new antiserum directed towards the synthetic c-terminus of the Fos protein in avian species: immunological, physiological and behavioral evidence. *J Neurosci Meth*, 91: 31-45, 1999.

DA SILVA, A.A.; CAMPANELLA, L.C.A.; RAMOS, M.C.; PARREIRA, C.; FARIA, M.S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. Arcopallium, NMDA antagonists and ingestive behaviors in pigeons. *Physiol Behav*, 98: 594-601, 2009.

DA SILVA, A. A. Ingestão de água e alimento após o bloqueio de receptores glutamatérgicos ionotrópicos no arcopallio intermédio, região lateral do núcleo intersticial da estria terminal e núcleo taeniae da amígdala de pombos. Tese apresentada para obtenção do título de doutor. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

DA SILVA, E.S.; DOS SANTOS, T.V.; HOELLER, A.A.; DOS SANTOS, T.S.; PEREIRA, G.V.; MENEGHELLI, C.; PEZLIN, A.I.; DOS SANTOS, M.M.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Behavior and metabolic effects of central injections of orexins/hypocretins in pigeon (*Columba livia*). *Regul Pept*, 147 (1-3): 9-18, 2008.

DA SILVA, R.A.; DA SILVA, A.S.S.; POFFO, M.J.; RIBAS, D.C.; FARIA, M.F.; MARINO-NETO, J, Paschoalini MA. Feeding behavior after metergoline or GR-46611 injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pigeon. *Behav Brain Res*, 179: 248-257, 2007.

DA SILVA, R.A.; DE OLIVEIRA, S.T.; HACKL, L.P.N.; SPILERE, C.I.; FARIA, M.S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D/1B} receptors agonists in the pigeon. *Brain Res*, 1026 (2): 275-283, 2004.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*, 232: 1-55, 1964.

DE ARRUDA CAMARGO, G.M.P.; DE ARRUDA CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A. On a possible dual role for the lateral septal area 5-HT_{1A} receptor system in the regulation of water intake and urinary excretion. *Behav Brain Res*, 215: 122-128, 2010.

DE SOUZA VILLA, P.; MENANI, J.V.; DE ARRUDA CAMARGO, G.M.P.; DE ARRUDA CAMARGO, L.A.; SAAD, W.A. Activation of the serotonergic 5-HT_{1A} receptor in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibits water intake and increases urinary excretion in water-deprived rats. *Regul Pept*, 150: 14-20, 2008.

DE VRY, J.; SCHREIBER, R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neurosci Biobehav Rev*, 24: 341-353, 2000.

DEN BOER-VISSER, A.M.; DUBBELDAM, J.L. The distribution of dopamine, substance P, vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y immunoreactivity in the brain of the collared dove, *Streptopelia decaocto*. *J Chem Neuroanat*, 23 (1): 1-27, 2002.

DENBOW, D.; VAN KREY, M.H.P.; CHERRY, J.A. Feeding and drinking response of young chicks to injections of serotonin into the lateral ventricle of the brain. *Poult Sci*, 61: 150-155, 1982.

DENBOW, D.; VAN KREY, M.H.P.; LACY, M.P.; DIETRICK, T.J. Feeding, drinking and body temperature of Leghorn chicks: Effects of ICV injections of biogenic amines. *Physiol Behav*, 31: 85-90, 1983.

DOS SANTOS, M.M.; HOELLER, A.A.; DOS SANTOS, T.S.; FELISBINO, M.B.; HERDT, M.A.; DA SILVA, E.S.; PASCHOALINI,

M.A.; MARINO NETO, J. Behavioural and electroencephalographic effects of systemic injections of 8-OH-DPAT in the pigeon (*Columba livia*). *Behav Brain Res*, 201:244-56, 2009.

DOS SANTOS, T.S.; MENEGHELLI, C.; HOELLER, A.A.; PASCHOALINI, M.A.; ARCKENS, L.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO NETO, J. Behavioral profile and Fos activation of serotonergic and non-serotonergic raphe neurons after central injections of serotonin in the pigeon (*Columba livia*). *Behav Brain Res*, 220:173-84, 2011.

DUGOVIC, C.; WAUQUIER, A.; LEYSEN, J.E.; MARRANNES, R.; JANSSEN, P.A.J. Functional role of 5-HT₂ receptors in the regulation of sleep and wakefulness in the rat. *Psychopharmacology*, 97: 436-442, 1989.

DUGOVIC, C.; WAUQUIER, A. 5-HT₂ receptors could be primarily involved in the regulation of slow wave sleep in the rat. *Eur J Pharmac*, 137: 145-146, 1987.

DUGOVIC, C. Functional activity of 5-HT₂ receptors in the modulation of the sleep/wakefulness states. *J. Sleep Res*, 1: 163-168, 1992.

EBENEZER, I.S.; ARKLE, M.J.; TITE, R.M. 8-Hydroxy-2-(di-N-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Method Find Exp Clin Pharmacol*, 29 (4): 269-274, 2007.

EBENEZER, I.S.; VELLUCCI, S.V.; PARROT, R.F. The differential effects of intravenously administered 8-OH-DPAT on operant food intake in satiated and food-deprived pigs are mediated by central 5-HT_{1A} receptors. *Physiol Behav*, 73 (1-2): 223-7, 2001.

EL MESTIKAWY, S.; RIAD, M.; LAPORTE, A.M.; VERGE, D.; DAVAL, G.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Production of specific anti-rat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett*, 118: 189-192, 1990.

ELMQUIST, JK; ELIAS, CF; SAPER, CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22: 221-232, 1999.

FALCK, B.; HILLARP, N.A.; THIEME, G.; TORP, A. Fluorescence of catecholamines and related compounds with formaldehyde. *J Histochem Cytochem*, 10: 348-354, 1962.

FARGIN, A.; RAYMOND, J.R.; LOHSE, M.J.; KOBILKA, B.K.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT1A receptor. *Nature*, 335: 358-360, 1988.

FLETCHER, P.J.; BURTON, M.J. Effects of manipulations of peripheral serotonin on feeding and drinking in the rat. *Pharm Bioche Be*, 20: 835-840, 1984.

FLETCHER, P.J. Dopamine receptor blockade in nucleus accumbens or caudate nucleus differentially affects feeding induced by 8-OH-DPAT injected into dorsal or median raphe. *Brain Res*, 552:181-189, 1991.

FORNAL, C.; AUERBACH, S.; JACOBS, B.L. Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. *Exp Neurol*, 88: 590-608, 1985.

FORSTER, E.A.; CLIFFE, I.A.; BILL, D.J.; DOVER, G.M.; JONES, D.; REILLY, Y.; FLETCHER, A. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT1A receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol*, 281: 81-88, 1995.

FRANCHINI, L.; JOHNSON, A.K.; DE OLMOS, J.; VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. *Am J Physiol*, 282: 235-243, 2002.

FRANCIS, H.M.; KRAUSHAAR, N.J.; HUNT, L.R.; CORNISH, J.L. Serotonin 5-HT4 receptors in the nucleus accumbens are specifically involved in the appetite suppressant and not locomotor stimulant effects of MDMA ('ecstasy'). *Psychopharmacology*, 213:355-363, 2011.

FRANKFURT, M.; MENDELSON, S.D.; MCKITTRICK, C.R. AND MCEWEN, B.S. Alterations of serotonin receptor binding in the hypothalamus following acute denervation. *Brain Res*, 601:349-352, 1993.

FRY, M.; FERGUSON, A.V. The sensory circumventricular organs: Brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiol Behav*, 91: 413-23, 2007.

FUXE, K.; LJUNGGREN, L. Cellular localization of monoamines in the upper brain stem of the pigeon. *J Comp Neurol*, 125: 355-382, 1965.

GEORGE, S.R.; MEISSL, H. An attempt to record neuronal activity in the paraventricular organ of *Rana esculenta* by means of a direct access to the infundibular recess. *Cell Tiss Res*, 250: 53-56, 1987.

GERETS, H.H.; PEETERS, K.; ARCKENS, L.; VANDESANDE, F.; BERGHMAN, L.R. Sequence and distribution of pro-opiomelanocortin in the pituitary and the brain of the chicken (*Gallus gallus*). *J Comp Neurol*, 417 (2): 250-262, 2000.

GLEESON, S.; WEISSMAN, B.A.; SEGCEL, M.R.; BARRETT, J.E. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. *Eur J Pharmacol*, 229: 109-115, 1992.

GODINO, A.; DE LUCA JR, L.A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293:R1027-R1036, 2007.

GOOLEY, J.J.; SCHOMER, A.; SAPER, C.B. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci*, 9: 398-407, 2006.

GOZLAN, H.; EL MESTIKAWY, S.; PICHAT, L.; GLOWINSKI, J.; HAMON, M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature*, 305 (5930):140-2, 1983.

GÜNTÜRKÜN, O.; GROTHUES, A.; HAUTKAPPE, A.; VISE, F.; WAWRZYNIAK, N.; ZWILLING, U. Serotonergic modulation of ingestive behavior in pigeons. *Pharmacol Biochem Behav*, 32:415-20, 1989.

HÄCKL, L.P.; DE OLIVEIRA RICHTER, G.; SERRALVO FARIA, M.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Behavioral effects of 8-OH-DPAT injections into pontine and mesencephalic areas containing

5-HT-immunoreactive perikarya in the pigeon. *Brain Res*, 1035:154-67, 2005.

HAIDA, Y.; UBUKA, T.; UKENA, K.; TSUTSUI, K.; OISHI, T.; TAMOTSU, S. Photoperiodic response of serotonin- and galanin-immunoreactive neurons of the paraventricular organ and infundibular nucleus in Japanese Quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Zool Sci*, 21: 575-582, 2004.

HAJÓS, M.; HAJÓS-KORCSOK, E.; SHARP, T. Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Brit J Pharmacol*, 126: 1741-1750, 1999.

HALFORD, J.C.; WANNINAYAKE, S.C.; BLUNDELL, J.E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. *Pharmacol Biochem Behav*, 61:159-68, 1998.

HAMON, M.; FATTACCINI, C.M.; ADRIEN, J.; GALLISSOT, M.C.; MARTIN, P.; GOZLAN, H. Alterations of central serotonin and dopamine turnover in rats treated with ipsapirone and other 5-hydroxytryptamine 1A agonists with potential anxiolytic properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 246:745-752, 1988.

HEISLER, L.K.; COWLEY, M.A.; TECOTT, L.H.; FAN, W.; LOW, M.J.; SMART, J.L.; RUBINSTEIN, M.; TATRO, J.B.; MARCUS, J.N.; HOLSTEGE, H.; LEE, C.E.; CONE, R.D.; ELMQUIST, J.K. Activation of Central Melanocortin Pathways by Fenfluramine. *Science*, 297 (26): 609-611, 2002.

HEISLER, L.K.; JOBST, E.E.; SUTTON, G.M.; ZHOU, L.; BOROK, E.; THORNTON-JONES, Z.; LIU, H.Y.; ZIGMAN, J.M.; BALTHASAR, N.; KISHI, T.; LEE, CE.; ASCHKENASI, C.J.; ZHANG, C-Y.; YU, J.; BOSS, O.; MOUNTJOY, K.G.; CLIFTON, P.G.; LOWELL, B.B.; FRIEDMAN, J.M.; HORVATH, T.; BUTLER, A.A.; ELMQUIST, J.K.; COWLEY, M.A. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*, 51: 239-249, 2006.

HEISLER, L.K.; CHU, H.M.; TECOTT, L.H. Epilepsy and obesity in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Ann N Y Acad Sci*, 861 (15):74-8, 1998.

HENSLER, J.G. Differential regulation of 5-HT_{1A} receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacol*, 26: 565–573, 2002.

HEROLD, C.; PALOMERO-GALLAGHER, N.; GÜNTÜRKÜN, O.; ZILLES, K. Serotonin 5-HT_{1A} receptor binding sites in the brain of the pigeon (*Columba livia*). *Neuroscience*, 200: 1-12, 2012.

HERRERA, D.G.; ROBERTSON, H.A. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol*, 50: 83-107, 1996.

HILAKIVI, I.; LEPPAVUORI, A. The use of alpha-adrenoreceptor agonist, and prazosin, an alpha-1 antagonist, on the stage of the sleep-waking cycle in the rat. *Acta Physiol Scand*, 120: 362-372.

HILLEBRAND, J.J.G.; WIED, D.; ADAN, R.H.A. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides*, 23: 2283-2306, 2002.

HIRUNAGI, K.; HASEGAWA, M.; VIGH, B.; VIGH-TEICHMANN, I. Immunocytochemical demonstration of serotonin-immunoreactive cerebrospinal fluid-contacting neurons in the paraventricular organ of pigeons and domestic chickens. *Brain Res*, 91: 327-330, 1992.

HJORTH, S.; BENGTSSON, H.J.; MILANO, S.; LUNDBERG, J.F.; SHARP, T. Studies on the role of 5-HT_{1A} autoreceptors and alpha 1-adrenoceptors in the inhibition of 5-HT release—I. BMY7378 and prazosin. *Neuropharmacol*, 34: 615-620, 1995.

HJORTH, S.; CARLSSON, A.; LINDBERG, P.; SANCHEZ, D.; WIKSTROM, H.; ARVINDSSON, L-E.; HACHSELL, U.; NILSSON, J.L.G. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT receptor stimulating activity. *J Neural Transm*, 55: 169-188, 1992.

HO, S.S.N.; CHOW, B.K.C.; YUNG, W-H. Serotonin increase the excitability of the hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons. *Eur J Neurosci*, 25: 2991-3000, 2007.

HOELLER, A.A.; DOS SANTOS, T.S.; BRUXEL, R.R.; DALLAZEN, A.R.; SILVA, H.T.A.; ANDRÉ, E.S.; MARINO-NETO, J. Serotonergic control of ingestive and post-ingestive behaviors in pigeons (*Columba livia*): The role of 5-HT_{1A} receptor-mediated central mechanisms. *Behav Brain Res*, 236: 118-130, 2013.

HOFFMAN, B.J.; MEZEY, E. Distribution of serotonin 5-HT_{1C} receptor mRNA in adult rat brain. *FEBS Lett*, 247: 453-462, 1989.

HOFFMAN, G.E.; LEE, W.S.; SMITH, M.S.; ABBUD, R.; ROBERTS, M.M.; ROBINSON, A.G.; VERBALIS, J.G. c-Fos and Fos-related antigens as markers for neuronal activity: perspectives from neuroendocrine systems. *NIDA Res Monogr*, 125:117-33, 1993.

HOFFMAN, G.E.; LYO, D. Anatomical Markers of Activity in Neuroendocrine Systems: Are we all 'Fos-ed out'? *J Neuroendocrinology*, 14: 259-268, 2002.

HORNUNG, J.P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat*, 26(4):331-43, 2003.

HOYER, D.; CLARKE, D.E.; FOZARD, J.R.; HARTIG, P.R.; MARTIN, G.R.; MYLECHARANE, E.J.; SAXENA, P.R.; HUMPHREY, P.P.A. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev*, 46: 157-204, 1994.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 71: 533-554, 2002.

HOYER, D. 5-HT₃, 5-HT₄ and 5-HT-M receptors. *Neuropsychopharmacol*, 3: 371-83, 1990.

HUBBARD, J.; LIN, N.; SIBBALD, J.R. Subfornical organ lesions in rats abolish hyperdipsic effects of isoproterenol and serotonin. *Brain Res Bull*, 23: 41-45, 1989.

HUSZAR, D.; LYNCH, C.A.; FAIRCHILD-HUNTRESS, V.; DUNMORE, J.H.; FANG, Q.; BERKEMEIER, L.R.; GU, W.; KESTERSON, R.A.; BOSTON, B.A.; CONE, R.D.; SMITH, F.J.;

CAMPFIELD, L.A.; BURN, P.; LEE, F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88: 131-141, 1997.

IDZIKOWSKI, C.; MILLS, F.J.; GLENNARD, R. 5-Hydroxytryptamine-2 antagonist increases human slow wave sleep. *Brain Res*, 378: 164-168, 1986.

ISON M, FACHINELLI C, RODRIGUEZ ECHANDÍA EL. Effect of the ICV Injection of 5,7-di-hydroxytryptamine on the aggressive behavior of dominant and submissive pigeons (*Columba livia*). *Pharmacol Bioche Beha*, 53 (4): 951-955, 1996.

JACCOBY S, ARNON E, SNAPIR N, ROBINZON B. Effects of bilateral basomedial hypothalamic lesions on feeding, fattiness, and reproductive functions in the White Leghorn hen. *Physiol Behav*, 56 (5):1081-1089, 1994.

JACOBS BL, FORNAL CA. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev*, 43 (4): 563-578, 1991.

JACOBS BL, FORNAL CA. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacol*, 21: 9S-15S, 1999.

JACOBS B, AZMITIA E. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72:165-229, 1992.

JOHNSTONE LE, FONG TM, LENG G. Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats. *Cell Metab*, 4: 313-321, 2006.

JONES SL, LIGHT AR. Serotonergic medullary raphespinal projection to the lumbar spinal cord in the rat: a retrograde immunohistochemical study. *J Comp Neurol*, 322:599-610, 1992.

JONGSMA ME, SEBENS JB, BOSKER FJ, KORF J. Effect of 5-HT_{1A} receptor-mediated serotonin augmentation on Fos immunoreactivity in rat brain. *Eur J Pharmacol*, 455 (2-3):109-115, 2002.

JØRGENSEN H, RIIS M, KNIGG E U, KJÆ RA, WARBER G J. Serotonin receptors involved in vasopressin and oxytocin secretion. *J Neuroendocrinology*, 15: 242-49, 2003.

JOUVET M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science*, 163: 32-41, 1969.

JOUVET M. The role of monoamines and acetylcholine-containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol*, 64:166-307, 1972.

JOYCE D, MROSOVSKY N. Eating, drinking and activity in rats following 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) administration. *Psychopharmacologia*, 5: 417-423, 1964.

KARTEN HJ, HODOS WA. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). Johns Hopkins Press, Baltimore, USA, 1967.

KATAYAMA J, YAKUSHIJI T, AKAIKE N. Characterization of the K current mediated by 5-HT receptor in the 1A acutely dissociated rat dorsal raphe neurons. *Brain Res*, 745:283-292, 1997.

KENNETT GA, MARCOU M, DOURISH CT, CURZON G. Single administration of 5-HT_{1A} agonists decreases 5-HT_{1A} presynaptic, but not postsynaptic receptor-mediated responses: relationship to antidepressant-like action. *Eur J Pharmacol*, 138:53-60, 1987.

KIEVIT P, HALEM H, MARKS DL, DONG JZ, GLAVAS MM, SINNAYAH P, PRANGER L, COWLEY MA, GROVE KL, CULLER MD. Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. *Diabetes*, 62(2): 490-497, 2013.

KIKTA DC, BARNEY CC, THREATRE RM, FREGLY MJ, ROWLAND NE, GREENLEAF JE. On the mechanism of serotonin-induced dipsogenesis in the rat. *Pharmacol Biochem Be*, 19: 519-525, 1983.

KING BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87(2): 221-244, 2006.

KLEINLOGEL H. Effects of the Selective $\alpha 1$ -Adrenoceptor Blocker Prazosin on EEG Sleep and Waking Stages in the Rat. *Neuropsychobiol*, 21:100-103, 1989.

KOBILKA BK, FRIELLE T, COLLINS S, YANG-FENG T, KOBILKA TS, FRANCKE U, LEFKOWITZ RJ, CARON MG. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*, 329, 75-79, 1987.

KUENZEL WJ, VAN TIENHOVEN A. Nomenclature and location of avian hypothalamic nuclei and associated circumventricular organs. *J Comp Neurol*, 206 (3):293-313, 1982.

KUENZEL WJ. Multiple effects of ventromedial hypothalamic lesions in the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*. *J Comp Physiol*, 90 (2): 169-182, 1974.

LAM DD, GARFIELD AS, MARSTON OJ, SHAW J, HEISLER LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol, Biochem Be*, 97: 84-91, 2010.

LAM DD, PRZYDZIAL MJ, RIDLEY SH, YEO GSH, ROCHFORD JJ, O'RAHILLY S, HEISLER LK. Serotonin 5-HT_{2C}Receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin₄ receptors. *Endocrinology*, 149 (3):1323-1328, 2008.

LANFUMEY L, HAMON M. Central 5-HT_{1A} receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol*, 27: 429-435, 2000.

LEE J-J, HAHM E-T, LEE C-H, CHO Y-W. 5-HT_{1A} receptor-mediated activation of a G-protein-coupled inwardly rectifying K⁺ current in rat medial preoptic area neurons. *Eur J Pharmacol*, 586: 114-122, 2008.

LEIBOWITZ SF, ALEXANDER JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatr*, 44: 851-864, 1998.

LEIBOWITZ SF, WEISS GF, SUH JS. Medial hypothalamic nuclei mediate serotonin's inhibitory effect on feeding behavior. *Pharmacol Biochem Be*, 37(4):735-742, 1990.

LEIBOWITZ SF, WORTLEY KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 25: 473-504, 2004.

LEINONEN L, STENBERG D. Sleep in *Macaca arctoides* and the effects of prazosin. *Physiol Behav*, 37 (2):199-202, 1986.

LIDOV HGW, GRZANNA R, MOLLIVER ME. The serotonin innervation of the cerebral cortex in the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*, 5 (2): 207-227, 1980.

LIN MT, TSAY HJ, SU WH, CHUEH FY. Changes in extracellular serotonin in rat hypothalamus affect thermoregulatory function. *Am J Physiol*, 274: R1260-1267, 1998.

LINDER AE, DIAZ J, NI W, SZASZ T, BURNETT R, WATTS SW. Vascular reactivity, 5-HT uptake, and blood pressure in the serotonin transporter knockout rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294 (4):1745-1752, 2008.

LONG AB, KUHN CM, PLATT ML. Serotonin shapes risky decision making in monkeys. *SCAN*, 4: 346-356, 2009.

MAGALHÃES-NUNES AP, BADAUÊ-PASSOS D JR, VENTURA RR, GUEDES D DA S JR, ARAÚJO JP, GRANADEIRO PC, MILANEZ-BARBOSA HK, DA COSTA-E-SOUSA RH, DE MEDEIROS MA, ANTUNES-RODRIGUES J, REIS LC. Sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, affects thirst, salt appetite and plasma levels of oxytocin and vasopressin in rats. *Exp Physiol*, 92 (5): 913-22, 2007.

MAMOUNAS LA, MOLLIVER ME. Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA). *Exp Neurol*, 102: 23-36, 1988.

MANNOURY LA COUR C, EL MESTIKAWY S, HANOUN N, HAMON M, *et al.* Regional differences in the coupling of 5-HT_{1A} receptors to G proteins in the rat brain. *Mol Pharmacol*, 70: 1013-1021, 2006.

MARCINKIEWICZ M, VERGE D, GOZLAN H, PICHAT L, HAMON M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain. *Brain Res*, 291: 159-163, 1984.

MARTIN-RUIZ R, UGEDO L. Electrophysiological evidence for postsynaptic 5-HT (1A) receptor control of dorsal raphe 5-HT neurones. *Neuropharmacol*, 41: 72-78, 2001.

MARVIN E, SCROGIN K, DUDÁS B. Morphology and distribution of neurons expressing serotonin 5-HT_{1A} receptors in the rat hypothalamus and the surrounding diencephalic and telencephalic areas. *J Chem Neuroanat*, 39: 235-241, 2010.

MCCUE MD. Specific dynamic action: a century of investigation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 144: 381-94, 2006.

MCDEVITT RA, NEUMAIER JF. Regulation of dorsal raphe nucleus function by serotonin autoreceptors: A behavioral perspective. *J Chem Neuroanat*, 41: 234-246, 2011.

MCGUIRK J, GOODALL E, SILVERSTONE T, WILLNER P. Differential effects of d-fenfluramine and d-amphetamine on the microstructure of human eating behavior. *Behav Pharmacol*, 2: 113-119, 1991.

MCKINLEY MJ, BICKNELL RJ, HARDS D, MCALLEN RM, VIVAS L, WEISINGER RS, OLDFIELD BJ. Efferent neural pathways of the lamina terminalis subserving osmoregulation. *Prog Brain Res*, 91: 395-402, 1992.

MCKINLEY MJ, MATHAI ML, MCALLEN RM, MCCLEAR RC, MISELIS RR, PENNINGTON GL, VIVAS L, WADE JD, OLDFIELD BJ. Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J Neuroendocrinol*, 16: 340-347, 2004.

MCMILLAN DE. The pigeon as a model for comparative behavioral pharmacology and toxicology. *Neurotoxicol Teratol*, 12(5):523-9, 1990.

MEIJER OC, DE KLOET ER. Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol*, 12:1-20, 1998.

MENEGHELLI C, ROCHA NH, MENGATTO V, HOELLER AA, SANTOS TS, LINO-DE-OLIVEIRA C, MARINO NETO J. Distribution of tryptophan hydroxylase-immunoreactive neurons in the brainstem and diencephalon of the pigeon (*Columba livia*). *J Chem Neuroanat*, 38: 34-46, 2009.

METZGER M, TOLEDO C, BRAUN K. Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. *Brain Res Bull*, 57: 547-551, 2002.

MIQUEL MC, DOUCET IE, BONI AC, EL MESTIKAWY LS, MATTHIESSEN L, DAVAL G, VERGE O, HAMON M. Central serotonin receptors respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry, radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem Int*, 19: (4): 453-465, 1991.

MIQUEL MC, DOUCET E, RIAD M, ADRIEN J, VERGÉ D, HAMON M. Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA in the rat brain. *Mol Brain Res*, 14: 357-362, 1992.

MOKROSZ MJ, CHOJNACKA-WÓJCIK E, TATARCZYŃSKA E, KŁODZIŃSKA A, FILIP M, BOKSA J, CHARAKCHIEVA-MINOL S, MOKROSZ JL. 1-(2-Methoxyphenyl)-4-[(4-succinimido)butyl]piperazine (MM-77): A new, potent, postsynaptic antagonist of 5-HT_{1A} receptors. *Med Chem Res*, 4: 161-168, 1994.

MONTI JM, JANTOS H, SILVEIRA R, REYES-PARADA M, SCORZA C. Sleep and waking in 5,7-DHT-lesioned or (-)-pindolol-pretreated rats after administration of buspirone, ipsapirone, or gepirone. *Pharmacol Biochem Behav*, 52 (2): 305-312, 1995.

MONTI JM, PINEYRO G, ORELLANA C, BOUSSARD M, JANTOS H. 5-HT receptor agonists DOI and 8-OH-DPAT increase wakefulness in the rat. *Biol Amin*, 7: 145-151, 1990.

MONTI JM. Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Med Rev*, 15: 269-281, 2011.

MORGAN JI, COHEN DR, HEMPSTEAD JL, CURRAN T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811):192-197, 1987.

MUSCAT R, MONTGOMERY AMJ, WILLNER P. Blockade of 8-OH-DPAT-induced feeding by dopamine antagonists. *Psychopharmacology*, 99: 402-408, 1989.

NICOLL RA, MALENKA RC, KAUER JA. Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 70: 513-565, 1990.

OLIVARES EL, COSTA-E-SOUSA RH, CAVALCANTE-LIMA HR, HRC LIMA, CEDRAZ-MERCEZ PL, REIS LC. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. *Braz J of Med Biol Res*, 36: 1709-1716, 2003.

OROSCO M, ROUCH C, DE SAINT-HILAIRE Z, NICOLAIDIS S. Dynamic changes in hypothalamic monoamines during sleep/wake cycles assessed by parallel EEG and microdialysis in the rat. *J Sleep Res*, 4 (3): 144-149, 1995.

PAEZ X, LEIBOWITZ SF. Changes in extracellular PVN monoamines and macronutrient intake after idazoxan or fluoxetine injection. *Pharmacol Biochem Behav*, 46: 933-941, 1993.

PARENT A. Comparative anatomy of the serotonergic systems. *J Physiol*, 77: 147-156, 1981.

PARKER GC, BALBOUL R, HOBDAJ JA, COSCINA DV. 5-HT receptor blockade in the posterior amygdala elicits feeding in female rats. *Neuro Report*, 12: 911-914, 2001.

PARKER GC, COSCINA DV. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Be*, 68: 729-734, 2001.

PASQUALETTI M, ORI M, CASTAGNA M, MARAZZITI D, CASSANO GB, NARDI I. Distribution and cellular localization of the serotonin type 2C receptor messenger RNA in human brain. *Neuroscience*, 92: 601-611, 1999.

PEYRON C, PETITI JM, RAMPON C, JOUVET M, LUPPI PH. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82(2): 443-468, 1998.

PHILLIPS-SINGH D, LI Q, TAKEUCHI S, OHKUBO T, SHARP PJ, BOSWELL T. Fasting differentially regulates expression of agouti-related peptide, pro-opiomelanocortin, prepro-orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell Tissue Res*, 313(2):217-25, 2003.

PONZONI A, MONTI JM, JANTOS H. The effects of selective activation of the 5-HT₃ receptor with m-chlorophenylbiguanide on sleep and wakefulness in the rat. *Eur J Pharmac*, 249: 259-264, 1993.

POPOVA NK. From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays*, 28:495-503, 2006.

PORTAS CM, THAKKAR M, RAINNIE D, MCCARLEY RW. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. *J Neurosci*, 16(8): 2820-2828, 1996.

PRATT WE, SCHALL MA, CHOI E. Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens differentially affects appetitive motivation for food on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Neurosci Lett*, 511: 84-88, 2002.

PUELLES P, MARTINEZ-DE-LA-TORRE M, PAXINOS G, WATSON C, MARTINEZ S. The Chick Brain in Stereotaxic

Coordinates: An Atlas featuring Neuromeric Subdivisions and Mammalian Homologies. Academic Press; 1 ed, 272 p, 2005.

RAAP DK, DON CARLOS L, GARCIA F, MUMA NA, WOLF WA, BATTAGLIA G, VAN DE KAR LD. Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacol*, 39: 1823-1832, 2000.

RAURICH A, MENGOD G, ARTIGAS F, CORTÉS R. Displacement of the binding of 5-HT(1A) receptor ligands to pre- and postsynaptic receptors by (-)pindolol. A comparative study in rodent, primate and human brain. *Synapse*, 34: 68-76, 1999.

REIS LC, MARINHO VR. Influence Of 5-ht1a agonist on the feeding behavior of *Coturnix japonica* (galliformes: aves). *Braz J Biol*, 65(4): 675-681, 2005.

REIS LC, RAMALHO MJ, FAVARETTO AL, GUTKOWSKA J, MCCANN SM, ANTUNES-RODRIGUES J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Proc Nat Acad Sci USA* 91: 12022-12026, 1994.

REIS LC. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. *Anais Acad Bras Ciênc*, 79(2): 261-283, 2007.

RITERS LV, EENS M, PINXTEN R, BALL GF. Seasonal changes in the densities of alpha (2) noradrenergic receptors are inversely related to changes in testosterone and the volumes of song control nuclei in male European starlings. *J Comp Neurol*, 444:63-74, 2002

ROBERTS C, PRICE GW, MIDDLEMISS DN. Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function. *Brain Res Bull*, 56 (5): 463-469, 2001.

RODGERS RJ, HOLCH P, TALLETT AJ. Behavioural satiety sequence (BSS): separating wheat from chaff in the behavioural pharmacology of appetite. *Pharmacol Biochem Be*, 97:3-14, 2010.

ROMERO L, HERVAIS I, ARTIGAS F. The 5-HT1A antagonist WAY-100635 selectively potentiates the presynaptic effects of

serotonergic antidepressants in rat brain. *Neurosci Lett*, 219: 123-126, 1996.

ROSEBERRY AG, LIU H, JACKSON AC, CAI X, FRIEDMAN JM. Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron*, 41(5):711-722, 2004.

ROWLAND NE, CAPUTO FA, FREGLY MJ. Water intake induced in rats by serotonin and 5-hydroxytryptophan: different mechanisms? *Brain Res Bull*, 18(4): 501-508, 1987.

RUETER LE, JACOBS BL. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res*, 739 (1-2): 57-69, 1996.

SAAD WA, CAMARGO LAA, ANTUNES-RODRIGUES J, SIMÕES S. Effect of electrolytic and chemical lesion by ibotenic acid of the septal area on water and salt intake. *Brain Res Bull*, 47(2):163-9, 1998.

SAADOUN A, CABRERA MC. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on food and water intake in chickens. *Physiol Behav*, 75: 271-275, 2002.

SAADOUN A, CABRERA MC. Hypophagic and dipsogenic effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT in broiler chickens. *J Anim Physiol An N*, 92: 597-604, 2008.

SANO Y, UEDA S, YAMADA H, TAKEUCHI Y, GOTO M, KAWATA M. Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing CSF-containing neurons in the submammalian paraventricular organ. *Histochem*, 77: 423-430, 1983.

SAWIN ER, RANGANATHAN R, HORVITZ HR. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*, 26(3):619-631, 2000.

SCHMITT JAJ, WINGER M, RAMAEKERS JG, EVERS EAT, Riedel WJ. Serotonin and human cognitive performance. *Curr Pharm Des*, 12: 2473-2486, 2006.

SCHREIBER R, SELBACH K, ASMUSSEN M, HESSE D, DE VRY J. Effects of serotonin_{1/2} receptor agonists on dark-phase food and water intake in rats. *Pharmacol Biochem Be*, 67: 291-305, 2000.

SCHWARTZ DH, MCCLANE S, HERNANDEZ L, HOEBEL BG. Feeding increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. *Brain Res*, 479: 349-354, 1989.

SECOR SM. Specific dynamic action: a review of the postprandial metabolic response. *J Compar Physiol B*, 179:1-56, 2009.

SERRES F, LI Q, GARCIA F, RAAP DK, BATTAGLIA G, MUMA NA, VAN DE KAR LD. Evidence that Gz-proteins couple to hypothalamic 5-HT_{1A} receptors in vivo. *J Neurosci*, 20:3095-3103, 2000.

SHARP T, BOOTHMAN L, RALEY J, QUÉRÉE P. Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *TRENDS Pharmacol Sci*, 28 (12): 629-36, 2007.

SHOR-POSNER G, GRINKER JA, MARMESON C, BROWN O, LEIBOWITZ SF. Hypothalamic serotonin in the control of meal patterns and macronutrient selection. *Brain Res Bull*, 17: 663-671, 1986.

SHOUSE, M.N.; STABA, R.J.; SAQUIB, S.F.; FARBER, P.R. Monoamines and sleep: microdialysis findings in pons and amygdale. *Brain Research*, 860: 181-189, 2000.

SILHOL, S.; GLIN, L.; GOTTESMANN, C. Study of the 5-HT₂ antagonist ritanserin on sleep/waking cycle in the rat. *Pharmac Biochem Be*, 41, 241-243, 1991.

SIMANSKY, K.J.; BOURBONNAIS, K.A.; SMITH, G.P. Abdominal vagotomy reduces the dipsogenic but not the anorexic action of systemic serotonin in rats. *Soc Neurosci Abstr*, 8: 605, 1982.

SIMANSKY, K.J.; NICKLOUS, D.M. Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake blockade by the 5-HT_{1B} antagonist SB-216641. *Pharmacol Biochem Be*, 71(4): 681-690, 2002.

SIMANSKY, K.J.; VAIDYA, A.H. Behavioral mechanisms for the anorectic action of the serotonin (5-HT) uptake inhibitor sertraline in rats: comparison with directly acting 5-HT agonists. *Brain Res Bull*, 25: 953-960, 1990.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*, 73 (1-2): 37-42, 1996.

SMITH, D.W.; DAY, T.A. Hypovolaemic and osmotic stimuli induce distinct patterns of c-Fos expression in the rat subfornical organ. *Brain Res*, 679: 34-41, 1995.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. *Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research*. W. H. Freeman and Co.: New York. 937(13): 440, 2012.

SOTELO, C.; CHOLLEY, B.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT_{1A} autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei. *Eur J Neurosci*, 2: 1144-1154, 1990.

SPROUSE, J.S.; AGHAJANIAN, G.K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse*, 1:3-9, 1987.

SPUDEIT, W.A.; SULZBACH, N.S.; BITTENCOURT, M.DE A.; DUARTE, A.M.; LIANG, H.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. The behavioral satiety sequence in pigeons (*Columba livia*). Description and development of a method for quantitative analysis. *Physiol Behav*, 122: 62-71, 2013.

STEFFENS, S.M.; CASAS, D.C.; MILANEZ, B.C.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons. *Brain Res Bull*, 44: 681-8, 1997.

STEFFENS, S.M.; DA CUNHA, I.C.; BECKMAN, D.; LOPES, A.P.; FARIA, M.S.; MARINO-NETO, J.; PASCHOALINI, M.A. The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area on feeding in female rats during the estrous cycle. *Physiol Behav*, 95 (3): 484-91, 2008.

STEINBUSCH, H.W.; NIEUWENHUYS, R. Localization of seroto-nin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. *Adv Exp Med Biol*, 133: 7-35, 1981.

STEINBUSCH, H.W. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*, 6: 557-618, 1981.

STRICKER, E.M.; HOFFMANN, M.L. Inhibition of vasopressin secretion when dehydrated rats drink water. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289: R1238-R43, 2005.

SUNTSOVA, N.; SZYMUSIAK, R.; ALAM, M.N.; GUZMAN-MARIN, R.; MCGINTY, D. Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol (Lond)*, 543: 665-77, 2002.

SZYMUSIAK, R.; ALAM, N.; STEININGER, T.L.; MCGINTY, D. Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic /anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res*, 803: 178-188, 1998.

SZYMUSIAK, R.; GVILIA, I.; MCGINTY, D. Hypothalamic control of sleep. *Sleep Med*, 8: 291-301, 2007.

TAKASE, L.F.; NOGUEIRA, M.I. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. *Brain Res*, 1200: 10-18, 2008.

TECOTT, L.H. Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metab*, 6 (5): 352-61, 2007.

TÖRK, I. Anatomy of the serotonergic system. *Ann NY Acad Sci*, 600: 9-34, 1990.

UMBRIACO, D.; ANCTIL, M.; DESCARRIES, L. Serotonin-immunoreactive neurons in the cnidarian *Renilla koellikeri*. *J Comp Neurol*, 291 (2): 167-78, 1990.

UPHOUSE, L.; GUPTARAK, J. Serotonin and sexual behaviour. In: Muller C, Jacobs B (eds) *Handbook of behavioural neurobiology of serotonin*. Elsevier, Amsterdam, 347-365, 2010.

VAISSE, C.; CLEMENT, K.; GUY-GRAND, B.; FROGUEL, P.A. frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*, 20: 113-4, 1998.

VAN DE KAR, L.D.; LI, Q.; CABRERA, T.M.; BROWNFIELD, M.S.; BATTAGLIA, G. Alterations in 8-Hydroxy-2-(dipropylamino) tetralin-induced neuroendocrine responses after 5,7-dihydroxytryptamine-induced denervation of serotonergic neurons. *JPET*, 286: 256-62, 1998.

VARNÄS, K.; HALLDIN, C.; HALL, H. Autoradiographic distribution of serotonin transporters and receptor subtypes in human brain. *Hum Brain Mapp*, 22(3): 246-60, 2004.

VERGE, D.; DAVAL, G.; MARCINKIEWICZ, M.; PATEY, A.; EL MESTIKAWY, S.; GOZLAN, H.; HAMON, M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine treated rats. *J Neurosci*, 6: 3474-82, 1986.

VERTES, R.P.; FORTIN, W.J.; CRANE, A.M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 407: 555-82, 1999.

VOIGT, J-P.; KIENZLE, F.; SOHR, R.; REX, A.; FINK, H. Feeding and 8-OH-DPAT-related release of serotonin in the rat lateral hypothalamus. *Pharmacol Biochem Be*, 65 (1): 183-9, 2000.

WEIGER, W.A. Serotonergic modulation of behaviour: a phylogenetic overview. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 72: 61-95, 1997.

WILKINSON, L.O.; AUERBACH, S.B.; JACOBS, B.L. Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia. *J Neurosci*, 11 (9): 2732- 42, 1991.

WILLIAMS, G.; HARROLD, J.A.; CUTLER, D.J. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *P Nutr Soc*, 59: 385-396, 2000.

WOTUS, C.; ARNHOLD, M.M.; ENGELAND, W.C. Dehydration-induced drinking decreases Fos expression in hypothalamic paraventricular neurons expressing vasopressin but not corticotropin-

releasing hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: R1349-58, 2007.

WU, L.Q.; DICKMAN, J.D. Magnetoreception in an avian brain in part mediated by inner ear lagena. *Curr Biol*, 21(5): 418-23, 2011.

XU, Z.; HERBERT, J. Regional suppression by water intake of c-fos expression induced by intraventricular infusions of angiotensin II. *Brain Res*, 659: 157-168, 1994.

YAMADA, H.; SANO, Y. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*). II. The distribution of the nerve fibers. *Biog Amin*, 2: 21-36, 1985.

YAMADA, H.; TAKEUCHI, Y.; SANO, Y. Immunohistochemical studies on the serotonin neuron system in the brain of the chicken (*Gallus domesticus*) I. The distribution of the neuronal somata. *Biog Amin*, 1: 83-94, 1984.

YEO, G.S.; FAROOQI, I.S.; AMINIAN, S.; HALSALL, D.J.; STANHOPE, R.G.; O'RAHILLY, S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*, 20: 111-2, 1998.

ZENDEHDEL, M.; HAMIDI, F.; BABAPOUR, V.; MOKHTARPOURIANI, K.; MAZAHERI, R.; FARD, N. The effect of melanocortin (Mc3 and Mc4) antagonists on serotonin-induced food and water intake of broiler cockerels. *J Vet Sci*, 13(3): 229-234, 2012.

ZHOU, L.; WILLIAMS, T.; LACHEY, J.L.; KISHI, T.; COWLEY, M.A.; HEISLER, L.K. Serotonergic pathways converge upon central melanocortin systems to regulate energy balance. *Peptides*, 26: 1728-32, 2005.