

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

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE 5-HT E 8-OH-DPAT
SOBRE OS ESTADOS DE VIGÍLIA E SONO DE POMBOS (*Columba livia*)**

ALEXANDRE ADEMAR HOELLER

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

ALEXANDRE ADEMAR HOELLER

EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE 5-HT E 8-OH-DPAT
SOBRE OS ESTADOS DE VIGÍLIA E SONO DE POMBOS (*Columba livia*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Neurociências

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto
Co-Orientador: Prof. Dr. Edison Sanfelice André

FLORIANÓPOLIS - SC

2009

Este trabalho é dedicado à minha família:

meus pais, meu irmão e minha esposa

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Arliones e Bete e meu irmão Junior pelo incentivo e carinho demonstrados durante todos esses anos. Minha gratidão será sempre eterna pois nenhuma das minhas conquistas seria possível sem eles;

À minha esposa Fernanda, pelo amor incondicional, apoio constante, e por acreditar que poderíamos vencer frente a um futuro cheio de adversidades, em busca do nosso aperfeiçoamento acadêmico e social, sempre ao meu lado. Também gostaria de agradecer aos meus sogros Joy e Sandra pelo apoio e compreensão da nossa ausência durante esses anos de dedicação aos estudos;

Ao professor Dr. José Marino Neto, por acreditar no meu trabalho, pelos ensinamentos, dedicação e companheirismo prestados nesses anos;

Aos queridos amigos neurocientistas e pessoal do IEB: Tiago Souza dos Santos, Samuel Vandressen Filho, Eduardo Simão da Silva, Cristiane Meneguelli, Carlos Fernando Crispim Junior, Rafael Goi Briese, Leandro Schwarz e Miguel Antonio Sovierzoski pela força prestada durante os momentos difíceis desta caminhada e por proporcionarem tantos momentos de alegria;

Aos amigos do Laboratório de Neurofarmacologia Marcelo Duzzioni, Filipe Silveira Duarte, Ligia Moreiras Sena e Gilliard Lach pela amizade e por me recepcionar de forma tão calorosa em seu laboratório;

Aos alunos de Iniciação Científica pela significativa contribuição: Gabriel Vilella Kozakevich, Anderson Roberto Dallazen, Renato Rodrigo Bruxel e Marília Mainardi Mastrocola;

Aos professores que contribuíram efetivamente na minha formação acadêmica durante o mestrado: Dr. Edison Sanfelice André, Dr. Roger Walz, Dr. Odival Cezar Gasparotto, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima e Dra. Carla Ines Tasca;

Aos professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) Dr. Norberto Garcia Cairasco, Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira e ao Henrique Tomaz do Amaral Silva por disponibilizar e auxiliar na implementação da rotina de Matlab para a análise de *wavelet* dos nossos dados;

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas Nivaldo, Carlos e Vilma pelos ensinamentos e por mostrarem-se sempre solícitos;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Instituto de Engenharia Biomédica (IEB) e especialmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento dessa dissertação de mestrado.

“Hastes de trigo, cheias de grãos, aprendem a curvar a cabeça”

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar a participação dos mecanismos serotoninérgicos sobre a regulação dos estados de sono e vigília em pombos (*Columba livia*) por meio da: 1) caracterização comportamental e eletrográfica hipocampal dos estados de sono e vigília após administração sistêmica (i.m.) de 5-HT ou 8-OH-DPAT (agonista seletivo 5-HT_{1A}); 2) quantificar os efeitos da administração de 5-HT ou 8-OH-DPAT sobre a atividade eletrográfica hipocampal dos diferentes estados identificados. Para a execução dos experimentos foram utilizados 19 pombos adultos (ambos os sexos, 350 g), acondicionados em gaiolas individuais (ciclo de 12:12 h, a 22-24° C), com livre acesso a ração e água. Os animais receberam os tratamentos (via intramuscular, 1 ml/kg) de acordo com um quadrado latino, havendo intervalo mínimo de 7 dias entre os experimentos. A partir da administração das drogas (5-HT, 1 e 2 mg/kg; 8-OH-DPAT, 0,6 e 2 mg/kg; ou veículo, ac. ascórbico 1%, grupo controle), foram efetuados simultaneamente registros comportamentais (por uma vídeo-câmera) e eletrográficos (EEG hipocampal bilateral, EOG e EMG do músculo trapézio) durante 1 hora. Os dados eletrográficos obtidos corroboram estudos comportamentais prévios realizados em nosso laboratório onde a injeção sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT estão associados à diminuição do tempo de vigília e ao aumento específico dos estados eletrográficos de sono de ondas lentas (SWS). A administração de 5-HT ainda foi capaz de aumentar os estados de sonolência (DRW) e sono REM (REMS) de forma dose-dependente em relação ao grupo controle enquanto os animais que receberam 8-OH-DPAT mantiveram a duração dos episódios de DRW e não demonstraram episódios de sono REM. Os aspectos gerais do EEG hipocampal durante os estados de sono e vigília, pelo exame visual, são indistinguíveis daqueles observados nos pombos não tratados. Durante a análise quantitativa, o tratamento com 5-HT foi capaz de modificar efetivamente a atividade espectral dos estados relacionados ao sono, ocorrendo de forma isolada com poucas diferenças em ambos os hipocampos durante a DRW e de forma mais intensa durante o SWS e REMS, havendo discrepâncias da atividade hipocampal entre os hipocampos. A análise espectral não foi capaz de revelar diferenças entre o sono induzido pelo 8-OH-DPAT e o sono registrado após administração do veículo, indicando que as características eletrográficas hipocampais podem ser similares durante o sono induzido pelo 8-OH-DPAT ou o sono diurno espontâneo de pombos. De forma complementar, a análise espectral de *wavelet* ressaltou os episódios de sono NREM, REM e sono de ondas lentas unihemisférico (USWS) encontrados durante nossos estudos. Após o tratamento com 5-HT e 8-OH-DPAT, durante registros noturnos e

raramente nos animais que receberam veículo durante o período vespertino, foram observados episódios de curto período de sono unihemisférico. Tanto os animais tratados com 5-HT ou 8-OH-DPAT quanto os animais registrados durante a noite, apresentaram uma antecipação na demonstração desse fenômeno, concomitante ao aumento da duração total de USWS e diminuição da duração média desses episódios (exceto o grupo 8-OH-DPAT de maior dose) em relação aos animais que receberam apenas veículo durante o período vespertino. Esses dados podem indicar que, embora circuitos mediados por receptores 5-HT possuam um papel importante no controle dos estados de sono e vigília, suas ações sobre esses estados podem divergir profundamente entre as aves, e entre estas e os mamíferos. Nossos dados sugerem que a resposta hipnagênica intensa e precipitada após a injeção sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT pode ser mediada por receptores serotoninérgicos localizados em locais distantes daqueles alcançados pelas injeções icv ou na rafe pontomesencefálica, ocorrendo possivelmente em regiões do tronco encefálico caudal ou em receptores localizados periféricamente. O presente trabalho indicou que circuitos serotoninérgicos possuem papel crucial sob mecanismos que controlam os estados de sono e vigília e outros comportamentos espontâneos tanto em mamíferos como em aves, podendo a ação sob esses estados, sua localização no encéfalo e o papel desses receptores serotoninérgicos representar uma variação inter-específica.

Palavras-Chave: Sono, Serotonina, receptor 5-HT_{1A}, Hipocampo, Aves, EEG

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the role of serotonergic mechanisms on the regulation of sleep-waking states in pigeons (*Columba livia*) through 1) behavioral and hippocampal electrographic recordings after 5-HT or 8-OH-DPAT (selective 5-HT_{1A} agonist) peripheral administration (i.m.); 2) hippocampal EEG analysis after 5-HT or 8-OH-DPAT administration. 19 adult domestic pigeons of both sexes, 350 g body weight, were maintained in individual cages at a temperature of 22-24° C, on a 12:12 light-dark cycle (lights on at 07:00 h) with free access to food and water. All the animals within a group received all doses, distributed according to a Latin-square design, with a minimum interval of 7 days between experiments. The animals received the assigned 5-HT (1.0 or 2.0 mg/kg) or 8-OH-DPAT (0.6 or 2 mg/kg) or vehicle injection, and the electrographic recording was continued for the next 60 minutes, simultaneously to a digital video recording which was taken with a webcam located inside the Faraday cage (in front of the recording cage). Our data corroborate behavioral previous studies of our laboratory where the systemic injections of 5-HT or 8-OH-DPAT are associated with a decreased duration of wakefulness and a specific slow-wave sleep (SWS) increased duration. The 5-HT administration was able to increase other sleep-related states like drowsiness (DRW) and REM sleep (REMS) in a dose-dependent way while 8-OH-DPAT-treated animals maintained the DRW duration and did not showed REMS episodes. The general attributes of amplitude and frequency of the EEG tracings during waking, DRW and SWS were similar in vehicle- and in 5-HT- and 8-OH-DPAT-treated pigeons. During relative power density analysis, 5-HT injection was able to effectively modify the spectral profile of sleep-related states, being slightly different in both hippocampus during DRW and more intense during SWS and REMS, with significant differences between hippocampus. After 8-OH-DPAT injection, differences were scattered across the spectra in isolated 1-Hz bins, forming no readily recognizable pattern of change. In general, the right hippocampus showed the same random distribution of isolated bins that were significantly affected by drug treatments. A single exception to this rule was observed in the right hippocampus during waking periods, when the relative power of frequency bins between 23 and 30 Hz were significantly and systematically increased after the highest 8-OH-DPAT dose. Additionally, even though the spectral wavelet analysis had being able to show NREM and REM sleep episodes, our study revealed unihemispheric SWS (USWS) episodes. After 5-HT or 8-OH-DPAT treatment or during night-period recordings and rarely during afternoon-period control recordings short USWS episodes were founded. As the 5-HT or 8-

OH-DPAT treated animals as night-period recording animals showed an advancement of this asymmetric sleep phenomenon, followed by an increase of the total unihemispheric duration and a decrease of the mean duration of these episodes (except on the 8-OH-DPAT major group animals) related to the control animals recording during the afternoon period. These data may indicate that although circuits mediated by 5-HT receptors have an important role on the control of sleep-waking states, their actions on these states can differ profoundly between birds, and between them and mammals. Our data may suggest that the early and intense hypnogenic response to 5-HT or 8-OH-DPAT may be mediated by 5-HT receptors located at sites far from those reached by i.c.v. or pontomesencephalic injections, possibly at caudal brainstem levels or at peripherally located receptors. In summary, the present results indicated that 5-HT-mediated serotonergic mechanisms play a crucial role in mechanisms controlling sleep-waking states in both mammalian and avian species, their actions upon these states, and their localization in the brain and the role of the 5-HT receptor in these phenomena may present substantial inter-specific variance.

Keywords: Sleep, Serotonine, 5-HT_{1A} receptor, Hippocampus, Avian, EEG

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Animais	29
2.2 Drogas e grupos experimentais	29
2.3 Confeção e implantação de eletrodos	30
2.4 Ambiente e protocolo de registro	32
2.5 Análise comportamental	33
2.6 Análise eletrográfica	34
2.7 Verificação histológica da localização dos eletrodos hipocampais	35
3 RESULTADOS	37
3.1 Análise comportamental após administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT	37
3.2 Caracterização eletrográfica dos estados de sono e vigília	40
3.3 Efeitos da administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT sobre os estados eletrográficos de vigília e sono	44
3.4 Análise espectral relativa dos traçados eletrográficos hipocampais sobre os estados de vigília e sono	49

3.5 Análise espectral relativa dos traçados eletrográficos hipocampais sobre os estados de vigília e sono após administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT	52
3.6 Evidências de sono de ondas lentas unihemisférico	55
4 DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE A: RESUMO PUBLICADO EM CONGRESSO	80
APÊNDICE B: ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ambiente experimental (interior da gaiola de Faraday) durante o registro eletrográfico 33
- Figura 2: Fotomicrografia de um corte frontal da região caudal telencefálica do pombo, evidenciando a localização dos eletrodos implantados bilateralmente no hipocampo 36
- Figura 3: Latência para o primeiro episódio de vigília relaxada (VR) e do comportamento similar ao sono (SLB) e duração total de vigília atenta, vigília relaxada e comportamento similar ao sono 1 hora após a administração de 5-HT ou 8-OH-DPAT 39
- Figura 4: Traçados da atividade eletrográfica bilateral do hipocampo (esquerdo: Hp-E; direito: Hp-D), eletrooculograma (EOG) e atividade muscular da região dorsal do pescoço (EMG) durante os estados de vigília (W), sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono de movimento rápido dos olhos (REMS) no pombo 41
- Figura 5: Traçado eletrográfico bilateral da região hipocampal evidenciando um episódio de sonolência (DRW) durante o comportamento de vigília imóvel com a correspondente análise de *wavelet* (abaixo) de ambos os hemisférios 42
- Figura 6: Traçado eletrográfico bilateral da região hipocampal evidenciando um episódio de sono REM (REMS) durante um estado de sono profundo (SWS) com a correspondente análise de *wavelet* (abaixo) de ambos os hemisférios 43
- Figura 7: Latência para o primeiro episódio de sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono REM (REMS) e duração acumulada dos episódios de vigília, sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono REM (REMS) (em períodos de 10 minutos) após administração sistêmica de 5-HT (1 ou 2 mg/kg) ou veículo 45
- Figura 8: Hipnograma de um único animal após administração sistêmica de 5-HT (1 e 2 mg/kg) e de veículo, demonstrando a distribuição, incidência, duração e latência para o primeiro episódio dos estados eletrográficos de vigília (W), sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono REM (REMS) 46
- Figura 9: Latência para o primeiro episódio e duração acumulada de episódios de vigília, sonolência (DRW) e sono de ondas lentas (SWS) (em períodos de 10 minutos) após administração sistêmica de 8-OH-DPAT (0,6 ou 2,0 mg/kg) ou veículo 47

- Figura 10: Hipnograma de um único animal após administração sistêmica de 8-OH-DPAT (0,6 e 2 mg/kg) e de veículo, demonstrando a distribuição, incidência, duração e latência para o primeiro episódio dos estados eletrográficos de vigília (W), sonolência (DRW) e sono de ondas lentas (SWS) 48
- Figura 11: Análise espectral da atividade eletrográfica hipocampal bilateral (hipocampos direito e esquerdo) sobre os diferentes estados de sono e vigília (W, DRW, SWS e REMS) identificados nos animais controle 50
- Figura 12: Comparação entre os hipocampos direito e esquerdo através da análise espectral durante os estados de sono e vigília (W, DRW, SWS e REMS) identificados nos animais controle 51
- Figura 13: FFT (média das potências relativas \pm E.P.M.) do EEG hipocampal bilateral de 0 a 30 Hz, em frequências de 1 em 1 Hz, dos diferentes estados eletrográficos identificados após tratamento com 5-HT (1 e 2 mg/kg) e veículo 53
- Figura 14: FFT (média das potências relativas \pm E.P.M.) do EEG hipocampal bilateral de 0 a 30 Hz, em frequências de 1 em 1 Hz, dos diferentes estados eletrográficos identificados após tratamento com 8-OH-DPAT (0,6 e 2 mg/kg) e veículo 55
- Figura 15: Latência para o primeiro episódio de sono de ondas lentas unihemisférico (USWS) após tratamento sistêmico com veículo, durante o período vespertino (0 Di), e durante o período noturno (0 No) sem injeção do veículo, e após injeção das drogas (5-HT nas doses de 1 e 2 mg/kg e 8-OH-DPAT nas doses de 0,6 e 2 mg/kg) 57
- Figura 16: Traçado eletrográfico hipocampal bilateral evidenciando um episódio de sono de ondas lentas unihemisférico (USWS) e os dados respectivos da análise de *wavelet* 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Catálogo de Eventos Comportamentais	34
Tabela 2:	Duração e latência para o primeiro episódio de vigília atenta e relaxada, comportamento similar ao sono, comer, beber, auto-limpeza e locomoção após administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT	38
Tabela 3:	Duração média dos episódios de USWS e duração total desses episódios após 1 hora da administração sistêmica da droga/veículo	56

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidróxiindoleacético
5-HT	5-hidróxitriptamina
5-HTP	5-hidróxitriptofano
8-OH-DPAT	8-hidróxi-2(di-n-propilamino)tetralina
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
DRW	Sonolência
EEG	Eletroencefalograma
EEGgráficos	Registros eletroencefalográficos
EMG	Eletromiograma
EOG	Eletrooculograma
FFT	Transformada rápida de Fourier
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Hp	Hipocampo
Hp-D	Hipocampo direito
Hp-E	Hipocampo esquerdo
i.c.v.	Injeção intracerebroventricular
i.m.	Injeção intramuscular
i.p.	Injeção intraperitoneal
ISRS	Drogas inibidoras seletivas da recaptção de serotonina
i.t.	Injeção intratecal
i.v.	Injeção intravenosa
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NREM	Sono não REM

REMS	Sono REM
s.c.	Injeção subcutânea
SERT	Transportador específico de serotonina
SLB	Comportamento similar ao sono
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sono paradoxal
STFT	Transformada de Fourier de curto período
SWA	Atividade de ondas lentas
SWS	Sono de ondas lentas
USWS	Sono de ondas lentas unihemisférico
W	Vigília
VA	Vigília atenta
VR	Vigília relaxada

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre o sono e seus distúrbios aumentou rapidamente após a metade do século passado, conduzido pela descoberta de que este estado não corresponde ao simples conceito de ausência passiva da vigília. O sono pode ser definido como um estado de imobilidade com grande redução da responsividade, que pode ser distinguido do coma ou anestesia pela sua rápida reversibilidade (Siegel, 2005). A identificação do sono é feita pela manutenção de um estado quiescente em uma postura espécie-específica acompanhada por uma resposta reduzida a estímulos externos. Um critério de fundamental importância para sua caracterização é a averiguação de alterações da atividade elétrica encefálica, captada pelo eletroencefalograma (EEG). Com mínimas exceções, alterações do EEG confirmam mudanças exatas relacionadas ao binômio vigília-sono (Zepelin *et al.*, 2005).

O sono apresenta fases distintas que incluem: o sono REM (do inglês *rapid eyes movement* – movimento rápido dos olhos, também denominado sono paradoxal – SP – ou dessincronizado) e não REM (NREM). Em humanos, esses estados de sono alternam-se durante a noite em um ciclo de 90 minutos. Em primatas, aves e felinos, normalmente o sono NREM é dividido em sub-estágios (de 1 à 4), correspondentes ao aumento da profundidade do sono. Os estágios NREM mais profundos, estágios 3 e 4, são coletivamente referidos como sono de ondas lentas (SWS), baseado na prevalência de oscilações corticais de baixa frequência no EEG. Alterações drásticas na eletrofisiologia encefálica, neuroquímica e da anatomia funcional acompanham estes estágios de sono, tornando-os biologicamente distintos do encéfalo em vigília (Walker e Berger, 1972; Van Twyver e Allison, 1972; Hobson e Pace-Schott, 2002; Walker e Stickgold, 2006).

Apesar de animais de diferentes espécies apresentarem maior ou menor desenvolvimento comportamental de sono, apenas mamíferos e aves apresentam

características poligráficas capazes de definir o SWS e o SP (Nicolau *et al.*, 2000; Rattenborg, 2006, Rattenborg *et al.*, 2008). Durante estudos em pombos, Van Twyver e Allison (1972) e Berger e Phillips (1994) incluíram a categoria “sonolência” nas suas análises, enquanto outros autores adicionaram esta categoria ao SWS durante a caracterização eletrográfica do sono nesses animais (Tobler e Borbély, 1988; Fuchs *et al.*, 2006; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Em pombos, durante o registro eletrográfico de 24 horas, a incidência de episódios de sono é muito maior à noite (411,7 episódios) em relação ao período diurno (19,7 episódios). As aves gastam 41,9% das 24h de registro dormindo (em SWS) e, ao contrário de roedores, são animais diurnos que dormem extensivamente durante o ciclo escuro. A duração média dos episódios de sono de ondas lentas é de 7,03 minutos (conforme Van Twyver e Allison, 1972), ocorrendo durante 92,7% do tempo total de sono. O sono REM ocorre em uma média de 216 vezes em um período de 24 horas com uma duração média desses episódios de 11 segundos, constituindo 7,3% do tempo total de sono (Walker e Berger, 1972).

Embora a aparente ausência de atividade de ondas lentas (SWA, entre 0 e 4 Hz) no córtex dorsal de répteis apóie a origem independente da SWA em mamíferos e aves, algum grau de homologia pode haver entre o sono de répteis e o SWS de mamíferos. Especificamente, durante o registro eletrográfico do sono de répteis, observam-se espículas hipocampais similares àquelas observadas durante o SWS de mamíferos (Rattenborg, 2006), havendo também semelhança no aumento de espículas hipocampais após privação de sono em ambas as espécies (Hartse, 1994), sugerindo a existência de um correlato eletrofisiológico do SWS e aparente regulação homeostática entre esses animais. Estes dados indicam que o córtex dorsal de répteis pode exibir atividade neuronal similar (oscilação lenta) àquela responsável por gerar a SWA em mamíferos (Steriade, 2006).

Uma das estruturas mais importantes do encéfalo relacionada à regulação do sono é o hipotálamo. Certos grupos de neurônios hipotalâmicos, assim como grupos de neurônios

adjacentes do prosencéfalo, sintetizam o neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso. Os neurônios GABAérgicos são capazes de inibir diferentes grupos celulares envolvidos na vigília, diminuindo a frequência de disparos de neurônios que contém neurotransmissores como a histamina, noradrenalina e/ou glutamato, induzindo conseqüentemente o sono. Neurônios serotoninérgicos também ficam inativos durante o sono, possuindo um papel importante na manutenção da vigília (estado onde há maior frequência de disparos destas células) e na regulação de alguns eventos fásicos do sono REM (Sharpley *et al.*, 1994; Bjorvatn *et al.*, 1997; Garcia-Rill *et al.*, 2003; Siegel, 2004).

Os primeiros estudos sobre serotonina (5-hidróxitriptamina - 5-HT) a relacionaram inicialmente ao aumento do tônus vascular em virtude de sua presença no soro (daí o nome serotonina) (Rapport *et al.*, 1948). A 5-HT é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, elemento essencial na dieta, presente em grãos, carnes e laticínios, e que é captado para os neurônios por um transportador da membrana plasmática e convertido em um intermediário denominado 5-hidróxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano-5-hidroxilase, sendo então convertido em 5-HT pela enzima 5-HTP descarboxilase. O armazenamento de 5-HT nas vesículas sinápticas é realizado pelo transportador vesicular VMAT que também é responsável por carregar outras monoaminas nas vesículas sinápticas. Os efeitos sinápticos do neurotransmissor são finalizados pelo seu transporte de volta aos terminais nervosos através de um transportador específico de serotonina (SERT).

Alterações dos níveis serotoninérgicos na fenda sináptica estão intimamente relacionadas a transtornos de humor, havendo o uso clínico de várias drogas antidepressivas que são inibidoras seletivas da recaptação de serotonina (ISRSs) (Nemeroff e Owens, 2002). Estudos mais recentes sobre a 5-HT a tem relacionado com a regulação cardiovascular, respiração e termoregulação, e uma variedade de funções comportamentais ligadas ao ritmo

circadiano, ciclo vigília-sono, apetite, agressividade, comportamento sexual, sensação de dor e aprendizado. A regulação farmacológica da função serotoninérgica apresenta influências sobre inúmeros distúrbios psiquiátricos, incluindo depressão, distúrbios de ansiedade, esquizofrenia e anorexia nervosa, além de também estar relacionada ao déficit de atenção, atividade compulsiva, abuso de substâncias e até doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Lucki, 1998).

No sistema nervoso central (SNC), os neurônios serotoninérgicos estão agrupados nos núcleos da rafe, localizados medialmente no tronco encefálico, projetando-se para diferentes regiões do encéfalo, sendo que os mais caudais, no bulbo, inervam a medula espinhal, enquanto os mais rostrais, na ponte e mesencéfalo, inervam a maior parte do encéfalo.

Além de receber densas projeções serotoninérgicas, o hipocampo (tanto de aves quanto de mamíferos) possui um papel similar nessas espécies, inclusive no envolvimento da aquisição de informações espaciais. Durante experimentos de memória navegacional tanto os pombos que sofreram lesão do hipocampo direito quanto os pombos controle apresentaram boa orientação para voltar para suas gaiolas quando soltos em locais distantes e não familiares, indicando um bom aprendizado do mapa navegacional. Em contraste, pombos que tiveram o hipocampo esquerdo ablado mostraram certo prejuízo na orientação de volta para casa, indicando uma falha no aprendizado do mapa navegacional. De forma interessante, tanto os pombos com lesão no hipocampo direito quanto no esquerdo demonstraram algum prejuízo no desempenho em relação aos animais controle, sugerindo que aspectos diferentes da navegação de pombos domésticos podem ser lateralizados para diferentes hemisférios. A partir deste estudo, o hipocampo esquerdo pareceu crucial para o aprendizado do mapa navegacional determinando a direção aproximada da suas casas a partir de locais distantes e não familiares, enquanto o hipocampo direito (e possivelmente o esquerdo também) parece ter

um importante papel na navegação local próxima a casa, sendo baseado em pistas familiares (Gagliardo *et al.*, 2001; Gagliardo *et al.*, 2002).

Discrepâncias da atividade neural entre hemisférios não parecem estar limitadas unicamente ao aprendizado navegacional. Na maioria dos mamíferos o estado de sono ocorre de forma bilateral, ou seja, as características do EEG são similares e ocorrem simultaneamente em ambos os hemisférios. Entretanto, episódios de atividade unihemisférica podem ser observados em mamíferos aquáticos (Lyamin *et al.*, 2008a; Lyamin *et al.*, 2008b), permitindo a esses animais emergir à superfície para respirar, e também amplamente encontrado em aves (Szymczak *et al.*, 1996; Rattenborg *et al.*, 2000; Rattenborg *et al.*, 2001; Ayala-Guerrero *et al.*, 2003) onde provavelmente possui a função de detectar prováveis predadores que permeiam o ambiente. Durante o sono, enquanto um olho está fechado o hemisfério contralateral permanece “acordado/ativo”, havendo a situação oposta em relação ao outro olho e hemisfério contralateral, caracterizando assim o sono unihemisférico.

Szymczak e colaboradores (1996) relatam ter encontrado claramente episódios de sono unihemisférico no ectoestriado (região lateral do telencéfalo relacionada ao sistema visual de aves) em *blackbirds*, observando que os episódios de USWS ocorrem principalmente quando os pássaros adotam uma postura de sono frontal (pescoço retraído com a cabeça repousando sobre o peito), provavelmente porque esta postura facilita a observação do meio que o cerca, sugerindo que o sono unihemisférico nessas aves está relacionado à ativação sensorial unilateral do sistema visual. Embora não tenham conseguido identificar estados de sono durante registros EEGgráficos diurnos, observaram episódios eletrográficos de USWS em todas as aves estudadas durante o ciclo escuro. Os autores relatam um padrão eletrográfico semelhante ao estado de SWS em um hemisfério enquanto o hemisfério contralateral demonstra características típicas de vigília.

Devido a grande diversidade de receptores serotoninérgicos, a 5-HT acaba vinculando-se a processos relevantes tanto para o controle da vigília como do sono, dependendo apenas da localização desses receptores no encéfalo e do tipo de receptor ativado. Os receptores serotoninérgicos são classificados em 7 classes, designados entre 5-HT₁₋₇. As classes 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₅ apresentam cinco (5-HT_{1A-B-D-E-F}), três (5-HT_{2A-B-C}) e dois (5-HT_{3A-B} e 5-HT_{5A-B}) subtipos, enquanto as classes 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ tem até o momento um subtipo cada. Exceto o receptor 5-HT₃, todos os outros receptores serotoninérgicos são estruturalmente relacionados à superfamília dos receptores acoplados a proteína G (Julius, 1991; Hoyer et al., 1994; Lucki, 1998; Siegel, 2004; Green, 2006; Monti e Jantos, 2009).

Os efeitos comportamentais relacionados ao sono após administração de serotonina começaram a ser notados no final da década de 50. Bradley (citado por Koella e Czicman, 1966) administrou baixas doses de 5-HT no ventrículo lateral de gatos e observou, após um período inicial de vigília, sinais de sonolência e sono. Efeitos similares foram observados após injeção intravenosa (i.v.) de 5-HT (5-30 µg/kg) em gatos curarizados, um período inicial de vigília seguido por um estado de sono profundo (Koella e Czicman, 1966).

Grande parte dos trabalhos que vinculam o papel da serotonina à modulação dos estados de vigília e sono tem focado a participação de receptores do tipo 5-HT_{1A} e 5-HT₂ (Bjorvatn e Ursin, 1998). Em roedores e humanos, antagonistas para o receptor 5-HT₂ como a ritanserina, promovem intenso aumento do SWS, mediados por receptores 5-HT_{2A} e/ou 5-HT_{2C}. Em contraste, o uso do antagonista para receptor 5-HT_{2B}, SB-215505, promove um aumento da atividade motora e vigília e diminui a atividade teta (entre 4-5 Hz) durante a vigília e SP em ratos. Tal efeito sugere que a ativação de receptores 5-HT_{2B} pode contribuir para o início do sono e geração da atividade teta durante a vigília e SP (Kantor *et al.*, 2004). Estudos em camundongos *knock-out* para o receptor 5-HT_{2C} evidenciam um maior tempo de

vigília, anormalidades na expressão do sono REM e uma série de alterações homeostáticas após a privação de sono em relação aos camundongos selvagens (Frank *et al.*, 2002).

Os receptores 5-HT_{1A} estão localizados no soma e nos dendritos (autoreceptor somatodendrítico) de neurônios serotoninérgicos e em locais pós-sinápticos, estando relacionado a uma variedade de comportamentos neurofisiológicos como humor, cognição, comportamento sexual, estados de sono e vigília e alimentação. O receptor 5-HT_{1A} é acoplado à adenilato ciclase, sendo que a sua ativação inibe a enzima. A estimulação do receptor 5-HT_{1A} somatodendrítico inibe a taxa de disparo dos neurônios serotoninérgicos, enquanto a ativação do receptor pós sináptico induz respostas inibitórias nas estruturas que recebem aferências serotoninérgicas (Tredici *et al.*, 2004; English e Wilding, 2006; Green, 2006). Entre as áreas do encéfalo ricas em receptores 5-HT_{1A} pode-se incluir o córtex cerebral, núcleo septal, o hipotálamo, algumas estruturas amigdalóides, núcleo da rafe (particularmente o núcleo dorsal da rafe) e o hipocampo (Luebke *et al.*, 1992; Monti e Jantos, 2009).

As administrações sistêmica (subcutânea, s.c., 0,010 e 0,375 mg/kg) e central (núcleo dorsal da rafe, NDR, 10 µM) de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT_{1A}, promoveram efeitos paradoxais sobre o estado hipnótico de ratos. A administração sistêmica de maior dose de 8-OH-DPAT foi capaz de aumentar consideravelmente a vigília e reduzir o SWS e SP, sugerindo uma possível ativação de receptores 5-HT pós-sinápticos. A perfusão do agonista serotoninérgico no NDR produziu um aumento do sono REM quatro vezes maior em relação aos animais controle, sugerindo uma possível desinibição colinérgica de neurônios pontinos na produção do sono REM devido à estimulação de autoreceptores 5-HT_{1A}, gerando um aumento do sono REM. Outros estados do sono não foram alterados após administração central de 8-OH-DPAT (Bjorvatn *et al.*, 1997). Estes resultados entram em conflito com os dados de Monti e Jantos (1992), que não notaram alterações relevantes no SP, encontrando

um aumento no SWS e redução da vigília após administração de 8-OH-DPAT no NDR (doses entre 6-24 mM).

Bjorvatn e colaboradores (1997) ainda relatam que a administração intratecal (i.t.) de um agonista seletivo 5-HT_{1A} é capaz de aumentar a duração de SWS enquanto a vigília é reduzida, presumidamente por estimular receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos em aferentes primários da medula espinhal. Microinjeções de 5-HT na região dos neurônios basais colinérgicos produzem um aumento na atividade de ondas lentas, provavelmente por estimular receptores 5-HT_{1A}. A injeção direta de um agonista seletivo 5-HT_{1A} no núcleo tegmental pedunculopontino reduz o sono REM. Esses dados sugerem que a ativação de receptores 5-HT_{1A} pode aumentar a vigília, aumentar o SWS ou aumentar o sono REM dependendo da localização destes receptores no SNC. Doses moderadas e altas de 8-OH-DPAT (0,1-2,0 mg/kg) administradas via s.c. em ratos aumentam a vigília e reduzem o SWS e sono REM (Dzolic *et al.*, 1992; Monti e Jantos, 1992).

Estudos em nosso laboratório têm examinado sistematicamente o papel de circuitos serotoninérgicos sobre o sono e ingestão de alimentos em pombos domésticos. Experimentos relacionados à administração intracerebroventricular (i.c.v.) de 5-HT revelaram que o volume total de água ingerida após 1 hora de registro equivale à cerca de 10% do peso corporal dos animais estudados (Steffens *et al.*, 1997). Em contrapartida, a injeção i.c.v. de 8-OH-DPAT não reproduziu totalmente este efeito dipsogênico indicando que outros subtipos de receptores para 5-HT devem estar envolvidos na intensa ingestão hídrica induzida pela 5-HT (Sell *et al.*, 2000; Brun *et al.*, 2001). A análise deste efeito em pombos saciados e privados de alimento por 24 horas – associada à redução da atividade de neurônios serotoninérgicos provocada por injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT em pombos (Gleeson *et al.*, 1992) – sugere que um controle serotoninérgico inibitório e tônico deve fazer parte dos mecanismos centrais de

controle do comportamento de beber em pombos saciados, semelhante ao observado em mamíferos (Da Silva *et al.*, 2004).

Estudos relacionados à administração i.c.v. de 8-OH-DPAT em pombos realimentados após jejum de 24 horas revelaram um aumento na duração do comportamento de comer sem alterar a quantidade de alimento ingerido (Steffens *et al.*, 1997), enquanto não foram observadas alterações na ingestão de alimento e em comportamentos não-ingestivos em animais saciados (Da Silva *et al.*, 2004). Embora as injeções de 8-OH-DPAT na linha média da rafe tenham desencadeado aumentos significantes tanto na ingestão de alimento quanto na ingestão de água de pombos, os efeitos dipsogênicos foram mais intensos e consistentes que os efeitos hiperfágicos (Häckl *et al.*, 2005). Injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT (0,06, 0,2, 0,6 e 2 mg/kg) sobre os comportamentos de ingestão hídrica e alimentar em pombos domésticos administradas durante o período matutino (10 – 13 h), caracterizado por pequena e estável ingestão de alimentos, e no período vespertino, (14-17 h) caracterizado por alta atividade ingestiva, resultaram um efeito hipofágico, além de promoverem aumento da duração e diminuição da latência para o primeiro episódio do comportamento de sono (Santos *et al.*, 2005).

O efeito hipnogênico causado por injeções i.c.v. de 8-OH-DPAT revela um importante envolvimento dos mecanismos do receptor 5-HT_{1A} no controle do comportamento de sono induzido pela 5-HT em pombos (Steffens *et al.*, 2001). Adicionalmente, a administração intramuscular (i.m.) de zimelidina (7,5 mg/kg), um ISRS, é capaz de diminuir até 30% do sono REM de aves durante registros noturnos em comparação a ratos tratados com a mesma droga (5 mg/kg), corroborando o conceito de que mecanismos neurais similares devem participar da geração deste estado de sono (Fuchs *et al.*, 2006).

Os estudos EEGráficos realizados em aves são menos numerosos e menos detalhados quando comparados aos estudos realizados em mamíferos. Os relatos dos padrões EEGráficos

associados aos estados comportamentais mostram que estes traçados apresentam certa constância. Os comportamentos típicos da vigília e atividade motora apresentam um EEG de ondas de baixa amplitude e alta frequência (dessincronizado), caracterizando a vigília atenta (VA). Na sonolência (ou vigília relaxada - VR), a atividade dessincronizada do EEG, típica da vigília, é gradativamente substituída por uma atividade de ondas sincronizadas com menor frequência e maior amplitude; a continuidade desta atividade elétrica encefálica lenta, com grande amplitude associada a uma postura típica de sono e menor atividade motora, distingue o SWS. Esta atividade elétrica lenta, característica de sono, é intercalada por breves períodos de atividade de alta frequência e baixa amplitude, semelhante à vigília, mas ainda associada à postura de sono, e com hipotonia muscular episódica, próprias do sono REM (Walker e Berger, 1972; Ayala-Guerrero, 1989; Bruno-Neto *et al.*, 1996). Por critérios comportamentais e EEGráficos, tais estados são similares, respectivamente, ao SWS e SP de mamíferos (Van Twyver e Allison, 1972; Campbell e Tobler, 1984).

A administração intraperitoneal (i.p.) de bloqueadores muscarínicos (escopolamina e metilbrometo de escopolamina), de um antagonista nicotínico (mecamilamina) e um anticolinesterásico (eserina) revelaram uma participação colinérgica tônica e discreta na regulação do EEG hipocampal de pombos domésticos, não sendo possível observar uma atividade rítmica comparável ao teta hipocampal de mamíferos (André, 1997).

Estudos eletrográficos sobre a participação do sistema serotoninérgico na regulação do sono e vigília em aves são escassos, sendo muitas vezes realizados em animais silvestres ou em aves de corte que tendem a apresentar respostas variadas devido ao processo prévio de seleção genética. De forma adicional, informações sobre a atividade hipocampal em consonância a dados comportamentais podem contribuir para elucidar os aspectos fundamentais ou espécie-específicos dos sistemas de regulação dos estados de sono e vigília em vertebrados. A partir do exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a

participação dos mecanismos serotoninérgicos sobre a regulação dos estados de sono e vigília em pombos (*Columba livia*) por meio da: 1) caracterização comportamental e eletrográfica hipocampal dos estados de sono e vigília após administração sistêmica (i.m.) de 5-HT ou 8-OH-DPAT (agonista seletivo 5-HT_{1A}); e 2) quantificar os efeitos da administração de 5-HT ou 8-OH-DPAT sobre a atividade eletrográfica hipocampal dos diferentes estados identificados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 19 pombos domésticos (*Columba livia*) adultos de ambos os sexos, pesando aproximadamente 350 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada do Instituto de Engenharia Biomédica (IEB/CTC – UFSC), acondicionados em gaiolas individuais, mantidos em períodos claro-escuro de 12 horas (7h-19h, claro sob luz artificial), à temperatura ambiente de aproximadamente 22° C, recebendo ração (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda, Itajaí, SC) e água *ad libitum*. Ressalta-se que todos os experimentos foram executados conforme as normas postuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

2.2 DROGAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

- Serotonina (5-HT, Sigma). Administrada via i.m. no músculo peitoral nas doses de 1 e 2 mg/kg, dissolvida em solução de ácido ascórbico 1% em água destilada (utilizada nos experimentos com o grupo controle). Estas doses foram derivadas de experimentos prévios realizados em ratos por Kikta e colaboradores (1983) e codornas por Polo e colaboradores (2007).
- 8-hidróxi-2(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, RBI/Sigma). Injetado sistemicamente via i.m. no músculo peitoral, nas doses 0,6 e 2 mg/kg, dissolvidas em solução

de ácido ascórbico 1% em água destilada (também utilizado como solução para o grupo controle). Estas doses foram derivadas de experimentos realizados em pombos por Barrett e colaboradores (1994) e Santos e colaboradores (2005).

A administração das drogas/veículos nas diferentes doses foi distribuída de acordo com um esquema amostral de quadrado latino específico para cada grupo, respeitando um intervalo mínimo de sete dias. Cada grupo experimental foi preenchido com uma amostra de 6 animais. Ao longo dos experimentos alguns animais foram eliminados devido a problemas decorrentes da implantação errônea dos eletrodos ou curto-circuito dos eletrodos soldados ao soquete de registro.

2.3 CONFECÇÃO E IMPLANTAÇÃO DE ELETRODOS

Os eletrodos bipolares para o registro do EEG foram confeccionados com fios NiCr (California Fine Wire, Grover Beach, CA) de aproximadamente 150 μm de diâmetro, isolados com verniz (*H-poly red*). Esses fios foram segmentados em 25 mm, posicionados paralelamente, sofrendo então a remoção do verniz na parte distal de cada fio em cerca de 2,5 mm. Em seguida acoplou-se um segmento de borracha (aproximadamente 3 mm) na região distal, sendo as mesmas extremidades dobradas em “T” e as extremidades proximais, que também sofreram a retirada do verniz, soldadas à dois pinos de uma barra de pinos fêmea. Outros dois pinos deste soquete foram destinados a outro eletrodo de registro hipocampal contralateral, sendo o 5º pino destinado à referência de todos os outros eletrodos, soldado a um parafuso pré-implantado na região frontal do crânio da ave. Os eletrodos foram implantados na superfície do hipocampo direito e esquerdo (Hp-D, A = 4.0mm; L = +1.5mm; Hp-E, A = 4.0mm; L = - 1.5mm a partir da linha intereural, conforme coordenadas

estereotáticas do atlas para pombos de Karten e Hodos (1967). Os eletrodos bipolares para registro eletromiográfico (EMG) do músculo trapézio foram confeccionados a partir do fio envernizado pré-citado. Dois fios com as extremidades livres foram soldados a dois pinos de um soquete, sendo as outras duas extremidade transpassadas no ventre muscular através de uma agulha-guia, retirando-se o verniz no segmento do fio que foi alocado no interior do ventre. O eletrooculograma (EOG), que detectou a movimentação do campo elétrico existente entre a retina e a córnea resultante da atividade sináptica retiniana, que torna a retina negativa em relação à córnea (Andersen *et al.*, 2001), foi registrado através de eletrodos confeccionados pelo mesmo fio, soldando duas extremidades a dois soquetes e implantando as extremidades no canto anterior e posterior do olho direito da ave.

Para a implantação dos eletrodos os animais foram anestesiados com Xilazina (0,05 ml/100g) e Cetamina (0,15 ml/100g), por via intraperitoneal, em dose única. Quando necessário, devido ao longo período do procedimento cirúrgico, foi efetuada suplementação anestésica. Os pombos foram fixados a um aparelho estereotático (Kopf Instruments, Inc.) adaptado para aves. Após constatação da profundidade anestésica, mediante observação de hipotonia da musculatura cervical e ausência do reflexo de retirada da pata, realizou-se uma incisão longitudinal sobre a pele da cabeça expondo a calota craniana e a musculatura do pescoço inserida na região occipital. O periósteo foi removido para futuramente permitir melhor aderência do acrílico ao soquete. Em seguida, foram realizados orifícios com cerca de 3 mm de diâmetro na calota craniana do pombo, nos pontos previamente marcados correspondentes à região hipocampal, com uso de uma broca de uso odontológico movida por uma ferramenta rotativa (MultiPro 395JU Dremel®). Outros dois orifícios foram feitos para implantação de parafusos destinados a fixar o soquete à calota craniana através do acrílico e, um especificamente destinado a servir como referência (indiferente) dos demais eletrodos. O conjunto formado pelos eletrodos soldados ao conector e os parafusos, foram fixados ao

crânio do animal com acrílico autopolimerizante (líquido + resina, Jet Clássico) seguido da sutura da pele em torno do mesmo.

2.4 AMBIENTE E PROTOCOLO DE REGISTRO

Os registros eletrofisiológicos foram realizados em uma gaiola de Faraday (1,0 x 0,6 x 0,7 m) dividida internamente por uma placa de acrílico, sendo um lado destinado ao alojamento do equipamento de aquisição de sinais e o outro lado destinado a locação da gaiola que comportará o animal (similar às utilizadas no biotério setorial do laboratório, ver figura 1). Nesta gaiola foram realizados os registros eletrográficos e comportamentais, havendo ração e água *ad libitum* durante os experimentos. A gaiola de Faraday era iluminada com cinco lâmpadas, sendo três *Eveready Energizer* PR2 2,4 V e 2 PR3 3,6 V, totalizando 4,7 W, ligadas à rede através de uma fonte de tensão contínua de 12 V, havendo dois *coolers* que realizam a exaustão e o influxo de ar, além de possuir uma *webcam* interna (*orbit* Logitech Quickcam®), conectada via USB a um microcomputador externo (Pentium® 4 2.26 GHz, 480 MB RAM) que possibilita o monitoramento dos animais simultaneamente ao registro eletrográfico. Ressalta-se que os *coolers* também geram um ruído branco que foi utilizado para mascaramento de possíveis interferências sonoras (aproximadamente 35 dB). O sistema utilizado para a aquisição dos sinais eletrofisiológicos é constituído de pré-amplificadores específicos correspondentes a canais distintos, da marca BIOPAC – MP100 (BIOPAC Systems WSW, Inc) acoplado a uma interface conversora digital ligada a um microcomputador (Pentium® 90 MHz 32MB RAM) que, através do programa ACQ-Knowledge (v.3.2) arquivou os sinais adquiridos em disco rígido.

Decorridos 5 dias do ato cirúrgico, os animais foram submetidos à habituação no ambiente de registro (gaiola de Faraday), assim como, adaptação do cabo conectado ao

soquete. Os animais foram alocados diariamente à gaiola durante 3 horas, tendo livre acesso à água e ração. Os registros experimentais começaram a partir do 12º dia pós-operatório. Antes de iniciar a aquisição dos sinais, os animais permaneceram em ambientação durante 2 horas, já com o cabo conectado ao seu soquete. Com o término da ambientação a droga/veículo foi administrada, sendo iniciado imediatamente após, o registro experimental (eletrográfico e comportamental) durante 1 hora. Ressalta-se que o interior da gaiola de Faraday possuía condições similares às existentes no biotério setorial e que, concomitante ao registro eletrográfico e actigráfico, foi realizado o registro digital através da webcam instalada no interior da gaiola de Faraday que forneceu subsídios para análise comportamental.



Figura 1: Ambiente experimental (interior da gaiola de Faraday) durante o registro eletrográfico.

2.5 ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os comportamentos demonstrados pelo animal durante os registros foram quantificados de acordo com critérios pré-estabelecidos em nosso laboratório (ver tabela 1). Estes registros foram realizados simultaneamente à aquisição eletrográfica, permitindo a

análise dos dados comportamentais relacionadas aos estados eletrográficos na mesma seqüência temporal.

Os dados de duração total e latência dos diferentes comportamentos após 1 hora de registro foram analisados estatisticamente por intermédio de análise de variância (ANOVA de uma via), seguidas pelo teste (post hoc) de Duncan. O nível de significância adotado nesses procedimentos foi $p < 0,05$.

Tabela 1: Catálogo de Eventos Comportamentais

EVENTOS COMPORTAMENTAIS	DESCRIÇÃO
Vigília Atenta	Pombo imóvel com a cabeça elevada, olhos abertos e fixos, com movimentos de piscar rápidos, podendo estar associado a movimentos da cabeça
Vigília Relaxada	Pombo imóvel, com piscadas lentas, podendo estar associado a movimentos suaves e discretos da cabeça
Locomoção	Qualquer deslocamento do pombo dentro da gaiola, ou alternância de sustentação do corpo pelas pernas
Auto-Limpeza	Comportamento de esfregar o bico (ou bicar) nas penas de qualquer parte do corpo
Ingestão de Alimentos (comer e beber)	Comportamentos de deglutição quando o pombo está ingerindo alimento sólido ou água
Comportamento Similar ao Sono (SLB)	Animal imóvel com um ou dois olhos fechados, cabeça fletida e apoiada sobre o peito, retração do pescoço, penas eriçadas, eventualmente apoiado apenas em uma das pernas sobre o piso da gaiola ou no poleiro. Ocasionalmente pode adotar uma postura sentada

2.6 ANÁLISE ELETROGRÁFICA

A análise dos dados eletrográficos obtidos foi configurada em três módulos distintos:

1) análise qualitativa; consistiu na inspeção visual dos registros obtidos, averiguando períodos isentos de artefatos e sem flutuação de linha de base, além da quantificação da duração e latência dos diferentes eventos eletrográficos. Eventuais períodos alterados de comportamento ou demonstração de dissociação entre comportamento e eletrograma e/ou actigrama também foram colhidos para análise, objetivando identificar a presença de sono unihemisférico nos traçados. 2) análise quantitativa; consistiu na análise espectral (análise de potência) pela

transformada rápida de Fourier (FFT - *fast Fourier transform*), de 4 amostras de 2 segundos pré-selecionadas para cada estado, de cada animal, além da análise espectral *wavelet* de Morlet, um método desenvolvido para análise de sinais não-estacionários com componentes dinâmicos e uma variedade de frequências, permitindo o estudo de domínios de tempo e frequência (Rossetti *et al.*, 2006; Romcy-Pereira *et al.*, 2008). 3) análise estatística; após essas etapas os dados absolutos da FFT adquiridos no software ACQKnowledge foram exportados para uma planilha eletrônica (*Excel for Windows versão 5.0 - Microsoft*). Ato contínuo, os dados foram transformados em percentuais em relação à potência total (potência relativa). Os dados do EEG destinados à análise estatística, para cada segmento de 2 segundos das amostras selecionadas, incluíram: a potência absoluta total (em $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$) e os dados das potências relativas de 1 a 30 Hz do espectro. Comparação das bandas de frequência (entre 1 e 1 Hz) entre os hipocampos, os diferentes estados e os diferentes grupos experimentais foi realizada por ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis. Possíveis diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste (post hoc) U de Mann-Whitney para identificar os grupos discrepantes, adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$.

2.7 VERIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DA LOCALIZAÇÃO DOS ELETRODOS HIPOCAMPAIS

Ao final dos protocolos de registro, os pombos foram anestesiados com hidrato de cloral (0,6 ml/Kg de peso corporal, i.p.) e perfundidos intracardiamente com solução salina (NaCl a 0,9%) seguida de formol a 10%. Uma vez dissecados, os encéfalos foram mantidos em formol a 10% por uma semana. Após este período, foram submetidos à microtomia em vibrátomo (*Vibratome® 1500 Sectioning System*) em cortes com espessura de 100 μm . Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, deixados secar ao abrigo do ar e da umidade

por 48 horas, sendo então corados pela técnica de Nissl (Tionina a 0,1%). Depois de corados, os cortes foram cobertos com lamínulas sobre bálsamo do Canadá, sendo finalmente examinados ao microscópio óptico (Olympus - BH2), para a avaliação do posicionamento dos eletrodos (ver figura 2).

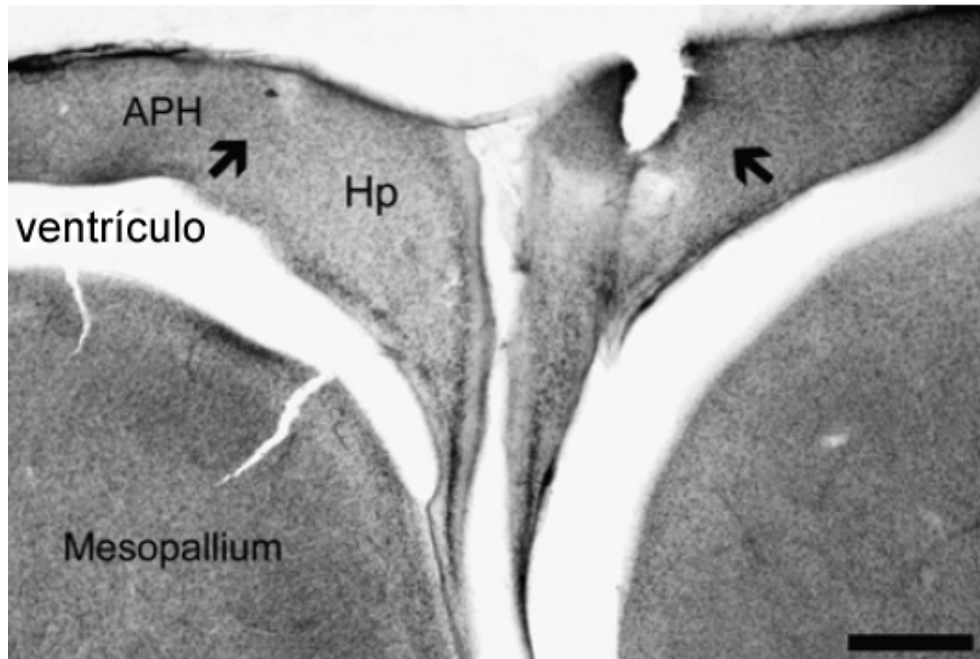


Figura 2: Fotomicrografia de um corte frontal da região caudal telencefálica do pombo, evidenciando a localização dos eletrodos implantados bilateralmente no hipocampo (Hp, setas). APH: Área parahipocampal. Barra horizontal = 500 μ m.

3 RESULTADOS

Os experimentos propostos foram concluídos utilizando-se 19 animais. Objetivamos quantificar durante o presente trabalho dados comportamentais e eletrográficos obtidos em pombos durante o período vespertino, caracterizado por alta atividade ingestiva e exploratória, após a administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT durante 1 hora.

3.1 ANÁLISE COMPORTAMENTAL APÓS ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE 5-HT OU 8-OH-DPAT

A análise de ANOVA de 1 via dos comportamentos demonstrados pelos animais após administração de veículo, 5-HT ou 8-OH-DPAT revelou diferenças estatísticas para a latência do primeiro episódio de vigília relaxada ($F(4,25)=4,413406$, $p=0,007768$), comportamento similar ao sono ($F(4,25)=5,246906$, $p=0,003293$), para o primeiro episódio de locomoção ($F(4,24)=5,990815$, $p=0,001724$), e também na duração total após 1 hora de registro de vigília atenta ($F(4,25)=5,89746$, $p=0,001745$), vigília relaxada ($F(4,25)=10,14815$, $p=0,000051$), comportamento similar ao sono ($F(4,25)=12,90235$, $p=0,000008$) e locomoção ($F(4,25)=3,57567$, $p=0,019417$).

Os animais do grupo controle, que receberam apenas injeção do veículo (ácido ascórbico 1%), exibiram comportamentos semelhantes aos observados em estudos prévios do nosso laboratório realizados na própria gaiola do animal situada no biotério setorial, exibindo predominantemente comportamentos relacionados à vigília (aproximadamente 2/3 do registro), permanecendo na maior parte do tempo em uma postura de vigília atenta imóvel ($1098 \pm 119,8$ s) ou relaxada ($1771,3 \pm 186,9$ s). Eventualmente, estes estados foram

interrompidos por comportamentos ingestivos (beber [$7,6 \pm 7,1$ s] e comer [$9,2 \pm 9,2$ s]) e comportamentos estereotipados de auto-limpeza ($39 \pm 22,7$ s) e locomoção pela gaiola (38 ± 17 s). Mesmo tratando-se de um experimento controle, durante grande parte do registro as aves apresentaram episódios de um comportamento similar ao sono (SLB, do inglês *sleep-like behavior*), caracterizado pela retrusão do pescoço, eriçamento das penas e movimentos palpebrais lentos ou fechamento das pálpebras. Tais episódios surgiram normalmente a partir dos 20 minutos iniciais do registro ($1229,2 \pm 167,1$ s), apresentando duração total média de 10 minutos ($646,8 \pm 195,7$ s, ver tabela 2). A duração total desse evento parece atestar uma boa adaptação desses animais à gaiola de registro.

Tabela 2: Duração e latência para o primeiro episódio de vigília atenta e relaxada, comportamento similar ao sono, comer, beber, auto-limpeza e locomoção após administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT (* $p < 0,05$ quando comparado ao veículo, ** $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 8-OH 2 mg/kg, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-HT 2 mg/kg)

Comportamento	Doses de 5-HT e 8-OH-DPAT (mg/kg)				
	0	5-HT 1	5-HT 2	8-OH 0,6	8-OH 2
Vigília Atenta					
Duração (s)	$1098 \pm 119,8$	$509,3 \pm 123,4^*$	$347,6 \pm 63,5^*$	$810,2 \pm 147,4\#$	$521,2 \pm 140,1^*$
Vigília Relaxada					
Latência (s)	$1867,5 \pm 775,3$	$332,2 \pm 116,3^*$	$55 \pm 28,9^*$	$332,8 \pm 109,3^*$	$144,8 \pm 82,8^*$
Duração (s)	$1771,3 \pm 186,9$	$752,2 \pm 77,5^*$	$675,3 \pm 155,2^*$	$609,6 \pm 151,9^*$	$681,8 \pm 174,8^*$
Comportamento Similar ao Sono					
Latência (s)	$1229,2 \pm 167,1$	$723,2 \pm 181,8^*$	$305,6 \pm 100,9^*$	$911 \pm 224,4\#$	$440,6 \pm 91,6^*$
Duração (s)	$646,8 \pm 195,7$	$2337,6 \pm 110,4^*$	$2571,2 \pm 196,4^*$	$2119,3 \pm 286,6^*$	$2388,2 \pm 254,5^*$
Comer					
Latência (s)	$3296,6 \pm 303,3$	3600 ± 0	3600 ± 0	$2663,8 \pm 624,0$	3600 ± 0
Duração (s)	$9,2 \pm 9,2$	0 ± 0	0 ± 0	$39,8 \pm 39,2$	0 ± 0
Beber					
Latência (s)	$2754,3 \pm 584,8$	3600 ± 0	3600 ± 0	$2603,6 \pm 640,5$	$2953,2 \pm 572,6$
Duração (s)	$7,6 \pm 7,1$	0 ± 0	0 ± 0	$8,8 \pm 5,7$	$1,5 \pm 0,9$
Auto-Limpeza					
Latência (s)	$2055,3 \pm 700,1$	$3366 \pm 234,0$	$3095,8 \pm 504,2$	$3485,5 \pm 114,5$	3600 ± 0
Duração (s)	$39 \pm 22,7$	$0,8 \pm 0,8$	$5,8 \pm 5,8$	$0,5 \pm 0,5$	0 ± 0
Locomoção					
Latência (s)	$595 \pm 366,3$	$3600 \pm 0^* **$	$3600 \pm 0^* **$	$2136,2 \pm 701,3$	$1848 \pm 783,7$
Duração (s)	$38 \pm 17,0$	$0 \pm 0^*$	$0 \pm 0^*$	$11,6 \pm 5,3^*$	$7,33 \pm 5,1^*$

Após administração sistêmica de 5-HT ou 8-OH-DPAT observou-se diminuição da latência para o primeiro episódio de comportamentos similar ao sono (com exceção do grupo

8-OH-DPAT 0,6 mg/kg), associada ao aumento da latência para o comportamento de locomoção (animais tratados com 5-HT). Observou-se após 1 hora da administração das drogas uma diminuição da duração total dos comportamentos de vigília atenta (com menor intensidade no grupo 8-OH-DPAT 0,6 mg/kg) e relaxada, refletindo o intenso aumento na duração total do comportamento de sono nos animais tratados com 5-HT ou 8-OH-DPAT (ver figura 3). A administração das drogas também afetou o comportamento de locomoção dos animais na gaiola resultando na diminuição da duração desse comportamento em relação aos animais controle (tabela 2).

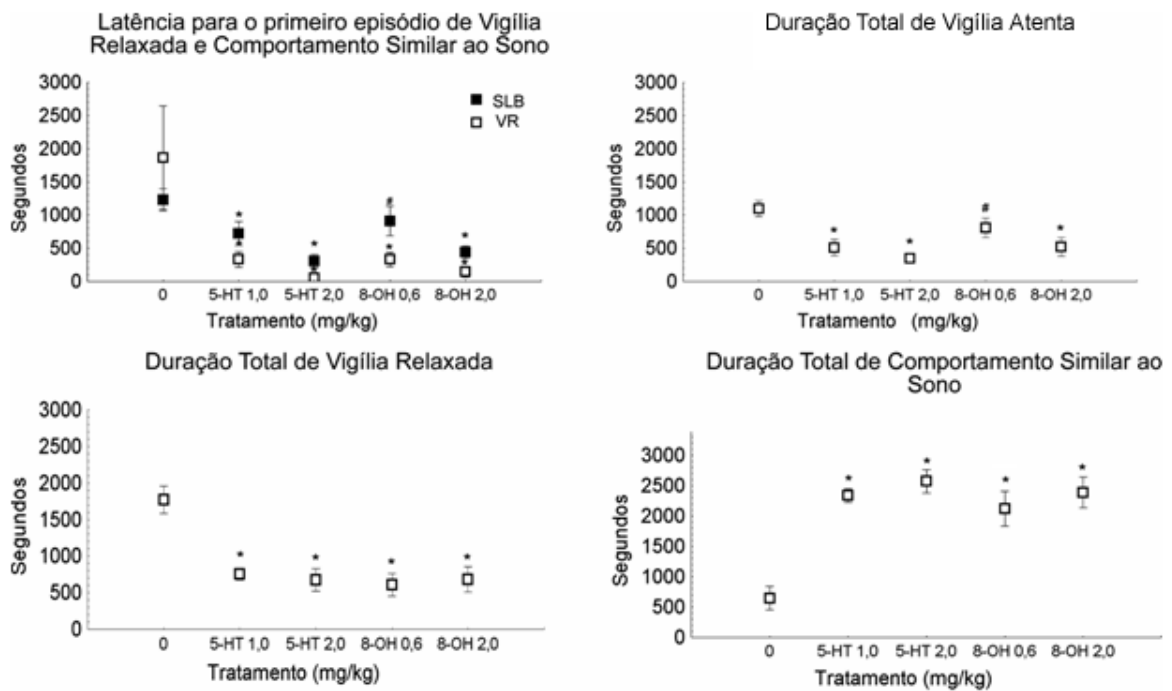


Figura 3: Latência para o primeiro episódio de vigília relaxada (VR) e do comportamento similar ao sono (SLB) e duração total de vigília atenta, vigília relaxada e comportamento similar ao sono 1 hora após a administração de 5-HT ou 8-OH-DPAT. Dados são expressos como média \pm EPM. (*) $p < 0,05$ quando comparados ao grupo veículo. (#) $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-HT 2 mg/kg.

3.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROGRÁFICA DOS ESTADOS DE SONO E VIGÍLIA

Durante os experimentos foram distinguidos 4 estados eletrográficos caracterizados pelo registro de eletrodos localizados bilateralmente no hipocampo, no músculo trapézio e na região ocular da ave. Durante os períodos de vigília atenta imóvel, os traçados eletrográficos hipocampais apresentaram baixas amplitudes e frequências altas, enquanto a atividade elétrica dos músculos do pescoço refletiu o aumento do tônus muscular ou a presença de pacotes de alta amplitude relacionados aos movimentos exploratórios do pescoço e da cabeça. Durante os períodos de vigília atenta, a atividade ocular do EOG demonstrava-se contínua, conseqüência da grande incidência de piscadas e/ou movimento ocular. Outro estado eletrográfico identificado foi o estado de sonolência (DRW), composto pela transição de curtos períodos de atividade de ondas lentas com alta amplitude e atividade rápida de baixa amplitude, havendo ausência dos surtos eletromiográficos causados por movimentos bruscos da cabeça e pescoço e leve diminuição do tônus muscular, acompanhada da diminuição do número de piscadas e movimento lento das pálpebras. O SLB esteve relacionado, além da DRW, a dois estados eletrográficos distintos: o sono de ondas lentas (SWS) caracterizado pela presença constante de atividade lenta de alta amplitude, acompanhada de um padrão eletromiográfico de baixa amplitude, denotando um tônus muscular mínimo, e atividade ocular quase inexistente, podendo ou não observar-se o fechamento bilateral das pálpebras. Ocasionalmente durante o SWS o EEG alternava-se transitoriamente para um curto estado de alta frequência e baixa amplitude, distinguido então o sono REM. Embora o traçado eletrográfico assemelhe-se ao traçado característico de vigília, o padrão comportamental durante este estado permanece similar ao estado de sono profundo, podendo ou não estar acompanhado da queda súbita da cabeça, decorrente da hipotonia acentuada peculiar a este estado hipnótico. Tal estado eletromiográfico, de intensa hipotonia, foi raramente identificado durante nossos registros,

havendo durante este estágio maior incidência da atividade óculo-motora comumente associada ao fechamento das pálpebras (ver figura 4).

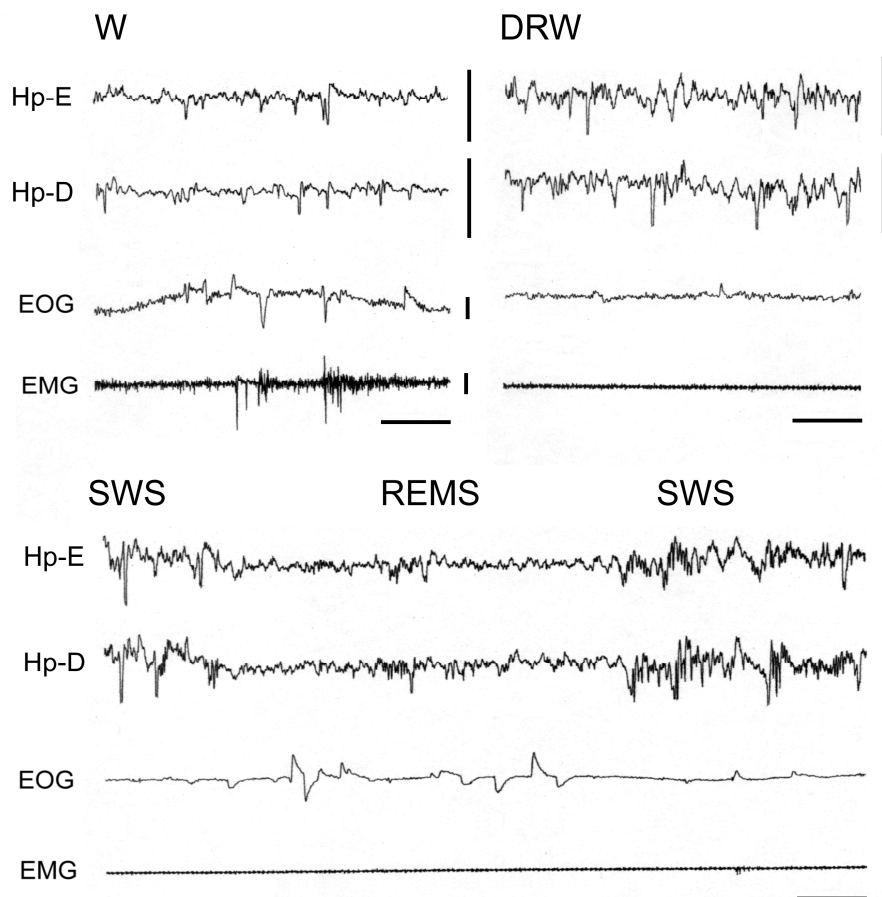


Figura 4: Traçados da atividade eletrográfica bilateral do hipocampo (esquerdo: Hp-E; direito: Hp-D), eletrooculograma (EOG) e atividade muscular da região dorsal do pescoço (EMG) durante os estados de vigília (W), sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono de movimento rápido dos olhos (REMS) no pombo. Barra horizontal: 1 s; vertical: 250 μ V.

A partir da inspeção visual dos traçados eletrográficos, não foi possível averiguar diferenças morfológicas de amplitude e frequência dos sinais obtidos, durante qualquer estado eletrográfico, entre os animais que receberam apenas veículo, 5-HT ou 8-OH-DPAT. Adicionalmente, embora os animais que receberam apenas veículo ou 8-OH-DPAT tenham desencadeado episódios de DRW e SWS, não foi possível evidenciar episódios característicos de sono REM. Sendo assim, objetivando comparar quantitativamente os episódios de sono REM encontrados em animais tratados com 5-HT, optou-se em selecionar trechos de 2 s deste

estado a partir de registros noturnos (em 2 animais), realizados sob condições normais, sem nenhum tratamento (ver tópicos 3.4 e 3.5).

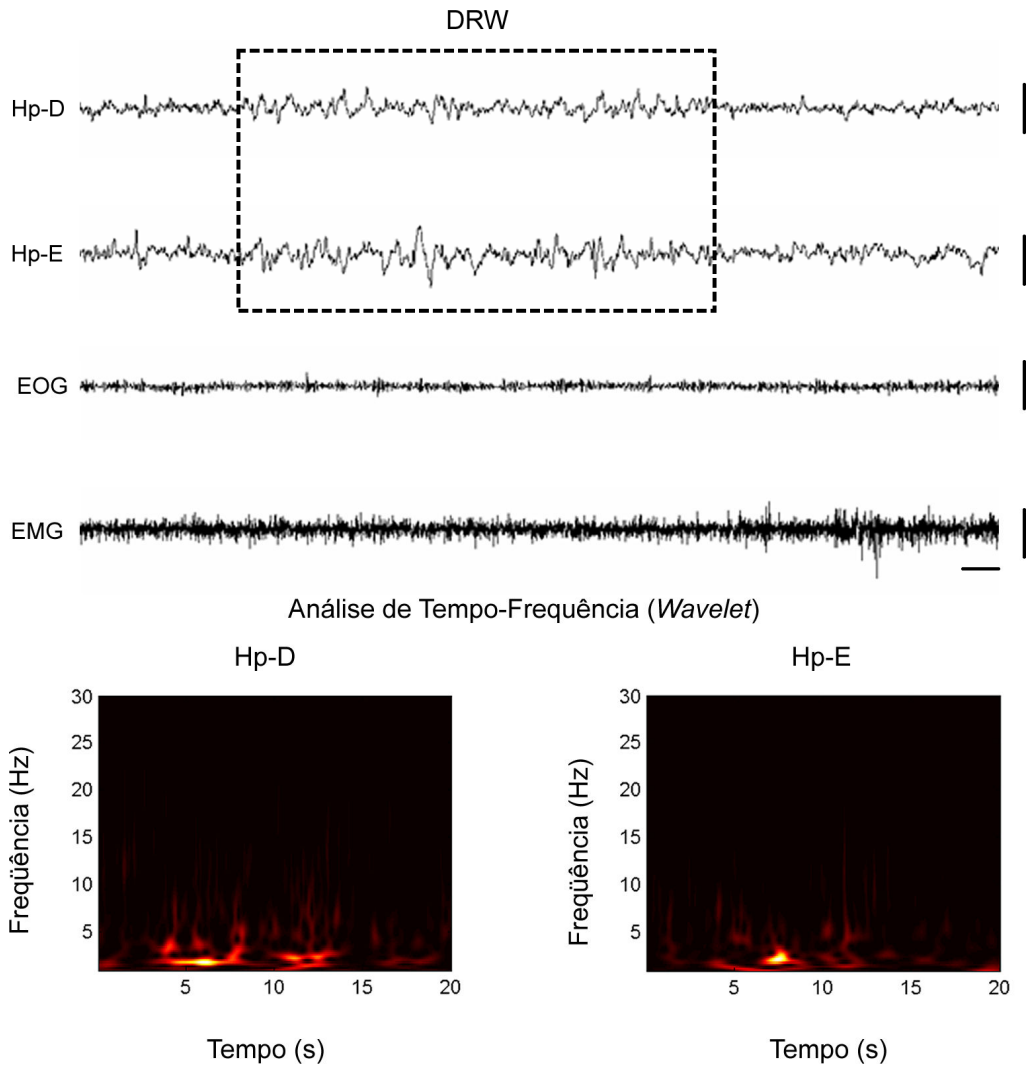


Figura 5: Traçado eletrográfico bilateral da região hipocampal evidenciando um episódio de sonolência (DRW) durante o comportamento de vigília imóvel com a correspondente análise de *wavelet* (abaixo) de ambos os hemisférios. Barra horizontal: 1 s; vertical: 250 μ V.

Com intuito de evidenciar as diferentes frequências predominantes em função do tempo durante os distintos estados eletrográficos caracterizados, utilizamos a análise de *wavelet* para corroborar nossos achados visuais. A figura 5 demonstra o surgimento de um curto episódio de sonolência enquanto o animal estudado apresentava uma postura de vigília imóvel. De acordo com a análise de *wavelet* observam-se em ambos os hipocampus maior

intensidade da potência em frequências baixas (ondas delta, entre 0 e 4 Hz) durante o estado de sonolência (em destaque, entre 4 e 14 s) em relação aos períodos de vigília.

Adicionalmente, a figura a seguir evidencia um período de sono de ondas lentas interrompido por um episódio de sono REM em ambos os hipocampos (em destaque). Logo abaixo aos traçados eletrográficos observa-se na análise de *wavelet*, durante os períodos de sono profundo, a presença de grande intensidade das potências na faixa de frequência de ondas lentas (entre 0 e 4 s e 9 e 20 s), enquanto durante o episódio de sono REM, observa-se a ausência desta atividade nas frequências baixas (entre 4 e 9 s) nos dois hemisférios.

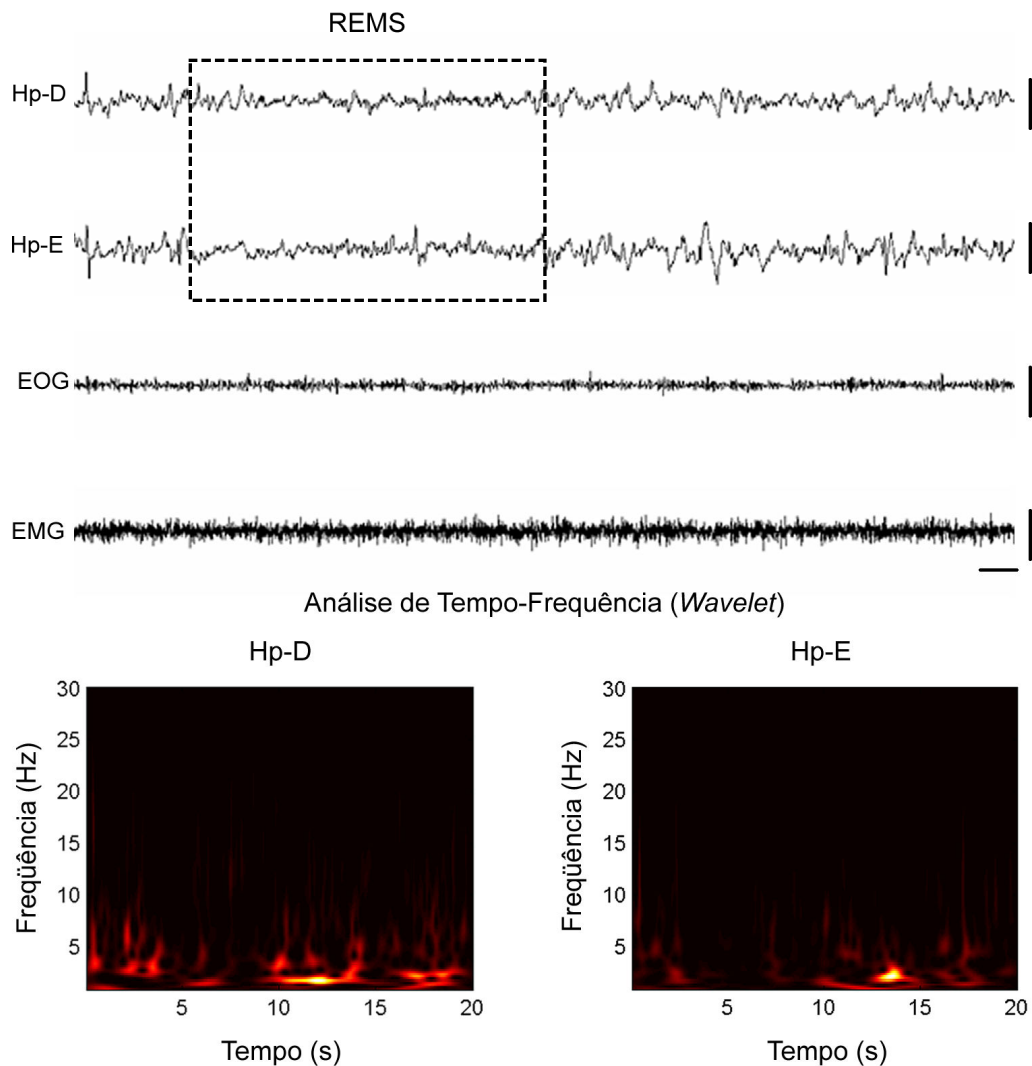


Figura 6: Traçado eletrográfico bilateral da região hipocampal evidenciando um episódio de sono REM (REMS) durante um estado de sono profundo (SWS) com a correspondente análise de *wavelet* (abaixo) de ambos os hemisférios. Barra horizontal: 1 s; vertical: 250 μ V.

3.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE 5-HT OU 8-OH-DPAT SOBRE OS ESTADOS ELETROGRÁFICOS DE VIGÍLIA E SONO

Efeitos significantes do tratamento [$F(6,176)=56.9$, $p=0,000$], períodos de registro [$F(15,243,3)=374.1$, $p=0,000$] e da interação entre esses dois fatores [$F(30,259)=3.6$, $p=0,000$] foram encontrados após análise ANOVA de 2 vias da duração acumulada dos estados de vigília, sonolência, sono de ondas lentas e sono REM. Após a administração sistêmica de 5-HT observa-se uma diminuição progressiva, dose dependente, do tempo de vigília em relação aos animais do grupo controle. Efeitos hipnogênicos causados pela administração da droga podem ser vistos a partir dos primeiros 10 minutos de registros após injeção da droga de dose maior (2 mg/kg) e 20 minutos após injeção da dose menor (1 mg/kg), havendo diferença estatística entre o grupo tratado e grupo veículo durante todo o registro experimental e diferença entre grupos tratados no 50º minuto. Animais tratados com 5-HT caracterizaram-se por antecipar os estados de sonolência [$F(2,15)=23.89$, $p=0,000022$], sono de ondas lentas [$F(2,15)=6.39$, $p=0,009856$] e sono REM [$F(2,15)=59.91$, $p=0,000000$] (estado não encontrado no grupo controle) durante o registro eletrográfico. A latência para o primeiro episódio de sonolência dos animais do grupo controle encontra-se por volta de 10 minutos ($599,17 \pm 89,7$ s), diminuindo significativamente após administração de 5-HT, tanto na dose menor ($107,67 \pm 34,4$ s) quanto maior ($86,67 \pm 36,4$ s). Um aumento da duração deste estado nos animais tratados com a dose de 1 mg/kg pode ser observado a partir do 20º minuto, aumentando progressivamente até o fim do registro. De forma mais intensa, a dose de 2 mg/kg de 5-HT é capaz de antecipar o aumento da duração deste estado a partir do 10º minuto, estendendo-se até o término do registro. Diferenças entre os grupos tratados podem ser observadas a partir do 40º minuto. De forma similar, o tratamento serotoninérgico adianta o aparecimento do primeiro episódio de SWS, ocorrendo a partir de $802,17 \pm 177$ s na dose de 1

mg/kg e $404 \pm 38,8$ s na dose de 2 mg/kg em relação ao grupo veículo ($1694 \pm 414,9$ s). A duração deste estado se encontra aumentada nos animais tratados, havendo um aumento progressivo da sua duração a partir do 30º minuto. Embora episódios de sono REM não tenham sido encontrados nos animais controle, eles aparecem nos animais tratados a partir do 30º minuto ($1818,8 \pm 171,3$ s) na dose de 1 mg/kg e mais precocemente na dose maior ($1452,3 \pm 191,7$ s). O aumento da duração deste estado torna-se significativo a partir do 40º minuto, havendo diferença entre os grupos tratados no 50º minuto (ver figura 7 e 8).

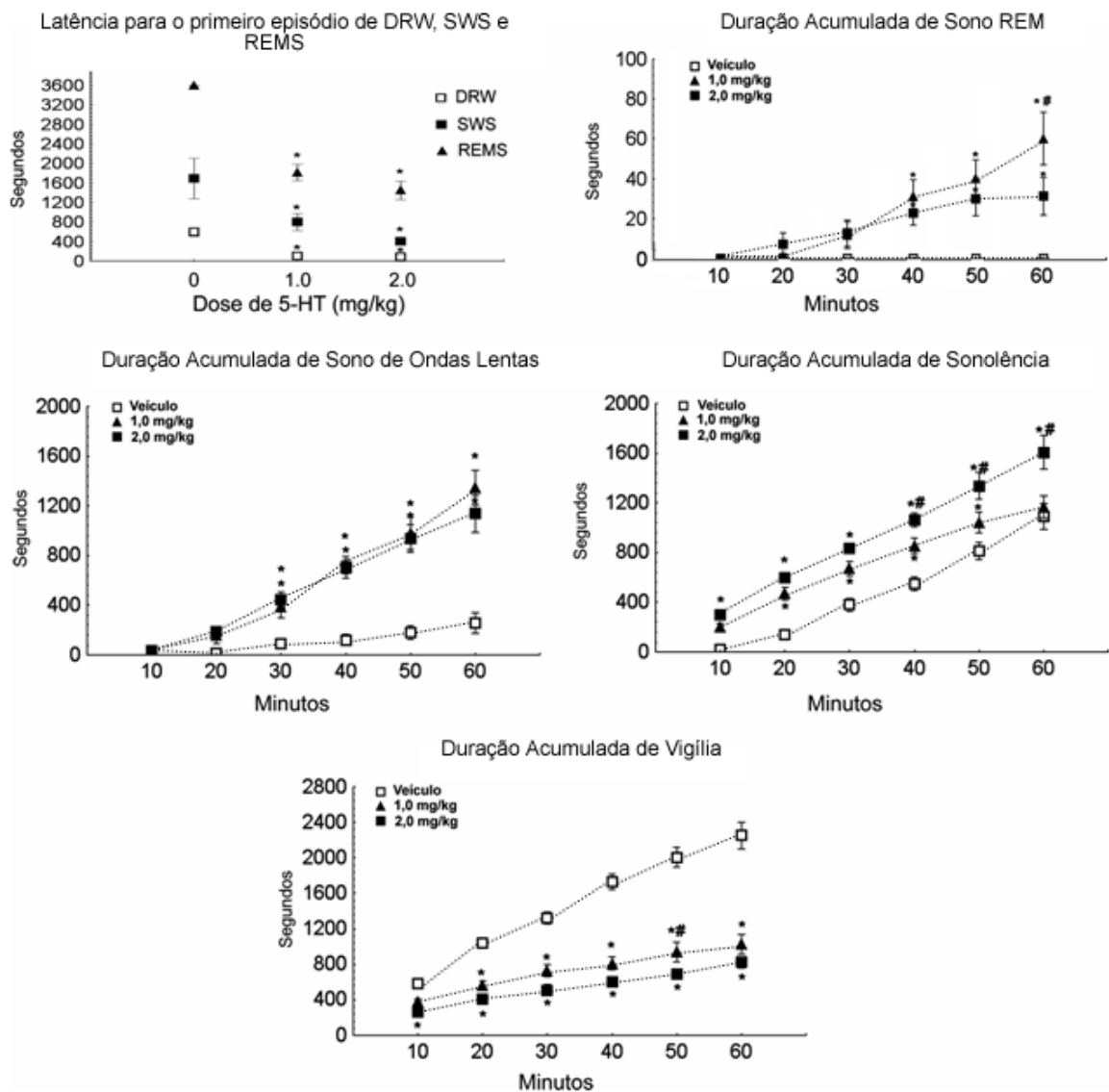


Figura 7: Latência para o primeiro episódio de sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono REM (REMS) e duração acumulada dos episódios de vigília, sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono REM (REMS) (em períodos de 10 minutos) após administração sistêmica de 5-HT (1 ou 2 mg/kg) ou veículo. Dados são expressos como média \pm EPM. (*) $p < 0,05$ quando comparado aos animais tratados com veículo, (#) $p < 0,05$ quando há diferenças entre grupos tratados.

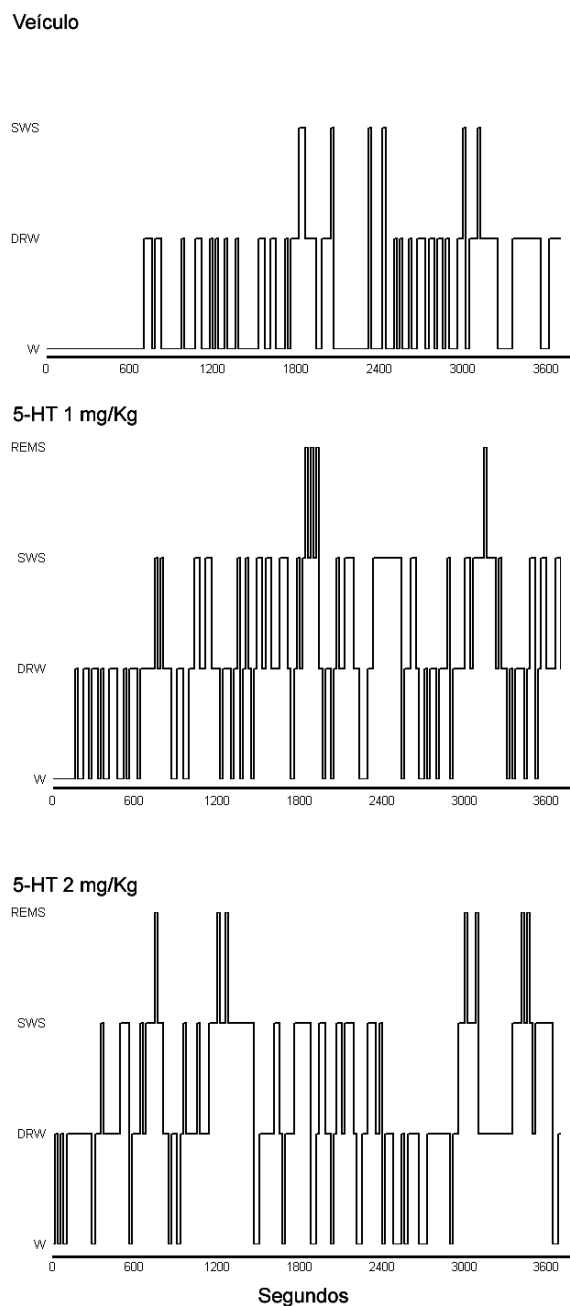


Figura 8: Hipnograma de um único animal após administração sistêmica de 5-HT (1 e 2 mg/kg) e de veículo, demonstrando a distribuição, incidência, duração e latência para o primeiro episódio dos estados eletrográficos de vigília (W), sonolência (DRW), sono de ondas lentas (SWS) e sono REM (REMS).

Efeitos significantes do tratamento [$F(2,90)=36.13$, $p<0,0001$] e períodos de registro [$F(5,90)=31.03$, $p<0,0001$] foram observados por análise ANOVA de 2 vias da duração acumulada da vigília, que apresentou uma queda progressiva após administração de 8-OH-DPAT quando comparada aos animais que receberam injeção do veículo (figura 9).

Diferenças significantes foram observadas no grupo tratado com a dose de 0,6 mg/kg após o 50º minuto, enquanto o grupo tratado com a dose de 2 mg/kg apresentou uma diminuição significativa na duração da vigília aproximadamente no 20º minuto após a injeção da droga, quando comparado ao grupo veículo. Ressalta-se que as injeções de 8-OH-DPAT não demonstraram serem capazes de alterar a latência para o primeiro episódio de sonolência, enquanto a duração deste estado revelou efeitos significantes no tratamento [$F(2,90)=3.5$, $p=0,03$] e nos períodos de registro [$F(5,90)=37.7$, $p<0,0001$]. Diminuição significativa na duração de sonolência foi observada 50 minutos após os tratamentos com ambas as doses quando comparadas ao grupo tratado com veículo (figura 9).

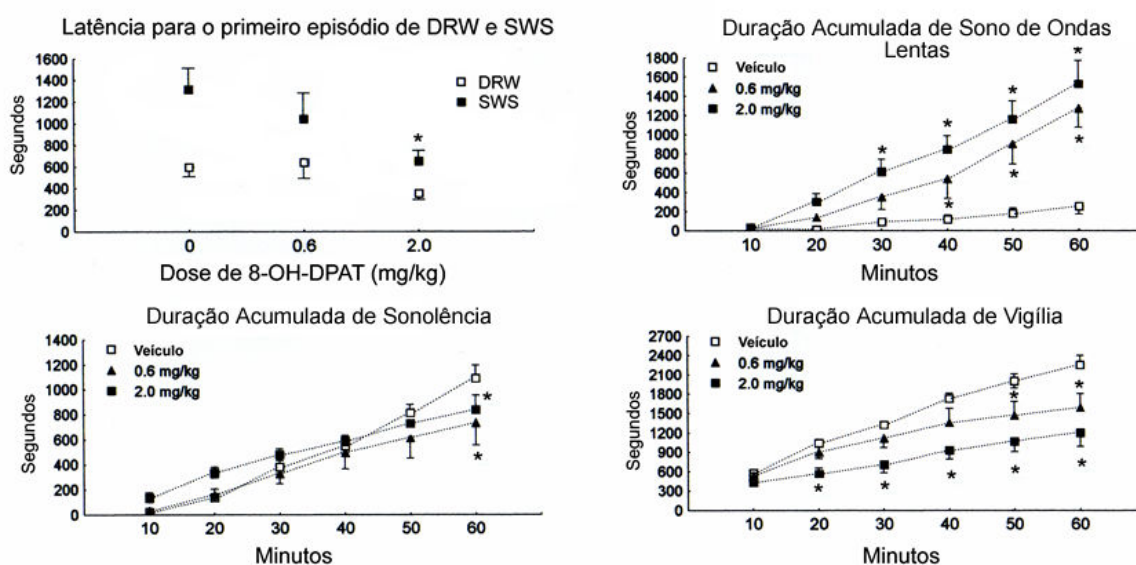


Figura 9: Latência para o primeiro episódio e duração acumulada de episódios de vigília, sonolência (DRW) e sono de ondas lentas (SWS) (em períodos de 10 minutos) após administração sistêmica de 8-OH-DPAT (0,6 ou 2,0 mg/kg) ou veículo. Dados são expressos como média \pm EPM. (*) $p < 0,05$ quando comparado aos animais tratados com veículo.

As injeções de 8-OH-DPAT afetaram intensamente a latência e duração do SWS (figura 9). A latência para o primeiro episódios de SWS mostrou-se significamente reduzida após administração da dose de 2 mg/kg, e ambas as doses aumentaram significamente a duração acumulada de SWS (dose: $F(2,90)=36.2$, $p<0,0001$; período após injeção: $F(5,90)=24.11$, $p= p<0,0001$, demonstrando também interação significativa entre

esses fatores: $F(10,90)=3.47$, $p=0,0006$). Aumentos significativos do SWS foram observados após o 40º minuto pós-tratamento no grupo da dose de 0,6 mg/kg, enquanto a duração acumulada de SWS após a dose de 2 mg/kg encontrou-se significativamente aumentada quando comparada aos animais controle a partir do 30º minuto (figura 9). A partir da figura 10 demonstra-se um hipnograma derivado de registros após cada tratamento em um único animal, denotando no grupo tratado aumento gradual na frequência e na duração dos episódios de SWS acompanhadas de redução da latência para o primeiro episódios de SWS.

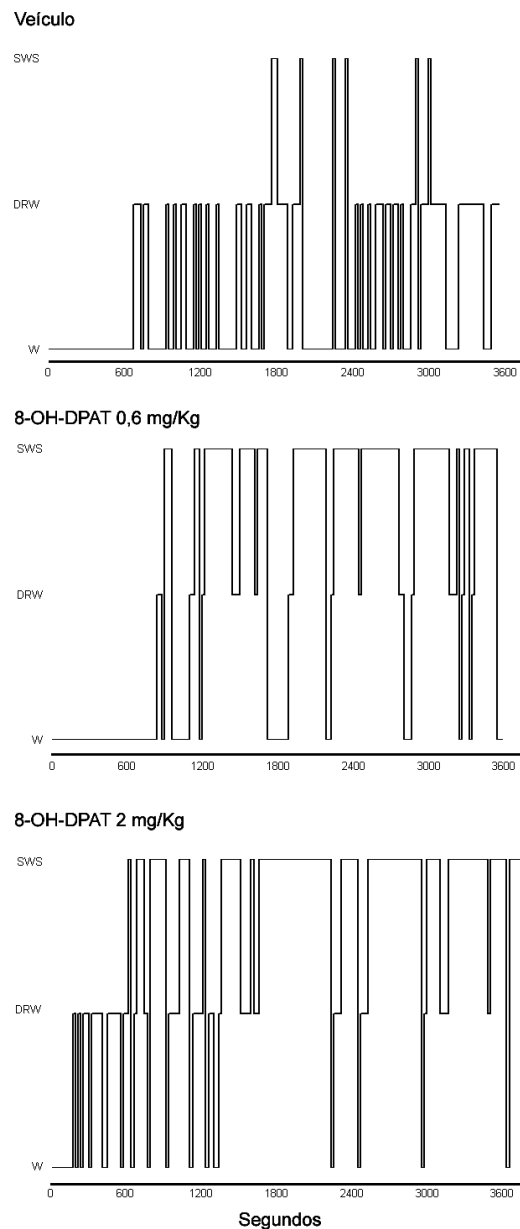


Figura 10: Hipnograma de um único animal após administração sistêmica de 8-OH-DPAT (0,6 e 2 mg/kg) e de veículo, demonstrando a distribuição, incidência, duração e latência para o primeiro episódio dos estados eletrográficos de vigília (W), sonolência (DRW) e sono de ondas lentas (SWS).

3.4 ANÁLISE ESPECTRAL RELATIVA DOS TRAÇADOS ELETROGRÁFICOS HIPOCAMPAIS SOBRE OS ESTADOS DE VIGÍLIA E SONO

As análises qualitativas de duração e latência dos diferentes estados eletrográficos foram sucedidas pela análise quantitativa do EEG hipocampal. Para tal, efetuou-se uma pré-seleção de 4 segmentos de 2 s de cada estado eletrográfico, de cada animal, em cada grupo, seguida pela exportação dos dados absolutos das respectivas FFTs para o programa estatístico, calculando-se as potências relativas desses episódios a partir dos dados percentuais relacionados à potência total, na faixa de frequência entre 0 e 30 Hz, entre 1 e 1 Hz.

A figura 11 demonstra a potência espectral relativa de cada estado, nos hipocampos direito e esquerdo. As diferenças encontradas entre as potências relativas durante a comparação entre os estados de sono e vigília revelam discrepâncias sutis e isoladas, concentradas principalmente em frequências altas, onde os estados de vigília e sono REM apresentam maior intensidade das potências em relação aos estados de sono e, de forma menos intensa, em frequências baixas, inferiores a 6 Hz. Durante a comparação dos estados eletrográficos de vigília e sono, nota-se grande similaridade entre os estados de vigília e REMS, e DRW e SWS, enquanto os estados que apresentam características eletrográficas de ondas lentas (como DRW e SWS) diferenciam-se dos estados de atividade dessincronizada (W e REMS). De forma interessante, ambos os hipocampos apresentam um perfil similar do espectro de potência relativa embora aparentemente as diferenças encontradas durante a comparação dos estados de sono e vigília encontram-se mais evidentes no hemisfério esquerdo que no direito.

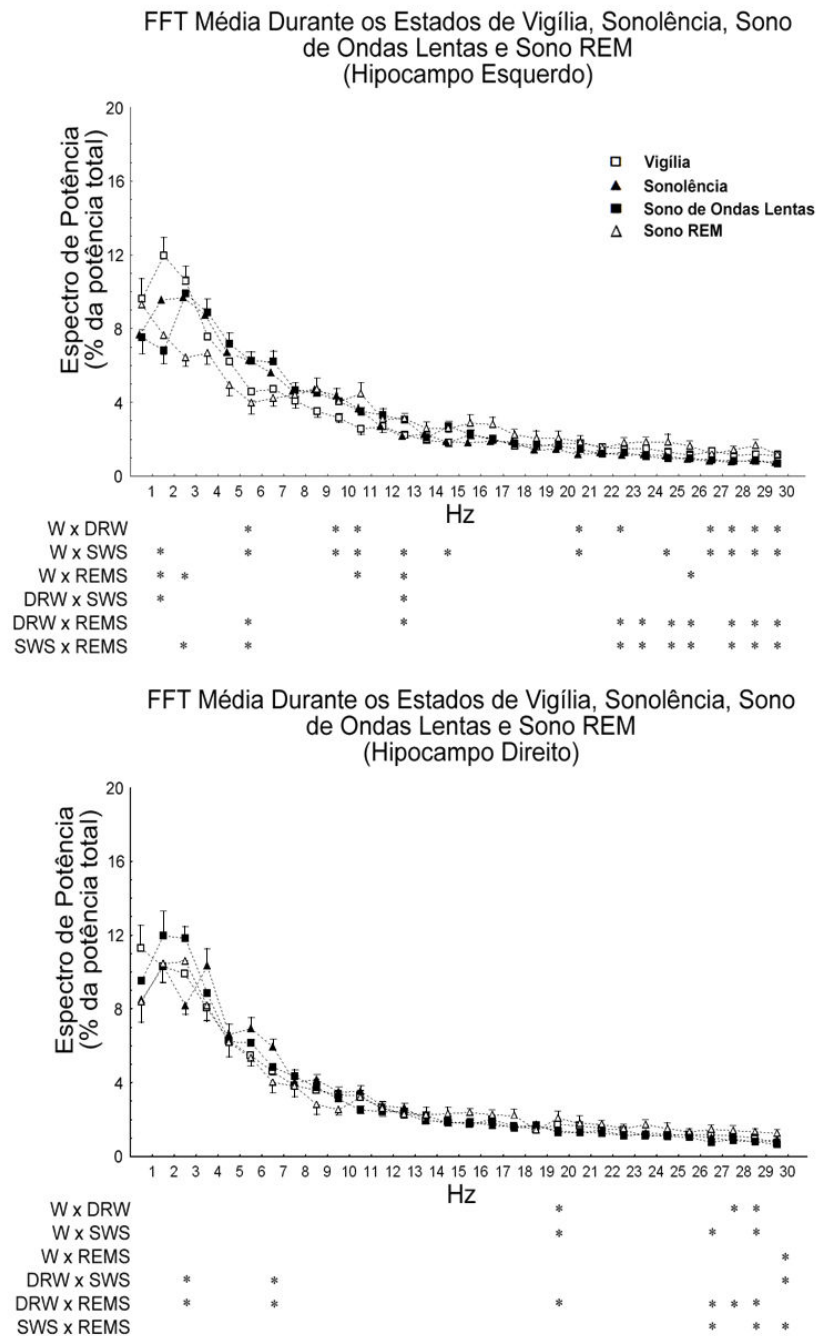


Figura 11: Análise espectral da atividade eletrográfica hipocampal bilateral (hipocampus direito e esquerdo) sobre os diferentes estados de sono e vigília (W, DRW, SWS e REMS) identificados nos animais controle. Dados são expressos como média \pm EPM, adotando-se $p < 0,05$ (*).

A figura abaixo ressalta as diferenças encontradas entre os hipocampus direito e esquerdo durante a análise espectral dos estados de vigília e sono. Comparando-se a atividade hipocampal bilateral durante os estados de vigília e sonolência não foi possível observar diferenças expressivas entre os hemisférios estudados, embora a intensidade das potências

relativas em ambos os hemisférios parece oscilar ritmicamente ao longo das frequências. De forma interessante, durante o estado de sono de ondas lentas a comparação entre os hipocampus demonstrou de modo mais intenso diferenças entre a intensidade das potências principalmente em frequências baixas (durante a SWA) e intermediárias. Ressalta-se que a presença de atividade assimétrica entre os hipocampus durante este estado de sono não reflete a presença de USWS, tendo em vista que as amostras selecionadas para a análise de FFT apresentavam padrões eletrográficos com atividade lenta e grandes amplitudes tanto no hipocampo direito como esquerdo. Perfil similar foi observado durante o estado de sono REM, havendo oscilações rítmicas entre a intensidade das potências, denotando assimetria da atividade elétrica hipocampal durante este estado.

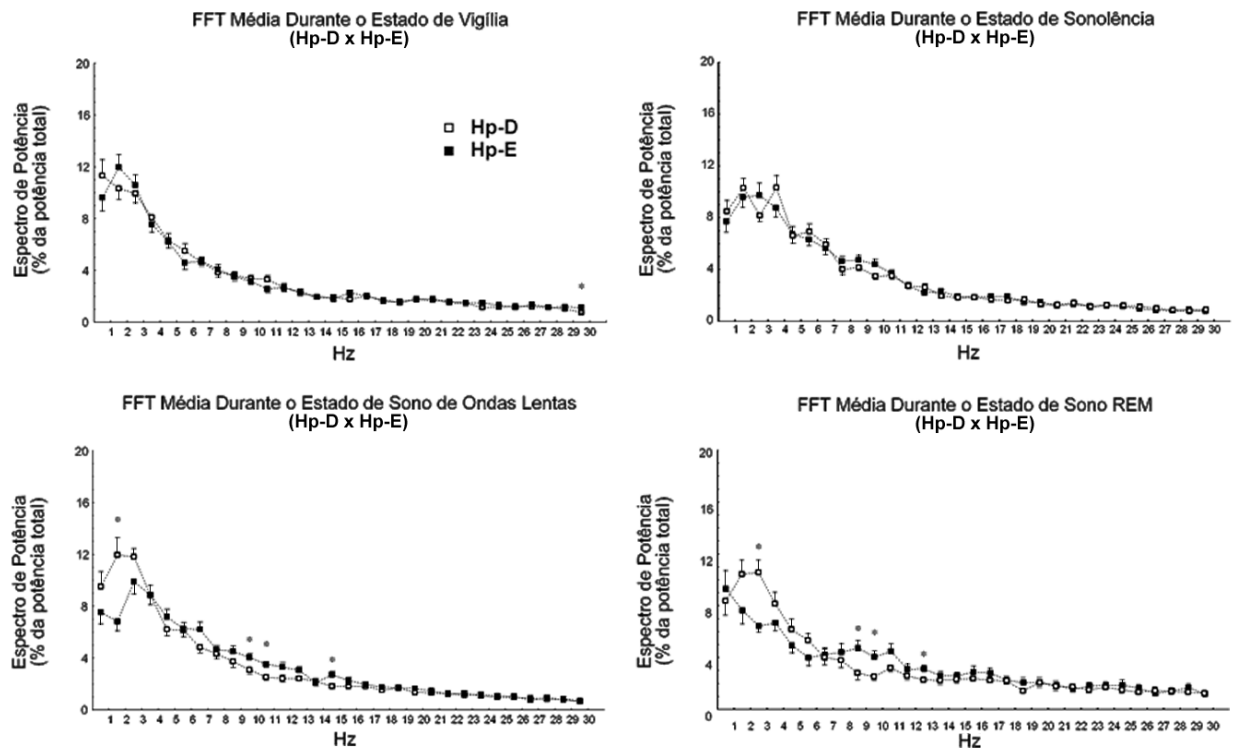


Figura 12: Comparação entre os hipocampus direito e esquerdo através da análise espectral durante os estados de sono e vigília (W, DRW, SWS e REMS) identificados nos animais controle. Dados são expressos como média \pm EPM, adotando-se $p < 0,05$ (*).

3.5 ANÁLISE ESPECTRAL RELATIVA DOS TRAÇADOS ELETROGRÁFICOS HIPOCAMPAIS SOBRE OS ESTADOS DE VIGÍLIA E SONO APÓS ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE 5-HT OU 8-OH-DPAT

A análise do espectrograma de todos os estados eletrográficos identificados nos animais que receberam injeção sistêmica de 5-HT apresentou diferenças em relação ao grupo não tratado, conforme pode ser observado na figura 13.

O tratamento com 5-HT em ambas as doses não foi capaz de alterar de forma efetiva o estado de vigília, embora tenha sido encontrado diferenças estatísticas isoladas em ambos os hipocampos, principalmente em frequências intermediárias e altas. A injeção de 5-HT parece provocar maiores alterações sobre os estados relacionados ao sono, provocando efeitos leves sobre o estado de sonolência, havendo oscilações entre a intensidade das potências principalmente em frequências menores e intermediárias e diferenças estatísticas entre as potências dos grupos tratados e controle em frequências maiores (entre 23 e 25 Hz em ambos os hipocampos). Tais diferenças encontradas durante os estados de vigília e sonolência não parecem refletir de forma efetiva uma alteração da atividade hipocampal tendo em vista a ocorrência episódica dessas diferenças entre a intensidade das potências dos grupos tratados e controle. Em contrapartida, durante o sono de ondas lentas, a 5-HT foi capaz de aumentar a intensidade da atividade de ondas lentas no hipocampo esquerdo, enquanto nenhuma alterações foi observada no hemisfério contralateral, indicando uma discrepância da atividade elétrica hipocampal entre os hipocampos. Durante os períodos de sono REM o grupo tratado apresentou uma oscilação da prevalência da intensidade das potências no hipocampo esquerdo, havendo um aumento da potência durante SWA e diminuição nas frequências maiores, enquanto no hipocampo direito as diferenças mostraram-se mais discretas principalmente nas frequências intermediárias e maiores.

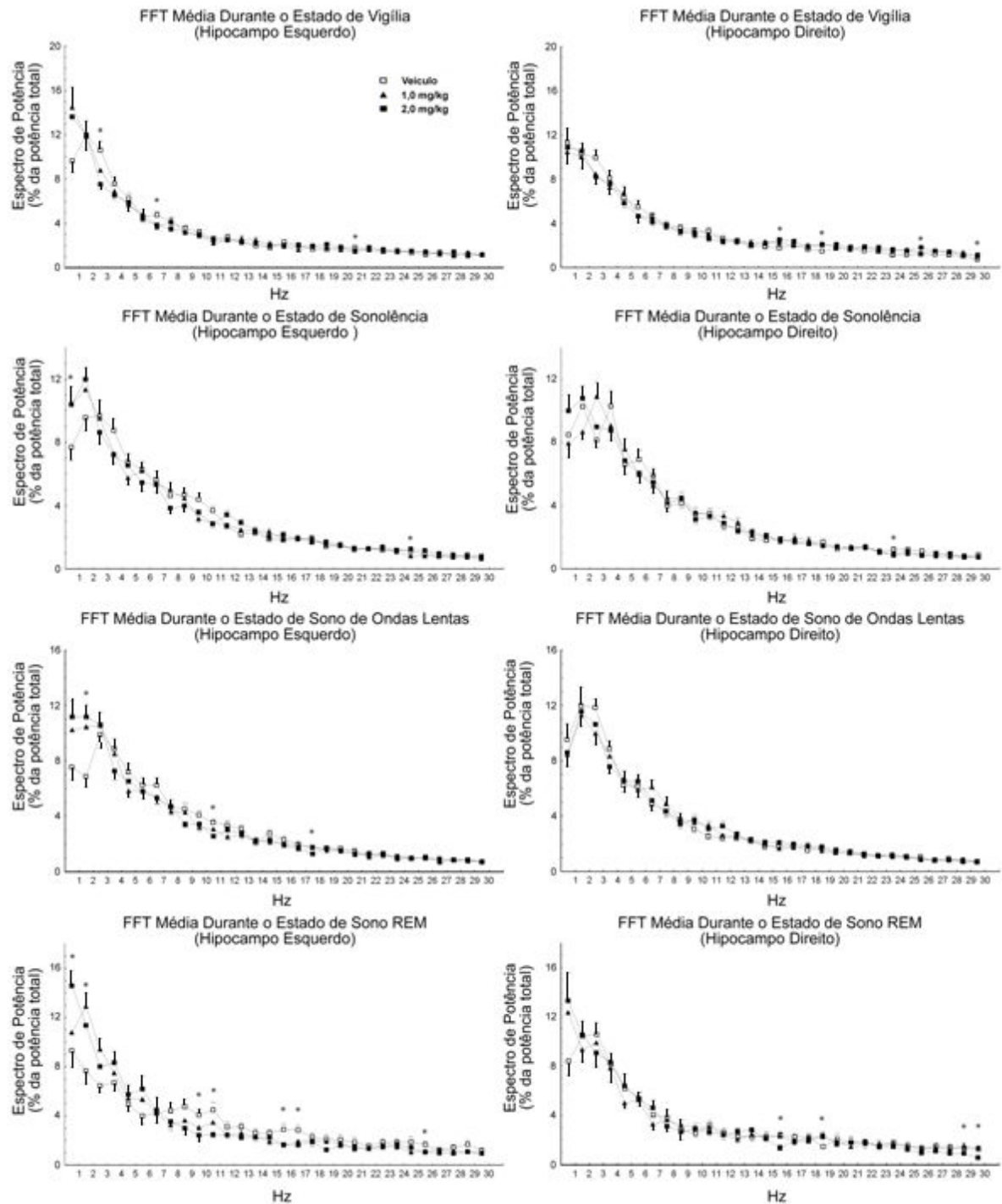


Figura 13: FFT (média das potências relativas \pm E.P.M.) do EEG hipocampal bilateral de 0 a 30 Hz, em freqüências de 1 em 1 Hz, dos diferentes estados eletrográficos identificados após tratamento com 5-HT (1 e 2 mg/kg) e veículo.

De forma menos intensa que a 5-HT, o tratamento com o agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT não foi capaz de alterar efetivamente a atividade elétrica hipocampal durante qualquer estado relacionado ao sono e vigília. As diferenças estatísticas encontradas mostraram-se

isoladas e, comumente durante todos os estados observados após o tratamento com 8-OH-DPAT, foram observadas oscilações entre a intensidade das potências em grande parte das frequências. No hipocampo esquerdo, poucas diferenças entre os dados espectrais dos grupos tratados e controle foram observadas. Essas diferenças encontraram-se dispersas e ocorreram de forma isolada, não evidenciando nenhum padrão de mudança. Em geral, o hipocampo direito mostrou a mesma distribuição esparsa em frequências isoladas que foram significativamente alteradas pelo tratamento com 8-OH-DPAT. Uma exceção foi observada no hipocampo direito durante períodos de vigília, quando a potência relativa entre frequências de 23 e 30 Hz mostraram-se significativamente e sistematicamente aumentadas após a administração da dose maior de 8-OH-DPAT. As poucas diferenças encontradas durante a análise espectral dos estados de vigília, sonolência e sono de ondas lentas após a administração sistêmica do agonista 5-HT_{1A} não parecem refletir de forma concludente uma alteração da atividade elétrica hipocampal, assemelhando-se ao sono diurno normal dos pombos estudados.

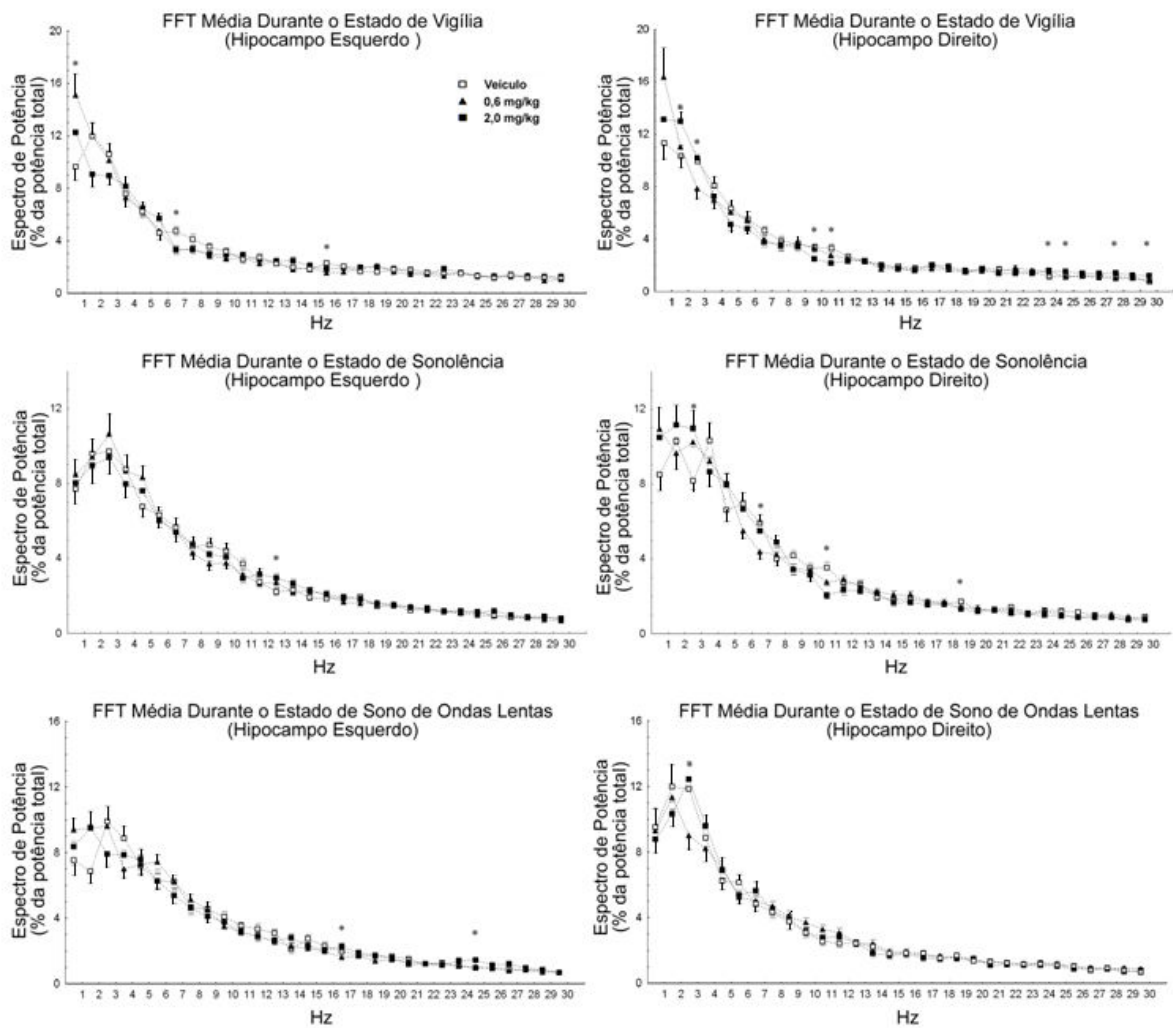


Figura 14: FFT (média das potências relativas \pm E.P.M.) do EEG hipocampal bilateral de 0 a 30 Hz, em frequências de 1 em 1 Hz, dos diferentes estados eletrográficos identificados após tratamento com 8-OH-DPAT (0,6 e 2 mg/kg) e veículo.

3.6 EVIDÊNCIAS DE SONO DE ONDAS LENTAS UNIHEMISFÉRICO

Durante os experimentos também fomos capazes de identificar curtos episódios de sono unihemisférico hipocampal durante o estado de sono de ondas lentas em todos os animais utilizados. A análise de variância de 1 via revelou diferenças significantes na duração desses episódios durante os experimentos ($F(5,241)=11,21298$, $p=0,000000$) assim como na duração total dos episódios de sono unilateral ($F(5,26)=3,210009$, $p=0,021776$) após 1 hora de registro entre os animais tratados e dois animais registrados durante o período noturno (entre 19 e 20h) sem qualquer influencia de drogas.

A incidência desse fenômeno comum às aves e mamíferos aquáticos foi baixa nos animais controle, totalizando após o registro de 1 hora $14 \pm 4,78$ s, com episódios de aproximadamente $4,66 \pm 0,24$ s. De forma interessante, uma proporção inversa foi observada nos animais tratados com 5-HT e 8-OH-DPAT (na dose menor). Enquanto a duração total dos episódios de sono unilateral aumentou nos grupos tratados e controle noturno em relação ao grupo controle diurno, a duração desses episódios parece diminuir nesses mesmos grupos (com exceção dos animais tratados com 8-OH-DPAT na maior dose) em relação ao controle diurno (ver tabela 3).

Tabela 3: Duração média dos episódios de USWS e duração total desses episódios após 1 hora da administração sistêmica da droga/veículo (* $p < 0,05$ quando comparado ao veículo diurno, ** $p < 0,05$ quando comparado ao veículo noturno, # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com 8-OH-DPAT 2,0 mg/kg)

Tratamento (mg/kg)	Duração Média dos Episódios de USWS (s)	Duração Total dos Episódios de USWS (s)
Veículo Diurno	$4,66 \pm 0,24$	$14 \pm 4,78$
Veículo Noturno	$3,86 \pm 0,35$ *	29 ± 2
5-HT 1,0	$3,52 \pm 0,09$ * #	$38,16 \pm 5,98$ *
5-HT 2,0	$3,06 \pm 0,15$ * ** #	$34,5 \pm 4,34$
8-OH 0,6	$3,46 \pm 0,13$ * #	$26 \pm 3,29$
8-OH 2,0	$4,53 \pm 0,23$ **	$42 \pm 8,69$ *

O surgimento dos episódios de sono unilateral também apareceu antecipadamente nos animais tratados e no grupo controle noturno quando comparados aos animais que receberam apenas veículo no período vespertino, conforme observado por ANOVA de 1 via ($F(5,26)=5,083225$, $p=0,002212$). Enquanto os animais tratados com 5-HT e 8-OH-DPAT (na menor dose) apresentaram o primeiro episódio de sono unilateral aproximadamente 20 minutos após a injeção da droga e os animais registrados durante a noite e que receberam a dose maior de 8-OH-DPAT aproximadamente 10 minutos, os animais registrados durante o período vespertino demonstraram esse fenômeno apenas a partir do 40º minuto ($2369,5 \pm 455,60$ s), conforme observado na figura 16.

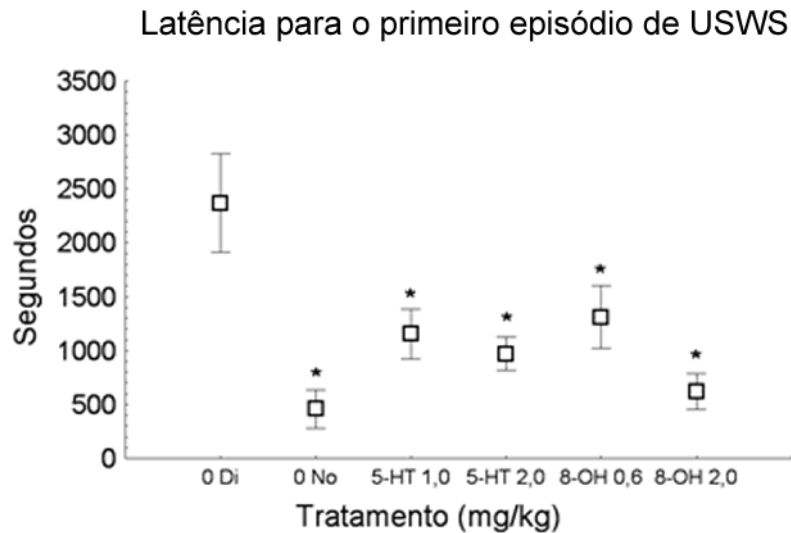


Figura 15: Latência para o primeiro episódio de sono de ondas lentas unihemisférico (USWS) após tratamento sistêmico com veículo, durante o período vespertino (0 Di), e durante o período noturno (0 No) sem injeção do veículo, e após injeção das drogas (5-HT nas doses de 1 e 2 mg/kg e 8-OH-DPAT nas doses de 0,6 e 2 mg/kg).

A figura a seguir ilustra um episódio típico de SWS unihemisférico durante um registro noturno. Esses episódios assimétricos apresentam curta duração (conforme apresentado anteriormente) e comumente estão associados ao fechamento ocular. Infelizmente não fomos capazes de identificar estados associados de fechamento ocular unilateral durante esses períodos de sono unihemisférico. Como exemplificado abaixo, observam-se predominância de potências mais intensas nas frequências lentas (entre 0 e 4 Hz) durante o sono de ondas lentas em ambos os hemisférios, excetuando um curto período (entre 2 e 6 s) no hipocampo direito que apresentou um traçado similar ao de vigília (comparar com figura 5), caracterizando assim um episódio de sono unihemisférico.

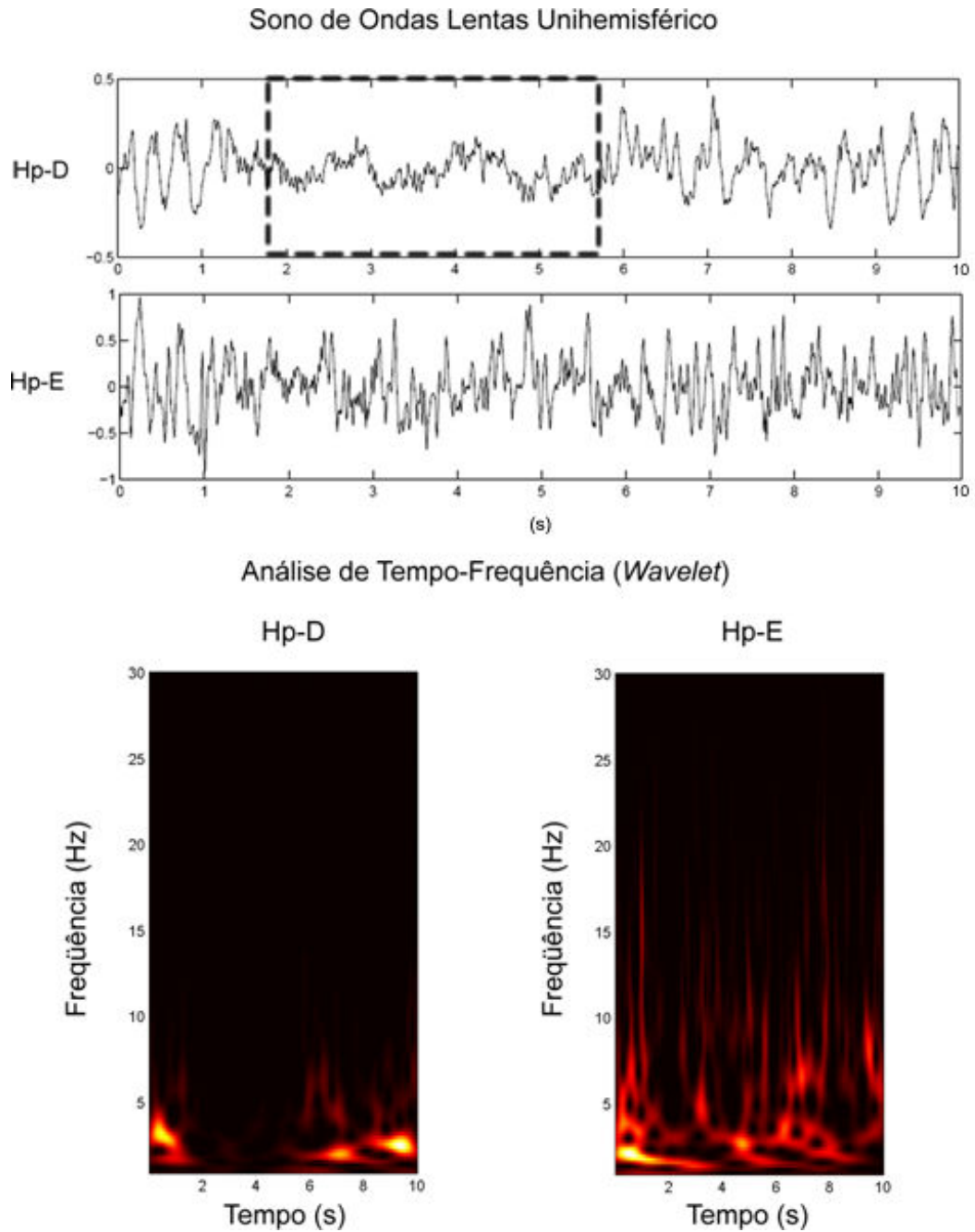


Figura 16: Traçado eletrográfico hipocampal bilateral evidenciando um episódio de sono de ondas lentas unihemisférico (USWS) e os dados respectivos da análise de *wavelet*. Barra vertical em μV .

4 DISCUSSÃO

Os dados eletrográficos obtidos corroboram estudos comportamentais prévios do nosso laboratório onde a injeção sistêmica de 5-HT e 8-OH-DPAT aumentou de forma dose-dependente o comportamento similar ao sono (SLB) em pombos com livre acesso a comida e água, sendo este aumento associado ao aumento específico dos estados eletrográficos de sonolência, sono de ondas lentas e sono REM nos animais tratados com 5-HT e sono de ondas lentas nos animais que receberam 8-OH-DPAT.

Além de provocar um estado de sono intenso, a administração de 5-HT e do agonista 5-HT_{1A} também foi capaz de diminuir consideravelmente a latência para esses episódios relacionados ao sono (com exceção do estado de DRW nos animais que receberam 8-OH-DPAT), sendo esses episódios ocasionalmente interrompidos por breves períodos de vigília onde podem ser observados comportamentos ingestivos ou relacionados à auto-limpeza e/ou locomoção.

Nossos dados corroboram estudos comportamentais realizados em codornas, onde injeções sistêmicas de hidroxitriptofano, 5-HT ou quipazina (um agonista de receptores 5-HT_{2A-2C-3}) promovem rapidamente uma postura de sono, caracterizada pelo eriçamento das penas, movimentos orais rápidos, piscadelas, adoção de uma postura agachada e fechamento dos olhos. Os comportamentos promovidos pela 5-HT não foram afetados pelo pré-tratamento com quetanserina (um antagonista 5-HT_{2A-2C}), sugerindo que esses efeitos podem ser mediados por outros receptores serotoninérgicos além dos 5-HT_{2A-2C} (Polo *et al.*, 2007).

Embora a injeção icv de 5-HT em perus e em frangos do tipo *broiler* tenha causado hipofagia (comportamento também observado em pombos), não foram notadas respostas dipsogênicas ou hipnogênicas (Denbow *et al.*, 1982; Denbow, 1984), enquanto efeitos

hipofágicos e dipsogênicos, mas nenhum relato hipnogênico foi observado em galinhas do tipo *leghorn* com livre acesso a comida (Denbow *et al.*, 1983).

O agonista seletivo 8-OH-DPAT possui alta afinidade para receptores serotoninérgicos do subtipo $1A$ (De Vry e Schreiber, 2000) e sua injeção sistêmica em pombos (nas doses e via utilizadas nesse trabalho) diminuem o conteúdo de ácido 5-hidróxiindoleacético (5-HIAA) presentes no fluido cerebrospinal, sem afetar outros metabólitos monoaminérgicos (Mansbach *et al.*, 1988; Gleeson *et al.*, 1992). Este efeito é consistente com uma redução da atividade neuronal serotoninérgica, observada em mamíferos após ativação de autoreceptores somatodendríticos $5-HT_{1A}$, sugerindo que pelo menos parte do padrão comportamental e eletrográfico descrito aqui pode ser atribuída a atividade diminuída de circuitos serotoninérgicos.

De forma interessante, injeções icv de 8-OH-DPAT em pombos não foram capazes de provocar efeitos hipnogênicos (Steffens *et al.*, 1997; Da silva *et al.*, 2004), exceto após injeção de uma dose maior (60 nmol, Steffens *et al.*, 2001), assim como nenhum efeito foi observado após injeção local do agonista em neurônios imunoreativos à 5-HT presentes em áreas mediais pontomesencefálicas (Häckl *et al.*, 2005). Embora esses trabalhos tenham relatado forte efeito dipsogênico, leve efeito hiperfágico e praticamente nenhum aumento significativo no SLB, nossos dados sugerem que a intensa e antecipada resposta hipnogênica ao 8-OH-DPAT administrado sistemicamente pode ser mediada por receptores $5-HT_{1A}$ localizados em locais distantes daqueles alcançados pelas injeções icv ou pontomesencefálica, possivelmente em regiões do tronco encefálico caudal ou em receptores localizados periféricamente.

Os traçados eletrográficos após injeções de 5-HT e 8-OH-DPAT indicaram que os efeitos hipnogênicos desencadeados estão associados à diminuição do tempo de vigília e a um aumento específico dos estados eletrográficos de SWS. A administração de 5-HT ainda foi

capaz de aumentar os estados de sonolência e sono REM de forma dose-dependente em relação ao grupo controle enquanto os animais que receberam 8-OH-DPAT mantiveram a duração dos episódios de sonolência e não demonstraram episódios de sono REM.

Os aspectos gerais do EEG hipocampal durante os estados de sono e vigília, pelo exame visual, são indistinguíveis daqueles observados nos pombos não tratados (durante registro noturno) ou que receberam veículo (durante registro vespertino). A ausência de sono REM em nossos registros (controle diurno e tratados com 8-OH-DPAT) pode ser um indício de que nossos animais não estavam totalmente adaptados às injeções, ao procedimento de registro e/ou o ambiente de registro. Szymczak e colaboradores relataram ter dificuldades para definir os estados eletrográficos de sono mesmo em pássaros bem adaptados, sendo o sono REM mais influenciado que o SWS. Além disso, uma redução do sono REM foi observada em corvos que foram insuficientemente adaptados as condições do laboratório (Szymczak *et al.*, 1986). Entretanto, o tempo gasto pelos nossos animais em comportamentos de sono durante o monitoramento do EEG assemelha-se aos dados comportamentais obtidos em trabalhos prévios de nosso laboratório que enfocaram aspectos ingestivos e hipnogênicos desencadeados pela administração sistêmica do 8-OH-DPAT (Santos *et al.*, 2005), sugerindo que o registro eletrográfico não afeta significativamente o tempo total de sono. Além disso, nossos registros foram desenvolvidos durante a parte ativa do ciclo desses animais, quando episódios de sono REM são menos freqüentes em relação ao período escuro do ciclo (Walker e Berger, 1972; Van Twyver e Allison, 1972; Phillips e Berger, 1989), sugerindo que a ausência de sono REM pode ter sido ocasional e que o tratamento com 8-OH-DPAT não afetou sua baixa incidência.

De forma interessante, em roedores a serotonina (ou seus agonistas, administrados via i.c.v., i.p. ou s.c.) compartilha com outros neurotransmissores a habilidade de promover a vigília e suprimir o sono REM, sendo que receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C}, 5-HT₃ e 5-

HT₇ são expressos em estruturas relevantes na modulação do sono e vigília, envolvendo o córtex cerebral, tálamo, locus coeruleus, núcleo dorsal da rafe e hipocampo (Monti e Jantos, 2009). Ao contrário dos resultados aqui apresentados, injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT em ratos, em doses similares (0,375 mg/kg), demonstraram aumentar a duração de vigília e diminuir o SWS e sono REM nas 2 primeiras horas de registro após tratamento (Bjorvatn *et al.*, 1997 e Sørensen *et al.*, 2001), enquanto uma dose menor (0,010 mg/kg) não provocou alterações nos estados de sono, embora o aumento do SWS foi observado em ratos após injeções sistêmicas da mesma dose baixa de 8-OH-DPAT (0,010 mg/kg s.c.) (Monti e Jantos, 1992), indicando que a discrepância entre esses resultados ainda não parece estar resolvido.

Em humanos, a administração sistêmica de agonistas do receptor 5-HT_{1A} tem demonstrado inibir o sono REM tanto em pacientes saudáveis quanto acometidos por depressão (Gillin *et al.*, 1994; Gillin *et al.*, 1996; Seifritz *et al.*, 1998). Nossos dados também diferem dos resultados obtidos a partir de injeções centrais de 8-OH-DPAT em mamíferos, onde a perfusão ou injeção em bolus de 8-OH-DPAT no núcleo dorsal da rafe aumentaram o sono REM de ratos (Bjorvatn *et al.*, 1997; Bjorvatn e Ursin, 1998; Monti e Jantos, 2002) e em gatos (Portas *et al.*, 1996) mas não modificaram os índices de vigília ou SWS. Esses dados podem indicar que embora circuitos mediados por receptores 5-HT_{1A} possuam um papel importante no controle dos estados de sono e vigília em mamíferos e pássaros, suas ações sobre esses estados podem divergir profundamente.

A administração do antagonista 5-HT_{1A} WAY 100635 é capaz de aumentar a frequência de disparos de neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe de mamíferos tanto em experimentos eletrofisiológicos *in vitro* quanto *in vivo* e aumentou significativamente a liberação de 5-HT no hipocampo durante a vigília atenta (mas não durante a vigília relaxada ou sono), sugerindo que aferentes 5-HT podem exercer um controle tônico, inibitório e relacionado ao estado sobre receptores 5-HT_{1A} nesses neurônios (Fletcher *et al.*, 1996; Fornal

et al., 1996; Munday *et al.*, 1996). Estudos prévios no nosso laboratório indicam que a injeção sistêmica de WAY 100635, em doses suficientes para bloquear os efeitos ingestivos e hipnogênicos de 8-OH-DPAT, reduz o tempo gasto no SLB dos pombos durante o período ativo do ciclo claro-escuro, sugerindo que um controle tônico inibitório de neurônios serotoninérgicos relacionados à vigília e mediados por receptores 5-HT_{1A}, pode também estar presente em pombos durante o período claro do dia.

Curiosamente, receptores 5-HT₇ também são ativados por 8-OH-DPAT, que possui afinidade de ligação para os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₇ semelhante a 5-HT (Stowe e Barnes, 1998), e a ativação desses receptores ou a interação entre eles (Madden e Morrison, 2008) tem-se mostrado relevante em promover diferentes efeitos endócrinos e térmicos (Faure *et al.*, 2006). Recentemente observou-se em mamíferos que o reinício do relógio supraquiasmático por injeções de 8-OH-DPAT, um efeito relacionado ao domínio funcional do sono e vigília, é bloqueado por um antagonista 5-HT₇, mas não por um antagonista 5-HT_{1A} (Mendoza *et al.*, 2008). WAY 100635 também se mostrou capaz de bloquear de forma dose dependente a capacidade do 8-OH-DPAT em inibir o disparo de neurônios serotoninérgicos da rafe dorsal e induzir hipotermia, hiperfagia e elevar os níveis plasmáticos do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) (Fletcher *et al.*, 1996).

Durante a análise quantitativa o tratamento com 5-HT foi capaz de alterar efetivamente a atividade espectral principalmente nos estados de SWS, onde notou-se no hipocampo esquerdo o aumento das potências da SWA do grupo tratado em relação ao controle (efeito este não corroborado no hipocampo contralateral) e durante sono REM, onde constatou-se uma transição das potências prevalentes entre os grupos tratados e controle. De um modo interessante, a administração de 8-OH-DPAT não foi capaz de replicar esses efeitos durante a análise espectral, sugerindo que esta droga causa um ínfimo efeito, ou nenhum, sobre a atividade elétrica hipocampal durante os estados de sono e vigília identificados,

indicando que o sono induzido pelo 8-OH-DPAT apresenta-se, do ponto de vista eletrográfico, similar ao sono diurno natural de pombos.

Esses resultados não correlacionados e aparentemente inconclusivos encontrados principalmente após a administração de 8-OH-DPAT parecem assemelhar-se a dados de outros estudos realizados em aves e mamíferos. A oscilação entre a atividade de ondas lentas (delta, entre 0,5 e 4 Hz) foi observada durante registros noturnos em mamíferos e aves (Szymczak *et al.*, 1996), embora estudos em pombos e galinhas tenham demonstrado resultados contraditórios. Enquanto Tobler e Borbély (1988) não encontraram dados consistentes na SWA de pombos, Van Luijtelaar e colaboradores (1987) encontraram uma diminuição significativa desta atividade em galinhas. A inconsistência dos dados espectrais durante os estados de vigília e sono relatados por inúmeros pesquisadores (Zepelin *et al.*, 1982; Walker *et al.*, 1983) conduzem a uma imprecisão de um consenso que possa definir um padrão espectral da faixa delta quando registros contínuos são efetuados. Além disso, as diferenças da análise espectral do registro de vários estados de vigília em aves são pouco estudadas (Tobler e Borbély, 1988).

A análise espectral da região palial posterior de pombos revelou uma resposta diferente em relação a outras regiões avaliadas. A intensidade da potência na região palial posterior esquerda permaneceu inalterada após privação do sono de pombos, enquanto a mesma região no hemisfério direito demonstrou pronunciado aumento da intensidade média da potência entre 2,5 Hz. (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2008). Este mesmo trabalho revela que pombos domésticos não demonstraram um declínio acentuado da SWA do SWS durante o registro eletrográfico noturno, ao contrário de outros estudos relacionados ao sono de aves. O declínio do SWA durante a noite foi descrito em galinhas domésticas (*Gallus domesticus*; frequências predominantes entre 2,5–5,0 Hz, ondas de alta amplitude; van Luijtelaar *et al.*, 1987), *blackbirds* europeus (*Turdus merula*; densidade de potencia entre 0,5–4,0 Hz;

Szymczak et al., 1996), pardais não migratórios (*Zonotrichia leucophrys gambelii*; densidade de potência entre 1,5–2,5 Hz; Rattenborg et al., 2004) e rouxinóis não migratórios (*Catharus ustulatus*; densidade de potência entre 1,5–4,0 Hz; Fuchs, 2006).

Além disso, as discrepâncias da análise espectral parecem ser local-dependentes. Em contraste ao palio anterior e medial direito e esquerdo, onde o efeito da privação de sono por curto período sobre a SWA foi evidente e amplamente similar, os resultados para o palio posterior foram inconclusivos. Enquanto o hemisfério esquerdo não mostrou aumento significativo em qualquer banda de frequência durante o primeiro quarto da noite de recuperação após privação de sono, o palio posterior direito mostrou grande aumento da SWA. Devido a marcante variabilidade entre os dados encontrados em pássaros, este aumento foi apenas significativo para as bandas de frequência entre 0,78 e 1,17 Hz (Martinez-Gonzalez, 2008).

De forma complementar, utilizamos a análise espectral de *wavelet* de Morlet para ressaltar os episódios de sono NREM, REM e sono unihemisférico encontrados durante nossos estudos. Diferente da tradicional transformada rápida de Fourier, a utilização da análise de *wavelet* tem como principal vantagem o estudo combinado dos domínios de tempo e frequência, além de apresentar uma melhor resolução entre a decomposição espectral dos potenciais calculados em cada ponto de tempo em relação à Fourier análoga, a Transformada de Fourier de Curto Período (STFT) (Tallon-Baudry et al., 1997).

Encontramos após o tratamento com 5-HT e seu agonista 5-HT_{1A}, durante registros noturnos e raramente nos animais que receberam veículo durante o período vespertino, episódios de curto período de sono unihemisférico. De forma interessante, tanto os animais tratados com 5-HT e 8-OH-DPAT quanto os animais registrados durante a noite, apresentaram uma antecipação na demonstração desse fenômeno, concomitante ao aumento da duração total de sono unihemisférico e diminuição da duração desses episódios (exceto o

grupo 8-OH-DPAT de maior dose) em relação aos animais que receberam apenas veículo durante o período vespertino.

Episódios de sono unihemisférico são amplamente observados em mamíferos aquáticos, como golfinhos, baleias, leões e elefantes marinhos, entre outros (Rattenborg *et al.*, 2000; Lyamin *et al.*, 2008a; Lyamin *et al.*, 2008b), e na grande maioria das aves estudadas, como em galinhas, perus, *blackbirds* europeus, entre outras (Szymczak *et al.*, 1996; Rattenborg *et al.*, 2000; Ayala-Guerrero *et al.*, 2003; Mascetti *et al.*, 2007; Bobbo *et al.*, 2008; Rattenborg *et al.*, 2008). Embora um estudo prévio não tenha revelado a presença de sono unihemisférico durante o registro eletrográfico contínuo de 24 horas em pombos domésticos (Tobler e Borbély, 1988), trabalhos mais recentes tem evidenciado este fenômeno também em columbiformes, tanto durante o registro eletrográfico quanto na associação do fechamento unilateral dos olhos (Rattenborg *et al.*, 2001; Rattenborg *et al.*, 2005; Rattenborg *et al.*, 2008).

Infelizmente, devido à presença de apenas uma vídeo-câmera durante nossos registros eletrográficos, não foi possível determinar se houve ou não correlação entre o fechamento ocular unilateral e o sono unihemisférico eletrográfico nas aves estudadas. Tal correlação foi realizada em um estudo recente que utilizou 4 câmeras para monitorar cada ave. Como resultado, os autores observaram em determinado hemisfério um predomínio de ondas lentas (2-4 Hz) quando o olho contralateral encontrava-se fechado, e também notaram que esses pombos mantiveram o olho aberto durante os períodos de assimetria interhemisférica para monitorar o ambiente que os cerca (Rattenborg *et al.*, 2001).

Este mesmo trabalho relata que ao correlacionar o fechamento ocular com a atividade assimétrica hemisférica, os pombos gastam aproximadamente entre 14 e 18% do ciclo escuro em episódios de sono unihemisférico, enquanto durante o ciclo claro a incidência destes episódios cai para 11% aproximadamente (Rattenborg *et al.*, 2001). Diferentemente do que é notado em nossos dados, durante a fase escura, os mesmos autores observaram que os pombos

demonstraram episódios de sono assimétrico de aproximadamente 2 minutos. Tal aumento na duração desses episódios em relação aos nossos dados (entre 3 e 4 s aproximadamente) pode ser explicado por tratarem-se de registros noturnos, onde a incidência de episódios de sono profundo é muito maior em relação ao período diurno. De forma similar aos nossos achados, o estudo do sono em *blackbirds* europeus revelou uma duração média dos episódios de sono unihemisférico entre 2 e 4 s, somando-se durante a noite aproximadamente 140-200 s (Szymczak *et al.*, 1996). Em um recente estudo, Newman e colaboradores (2008) relatam não ter encontrado episódios prolongados de sono assimétrico (dados não mostrados) durante experimentos de privação de sono em pombos, atribuindo a possibilidade de camuflagem desses episódios de sono unihemisférico a artefatos de movimento.

Os trabalhos relatados, em consonância com os nossos achados, sugerem que enquanto circuitos serotoninérgicos podem possuir um importante papel no controle de estados de sono e vigília em pássaros, os efeitos comportamentais e eletrográficos da ativação de receptores 5-HT_{1A} podem estar intensamente ligados às espécies estudadas. Sabendo da existência de poucas evidências para heterogeneidade interespecífica de perfis farmacológicos ou seqüências genéticas dos receptores 5-HT_{1A} (Price *et al.*, 1996), uma possível relação entre essas diferenças e as espécies, e o forte e divergente procedimento de seleção artificial imposto sobre as espécies de aves domésticas (conduzindo a diferentes funções de balanço energético como ganho de peso e alimentação) merece ser alvo de investigação.

Trabalhos relacionados aos efeitos de drogas serotoninérgicas sobre a ingestão de alimentos, sono e outros comportamentos espontâneos de pombos podem também ser relevantes para a compreensão de mecanismos associados a sensibilidade dessa espécie a efeitos de anti-conflito ou ansiolíticos causados pelos seus agonistas (Mansbach *et al.*, 1988; Barrett e Gleason, 1992; Barrett *et al.*, 1994). É importante ressaltar que receptores 5-HT_{1A} são essenciais para o controle de comportamentos defensivos e estão relacionados à ansiedade

em mamíferos (Stefanski *et al.*, 1993; File e Gonzalez, 1996; File *et al.*, 1996; Gross *et al.*, 2002; Gordon *et al.*, 2005) e que o pombo tem-se evidenciado como um modelo sensível para a investigação dos efeitos ansiolíticos causados pela administração de agonistas serotoninérgicos. Injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT, numa faixa de dose similar a utilizada neste trabalho e que é capaz de diminuir a atividade de neurônios 5-HT em pombos (Mansbach *et al.*, 1988; Gleeson *et al.*, 1992), aumentam a frequência do comportamento de bicar em testes onde esta resposta é punida por um estímulo elétrico, mas não altera os níveis das respostas durante testes sem punição (Mansbach *et al.*, 1988; Barrett e Gleeson, 1992; Barrett e Vanover, 1993; Barrett *et al.*, 1994a; Barrett *et al.*, 1994b; Kleven e Koek, 1996; Kleven e Koek, 1998; Koek *et al.*, 1998). Esses dados sugerem que, assim como observado em mamíferos, receptores 5-HT_{1A} podem possuir papéis importantes na expressão de comportamentos defensivos ou relacionados ao medo, e isso pode ser um atributo conservado das funções dos receptores 5-HT₁ de espécies amniotas. De forma resumida, o presente trabalho indicou que circuitos serotoninérgicos possuem papel crucial sob mecanismos que controlam os estados de sono e vigília e outros comportamentos espontâneos tanto em mamíferos como em aves, podendo a ação sob esses estados, sua localização no encéfalo e o papel desses receptores serotoninérgicos representar uma variação inter-específica substancial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, M.L.; DO VALLE, A.C.; TIMO-IARIA, C.; TUFIK, S. **Implantação de eletrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato**. São Paulo, Universidade Federal de São Paulo, 2001.

ANDRÉ, E.S. **Efeitos da escopolamina, mecamilamina e eserina sobre o eletroscilograma hipocampal de pombos (*Columba livia*)**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de mestre em Neurociências, Florianópolis, 1997.

AYALA-GUERRERO, F. Sleep patterns in the parakeet *Melopsittacus undulatus*. **Physiology and Behavior**, 46:787-791, 1989.

AYALA-GUERRERO, F.; MEXICANO, G.; RAMOS, J.I. Sleep characteristics in the turkey *Meleagris gallopavo*. **Physiology and Behavior**, 78:435-440, 2003.

BARRETT, J.E.; GLEESON, S. Discriminative stimulus effects of 8-OH-DPAT in pigeons: antagonism studies with the putative 5-HT_{1A} receptor antagonists BMY 7378 and NAN-190. **European Journal of Pharmacology**, 217:163-171, 1992.

BARRETT, J.E.; VANOVER, K.E. 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanisms and future directions. **Psychopharmacology (Berl)**, 112(1):1-12, 1993.

BARRETT, J.E.; GAMBLE, E.H.; ZHANG, L.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.O. Anticonflict and discriminative stimulus effects in the pigeon of a new methoxy-chroman 5-HT_{1A} agonist, (+)S 20244 and its enantiomers (+)S 20499 and (-)S 20500. **Psychopharmacology (Berl)**, 116:73-78, 1994a.

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

BERGER, R.J.; PHILLIPS, N.H. Constant light suppresses sleep and circadian rhythms in pigeons without consequent sleep rebound in darkness. **The American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 267(4):R945-R952, 1994.

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 Research**, 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. **Reviews in the Neurosciences**, 9:265-273, 1998.

BOBBO, D.; NELINI, C.; MASCETTI, G.G. Binocular and monocular/unihemispheric sleep in the domestic chick (*Gallus gallus*) after a moderate sleep deprivation. **Experimental Brain Research**, 185:421-427, 2008.

BRUN, S.R.M.; DA 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. **Regulatory Peptides**, 98:127-135, 2001.

BRUNO-NETO, R.; ANDRÉ, E.S.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. **Análise qualitativa e quantitativa do eletroscilograma hipocampal em diferentes estados comportamentais em pombos**. XI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais, 1996.

CAMPBELL, S.S.; TOBLER, I. Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. **Neuroscience and Biobehavioral Review**, 8:269-300, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – COBEA. **Os princípios éticos da experimentação animal**. São Paulo, 1991.

DA SILVA, R.A.; OLIVEIRA, S.T.; HÄCKL, 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 Research**, 1026:275-283, 2004.

DE VRY J, SCHREIBER R. Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 24:341–353, 2000.

DENBOW, D.M. Body temperature and food intake of turkeys following ICV injections of serotonin. **Nutrition and Behavior**, 1:301-304, 1984.

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

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

DZOLJIC, M.R.; UKPONMWAN, O.E.; SAXENA, P.R. 5-HT₁-like receptor agonists enhance wakefulness. **Neuropharmacology**, 31(7):623-633, 1992.

ENGLISH, P.J.; WILDING, J.P.H. Applied physiology: the control of weight. **Current Paediatrics**, 16:439-446, 2006.

FAURE, C.; MNIE-FILALI, O.; SCARNA, H.; DEBONNEL, G.; HADDJERI, N. Effects of the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 on rat hormonal and temperature responses to the 5-HT_{1A/7} receptor agonist 8-OH-DPAT. **Neuroscience Letters**, 404(1-2):122-126, 2006.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A} receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 54:123-128, 1996.

FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **Journal of Neuroscience**, 16:4810-4815, 1996.

FLETCHER, A.; FORSTER, E.A.; BILL, D.J.; BROWN, G.; CLIFFE, I.A.; HARTLEY, J.E.; JONES, D.E.; MCLENACHAN, A.; STANHOPE, K.J.; CRITCHLEY, D.J.; CHILDS, K.J.; MIDDLEFELL, V.C.; LANFUMEY, L.; CORRADETTI, R.; LAPORTE, A.M.; GOZLAN, H.; HAMON, M.; DOURISCH, C.T. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. **Behavioural Brain Research**, 73(1-2):337-353, 1996.

FORNAL, C.A.; METZLER, C.W.; GALLEGOS, R.A.; VEASEY, S.C.; MCCREARY, A.C.; JACOBS, B.L. WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine_{1A} antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 278(2):752-762, 1996.

FRANK, M.G.; STRYKER, M.P.; TECOTT, L.H. Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT_{2C} receptor. **Neuropsychopharmacology**, 27:869-873, 2002.

FUCHS, T.; SIEGEL, J.J.; BURGDORF, J.; BINGMAN, V.P. A selective serotonin reuptake inhibitor reduces REM sleep in the homing pigeon. **Physiology and Behavior**, 87:575-581, 2006.

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; ODETTI, F.; BINGMAN, V.P.; SIEGEL, J.J.; VALLORTIGARA, G. Hippocampus and homing in pigeons: left and right hemispheric differences in navigational map learning. **European Journal of Neuroscience**, 13:1617-1624, 2001.

GAGLIARDO, A.; ODETTI, F.; IOALÈ, P.; BINGMAN, V.P.; TUTTLE, S.; VALLORTIGARA, G. Bilateral participation of the hippocampus in familiar landmark navigation by homing pigeons. **Behavioural Brain Research**, 136:201-209, 2002.

GARCIA-RILL, E.; KOBAYASHI, T.; GOOD, C. The developmental decrease in REM sleep. **Thalamus and Related Systems**, 2:115-131, 2003.

GILLIN, J.C.; BUCHSBAUM, M.S.; VALLADARES-NETO, D.C.; HONG, C.C.H.; HAZLETT, E.; LANGER, S.Z.; WU, J. Effects of zolpidem on local cerebral glucose metabolism during nonREM sleep in normal volunteers: a positron emission tomography study. **Neuropsychopharmacology**, 15: 302-313, 1996.

GILLIN, J.C.; JERNAJCZYK, W.; VALLADARES-NETO, D.C.; GOLSHAN, S.; LARDON, M.; STAHL, S. Inhibition of REM sleep by ipsapirone, a 5HT_{1A} agonist, in normal volunteers. **Psychopharmacology**, 116: 433-436, 1994.

GLEESON, S.; WEISSMAN, B.A.; SEGEL, M.R.; BARRETT, J.E. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. **European Journal Pharmacology**, 229(2-3):109-15, 1992.

GORDON, J.A.; LACEFIELD, C.O.; KENTROS, C.G.; HEN, R. State-dependent alterations in hippocampal oscillations in serotonin 1A receptor-deficient mice. **Journal of Neuroscience**, 25(28):6509–6519, 2005.

GREEN, A.R. Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamine. **British Journal of Pharmacology**, 147:S145-S152, 2006.

GROSS, C.; ZHUANG, X.; STARK, K.; RAMBOZ, S.; OOSTING, R.; KIRBY, L.; SANTARELLI, L.; BECK, S.; HEN, R. Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. **Nature**, 416:396–400, 2002.

HÄCKL, L.P.N.; RICHTER, G.O.; FARIA, M.S.; 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 Research**, 1035:154-167, 2005.

HARTSE, K.M. Sleep in insects and nonmammalian vertebrates. In: M.H. Kryger, T. Roth e W.C. Dement (Eds) *Principles and Practice of Sleep Medicine*, 2nd edn. W.B. Saunders, Philadelphia, 1994: 95-104.

HOBSON, J.A.; PACE-SCHOTT, E.F. The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems consciousness and learning. **Neuroscience**, 3:679-693, 2002.

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). **Pharmacological Reviews**, 46(2):157-203, 1994.

JULIUS, D. Molecular biology of serotonin receptors. **Annual Review of Neuroscience**, 14:335-360, 1991.

KANTOR, S.; JAKUS, R.; BALOGH, B.; BENKO, A.; BAGDY, G. Increased wakefulness, motor activity and decreased theta activity after blockade of the 5-HT_{2B} receptor by the subtype-selective antagonist SB-215505. **British Journal of Pharmacology**, 142:1332-1342, 2004.

KARTEN, H.J.; HODOS, W. **A Stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*)**. Baltimore, Johns Hopkins, 1967.

KIKTA, D.C.; BARNEY, C.C.; THREATTLE, R.M.; FREGLY, M.J.; ROWLAND, N.E.; GREENLEAF, J.E. On the mechanism of serotonin-induced dipsogenesis in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 19:519-525, 1983.

KLEVEN, M.S.; KOEK, W. Pharmacological characterization of in vivo properties of putative mixed 5-HT_{1A} agonist/5-HT_{2A/2C} antagonist anxiolytics. I. Antipunishment effects in the pigeon. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 276(2):388-397, 1996.

KLEVEN, M.S.; KOEK, W. Discriminative stimulus effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in pigeons and rats: species similarities and differences. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 284:238-249, 1998.

KOEK, W.; PATOISEAU, J.F.; ASSIE', M.B.; COSI, C.; KLEVEN, M.S.; DUPONT-PASSELAIGUE, E.; CARILLA-DURAND, E.; PALMIER, C.; VALENTIN, J.P.; JOHN, G.; PAUWELS, P.J.; TARAYRE, J.P.; COLPAERT, F.C. F 11440, a potent, selective, high efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist with marked anxiolytic and antidepressant potential. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 287:266–283, 1998.

KOELLA, W.P.; CZICMAN, J.S. Mechanism of the EEG-synchronizing action of serotonin. **The American Journal of Physiology**, 211:926-934, 1966.

LYAMIN, O.I.; LAPIERRE, J.L.; KOSENKO, P.O.; MUKHAMETOV, L.M.; SIEGEL, J.M. Electroencephalogram asymmetry and spectral power during sleep in the northern fur seal. **Journal of Sleep Research**, 17:154-165, 2008a.

LYAMIN, O.I.; MANGER, P.R.; RIDGWAY, S.H.; MUKHAMETOV, L.V.; SIEGEL, J.M. Cetacean sleep: an unusual form of mammalian sleep. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 32:1451-1484, 2008b.

LUCKI, I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biological Psychiatry**, 44:151-162, 1998.

LUEBKE, J.I.; GREENE, R.W.; SEMBA, K.; KAMONDI, A.; MCCARLEY, W.; REINER, P.B. Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 89:743-747, 1992.

MADDEN, C.J.; MORRISON, S.F. Brown adipose tissue sympathetic nerve activity is potentiated by activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A}/5-HT₇ receptors in the rat spinal cord. **Neuropharmacology**, 54:487-496, 2008.

MANSBACH, R.S.; HARROD, C.; HOFFMANN, S.M.; NADER, M.A.; LEI, Z.; WITKIN, J.M.; BARRETT, J.E. Behavioral studies with anxiolytic drugs. V. Behavioral and *in vivo* neurochemical analyses in pigeons of drugs that increase punished responding. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 246(1):114-120, 1988.

MARTINEZ-GONZALEZ, D.; LESKU, J.A.; RATTENBORG, N.C. Increased EEG spectral power density during sleep following short-term sleep deprivation in pigeons (*Columba livia*): evidence for avian sleep homeostasis. **Journal of Sleep Research**, 17:140-153, 2008.

MASCETTI, G.G.; RUGGER, M.; VALLORTIGARA, G.; BOBBO, D. Monocular-unihemispheric sleep and visual discrimination learning in the domestic chick. **Experimental Brain Research**, 176:70-84, 2007.

MENDOZA, J.; CLESSE, D.; PÉVET, P.; CHALLET, E. Serotonergic potentiation of dark pulse-induced phase-shifting effects at midday in hamsters. **Journal of Neurochemistry**, 106(3):1404-1414, 2008.

MONTI, J.M.; JANTOS, H. Dose-dependent effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on sleep and wakefulness in the rat. **Journal of Sleep Research**, 1(3):169-175, 1992.

MONTI, J.M.; JANTOS, H. **The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking** in DI GIOVANNI, G; DI MATTEO, V e ESPOSITO, E. Progress in Brain Research, vol. 172, cap. 29, 2009.

MONTI, J.M.; JANTOS, H.; MONTI, D. Increased REM sleep after intra-dorsal raphe nucleus injection of flesinoxan or 8-OHDPAT: prevention with WAY 100635. **European Neuropsychopharmacology**, 12:47–55, 2002.

MUNDEY, M.K.; FLETCHER, A.; MARSDEN, C.A. Effects of 8-OH-DPAT and 5-HT_{1A} antagonists WAY100635 and WAY100135, on guinea-pig behaviour and dorsal raphe 5-HT neurone firing. **British Journal of Pharmacology**, 117:750-756, 1996.

NEMEROFF, C.B.; OWENS, M.J. Treatment of mood disorders. **Nature Neuroscience (supplement)**, 5:1068-1070, 2002.

NEWMAN, S.M.; PALETZ, E.M.; RATTENBORG, N.C.; OBERMEYER, W.H.; BENCA, R.M. Sleep deprivation in the pigeon using the Disk-Over-Water method. **Physiology and Behavior**, 93:50-58, 2008.

NICOLAU, M.C.; AKAÂRIR, M.; GAMUNDÍ, A.; GONZÁLEZ, J.; RIAL, R.V. Why we sleep: the evolutionary pathway to the mammalian sleep. **Progress in Neurobiology**, 62:379-406, 2000.

PHILLIPS, N.H.; BERGER, R.J. Metabolism and body temperature during circadian sleep in the fed and fasting pigeon. In: REINERTSEN, R.E.; BECH, C. editors. **Physiology of Cold Adaption in Birds**, New York:Plenum, 265–74, 1989.

POLO, P.A.; REIS, R.O.; CEDRAZ-MERCEZ, P.L.; CAVALCANTE-LIMA, H.R.; OLIVARES, E.L.; MEDEIROS, M.A.; CÔRTEZ, W.S.; REIS, L.C. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). **Brazilian Journal of Biology**, 67(1):167-171, 2007.

PORTAS, C.M.; THAKKAR, M.; RAINNIE, D.; MCCARLEY, R.W. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OHDPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. **Journal of Neuroscience**, 16: 2820-2828, 1996.

PRICE, G.W.; ROBERTS, C.; WATSON, J.; BURTON, M.; MULHOLLAND, K.; MIDDLEMISS, D.N.; JONES, B.J. Species differences in 5-HT autoreceptors. **Behavioural Brain Research**, 73:79-82, 1996.

RAPPORT, M.M.; GREEN, A.A.; PAGE, I.H. Serum vasoconstrictor (serotonin). III. Chemical inactivation. **The Journal of Biological Chemistry**, 176:1243-1251, 1948.

RATTENBORG, N.C. Evolution of slow-wave sleep and palliopallial connectivity in mammals and birds: a hypothesis. **Brain Research Bulletin**, 69:20-29, 2006.

RATTENBORG, N.C.; AMLANER, C.J.; LIMA, S.L. Behavioral, neurophysiological and evolutionary perspectives on unihemispheric sleep. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 24:817-842; 2000.

RATTENBORG, N.C.; AMLANER, C.J.; LIMA, S.L. Unilateral eye closure and interhemispheric EEG asymmetry during sleep in the pigeon (*Columba livia*). **Brain, Behavior and Evolution**, 58:323-332, 2001.

RATTENBORG, N.C.; MANDT, B.H.; OBERMEYER, W.H.; WINSAUER, P.J.; HUBER, R.; WIKELSKI, M.; BENCA, R.M. Migratory sleeplessness in the White-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). **PLoS Biology**, 7(2):0924-0936, 2004.

RATTENBORG, N.C.; MARTINEZ-GONZALEZ, D; LESKU, J.A. Avian sleep homeostasis: Convergent evolution of complex brains, cognition and sleep functions in mammals and birds. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, 2008, doi:10.1016/j.neubiorev.2008.08.010

RATTENBORG, N.C.; OBERMEYER, W.H.; VACHA, E.; BENCA, R.M. Acute effects of light and darkness on sleep in the pigeon (*Columba livia*). **Physiology and Behavior**, 84:635-640, 2005.

ROMCY-PEREIRA, R.N.; DE ARAÚJO, D.B.; LEITE, J.P.; GARCIA-CAIRASCO, N. A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and coherence analysis. **Journal of Neuroscience Methods**, 167:384-392, 2008.

ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M.C.A.; DE OLIVEIRA, J.A.C.; GARCIA-CAIRASCO, N. EEG wavelet analyses of the *striatum-substantia nigra pars reticulata-superior colliculus* circuitry: audiogenic seizures and anticonvulsant drug administration in *Wistar audiogenic rats* (War strain). **Epilepsy Research**, 72:192-208, 2006.

SANTOS, M.M.; ARAÚJO, B.B.; SILVA, E.S.; FELISBINO, M.B.; HERDT, M.A.; FARIA, M.S.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. **Efeitos comportamentais de injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT (8OH) em pombos (*Columba livia*)**. XX Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais. Águas de Lindóia, São Paulo, 2005.

SEIFRITZ, E.; GILLIN, J.C.; RAPAPORT, M.H.; KELSOE, J.R.; BHATTI, T.; STAHL, S.M. Sleep EEG response to muscarinic and serotonin-1A receptor probe in patients with major depression and normal controls. **Biological Psychiatry**, 44:21-33, 1998.

SELL, I.M.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. **Effects of central injections of 5-HT, MK-212 or m-CPP on adrenaline-induced feeding behavior in pigeons**. XV Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais. Caxambu, Minas Gerais, 2000.

SHARPLEY, A.L.; ELLIOTT, J.M.; ATTENBURROW, M.J.; COWEN, P.J. Slow wave sleep in humans: role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2c} receptors. **Neuropharmacology**, 33(3-4):467-471, 1994.

SIEGEL, J.M. The neurotransmitters of sleep. **The Journal of Clinical Psychiatry**, 65(16):4-7, 2004.

SIEGEL, J.M. Clues to the functions of mammalian sleep. **Nature**, 437:1264-1271, 2005.

SØRENSEN, E.; GRØNLI, J.; BJORVATN, B.; URSIN, R. The selective 5-HT_{1A} receptor antagonist p-MPPI antagonizes sleep-waking and behavioural effects of 8-OH-DPAT in rats. **Behavioural Brain Research**, 121:181-187, 2001.

STEFANSKI, R.; PALEJKO, W.; BIDZINSKI, A.; KOSTOWSKI, W.; PLAZNIK, A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5-HT_{1A} receptor agonists. **Neuropharmacology**, 32: 977-985, 1993.

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 Research Bulletin**, 44:681-688, 1997.

STEFFENS, S.M.; ANDRIANI, V.M.A.; AZEVEDO, F.M.; BENEDETTI, M.A.; PASCHOAINI, M.A.; MARINO-NETO, J. **Sleep and serotonin in the pigeon**. I. Behavioral studies on the effects of icv injections of 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A/2C} and 5-HT₃ receptor agonists. XVI Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Anais. Caxambu, Minas Gerais, 2001.

STERIADE, M. Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems. **Neuroscience**, 137:1087-1106, 2006.

STOWE, R.L.; BARNES, N.M. Selective labelling of 5-HT₇ receptor recognition sites in rat brain using [3H]5-carboxamidotryptamine. **Neuropharmacology**, 37:1611-1619, 1998.

SZYMCZAK, J.T. Sleep pattern in the rook, *Corvus frugilegus*. **Acta Physiologica Polonica**, 37:191-198, 1986.

SZYMCZAK, J.T.; KAISER, W.; HELB, H.W.; BESZCZYNSKA, B. A study of sleep in the European Blackbird. **Psychology and Behavior**, 60(4):1115-1120, 1996.

TALLON-BAUDRY, C.; BERTRAND, O.; DELPUECH, C.; PERMIER, J. Oscillator gamma-band (30-70 Hz) activity induced by a visual search task in humans. **Journal of Neuroscience**, 17:722-734, 1997.

TOBLER, I.; BORBÉLY, A.A. Sleep and EEG spectra in the pigeon (*Columba livia*) under baseline conditions and after sleep deprivation. **Journal of Comparative Physiology, Part A: Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, 163:729-738, 1988.

TREDICI, A.L.D.; SCHIFFER, H.H.; BURSTEIN, E.S.; LAMEH, J.; MOHELL, N.; HACKSELL, UL; BRANN, M.R.; WEINER, D.M. Pharmacology of polymorphic variants of the human 5-HT_{1A} receptor. **Biochemical Pharmacology**, 67:479-490, 2004.

VAN LUIJTELAAR, E.L.J.M.; VAN DER GRINTEN, C.P.M.; BLOKHUIS, H.J.; COENEN, A.M.L. Sleep in the domestic hen (*Gallus domesticus*). **Physiology and Behavior**, 41:409-414, 1987.

VAN TWYVER, H.V.; ALLISON, T. A polygraphic and behavioral study of sleep in the pigeon (*Columba livia*). **Experimental Neurology**, 35:138-153, 1972.

WALKER, J.M.; BERGER, R.J. Sleep in the domestic pigeon (*Columba livia*). **Behavioral Biology**, 7:195-203, 1972.

WALKER, M.P.; STICKGOLD, R. Sleep, memory, and plasticity. **Annual Review Psychology**, 57:139-166, 2006.

WALKER, L.E.; WALKER, J.M.; PALCA, J.W.; BERGER, R.J. A continuum of sleep and shallow torpor in fasting doves. **Science**, 221:194-195, 1983.

ZEPELIN, H.; SIEGEL, J.M.; TOBLER, I. Mammalian sleep. In: KRYGER, M.H.; ROTH, T.; DEMENT, W.C. **Principles and Practice of Sleep Medicine**, pp 91-100, 2005.

ZEPELIN, H.; ZAMMIT, G.K.; MCDONALD, C.S.; CHOPP, M.; WANZIE, F.J.; COMAS, M.G. Sleep in the domestic duck. **Journal of Sleep Research**, 11:90, 1982.

RESUMO PUBLICADO EM CONGRESSO

I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina, Caribe e Península Ibérica (Neurolatam)

E.06.009 (RS25662B) - **Efeitos comportamentais e eletrográficos após administração sistêmica de 8-OH-DPAT em pombos (*Columba livia*)** Hoeller AA¹; dos Santos MM¹; Meneghelli C¹; Santos TS¹; Dallazen AR¹; Bruxel RR¹; André ES²; Marino-Neto J³ - ¹Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Ciências Fisiológicas; ²Universidade Regional de Blumenau - Departamento de Fisioterapia; ³Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Ciências Fisiológicas e Instituto de Engenharia Biomédica

Receptores 5-HT_{1A} têm sido associados ao controle de comportamentos de defesa, ingestão de alimentos/água e estados de sono e vigília (W) em mamíferos, mas são escassos os dados sobre o papel destes receptores em aves. Dados do nosso laboratório indicam que a injeção central de serotonina (5-HT) provoca intenso efeito hipnogênico em pombos. Este trabalho investigou os efeitos de injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT (8-OH, agonista de receptores 5-HT_{1A}) sobre o comportamento de sono (ou “sleep-like behavior”, SLB) e seus correlatos eletrográficos (atividade EEGráfica hipocampal), registrados simultaneamente durante 1 hora após o tratamento em pombos.

Foram utilizados 22 pombos adultos, (ambos os sexos, 400-450 g), acondicionados em gaiolas individuais (ciclo de 12:12 h, a 22-24° C), com livre acesso a ração e água, tratados com 8-OH (0.06, 0.2, 0.6 e 2.0 mg/kg; G8OH) ou veículo (ac. ascórbico 5%, controles, GC), 1 ml/kg via intramuscular. Os pombos receberam todos os tratamentos, havendo intervalo mínimo de 5 dias entre os experimentos.

A administração sistêmica de 8-OH diminuiu significativamente a latência para o início de SLB em todas as doses utilizadas durante o período matutino (M), mas apenas nas 3

doses maiores durante à tarde (V). A duração de SLB aumentou ($F[4,70]=19.6$, $p<0.0001$) em todas as doses utilizadas, nos períodos M e V. As duas doses maiores de 8-OH (0.6 e 2 mg/kg) diminuíram a duração acumulada de W quando comparados ao GC. A latência para o primeiro episódio de sonolência (D) não foi afetada, mas ocorreu diminuição da duração de D nos animais G8OH em relação ao GC. Após administração da maior dose de 8-OH houve redução da latência para o primeiro episódio de sono de ondas lentas (SWS) aumentando de forma dose-dependente a duração deste estado. Não observamos episódios de sono paradoxal neste estudo.

Estes dados sugerem que: 1) ao contrário de mamíferos, a injeção sistêmica de 8-OH é capaz de diminuir o tempo de W e aumentar a duração de SWS; 2) pode existir um importante envolvimento de receptores 5-HT_{1A} em mecanismos de controle de sono em pombos; 3) os efeitos do 8-OH foram mais intensos ao final da tarde que pela manhã, sugerindo uma importante modulação circadiana na atividade de receptores 5-HT_{1A} associados ao controle do ciclo vigília-sono em pombos.

Apoio Financeiro: CNPq

APÊNDICE B

ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO

DOS SANTOS, M.M.; HOELLER, A.A.; 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*). **Behavioural Brain Research**, 2009. doi: 10.1016/j.bbr.2009.02.017.



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Research report

Behavioural and electroencephalographic effects of systemic injections of 8-OH-DPAT in the pigeon (*Columba livia*)

Murilo Marcos Dos Santos^a, Alexandre Ademar Hoeller^a, Tiago Souza dos Santos^a,
Manuela Brisot Felisbino^a, Marcello Alberton Herdt^a, Eduardo Simão da Silva^a,
Marta Aparecida Paschoalini^a, José Marino-Neto^{a,b,*}

^a Laboratory of Comparative Neurophysiology, Department of Physiological Sciences, CCB, Federal University of Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b Biomedical Engineering Institute (IEB), CTC, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2008
Received in revised form 11 February 2009
Accepted 13 February 2009
Available online xxx

Keywords:

Food intake
Water intake
Sleep
5-HT_{1A} receptor
Hippocampus
Avian
EEG

ABSTRACT

The effects of systemic injections of the 5HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on the spontaneous ingestive, maintenance, locomotor and sleep-like behaviours, and the sleep/waking-related hippocampal electrographic activity were investigated in pigeons. 8-OH-DPAT (0.06, 0.2, 0.6 or 2.0 mg/kg) was found to dose-dependently reduce food and water intake, acutely (in the first 3 h) and 24 h after treatment, during both low-activity morning hours (starting at 10:00 h) and high-activity evening hours (starting at 14:00 h). Automated 24 h records of food and water intake indicated that hypophagic effects can last up to 18 h after injection. Duration and incidence of sleep-like postures increased at all doses, in both morning and afternoon. These effects were associated with decreases in exploratory and preening activities. The 8-OH-DPAT-induced hypnogenic, hypophagic and hypodipsic effects tended to be more intense in the morning than in the afternoon-trials. Pretreatment with WAY 100635 (a 5-HT_{1A} antagonist; 0.6 mg/kg) eliminated all of these 8-OH-DPAT-induced effects. WAY 100635 failed to affect feeding when injected alone, but decreased frequency of sleep-like responses and increased the latency to the first sleep-like episode. Hippocampal EEG tracings after 8-OH-DPAT injections (0.6 or 2.0 mg/kg) indicated that the hypnogenic effects are associated with a specific increase in the frequency and duration of slow wave sleep. Power density analysis of the hippocampal EEG failed to show differences between 8-OH-DPAT-induced sleep and the sleep occurring after vehicle injections, indicating that it may be electrographically similar to diurnal sleep episodes in the pigeon. These data suggest that while 5-HT_{1A} receptor-mediated mechanisms play crucial roles in ingestive and sleep/waking behaviours in mammals and birds, their action upon these states shows substantial inter-taxon variance.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Circuits controlling vigilance states and energy homeostasis are closely interrelated in both mammals and birds (e.g. [67,71,79]), and the interdependence between circadian organization of sleep–waking and energy metabolism appears to represent a major mechanism by which animals can adapt to food scarcity. In mammals, neurons using 5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin)

and the many receptors mediating its actions have been implicated in a wide variety of physiological and behavioural functions [46]. Several lines of evidence have indicated a role of 5-HT and its 5-HT_{1A} receptors in various aspects of mammalian ingestive behaviours (feeding [14,20,24,26,27,36,63]; and water and NaCl solution intake [12,19,55,82]), as well as in the expression of wake–sleep states and their associated electroencephalographic activity patterns in the neocortex and hippocampus [8,33,47,51,75,78,86].

Although less investigated in avian species, 5-HT circuits and 5-HT_{1A} receptors also appear to be important for the control of ingestive behaviours and sleep–waking states in birds. Intracerebroventricular (ICV) injections of 5-HT in pigeons (*Columba livia*) evoke a long-lasting *hypophagy*, an intense angiotensin II-mediated *dipsogenic* response and an increased incidence and duration of *sleep-like postures* [9,85]. Systemic injections of zimelidine, a selective serotonin reuptake inhibitor, in pigeons result in a decrease in the amount of time spent in REM sleep (REMS [35]. ICV injections

* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, CCB, Federal University of Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis, SC, Brazil.
Tel.: +55 48 3319352; fax: +55 48 231 9672.

E-mail addresses: murilomsantos@pop.com.br (M.M. Dos Santos), alexandrehoeller@gmail.com (A.A. Hoeller), tiagosemhmesmo@yahoo.com.br (T.S. dos Santos), mbrisot@hotmail.com (M.B. Felisbino), mano.h@terra.com.br (M.A. Herdt), edu.simao@yahoo.com.br (E.S. da Silva), marta@ccb.ufsc.br (M.A. Paschoalini), marino@ccb.ufsc.br, marino@ieb.ufsc.br (J. Marino-Neto).

of 8-hydroxy-2 (di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A/7} receptor agonist) in pigeons [15,85], or directly into pontomesencephalic raphe nuclei [42], evoke a strong *dipsogenic* and a weak hyperphagic effect (with no acute effects on sleep-like behaviours). In quails (*Coturnix japonica*, Galiformes), systemic injections of 8-OH-DPAT decrease food intake [73,74], while 5-HT ip injections increase the incidence of sleep-like postures [68]. In chickens and turkeys, ICV injections of 5-HT can elicit intense hypophagic effects, a modest increase in drinking and no reported effect on sleep signs [21–23], while systemic injections of 8-OH-DPAT increase food intake in food-deprived layer chickens, increase water and food intake in water-deprived cockerels, and reduced food intake if applied 15 min before refeeding [77]. It is thus apparent that 5-HT circuits play a significant, but strongly species-dependent, role in sleep–waking states and ingestive behaviours in birds.

These data contrast with those observed in mammals. Systemic injections of 8-OHDPAT increase waking and reduce slow wave sleep (SWS) and rapid eye movement sleep (REMS), while direct injection or microdialysis perfusion of 8-OHDPAT into the dorsal raphe nucleus (DRN) increases REM in rats (see e.g. [8,61]). In humans, systemic administration of agonists at the 5-HT_{1A} receptor have been shown to inhibit REM sleep [37,38,80]. Also, in contrast to observations made in pigeons, feeding behaviour can be increased by both intra-raphé and systemic 8-OH-DPAT administration to rats [6,14,24,31,36,63], but this response is highly dependent on rhythmic circadian factors, food texture and macronutrient content, developmental stage, and nutritional state (e.g. [1,24,26,27]). In rats, intra-MR or systemic 8-OH-DPAT does not stimulate water intake [13,89,93], but can increase hypertonic saline drinking [12,13], an effect also observed after 8-OH-DPAT injections into the lateral parabrachial nucleus [19].

These observations imply that, while important roles of 5-HT-mediated circuits in sleep/waking, feeding and drinking behaviours may be shared by birds and mammals, 5-HT_{1A} receptors may have different, taxa-specific roles, in the mediation of the feeding-, drinking- and sleep-related 5-HT effects observed in the pigeon. However, the effects of 8-OH-DPAT on the spontaneous behaviour of pigeons have been investigated only after central (ICV or intra-raphé) injections and over relatively short time periods (mostly not longer than 1 h) and, therefore, information on systemic and long-term effects is lacking. In the present study, we examine the effects of systemic injections of 8-OH-DPAT on the spontaneous ingestive, sleep-like, exploratory and maintenance behaviours at different times of the day, and also on the electrographically identified sleep/waking states in the pigeon.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All the experimental procedures described below were conducted in strict adherence to the recommendations found in the “Principles of Animal Care” (NIH publication No. 85-23, revised 1985) and were approved by the local Committee for Ethics in Animal Research (CEUA-UFSC, protocols nos. PP00240/2003 and PP00133/2007). Adult domestic pigeons (*C. livia* of both sexes, 300–360 g body weight, $N=57$), maintained in individual cages at a temperature of 22–24 °C, on a 12:12 light–dark cycle (lights on at 07:00 h; fluorescent day-light lamps resulting in 80–90 lx light intensity) and with free access to food and water were used throughout the experiments.

2.2. Drugs and injections

8-OH-DPAT (8-hydroxy-2 (di-n-propylamino) tetralin, 5-HT_{1A/7} receptor agonist, RBI-Sigma) and WAY 100635 (WAY, 5HT_{1A} receptor antagonist, N-[2-(4-2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-N-(2-pyridyl) cyclohexanecarboxamide, RBI-Sigma) were freshly dissolved in ascorbic acid (1% in distilled water), which was used as the control solution. 8-OH-DPAT doses were derived from the range effective in increased punished responding in the pigeon conflict procedure and in decreasing the 5-HT metabolite 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) in the cerebrospinal fluid of pigeons, without changes in other monoaminergic metabolites [39,52,54]. The

WAY 100635 doses selected here are higher than those that eliminated the effects of 8-OH-DPAT on food intake, body temperature and plasma ACTH in rats [1,26,32]. The injected volume (1 ml/kg bw, im, in the pectoral muscle) were administered over a period of 60 s. Immediately after the injections the animals were returned to their cages and behavioural recordings started.

2.3. Experimental procedures

2.3.1. Experiment 1: acute behavioural and ingestive effects of systemic 8-OH-DPAT injections at different times of the day

The effects of different 8-OH-DPAT doses (0, 0.06, 0.2, 0.6 and 2.0 mg/kg) on feeding and drinking and non-ingestive behaviours (see below) were investigated in free-feeding pigeons ($n=16$). To test for the 8-OH-DPAT effects in a situation of low or high demand for food, injections were administered at two different times during the light phase: in the morning (injections at 10:00 h during the illuminated part of the light–dark cycle, $n=8$) when pigeons have a low demand for food and in the afternoon (injections at 14:00 h, $n=8$) when ingestive episodes tend to be more intense [95]. All the animals within a group received all doses, distributed according to a Latin-square design. During the first hour after drug injection, digital video recordings (Sony Handycam MiniDV DCR-HC15) were taken from the bird's home cage, and the latency to the first event, as well as the frequency and total duration (sum of the duration of all events during the recording session) of drinking, feeding, preening, locomotor, exploratory, alert immobility and sleep-like behaviours were scored by a blind-to-condition observer. These behavioural units had been defined and used in previous reports (e.g. [16,17,18,43]) and are shown in a movie clip available on the Internet ([17], in the online version, at doi:10.1016/j.regpep.2007.12.003). Food pellets were delivered in plastic cups with a 6-cm hole at the top, allowing free access to the food while reducing food spillage. Water was offered in plastic bottles, with a spout projecting through the cage wires. At the end of the recording period, food pellets spilled on the cage floor were recovered, and the differences between the weights of the food and of the water at the start and end of the recording period were taken as the amounts of food and water consumed. Food and water intake was measured 1 h, 2 h, 3 h and 24 h after the treatments. Each of these experimental groups was formed by equal numbers of males and females. Because preliminary statistical analysis of this experiment revealed no significant sex-related differences in feeding and drinking responses to 8-OH-DPAT treatments, individuals of both sexes were unevenly distributed in Experiments 2, 3 and 4.

2.3.2. Experiment 2: long term (24 h) ingestive effects of systemic injections of 8-OH-DPAT

In a group of 5 experimentally naïve pigeons, food and water intake were continuously recorded for 24 h before and 24 h after 8-OH-DPAT (0.6 mg/kg) or vehicle injections. The duration of drinking and feeding episodes, as well the total intake at each of these episodes, were recorded through a locally developed system for automatic acquisition of feeding and drinking data developed in our laboratory [65], that allowed continuous monitoring of the weight of food pans and water bottles, through charge cells connected to a PC-clone computer. Weight from each charge cell was acquired at 5 samples/s, then stored and viewed through locally developed software. The raw data files were processed to produce hourly accounts of food removed from the containers. Animals were adapted to the recording chamber (with dimensions similar to those of the home-cage) for at least 5 days before starting the experiments. Pretreatment recordings started at 14:00 h; 24 h later the drug was injected and the recording continued for an additional period of 24 h. Each animal received all treatments with at least a 7-day interval. Food spillage was controlled only at the end of a 24 h recording period and never exceeded 3% of the total amount of food removed from the containers.

2.3.3. Experiment 3: the effects of the pretreatment with WAY 100635

The effects of the pretreatment (20 min in advance) with WAY (0.6 mg/kg) or its vehicle on the behaviour after injection of 8-OH-DPAT (0.6 mg/kg) or its vehicle were examined in 8 experimentally naïve pigeons. These birds had no access to food and water between the two injections, and the recording procedure was initiated immediately after the second injection, according to the procedures described in Experiment 1. These injections were performed at 14:00 h and food and water intake were recorded 1, 2, 3 and 24 h after the second injection. The sequence of treatments for each animal during these experiments followed a Latin-square design, with an interval of seven days between each treatment.

2.3.4. Experiment 4: acute effects of 8-OH-DPAT injections on electrographically identified sleep–waking states

The above experiments revealed intense hypnogenic effects after systemic injections of 8-OH-DPAT, as indicated by an increase in sleep-like behaviour duration and a considerable decrease in the latency to the first episode for these states. In Experiment 4, hippocampal EEG recordings were carried out to better characterize the electrographic state that predominates under the 8-OH-DPAT-evoked sleep-like behaviour. Six experimentally naïve pigeons were anesthetized with ketamine (0.15 ml/100 g) and xylazine (0.05 ml/100 g) and stereotaxically implanted with 4 pairs of bipolar NiCr wire electrodes (diameter 150 µm, insulated with H-Poly Red, exposed only at the tip cross-section, inter-wire distance of 300 µm, California Fine Wire, Grover Beach, CA). Two pairs of twisted electrodes were implanted bilaterally

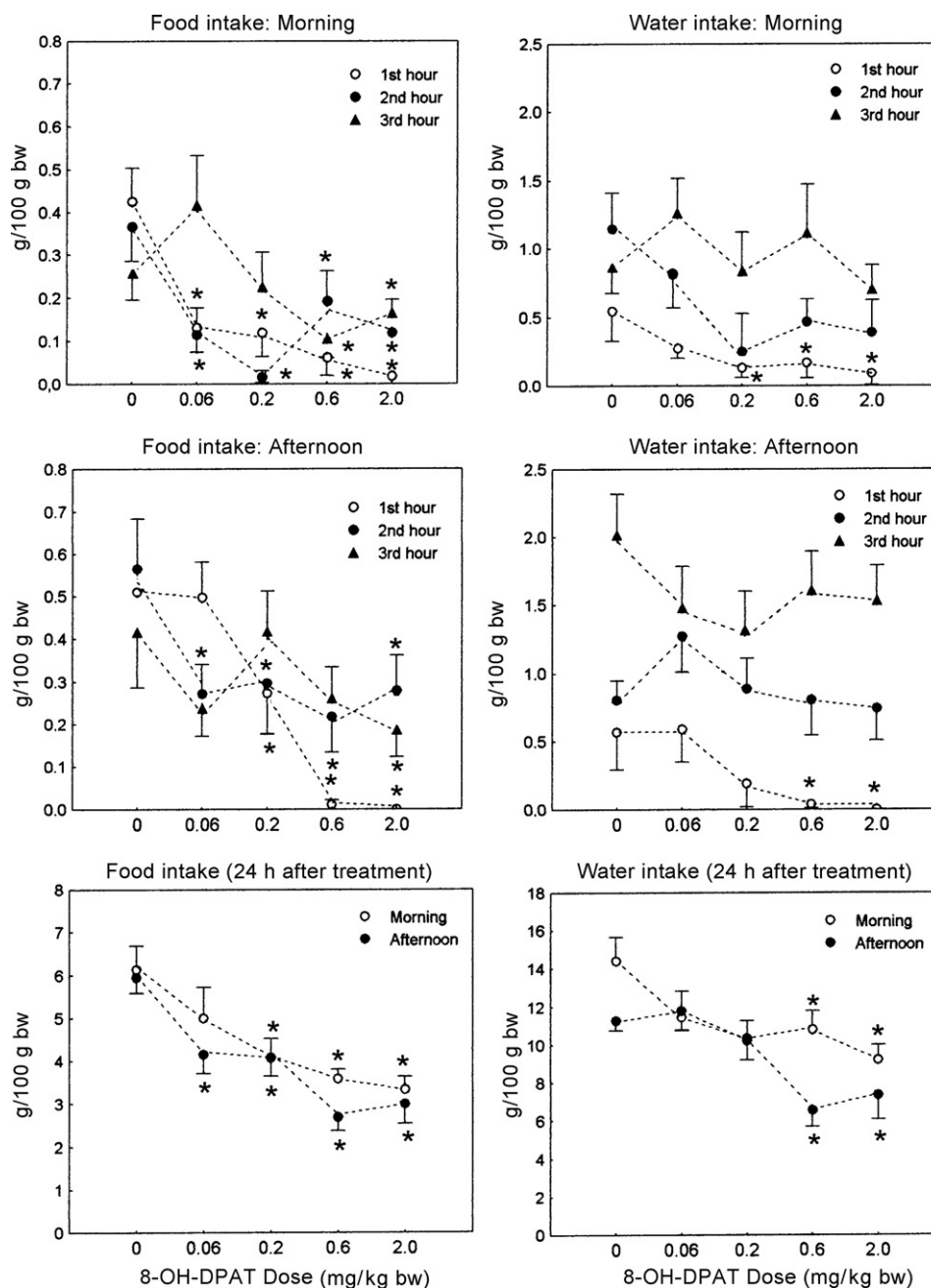


Fig. 1. Effects of systemic injections of 8-OH-DPAT on 1 h, 2 h, 3 h and 24 h food and water intake in free-feeding pigeons, in experiments carried out in the morning (10:00 h) or in the afternoon (14:00 h) periods of the light phase of the cycle. All data are expressed in mean \pm S.E.M. values. (*) $p < 0.05$ as compared to vehicle-treated animals in the same period of the day.

ally in the hippocampal area (Hp) for EEG recordings ($A = 4.0$ mm; $L = \pm 0.5$ mm, both sides according to [48] stereotaxic atlas for pigeons, see Fig. 5). An electrode pair was inserted in the trapezius muscle at the dorsal neck, for electromyographic recording (EMG) and another pair was attached near the right orbit for eye/eyelid movements recording (EOG). A stainless steel screw placed in the occipital area served as reference electrode. These electrodes were attached to a miniature plug which was anchored to the skull with jeweler's screws and fixed with dental cement.

After surgery, the animals were allowed to recover for at least 15 days before the first recording session. Five days after surgery, the pigeons were individually placed in the recording environment and connected to the recording cable for 2-h habituation sessions (daily) for at least 10 days. The experiments started at 12:00 h. Two hours before the injections, the animals were placed in the recording cage (similar to its home-cage, with fresh food/water available and a perch) situated inside a Faraday cage (1.0 m \times 0.6 m \times 0.7 m) with a ventilation/exhaustion system comprised of coolers in a sound-attenuated room, with free access to food and water. The cage was artificially illuminated with five white LED lamps (Eveready Energizer PR2 and PR3, totaling 4.7 W, resulting in a 45 lx light intensity) connected to a 12 V

continuous voltage source. Electrographic recordings were carried out using a digital polygraph system (BIOPAC System, MP-100/WSW). The signals were amplified (EEG: 20.000 \times , EOG: 5.000 \times , EMG: 1000 \times), filtered (through a built-in 60 Hz notch filter) and digitalized at a sampling rate of 256 Hz using ACQ-Knowledge software (v. 3.2). After the 2-h habituation period, a 20 min control recording was taken, the food and water were weighed, the animal received the assigned 8-OH-DPAT (0.6 or 2 mg/kg) or vehicle injection, and the electrographic recording was continued for the next 60 min. Digital video recordings were taken with a webcam (Orbit Logitech Quickcam[®]) located inside the Faraday cage (in front of the recording cage). Video recordings were synchronized with the EEG recordings by simultaneous activation of the internal time counters of both apparatuses, and corresponding files were examined simultaneously on 2 computers, advancing the recordings to equivalent time points.

Scoring of the vigilance states was carried out by visual inspection of the electrographic records, which were presented in 5–20-s epochs on the screen, and of the time-stamped video recordings. One person (A. Hoeller) carried out the scoring and four states were discriminated by combined electrographic and behavioural analysis.

Table 1
Water:food intake ratio (ml of water/g of solid food) after 8-OH-DPAT injections in free-feeding pigeons in the morning group (M) and in the afternoon group (A), for the total intake accumulated in the first 3 hours (3 h) and 24 hours (24 h) after injections.

8-OH (mg/kg)	Morning		Afternoon	
	3 h	24 h	3 h	24 h
Vehicle	1.83 ± 0.3	2.35 ± 0.4	2.23 ± 0.5	1.84 ± 0.8
0.06 mg/kg	1.92 ± 0.2	2.31 ± 0.6	2.81 ± 0.4	3.12 ± 1.0*
0.2 mg/kg	1.85 ± 0.3	2.59 ± 0.5	3.74 ± 0.8*	2.73 ± 1.2*
0.6 mg/kg	3.62 ± 0.9*	3.71 ± 0.9*	6.21 ± 1.2*	3.52 ± 0.9*
2.0 mg/kg	4.13 ± 1.1*	3.62 ± 0.8*	4.31 ± 1.0*	3.75 ± 1.3*

* $p < 0.05$ as compared to vehicle-treated animals.

according to criteria partially based on former studies in the pigeon ([35,66,67] see Fig. 5): (1) *Waking (W)*: characterized by active posture with frequent head and/or body exploratory movements, open eyes with fast blinking, high-activity EMG and a high-frequency and low-amplitude EEG; (2) *Drowsiness (D)*: periods of waking-sleep transition, characterized by a quiet, but upright, waking posture, slow blinks, absence of head/body exploratory activity, decreased EMG activity and presence of synchronized EEG activity; (3) *Slow Wave Sleep (SWS)*: the animal remains sitting or standing, with the neck retracted and sometimes resting on chest, with one or two closed eyes, low-activity EMG and a low-frequency, high-amplitude EEG; and (4) *Rapid Eye Movement Sleep (REMS)*: characterized by a posture identical to SWS, with sporadic and sudden downward head drops, followed by slow return to an upright posture, closed eyes (one or both), low-activity EMG, fast and high amplitude EOG activity indicative of large eye movements, and a high-frequency, low-amplitude EEG. We failed to record possible episodes of unilateral sleep not yet described in the pigeon [72], either behaviourally (due to the use of only one video camera) and electrographically (due to the poor inter-hemispheric differences present in these episodes [72,35]). Fast Fourier transforms (FFT) were performed on right and left hippocampal EEG recordings to calculate power density in 1.0 Hz bins between 0 and 30 Hz. Twenty-four 2-s

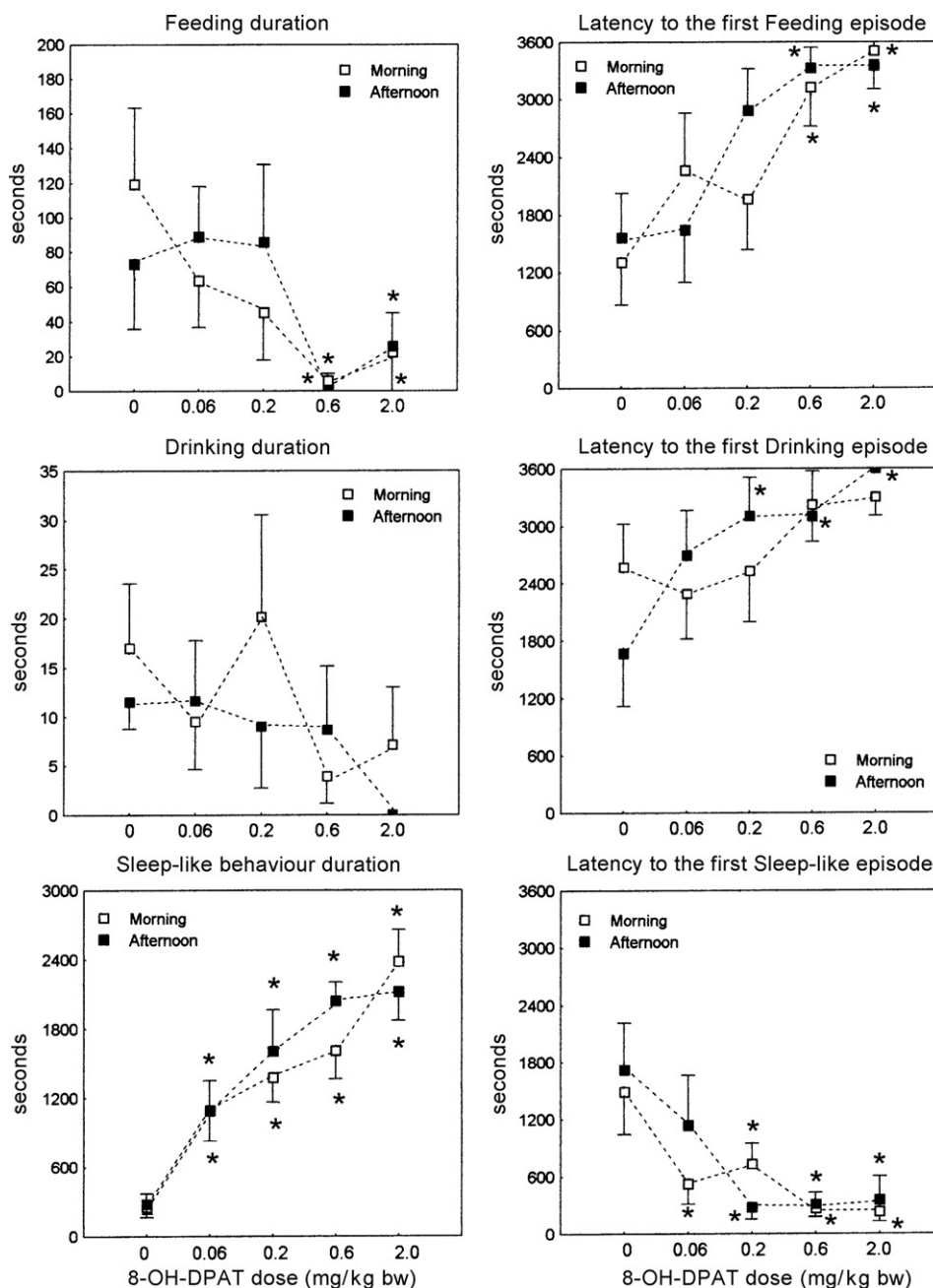


Fig. 2. Effects of systemic injections of 8-OH-DPAT on 1-h duration and the latency to the first episode of feeding, drinking and sleep-like behaviors in pigeons. The experiments were carried out in the morning (10:00 h) or in the afternoon (14:00 h) periods of the light phase. All data are expressed in mean ± S.E.M. values. (*) $p < 0.05$ as compared to vehicle-treated animals in the same period of the day.

Table 2
Behavioral effects of 8-OH-DPAT injections on free-feeding pigeons in the morning group (M) and in the afternoon group (A).

8-OH (mg/kg)	0		0.06		0.2		0.6		2.0	
	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A
Feeding										
Duration (s)	119.6 ± 55.4	73.2 ± 37.3	63.5 ± 35.8	89.1 ± 32.8	45.4 ± 20.8	85.9 ± 44.9	6.1 ± 4.0*	11.5 ± 1.5*	22.4 ± 22.4*	25.8 ± 25.8*
Frequency	5.2 ± 2.5	3.2 ± 1.2	1.6 ± 0.9	8.6 ± 3.8	2.0 ± 0.8	1.6 ± 0.9	0.6 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.4 ± 0.4	1.8 ± 1.8
Latency (s)	1304 ± 516	1566 ± 549	2266 ± 587	1644 ± 548	1966 ± 531	28789 ± 435	3127 ± 412*	3322 ± 277*	3505 ± 94*	3351 ± 248*
Drinking										
Duration (s)	17 ± 7.4	11.5 ± 3.1	9.5 ± 4.9	11.6 ± 6.9	20.1 ± 10.4	9.0 ± 7.7	3.9 ± 3.5	8.6 ± 6.5	7.1 ± 6.8	0.0 ± 0.0
Frequency	1.6 ± 1.0	1.5 ± 0.5	0.8 ± 0.3	1.2 ± 0.6	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.6	0.0 ± 0.0
Latency (s)	2572 ± 456	1666 ± 546	2288 ± 538	2689 ± 527	2529 ± 530	3107 ± 401*	3221 ± 348	3101 ± 342*	3304 ± 193	3600 ± 0*
Sleep-like										
Duration (s)	251.8 ± 88.0	285.0 ± 90.1	1089 ± 261*	1092 ± 289*	1378 ± 253*	1608 ± 356*	1610 ± 247*	2044 ± 156*	2381 ± 273*	2121 ± 252*
Frequency	9.6 ± 3.9	12.5 ± 4.6	28.2 ± 4.4*	27.9 ± 2.6*	33.4 ± 5.7*	32.4 ± 4.1*	60.6 ± 13.3*	33.4 ± 7.0*	26.2 ± 3.5	19.2 ± 4.3
Latency (s)	1492 ± 506	1724 ± 577	528 ± 212*	1139 ± 524	733 ± 220*	280 ± 130*	267 ± 91*	305 ± 132*	231 ± 108*	356 ± 246*
Exploratory										
Duration (s)	1356 ± 139	1358 ± 199	919 ± 130	934 ± 241	1258 ± 202	1044 ± 230	1013 ± 163	548 ± 101*	433 ± 201*	229 ± 63*
Frequency	38.6 ± 19.0	45.8 ± 9.4	29.5 ± 3.4	35.9 ± 9.0	26.8 ± 3.2	24.1 ± 5.0*	31.4 ± 6.2	20.8 ± 3.8*	13.1 ± 3.5*	9.5 ± 2.9*
Latency (s)	28.0 ± 9.2	22.5 ± 10.4	34.5 ± 16.7	33.8 ± 18.6	34.1 ± 22.0	154.2 ± 87.7	46.4 ± 21.1	279 ± 130	178.1 ± 42.0	878 ± 424*
Alert immob.										
Duration (s)	1283 ± 154	1109 ± 200	831 ± 142	698 ± 159	636 ± 75*	599 ± 138	721 ± 114*	842 ± 211	730 ± 219*	1141 ± 261
Frequency	26.8 ± 4.8	29.9 ± 6.5	22.6 ± 2.4	16.4 ± 3.9	17.2 ± 2.5	18.6 ± 5.3	20.0 ± 2.9	13.2 ± 2.6	15.1 ± 3.0	22.2 ± 5.2
Latency (s)	267 ± 238	539 ± 439	297 ± 168	742 ± 451	219.1 ± 87	22 ± 22	243 ± 154	142 ± 142	3304 ± 193	0.0 ± 0.0
Preening										
Duration (s)	445 ± 84	686 ± 117	598 ± 210	456 ± 107	238 ± 64	206 ± 68*	209 ± 65	93 ± 36*	11 ± 6.5*	27.8 ± 15.2*
Frequency	10.0 ± 1.0	13.8 ± 2.4	14.1 ± 3.1	17.2 ± 3.2	8.0 ± 2.1	7.0 ± 1.9*	9.8 ± 2.0	5.6 ± 2.1*	1.6 ± 1.0*	1.2 ± 0.4*
Latency (s)	785 ± 184	329 ± 116	725 ± 326	209 ± 57	1184 ± 342	1348 ± 430*	1528 ± 463	1290 ± 394*	2537 ± 506*	2848 ± 419*
Locomotion										
Duration (s)	51.8 ± 16.0	75.3 ± 31.6	88.5 ± 53.0	68.8 ± 39.1	19.5 ± 4.7	26.8 ± 6.8	24.2 ± 7.2	13.8 ± 6.2	13.2 ± 5.9	7.0 ± 3.6
Frequency	14.0 ± 5.8	18.2 ± 9.5	9.9 ± 2.3	17.8 ± 8.7	9.0 ± 3.2	8.8 ± 2.5	9.5 ± 2.3	4.9 ± 2.1	4.5 ± 1.8	1.9 ± 0.9
Latency (s)	687 ± 161	606 ± 283	379 ± 186	738 ± 434	762 ± 438	360 ± 125	578 ± 202	1505 ± 486	1908 ± 562*	2653 ± 470*

* $p < 0.05$ as compared to vehicle-treated animals.

epochs were taken and pooled from W, D or SWS episodes after each treatment, selected from artifact-free EEG periods. Samples were selected randomly across the 1 h recording and EEG artifacts were visually detected and omitted from the analysis. Total and relative power densities for each 1 Hz bin were processed through the appropriated ACQ-Knowledge software (v. 3.2) routine.

At the end of the experiments, the pigeons were deeply anesthetized and an anodic current (0.1 mA, 30 s) was passed through each electrode pair. The animals were then perfused transcardially with saline followed by 10% formalin solution. The brains were removed and cut in the transverse plane (100 μ m) on a vibratome. Sections were stained with thionin and cannula loci were examined and documented through a camera lucida attached to a light microscope to examine electrode placement.

2.4. Data analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Results of Experiment 1 were analyzed by three-way ANOVA tests using 8-OH-DPAT doses (0, 0.06, 0.2, 0.6 and 2.0 mg/kg), period of the day (morning or afternoon) and hour after treatment (1, 2 or 3 h) as factors. Two-way ANOVA tests were used to compare 24 h intake and behavioural data, with drug dose and period of the day as factors. In Experiment 2, water and food intake data were analyzed by two-way ANOVA tests, with treatment (vehicle or 8-OH-DPAT 0.6 mg/kg) and time (from 07:00 to 19:00 h). Comparisons between hourly pre-treatment scores and data from both vehicle and 8-OH-DPAT-treated animals were also carried out by two-way ANOVA tests, with experimental period (pre- or post-injection) and time (from 07:00 to 19:00 h).

In Experiment 3, water and food intake data were analyzed by two-way ANOVA tests, with treatment (vehicle + vehicle, vehicle + 8-OH-DPAT, WAY + vehicle or WAY + 8-OH-DPAT) and hour after treatment (1, 2 or 3 h) as factors. One-way ANOVA tests were used to compare 24 h water/food intake and behavioural data. In Experiment 4, durations of W, D and SWS were pooled for each 10-min period of the recording time. These data were analyzed by a 2-way ANOVA, with the six 10-min periods and the treatment (8-OH-DPAT 0.6 or 2 mg/kg, or vehicle) as factors. Latency to the first episode of each sleep state was examined by a 1-way ANOVA. All these tests were followed, when appropriate, by a *post hoc* Duncan's test, and a value of $p < 0.05$ was accepted as being statistically significant in these procedures. The calculated relative power densities for each 1 Hz bin in the left or right hippocampus were compared between different states and different treatment, using Kruskal–Wallis non-parametric ANOVA. Possible significant outcomes were tested with *post hoc* Mann–Whitney *U* tests to identify the deviating group, and values of $p < 0.05$ were accepted as statistically significant in these FFT quantitative analysis.

3. Results

3.1. Experiment 1: acute behavioural and ingestive effects of systemic 8-OH-DPAT injections at different times of the day

In this experiment, three-way ANOVA tests on food intake data indicated significant effects of dose [$F(4,210) = 9.69$, $p < 0.0001$], period of day [$F(1,210) = 15.26$, $p < 0.0001$] and hours after injection [$F(2,210) = 6.25$, $p < 0.002$], as well as a significant interaction between period of day and hour after injections [$F(2,210) = 4.12$, $p < 0.01$]. Fig. 1 shows the effects of 8-OH-DPAT injections on food and water intake during experiments carried out in the morning or in the afternoon. In the 1st hour after injection, all doses of 8-OH-DPAT significantly reduced food intake when the treatment occurred in the morning (Fig. 1). When the experiments were carried out in the afternoon period, only the lowest 8-OH-DPAT dose (0.06 mg/kg) failed to reduce feeding. A dose–response relationship is more evident in the duration of this hypophagic effect: in morning experiments, the two highest doses significantly decreased feeding in each of the 3 h after treatment. The effects of the two lowest doses were not detectable in the third hour after injections in the morning experiments. In the afternoon experiments, only the 3 highest 8-OH-DPAT doses decreased feeding in the 1st hour after the treatment, but a significant hypophagic effect of all doses were observed in the 2nd hour; only the highest dose reduced feeding in the third hour. On the other hand, the total 24-h food intake was decreased (2-way ANOVA, dose factor: $F(4,70) = 20.24$, $p < 0.0001$, Fig. 1) for all doses in the afternoon trials and for the 3 highest doses in the morning experiments.

Water intake was significantly affected by the different 8-OH-DPAT doses [$F(4,210) = 4.66$, $p = 0.001$], period of day [$F(1,210) = 11.38$, $p < 0.0001$] and hours after injection [$F(2,210) = 36.6$, $p < 0.0001$], with no significant interactions among these factors.

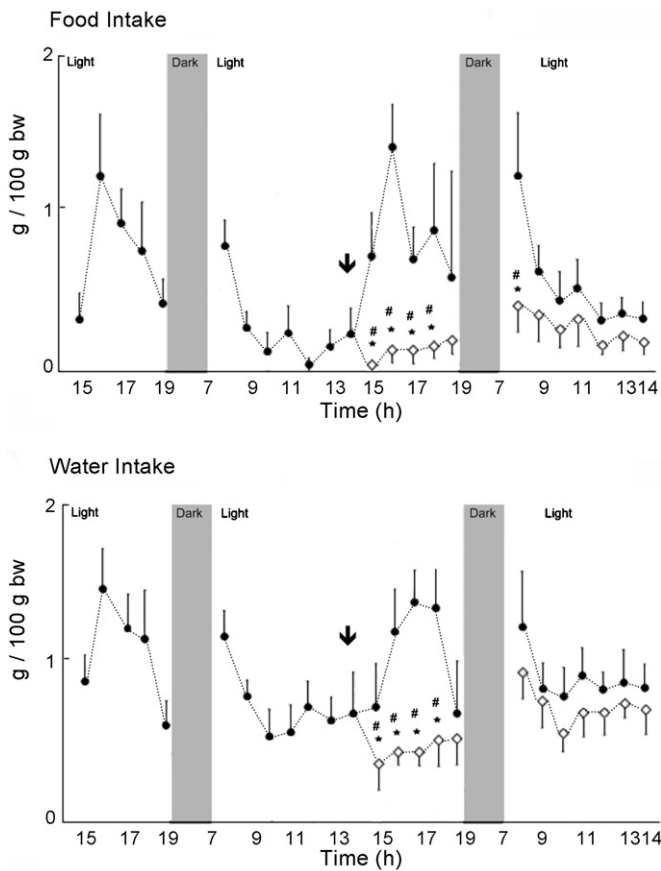


Fig. 3. Food and water intake before and after systemic injections of 8-OH-DPAT (0.6 mg/kg bw) or vehicle in free-feeding pigeons. The arrow indicates the moment of the injection (14:00 h). All data are expressed as mean \pm S.E.M. (*) $p < 0.05$ as compared to vehicle-injected animals at the same hour of the day; (#) $p < 0.05$ as compared to pre-treatment recordings at the same hour of the day.

8-OH-DPAT injections at all doses and in both morning and afternoon experiments failed to affect water intake in the 2nd and in the 3rd hour after treatments. Significantly decreased drinking was observed only after the 3 highest 8-OH-DPAT doses in the first hour after injections in morning experiments, and after the 2 highest doses in afternoon trials (Fig. 1). The 24-h water intake was affected only by the 2 highest doses in both periods of the day (2-way ANOVA, dose factor: $F(4,70) = 9.85$, $p < 0.0001$, Fig. 1). Two-way ANOVA tests were carried out with the water intake/food intake ratio accumulated for the first 3 h and 24 h after treatment, and indicated significant effects of the 8-OH-

DPAT doses [first 3 h: $F(4,70) = 3.76$, $p = 0.007$; 24 h: $F(4,70) = 2.72$, $p = 0.04$] but not of the period of day or the interaction between these factors. The water/food intake ratio significantly increased after 8-OH-DPAT injections at the 2 highest doses in the morning trials, at both 3 h and 24 h after treatments (Table 1). In afternoon trials, the 3 highest doses increased the 3-h water/food ratio and this index was increased by all doses 24 h after injections (Table 1).

The acute behavioural effects of 8-OH-DPAT injections are described in Fig. 2 and in Table 2. Two-way ANOVA tests indicated that the above-described ingestive effects were associated with significant and complex changes in feeding, drinking and non-ingestive behaviours. The different 8-OH-DPAT doses reduced feeding duration [$F(4,70) = 2.81$, $p = 0.03$] and increased the latency to start feeding [$F(4,70) = 7.04$, $p < 0.0001$] in the morning and in the afternoon experiments (at the 2 highest doses). On the other hand, drinking duration, frequency and latency were not significantly changed by any of the drug doses in the morning experiments, while the 3 highest 8-OH-DPAT doses increased the latency to start drinking in afternoon trials.

Duration of sleep-like postures increased significantly [$F(4,70) = 19.6$, $p < 0.0001$] at all doses and in both the morning and afternoon experiments (Fig. 2). These increases were also dose-dependent, ranging from 4 times higher than the controls for the 0.06 mg/kg dose, to nearly 9 times higher for the 2.0 mg/kg dose. Latency to start sleeping significantly decreased [$F(4,70) = 5.7$, $p = 0.005$] for all doses in the morning, but only for the 3 highest doses in the afternoon. Interestingly, the frequency of sleep-like episodes followed an inverted U-shaped curve. In both the morning and afternoon trials, significant increases in frequency [$F(4,70) = 14.08$, $p < 0.0001$] (Table 2) were observed only for the 3 lowest doses and results were similar to controls after the 2.0 mg/kg dose. The decrease in the exploratory behaviour duration [$F(4,70) = 9.84$, $p < 0.0001$] and frequency [$F(4,70) = 8.27$, $p < 0.0001$] was intense in the afternoon assays for the 3 highest doses. In the morning trials only the 2.0 mg/kg dose affected these parameters. Latency to start exploratory behaviour was increased in the afternoon tests [$F(4,70) = 4.12$, $p < 0.004$] for the highest dose, but was similar to vehicle-treated animals in the morning trials. Similarly to exploratory behaviour, preening was most intensely affected in the afternoon tests: duration [$F(4,70) = 12.05$, $p < 0.0001$] and frequency [$F(4,70) = 12.90$, $p < 0.0001$] were significantly decreased at the 3 highest doses in the afternoon, but were affected only by the 2.0 mg/kg dose in the morning. Locomotion is usually an event of low incidence, and its duration and frequency were not affected by the treatments. Latency to the first locomotor episode, however, was significantly reduced [$F(4,70) = 7.94$, $p = 0.0003$] by the 2.0 mg/kg dose, in both the morning and afternoon tests. Finally, the duration of alert immobility periods was significantly reduced

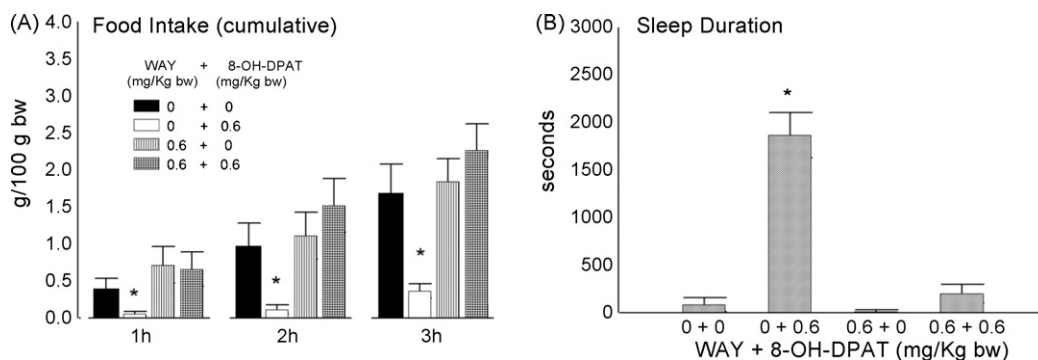


Fig. 4. (A) Cumulative (3-h) food intake and (B) sleep-like duration after systemic injection of vehicle or WAY 100635 (0.6 mg/kg) 20 min before systemic injection of 8-OH-DPAT (0.6 mg/kg) or of vehicle. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (*) $p < 0.05$ as compared to animals treated with vehicle followed by vehicle injection (0 + 0).

Table 3

Behavioral effects of 8-OH-DPAT (8OH, 0.6 mg/kg) or vehicle (Veh) injections in animals pretreated (20 min before) with vehicle or WAY 100635 (WAY, 0.6 mg/kg) injection.

	Veh + Veh	8OH + Veh	Veh + WAY	8OH + WAY
Feeding				
Duration (s)	109 ± 63	11.9 ± 6.1*	275 ± 130	207 ± 77
Frequency	3.4 ± 1.1	1.0 ± 1.0	4.4 ± 2.0	3.9 ± 2.2
Latency (s)	1988 ± 630	3091 ± 396*	637 ± 369	1485 ± 519
Drinking				
Duration (s)	5.1 ± 3.0	3.2 ± 2.7	9.5 ± 5.2	10.6 ± 4.2
Frequency	2.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	1.8 ± 1.5	2.1 ± 1.0
Latency (s)	2174 ± 646	3346 ± 199*	2431 ± 662	1886 ± 621
Sleep-like				
Frequency	12.3 ± 1.7	31.5 ± 8.3*	1.0 ± 1.0†	13.4 ± 2.8
Latency (s)	2999 ± 445	496 ± 191*	3585 ± 15†	1820 ± 465
Exploration				
Duration (s)	1159 ± 200	517 ± 40*	1465 ± 174	1276 ± 195
Frequency	32.3 ± 10.2	20.5 ± 4.9	35.2 ± 6.6	26.3 ± 6.1
Latency (s)	115 ± 68	166 ± 82	93 ± 59	82 ± 18
Alert immob.				
Duration (s)	1655 ± 325	817 ± 174*	1931 ± 258	1532 ± 267
Frequency	22.1 ± 5.5	16.4 ± 4.4	18.8 ± 9.2	15.6 ± 2.1
Latency (s)	31.2 ± 25.3	175 ± 111	236 ± 206	6.0 ± 6.0
Preening				
Duration (s)	543 ± 242	79.8 ± 35.3*	852 ± 323	306 ± 96
Frequency	11.0 ± 2.0	1.0 ± 1.0*	10.6 ± 2.2	8.0 ± 2.0
Latency (s)	909 ± 558	2737 ± 507*	412 ± 96	790 ± 407
Locomotion				
Duration (s)	44.8 ± 16.7	67.6 ± 15.4	90.8 ± 16.7	69.8 ± 25.3
Frequency	15.3 ± 6.5	15.5 ± 4.4	23.1 ± 5.7	12.8 ± 3.2
Latency (s)	185 ± 69	285 ± 189	198 ± 77	179 ± 85

* $p < 0.05$ as compared to the vehicle-treated group.

using the 3 highest 8-OH-DPAT doses in the morning experiments. The drug treatments had no effect on this behaviour in the afternoon trials (Table 2).

3.2. Experiment 2: long-term (24 h) ingestive effects of systemic injections of 8-OH-DPAT

The two-way ANOVA tests indicated significant effects of treatment [$F(1,96) = 4.1, p = 0.03$] and of hour of the day [$F(11,96) = 2.3, p = 0.02$] on food intake, with no significant interactions among these factors, indicating significant decreases in the intake in the first 4 h after 8-OH-DPAT (0.6 mg/kg) injections (Fig. 3). Food intake at the last hour of the light part of the cycle (the 5th hour after treatments) was highly variable in vehicle-treated animals, and was not significantly different from the 8-OH-DPAT-treated or the non-treated animals during the same hour of the day. Pigeons completely cease ingestive activities during the dark phase of the cycle, and the drug treatment did not change this situation, as evaluated by the complete absence of recorded movements of the charge cells at the food and water reservoirs. Interestingly, the intense feeding observed in non-treated animals or in vehicle-injected pigeons at the 1st hour after the lights turned on, was significantly reduced after 8-OH-DPAT injections. No differences were found between hourly food intake of vehicle-treated animals and their pre-injection recordings, while significant differences between pre- and post-treatment hours in 8-OH-DPAT experiments occurred at the same hours where vehicle vs. drug comparisons indicated significant differences (Fig. 3). Effects of these procedures on water intake followed a temporal pattern similar to that observed for food intake, except for the intake in the 1st morning hour after treatment, when water intake was similar in vehicle- and in 8-OH-DPAT-treated experiments (Fig. 3).

3.3. Experiment 3: the effects of the pre-treatment with WAY 100635

In Experiment 3, two-way ANOVA tests showed significant effects of treatment [$F(3,84) = 7.79, p < 0.0001$] and of post-treatment hour [$F(2,84) = 9.26, p < 0.0001$] on food intake (Fig. 4) and of treatments [$F(3,84) = 6.52, p < 0.0001$] and of post-treatment hour [$F(2,84) = 7.23, p < 0.0001$] on water intake (not shown). Pre-treatment with WAY 100635 eliminated the hypophagic and hypodipsic effects of 8-OH-DPAT injections during the first three post-injection hours (Fig. 4 and Table 3) and after 24 h (not shown), since these scores were not significantly different from those of vehicle-treated birds. WAY 100635 also blocked the 8-OH-DPAT-induced increases in sleep-like behaviour and decreases in exploratory and preening behaviours (Table 3). WAY 100635 did not affect ingestive behaviours when injected before vehicle treatment, but a significant decrease in frequency of sleep-like responses and also a significant increase in the latency to the first sleep-like episode were observed after this treatment (Table 3). No sleep-like episode was observed in 6 out of 8 animals during the WAY 100635 + vehicle experiments.

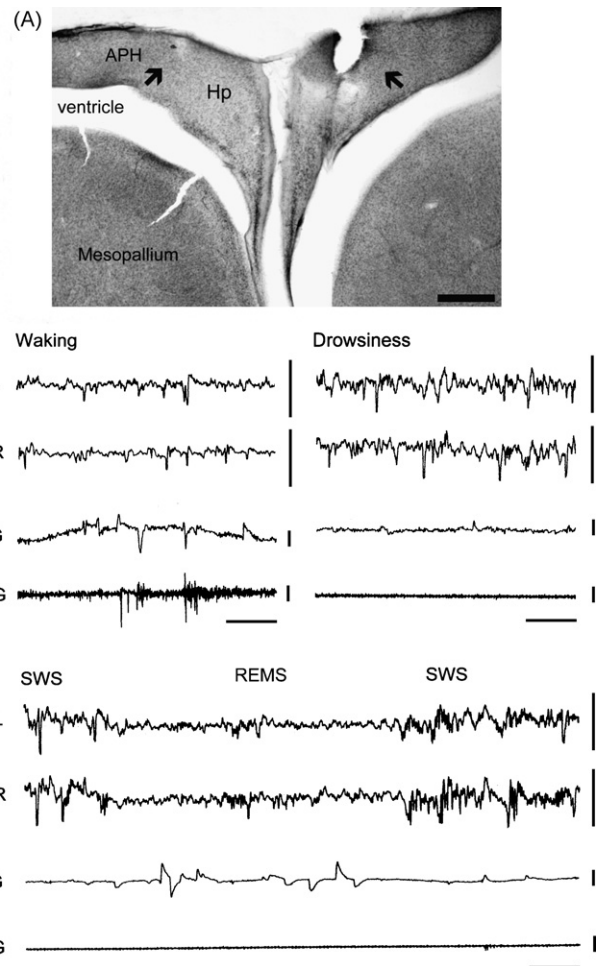


Fig. 5. (A) Photomicrographs of frontal thionin-stained sections taken at the caudal telencephalon of the pigeon, showing bilateral electrode placements in the hippocampus (Hp, arrows). APH: Area parahippocampalis. Scale bar = 500 μ m. (B) Tracings of bilateral EEG activity in the hippocampus (left: Hp-L; right: Hp-R), and of electrooculographic (EOG) and dorsal neck muscle EMG during waking, drowsiness, slow wave sleep (SWS) and rapid eye movement sleep (REMS) in the pigeon. Calibration bars: horizontal: 1 s; vertical 250 μ V.

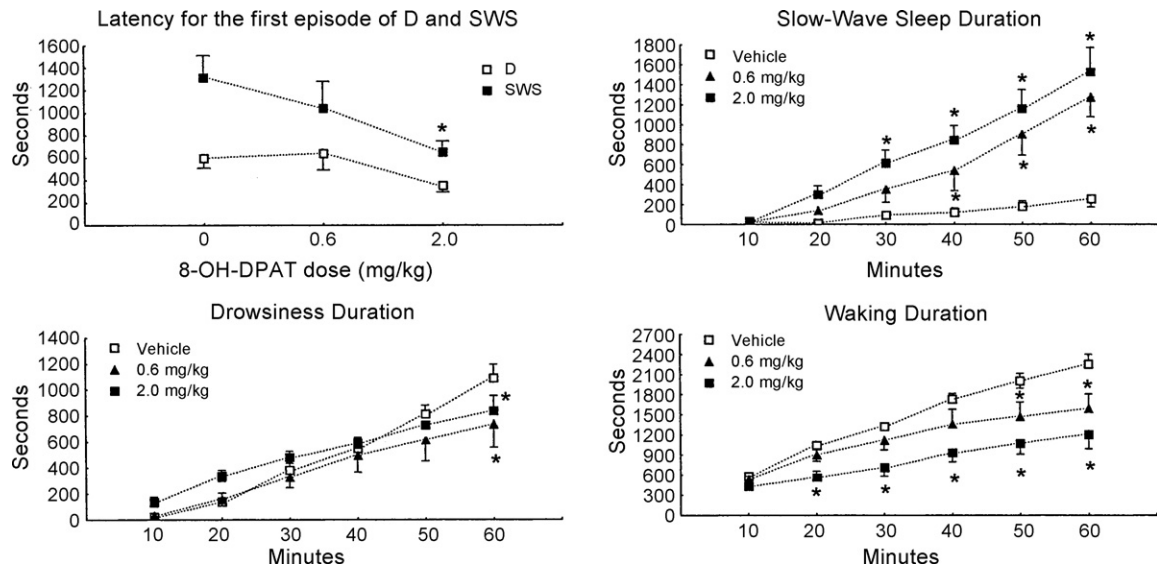


Fig. 6. Latency to the first episode and cumulative duration of electrographically identified waking, drowsiness (D) and slow wave sleep (SWS) episodes (in 10-min periods of the recording time) after systemic injection of 8-OH-DPAT (0.6 or 2.0 mg/kg) or of vehicle. Data are expressed as mean \pm S.E.M. (*) $p < 0.05$ as compared to animals treated with vehicle.

3.4. Experiment 4: acute effects of 8-OH-DPAT injections on electrographically identified sleep–waking states

The intense hypnogenic-like effect of 0.6 and 2.0 mg/kg doses of 8-OH-DPAT observed in the previous experiments, carried out in each animal's home cage, was also observed in the environment used for electrographic recordings. In a preliminary visual examination, the general attributes of amplitude and frequency of the EEG tracings during waking, D and SWS (Fig. 5) were similar in vehicle- and in 8-OH-DPAT-treated pigeons. Interestingly, we did not find epochs that could be confidently classified as REMS in the recordings carried out during the present study in the 6 pigeons examined either in the controls or in drug-treated birds.

Significant effects of treatment [$F(2,90) = 36.13, p < 0.0001$] and of recording time [$F(5,90) = 31.03, p < 0.0001$] were shown by two-way ANOVA examination of cumulative waking duration, that steadily declined after 8-OH-DPAT injections when compared to vehicle-injected animals (Fig. 6). Significant differences were observed in the 0.6 mg/kg dose group after the 50th minute, while the 2 mg/kg dose group showed a significant decrease in the waking duration after the 20th minute after treatment, when compared to the vehicle group. 8-OH-DPAT injections did not change the latency to the first episode of drowsiness, while the duration of this state revealed significant effects of treatment [$F(2,90) = 3.5, p = 0.03$] and recording periods [$F(5,90) = 37.7, p < 0.0001$]. A significant decrease in the drowsiness duration was observed 50 min after the treatments with both drug doses, as compared to vehicle-treated pigeons (Fig. 6).

8-OH-DPAT injections intensely affected latency and duration of SWS (Figs. 6 and 7). Latency to the first SWS episode was significantly reduced after the 2 mg/kg dose, and both doses significantly increased cumulative SWS duration (dose: $F(2,90) = 36.2, p < 0.0001$; time after treatment: $F(5,90) = 24.11, p < 0.0001$, with a significant interaction between these factors: $F(10,90) = 3.47, p = 0.0006$). Significant increases in SWS were observed after the 40th minute post-treatment in the 0.6 mg/kg dose group, while cumulative SWS duration after the 2.0 mg/kg dose was significantly increased as compared to vehicle-treated animals from the 30th minute onward (Fig. 6). Fig. 7 shows the hypnograms derived from the recordings after each treatment in a single animal, that indicate both a gradual increase in the frequency and duration of SWS episodes and a reduction in the latency to the first SWS episode.

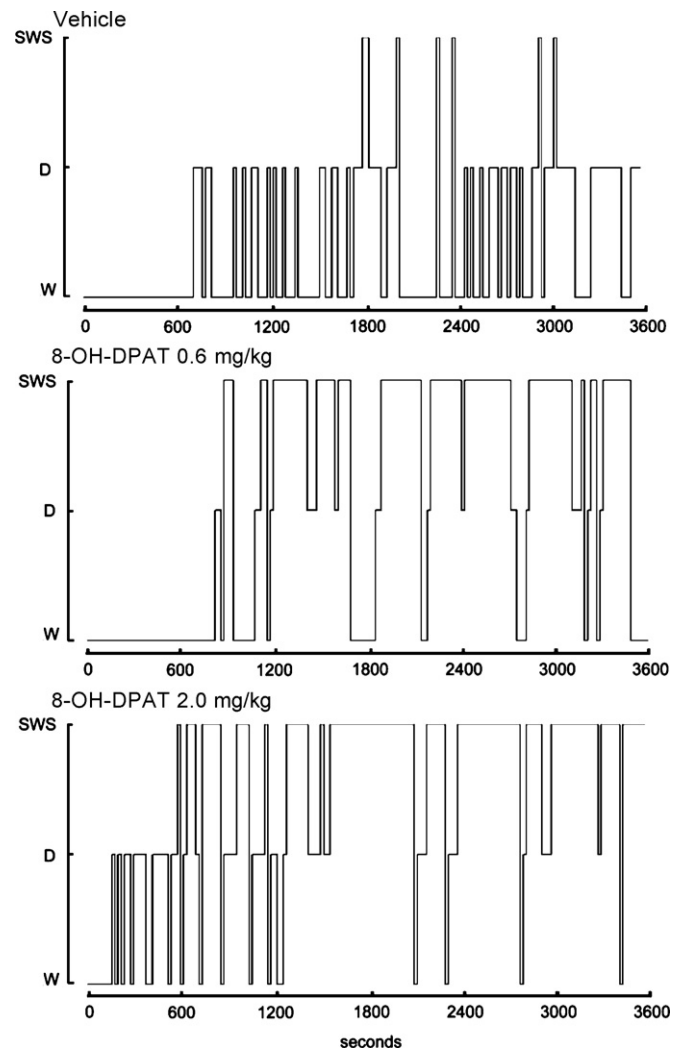


Fig. 7. Hypnograms of a single animal after systemic injections of 8-OH-DPAT (0.6 and 2.0 mg/kg) and of vehicle, showing the distribution, incidence, duration and latency to the first episode of electrographically identified waking (W), drowsiness (D) and slow wave sleep (SWS) episodes.

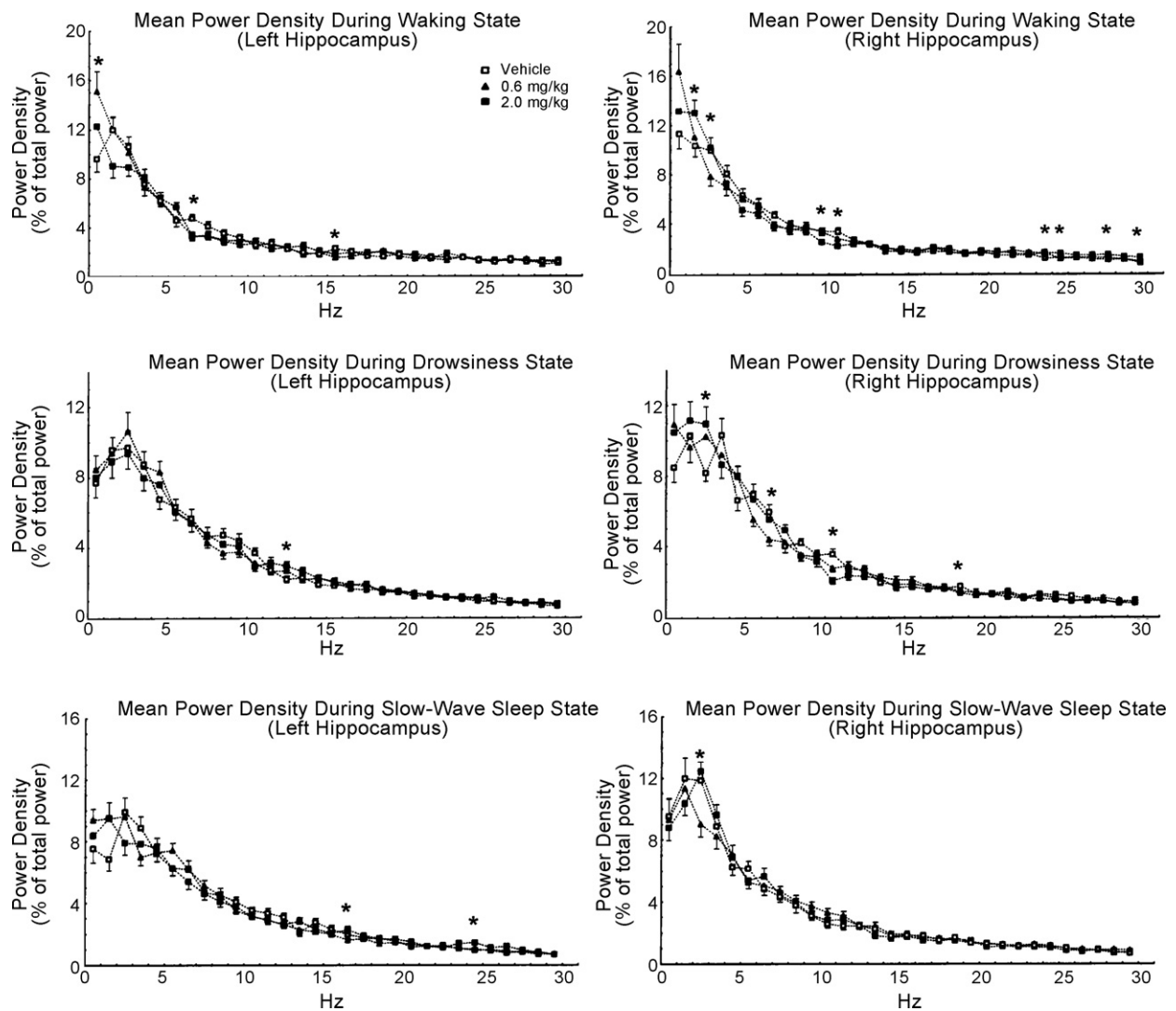


Fig. 8. EEG spectral power density (0–30 Hz, shown as percentage of the total power relative) during waking (W), drowsiness (D) and slow wave sleep (SWS) episodes in the right and left hippocampus. (*) Significant differences between 2.0 mg/kg and control group for each 1 Hz bin ($p < 0.05$, Mann–Whitney U test after a Kruskal–Wallis ANOVA).

Fig. 8 shows the relative power density in each state, in each right or left hemisphere hippocampus, after each 8-OH-DPAT dose. In the left hippocampus, few differences between 8-OH-DPAT- or vehicle-treated spectral data were observed. These differences were scattered across the spectra in isolated 1-Hz bins, forming no readily recognizable pattern of change. In general, the right hippocampus showed the same random distribution of isolated bins that were significantly affected by drug treatments. A single exception to this rule was observed in the right hippocampus during waking periods, when the relative power of frequency bins between 23 and 30 Hz were significantly and systematically increased after the highest 8-OH-DPAT dose.

4. Discussion

Our data indicate that systemic 8-OH-DPAT injections dose-dependently reduced food and water intake in free-feeding and -drinking pigeons and that these hypophagic and hypodipsic effects were accompanied by an intense increase in sleep-like behaviour, which was associated with a specific increase in electrographically identified SWS state. Hypophagia occurred acutely at all drug doses, was a long-lasting effect (extending to the day following the treatment at the higher doses) and was associated with a remarkable

increase in the latency to start eating and a modest reduction in the total duration of feeding. Water intake also decreased after 8-OH-DPAT injections, but this hypodipsic effect was, by far, less intense than the hypophagic one. Decreased drinking was observed only in the first hour after treatment and at the 3 highest doses. The water/food ratio significantly increased after 8-OH-DPAT injections, suggesting that the feeding was proportionally more vulnerable to the drug-induced inhibition than the drinking behaviour.

The present results also showed that 8-OH-DPAT injections provoked intense sleep at short latency. These sleep periods are interrupted by short waking and drowsiness epochs, during which ingestive and maintenance behaviour can be observed. Non-systematic observations carried out at the time of weighing the feeders indicate that these effects can outlast the 3-h observation period. This long lasting hypnogenic effect can, importantly, account for the reduction in ingestive behaviours, since it becomes apparent nearly 4–5 min after the injections and occupied almost 2/3 of the 1st hour after the highest 3 doses. However, an increase in sleep was significant at doses that were unable to affect duration and latency of ingestive behaviours. Furthermore, the doses that changed ingestive behaviours affected feeding and drinking differently. These observations suggest that a selective effect of 8-OH-DPAT on ingestive behaviours may have contributed to the

different hypophagic and hypodipsic responses, besides the evident sleep response.

These results are not consistent with previous data from our laboratory, showing strong dipsogenic and moderate hyperphagic responses after intracerebroventricular injections of 8-OH-DPAT in 24 h-fasted [85] and in free-feeding pigeons [15]. Increased water and food intake were also observed after microinjections of 8-OH-DPAT directly into the ponto-mesencephalic raphe nuclei, populated by 5-HT-immunoreactive neurons, in free-feeding pigeons [42]. These ingestive effects were blocked by pretreatment with p-MPPI (a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist), further suggesting the involvement of the 5-HT_{1A} receptor in these responses. Furthermore, intra-raphé injections of 8-OH-DPAT in pigeons also increased the water/food intake ratio. In contrast to the data here presented, however, the dipsogenic effect was proportionally more intense than the hyperphagic effect after intra-raphé injections of 8-OH-DPAT [42]. Nevertheless, in a sense, these discrepant data may be reconciled: irrespective of the administration route, 8-OH-DPAT treatments in the pigeon increase the water:food ratio and tend to have *poorly inhibitory or intensely excitatory* influences on drinking, while they show *poorly* (if any) *excitatory or intensely inhibitory* effects on feeding. It is apparent that although the intense sleep-like behaviour evoked by systemic 8-OH-DPAT may be the main cause of its hypoingestive effect, the latter is biased towards drinking, underscoring the previously advanced notion of an important role of 5-HT circuits and 5-HT_{1A} receptors in water intake control in pigeons [15,42,85]. Food and water intake have been shown to be positively correlated in time and amount in the pigeon, and the water:food intake ratio is very stable and resistant to fasting (which is accompanied by a severe reduction in drinking) and water deprivation (which evokes an intense hypophagic effect) in this species (e.g. [95]). The disruption of these relationships by 8-OH-DPAT treatments further reinforces the possibility of a drinking-selective effect of this drug.

While increased feeding is a common finding after both systemic and intra-raphé injections of 8-OH-DPAT in rodents in the middle or at the end of the dark period (when most feeding occurs in this species) (e.g. [6,14,24,31,36,63]), this drug induces a 5-HT_{1A} receptor-mediated hypophagia in fasted rats, in free-feeding rats at the beginning of the dark phase, and in rats adapted to daytime feeding (e.g. [1,14,25–27]). The present data indicated that 8-OH-DPAT-induced hypophagic and hypodipsic effects are relatively independent of the variations in food/water seeking through the active phase of the day. Ingestive inhibition appears to be somewhat more evident in a situation of low demand for food (during the morning–midday experiments), but is also present in the hours when feeding and drinking tend to increase [95], i.e., those preceding the dark period (during which the pigeon shows no food or water intake at all).

8-OH-DPAT is a selective agonist with high affinity for the 5-HT_{1A} receptor subtype (e.g. [20]) and its systemic injections in pigeons (in the dose range and route presently used) decrease the cerebrospinal fluid content of 5-HIAA, without affecting the other monoaminergic metabolites [39,54]. This effect is consistent with a reduction in 5-HT neuronal activity, observed in mammals after activation of 5-HT_{1A} somatodendritic autoreceptors, suggesting that at least part of the behavioural pattern described here may be attributed to a decreased activity in the 5-HT circuits. Since local injections of 8-OH-DPAT into the midline pontomesencephalic areas containing 5-HT-immunoreactive perikaria [42] or into the lateral ventricles [15,85] have been observed to evoke strong dipsogenic and mild hyperphagic effects (and no significant increase in sleep-like behaviour) the present results may suggest that the early and intense hypnogenic response to 8-OH-DPAT may be mediated by 5-HT_{1A} receptors located at sites far from those reached by ICV or pontomesencephalic injections, possibly at caudal brainstem

levels or at peripherally located receptors. In view of the above-mentioned increase in the water:food ratio, the hypnogenic effect may have only partially overridden a possible, pro-ingestive effect of this drug.

EEG tracings after 8-OH-DPAT injections indicated that the hypnogenic effects are associated with a reduced waking time, maintained amounts of drowsiness and to a specific increase in SWS electrographic patterns. The general aspects of the hippocampal EEG in these states, on visual examination, are undistinguishable from those observed in non-treated- or in vehicle-treated pigeons, and no episode of REM sleep was observed in these experiments. Absence of REMS in our recordings could be an indication that our animals were not thoroughly adapted to the microinjection, the recording procedure and/or the environment. However, the time spent in sleep behaviour in vehicle-treated animals in the three first experiments was not notably different from the total sleep time observed in vehicle-treated animals monitored by the EEG recordings, suggesting that the latter did not affect significantly the total sleep time. Furthermore, these recordings were carried out during the active part of the cycle, when REMS is less frequent than during the night (e.g. [66,90,92]), suggesting that the absence of REMS occurred by chance and that the drug treatments did not affect its (low) incidence. An alternative explanation for the absence of REMS in the present study may relate to the fact that the exposure to a low ambient temperature is known to inhibit REMS incidence in different species (e.g. [64,10]). Since the pigeon thermoneutral zone is approximately 25–30 °C [45], the ambient temperatures at the recording cages in the present study (22–24 °C) could have inhibited the occurrence of REM sleep.

Contrary to the results here presented, systemic injections of 8-OH-DPAT in rats, at similar doses (0.375 mg/kg), have been shown to increase waking and decrease SWS and REMS duration during an 8 h recording after treatment [7,83], while a lower dose (0.010 mg/kg) evoked no effect on sleep states. It should be noted that increases in SWS have also been observed in rats after systemic injections of the same low 8-OHDPAT dose (at 0.010 mg/kg s.c.) [59] and the discrepancy between these results is as yet unresolved. In humans, systemic administration of agonists at the 5-HT_{1A} receptor have been shown to inhibit REM sleep both in healthy and in depressed patients [37,38,80]. Our data also differs from the results obtained from central injections of 8-OH-DPAT in mammals. Microdialysis perfusion or bolus injections of 8-OHDPAT into the dorsal raphe nucleus have been reported to increase REMS in rats [7,8,60,61] and in cats [69] but did not modify the waking or SWS indexes. These data may indicate that while 5-HT_{1A}-mediated circuits play an important role in the control of sleep/waking states in mammals and in birds, their actions upon these states may differ profoundly. Interestingly, our power density analysis of the hippocampal EEG failed to show any striking differences between electrical activity during 8-OH-DPAT-induced sleep and the sleep occurring after vehicle injections, suggesting that this may cause little effect, if any, in the normal state-related electrical activity of the hippocampus. In this sense, 8-OH-DPAT-induced sleep appears to be electrographically similar to natural, diurnal sleep episodes in the pigeon.

In vivo studies in a variety of physiological and behavioural models of central 5-HT_{1A} receptor activation and *in vitro* electrophysiological experiments in rodents have demonstrated that WAY 100635 lacks agonist activity and, when injected alone at the dose used in this study, has no effects on feeding behaviour, performance in short-term memory tests, temperature or plasma levels of ACTH, corticosterone, oxytocin, prolactin and renin (e.g. [32,91]). In contrast, WAY 100635 alone increase the firing frequency of serotonergic neurons in the mammalian dorsal raphe nucleus in both *in vitro* and *in vivo* electrophysiological experiments and significantly increased hippocampal 5-HT release during active waking (but not during quiet waking or sleep) suggesting that 5-HT inputs may exert

a 5-HT_{1A} receptor-mediated tonic, inhibitory and state-related control on these neurons [34,62,32]. The present results indicated that WAY 100635 alone, at doses sufficient to block ingestive and hypnogenic effects of 8-OH-DPAT, reduces the time spent in sleep-like behaviour by the pigeons during the active period of the light–dark cycle. These data suggest that a tonic inhibitory control of waking-related serotonergic neurons, mediated by 5-HT_{1A} receptors, may also be present in pigeons during the light period of the day.

5-HT₇ receptors are also activated by 8-OH-DPAT, which have a binding affinity for the 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors approximately equal to that of 5-HT (e.g. [87]), and the activation of these receptors has been shown to account for different endocrine and thermal effects of this drug (e.g. [28]) or to interact to produce them (e.g. [53]). It has recently been shown in mammals that the resetting of the suprachiasmatic clock by 8-OH-DPAT injections, an effect related to the sleep/waking functional domain, is blocked by a 5-HT₇ antagonist, but not by a 5-HT_{1A} antagonist [56]. WAY 100635, considered a very potent and selective 5-HT_{1A} receptor antagonist, dose-dependently blocked the ability of 8-OH-DPAT to inhibit the firing of dorsal raphe 5-HT neurons and induced hypothermia, hyperphagia, and elevated plasma ACTH levels (e.g. [32]). The data here presented indicating that WAY 100635 reverses the 8-OH-DPAT-induced anti- ingestive and hypnogenic responses suggests that the ability of 8-OH-DPAT to evoke these effects is due to the activation of WAY 100635 sensitive sites (i.e., 5-HT_{1A} receptors) more than to its possible action on 5-HT₇ receptors.

As indicated in Section 1, decreased food intake has been observed in free-feeding and food-deprived quails (*C. japonica*, Galiformes) after systemic injections of 8-OH-DPAT (0.05–5.0 mg/kg, s.c.) and after a tryptophan-enriched diet [73,74], but the effects of these treatments on drinking or sleep-like behaviours were not reported. Systemic injections of the 5-HT precursor L-hydroxytryptophan, but not of 5-HT itself, increases water intake in these birds. Systemic injections of hydroxytryptophan, 5-HT or quipazine (an agonist at 5-HT_{2A-2C-3} receptors) in quails quickly evokes intense sleep-like postures, that are not affected by pre-treatment with ketanserin (a 5-HT_{2A-2C} antagonist), suggesting that these effects may be mediated by 5-HT receptors other than the 5-HT_{2A-2C} [68]. In contrast to the data here presented, systemic injections of 8-OH-DPAT (0.05 mg/kg bw) in 16-h food-deprived layer-type chickens, 60 min after refeeding, has been found to evoke late (60 min after injections) increases in food intake, with no effects on water intake [77]. The same treatment applied 15 min before refeeding reduced food intake (also without changes in water intake), and led to both water and food intake increases in 16-h water-deprived cockerels. The effects of these treatments on sleep-like behaviours were not reported. Hypophagy, but not dipsogenic or hypnogenic responses, has been observed after ICV injections of 5-HT in turkeys and in broiler chickens [21,22], while hypophagy and dipsogenic effects, but no reported hypnogenic responses, have been observed in free-feeding (but not in food-deprived) layer-type Leghorn chickens [23]. These data suggest that, while 5-HT circuits may play important roles in the control of ingestive behaviours and of sleep–waking states in birds, the behavioural effects of 5-HT_{1A} receptor activation may be strongly species-dependent. Since there appears to be little evidence for interspecific heterogeneity of pharmacological profiles or genetic sequences in 5-HT_{1A} receptors [70], a possible relationship between these species differences and the strong and divergent artificial selection procedures imposed on poultry species (e.g., toward different energy balance-related functions such as weight gain and feeding) should be investigated.

Data regarding the effects of 8-OH-DPAT on drinking, feeding, sleep and other spontaneous behaviours in pigeons may also be relevant to understanding the mechanisms associated with the

particular sensitivity of this species to anti-conflict or anxiolytic effects of 5-HT_{1A} agonists (e.g. [2,3,54]). It is interesting to note that 5-HT_{1A} receptors are important for the control of defensive and anxiety-related behaviours in mammals ([29,30,40,41,84]) and that the pigeon has been found to be a very sensitive model to probe for anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptor agonists. Systemic injection of 8-OH-DPAT, in a dose range similar to that used in the study here presented and which decreases the activity of 5-HT neurons in the pigeon [39,54], increases operant (key-pecking) responding in trials during which this response is punished by an electrical shock, but do not change response levels during non-punished trials [2–5,49,50,52,54]. These data suggest that, as observed in mammals, 5-HT_{1A} receptors may have important functional roles in the expression of defensive or fear-related behaviours, and that this may be a conserved attribute of the 5-HT₁ receptor functions of amniote species.

The distribution of 5-HT-immunoreactive (5-HT-IR) perikarya and fibers has been extensively described in a number of avian species (pigeon [11,42]; chicken [44,57,94]). These studies revealed that, in parallel to mammalian species, 5-HT-IR somata in the avian brain are mainly found in a number of midline (raphe) brainstem nuclei located at rostral pontine and mesencephalic levels (the raphe superior), at caudal pontine and medullary levels (the raphe inferior), as well as in the dorsolateral pontine tegmentum (the lateral group). 5-HT-IR, CSF-contacting cell bodies are also found in a circumventricular organ (the paraventricular organ) of the posterior third ventricle of birds. 5-HT-IR fibers in the pigeon constitute extensive ascending and descending fiber systems extending from the spinal cord to the rostral telencephalon. Dense terminal-like 5-HT-IR fibers have been shown to innervate the hippocampus, the medial aspects of the entire hypothalamus and preoptic region [44,58,76,81,88], and may provide the anatomical substrate for the important functional role of serotonergic circuits in the control mechanisms related to energy balance, to hydrosaline homeostasis and to sleep–waking cycle in avian forms.

In summary, the present results indicated that 5-HT-1A receptor-mediated serotonergic mechanisms play a crucial role in mechanisms controlling ingestive behaviours and sleep/waking states in both mammalian and avian species, their actions upon these states, and their localization in the brain and the role of the 5-HT_{1A} receptor in these phenomena may present substantial interspecific variance.

Acknowledgements

Alexandre Ademar Hoeller and Murilo Marcos dos Santos have contributed equally to the development of the present experiments, and both should be considered as the main authors of the present report. This work was supported by CNPq research grants to J.M.N. (proc. 471888/03-6) and to M.A.P. (proc. 474762/01-7). A.A.H. received a CNPq fellowship (M.Sc., proc.130817/2007-4) and T.S.S. received a M.Sc. fellowship from CAPES (41001010027P5). M.B.F. and M.A.H. received PIBIC fellowships from CNPq.

References

- [1] Arkle M, Ebenezzer IS. Ipsapirone suppresses food intake in food-deprived rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 2000;408(3):273–6.
- [2] Barrett JE, Gamble EH, Zhang L, Guardiola-Lemaitre BO. Anticonflict and discriminative stimulus effects in the pigeon of a new methoxy-chroman 5-HT_{1A} agonist (+)S 20244 and its enantiomers (+)S 20499 and (–)S 20500. *Psychopharmacol (Berl)* 1994;116:73–8.
- [3] Barrett JE, Gleeson S. Discriminative stimulus effects of 8-OH-DPAT in pigeons: antagonism studies with the putative 5-HT_{1A} receptor antagonists BMY 7378 and NAN-190. *Eur J Pharmacol* 1992;217:163–71.
- [4] Barrett JE, Vanover KE. 5-HT receptors as targets for the development of novel anxiolytic drugs: models, mechanisms and future directions. *Psychopharmacol (Berl)* 1993;112(1):1–12.

- [5] Barrett JE, Zhang L, Gleeson S, Gamble EH. Anxiolytic and antidepressant mechanisms of 5-HT_{1A} drugs in the pigeon: contributions from behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev* 1994;18:73–83.
- [6] 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* 1986;121:147–50.
- [7] 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* 1997;770:81–8.
- [8] Bjorvatn B, Ursin R. Changes in sleep and wakefulness following 5-HT_{1A} ligands given systemically and locally in different brain regions. *Rev Neurosci* 1998;9(4):265–73.
- [9] Brun SRM, Fernandez VLMF, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. *Regul Pept* 2001;98:127–35.
- [10] Cerri M, Ocampo-Garces A, Amici R, Baracchi F, Capitani P, Jones CA, et al. Cold exposure and sleep in the rat: effects on sleep architecture and the electroencephalogram. *Sleep* 2005;28:694–705.
- [11] Chalett E, Miceli D, Pierre J, Répérant J, Masicotte G, Herbin M, et al. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the brain of the pigeon (*Columba livia*). *Anat Embryol* 1996;193:209–27.
- [12] Cooper SJ, Ciccocioppo R. Effects of selective 5-HT_{1A} agonists in water-deprived rats on salt intake in two-choice tests. *Pharmacol Biochem Behav* 1993;45(3):513–8.
- [13] Cooper SJ, Fryer MJ, Neill JC. Specific effect of putative 5-HT_{1A} agonists, 8-OH-DPAT and gepirone, to increase hypertonic saline consumption in the rat: evidence against a general hyperdipsic action. *Physiol Behav* 1988;43(4):533–7.
- [14] Currie PJ, Coscina DV. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. *Neuroreport* 1993;4:1105–7.
- [15] Da Silva RA, De Oliveira ST, Hackl LPN, Spilere CI, Faria MS, Marino-Neto J, et al. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D/1B} receptors agonists in the pigeon. *Brain Res* 2004;1026:275–83.
- [16] Da Silva RA, Da Silva ASS, Poffo MJ, Ribas DC, Faria MS, Marino-Neto J, et al. Feeding behavior after metergoline or GR-46611 injections into the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pigeon. *Behav Brain Res* 2007;179:248–57.
- [17] Da Silva ES, dos Santos TV, Hoeller AA, dos Santos TS, Pereira GV, Meneghelli C, et al. Behavioral and metabolic effects of central injections of orexins/hypocretins in pigeons (*Columba livia*). *Regul Pept* 2008;147:9–18.
- [18] Dario AJS, Lopes PRC, Freitas CG, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Electrographic patterns of postprandial sleep after food deprivation or intraventricular adrenaline injections in pigeons. *Brain Res Bull* 1996;39:249–54.
- [19] De Gobbi JJ, Barbosa SP, De Luca Jr LA, Thunhorst RL, Johnson AK, Menani JV. Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. *Brain Res* 2005;1066:1–9.
- [20] 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* 2000;24:341–53.
- [21] Denbow DM. Body temperature and food intake of turkeys following ICV injections of serotonin. *Nutr Behav* 1984;1:301–4.
- [22] Denbow DM, Van krey HP, Cherry JA. Feeding and drinking response of young chicks to injections of serotonin into the lateral ventricle of the brain. *Poultry Sci* 1982;61:150–5.
- [23] Denbow DM, Van Krey HP, Lacy MP, Dietrick TJ. Feeding, drinking and body temperature of Leghorn chicks: effects of ICV injections of biogenic amines. *Physiol Behav* 1983;31:85–90.
- [24] Dourish CT, Hutson PH, Curzon G. Characteristics of feeding induced by the serotonergic agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). *Brain Res Bull* 1985;15:377–84.
- [25] Ebenezer IS. Effects of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT on food intake in food-deprived rats. *NeuroReport* 1992;3:1019–22.
- [26] Ebenezer IS, Arkle MJ, Tite RM. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin inhibits food intake in fasted rats by an action at 5-HT_{1A} receptors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007;29(4):269–72.
- [27] Ebenezer IS, Tite RM. Differential effects of the 5-HT_{1A} agonist gepirone on food intake in rats may depend on their motivation to eat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:727–31.
- [28] Faure C, Mnie-Filali O, Scarna H, Debonnel G, Haddjeri N. Effects of the 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 on rat hormonal and temperature responses to the 5-HT_{1A/7} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Neurosci Lett* 2006;404(1–2):122–6.
- [29] File SE, Gonzalez LE. Anxiolytic effects in the plus-maze of 5-HT_{1A} receptor ligands in dorsal raphe and ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:123–8.
- [30] File SE, Gonzalez LE, Andrews N. Comparative study of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. *J Neurosci* 1996;16:4810–5.
- [31] Fletcher PJ. Opiate antagonists inhibit feeding induced by 8-OH-DPAT: possible mediation in the nucleus accumbens. *Brain Res* 1991;560:260–7.
- [32] Fletcher A, Forster EA, Bill DJ, Brown G, Cliffe IA, Hartley JE, et al. Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behav Brain Res* 1996;73(1–2):337–53.
- [33] Fornal CA, Martin FJ, Metzler CW, Jacobs BL. Pindolol suppresses serotonergic neuronal activity and does not block the inhibition of serotonergic neurons produced by 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in awake cats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:229–38.
- [34] Fornal CA, Metzler CW, Gallegos RA, Veasey SC, McCreary AC, Jacobs BL. WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine 1A antagonist, increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278(2):752–62.
- [35] Fuchs T, Siegel JJ, Burgdorf J, Bingman VP. A selective serotonin reuptake inhibitor reduces REM sleep in the homing pigeon. *Physiol Behav* 2006;87:575–81.
- [36] Gilbert F, Dourish CT. Effects of the novel anxiolytics gepirone, buspirone and ipsapirone on free feeding and on feeding induced by 8-OH-DPAT. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;93:349–52.
- [37] Gillin JC, Buchsbaum MS, Valladares-Neto DC, Hong CCH, Hazlett E, Langer SZ, et al. Effects of zolpidem on local cerebral glucose metabolism during nonREM sleep in normal volunteers: a positron emission tomography study. *Neuropsychopharmacology* 1996;15:302–13.
- [38] Gillin JC, Jernajczyk W, Valladares-Neto DC, Golshan S, Lardon M, Stahl S. Inhibition of REM sleep by ipsapirone, a 5HT_{1A} agonist, in normal volunteers. *Psychopharmacology* 1994;116:433–6.
- [39] Gleeson S, Weissman BA, Seggel MR, Barrett JE. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. *Eur J Pharmacol* 1992;229:109–15.
- [40] Gordon JA, Lacefield CO, Kentros CG, Hen R. State-dependent alterations in hippocampal oscillations in serotonin 1A receptor-deficient mice. *J Neurosci* 2005;25(28):6509–19.
- [41] Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, et al. Serotonin 1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 2002;416:396–400.
- [42] Häckl LPN, Richter GO, Faria MS, Paschoalini MA, 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* 2005;1035:154–67.
- [43] Hagemann LF, Costa CV, Zeni LZR, Freitas CG, Marino Neto J, Paschoalini MA. Food intake after adrenaline and noradrenaline injections into the hypothalamic paraventricular nucleus in pigeons. *Physiol Behav* 1998;64:645–52.
- [44] 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. *Prog Brain Res* 1992;91:327–30.
- [45] Hissa R, John MT, Pilo B, Viswanathan M, George JC. Noradrenaline-induced hypothermia is suppressed in the vagotomized cold-exposed pigeon. *Comp Biochem Physiol* 1995;111A(1):89–97.
- [46] Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992;72:165–229.
- [47] Jacobs BL, Fornal CA. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 1999;21:95–155.
- [48] Karten HJ, Hodos WA. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). Baltimore: Johns Hopkins Press; 1967, 193 pp.
- [49] Kleven MS, Koek W. Pharmacological characterization of in vivo properties of putative mixed 5-HT_{1A} agonist/5-HT_{2A/2C} antagonist anxiolytics. I. Antipunishment effects in the pigeon. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276(2):388–97.
- [50] Kleven MS, Koek W. Discriminative stimulus effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in pigeons and rats: species similarities and differences. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:238–49.
- [51] Kocsis B, Varga V, Dahan L, Sik A. Serotonergic neuron diversity: identification of raphe neurons with discharges time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(4):1059–64.
- [52] Koek W, PatoiseauJF, Assieñ MB, Cosi C, Kleven MS, Dupont-Passelaigue E, et al. F 11440, a potent, selective, high efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist with marked anxiolytic and antidepressant potential. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:266–83.
- [53] Madden CJ, Morrison SF. Brown adipose tissue sympathetic nerve activity is potentiated by activation of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A/5-HT₇} receptors in the rat spinal cord. *Neuropharmacology* 2008;54:487–96.
- [54] Mansbach RS, Harrod C, Hoffmann SM, Nader MA, Lei Z, Witkin JM, et al. Behavioral studies with anxiolytic drugs. V. Behavioral and in vivo neurochemical analyses in pigeons of drugs that increase punished responding. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246(1):114–20.
- [55] Margatho LO, Barbosa SP, De Luca Jr LA, Menani JV. Central serotonergic and adrenergic/imidazoline inhibitory mechanisms on sodium and water intake. *Brain Res* 2002;956:103–9.
- [56] Mendoza J, Clesse D, Pévet P, Challet E. Serotonergic potentiation of dark pulse-induced phase-shifting effects at midday in hamsters. *J Neurochem* 2008;106(3):1404–14.
- [57] Metzger M, Toledo CA, Braun K. Serotonergic innervation of the telencephalon in the domestic chick. *Brain Res Bull* 2002;57:547–51.
- [58] Miceli D, Répérant J, Rio JP, Hains P, Medina M. Serotonin immunoreactivity in the retinal projecting isthmo-optic nucleus and evidence of brainstem raphe connections in the pigeon. *Brain Res* 2002;958:122–9.
- [59] Monti JM, Jantos H. Dose-dependent effects of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on sleep and wakefulness in the rat. *J Sleep Res* 1992;1:169–75.
- [60] Monti JM, Jantos H, Monti D. Increased REM sleep after intra-dorsal raphe nucleus injection of flesinoxan or 8-OHDPAT: prevention with WAY 100635. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12:47–55.
- [61] Monti JM, Monti D. Role of dorsal raphe nucleus serotonin 5-HT_{1A} receptor in the regulation of REM sleep. *Life Sci* 2000;66(21):1999–2012.
- [62] Munday MK, Fletcher A, Marsden CA. Effects of 8-OH-DPAT and 5-HT_{1A} antagonists WAY100635 and WAY100135, on guinea-pig behaviour and dorsal raphe 5-HT neurone firing. *Br J Pharmacol* 1996;117:750–6.

- [63] Parker GC, Coscina DV. Lesions of the posterior basolateral amygdala block feeding induced by systemic 8-OH-DPAT. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;68(4):729–34.
- [64] Parmeggiani PL. Thermoregulation and sleep. *Front Biosci* 2003;8:s557–67.
- [65] Pereira GV, Bose R, Paschoalini MA, Marino Neto J. Instrumented system for automatic acquisition of ponderal and behavioral data of related to feeding and drinking behaviors in avian species. In: *Anais do XXI Congresso da Associação Latino-americana de Ciências Fisiológicas*, vol. 21. Ribeirão Preto, SP, 2003, 341 pp.
- [66] Phillips NH, Berger RJ. Metabolism and body temperature during circadian sleep in the fed and fasting pigeon. In: Reinertsen RE, Bech C, editors. *Physiology of cold adaption in birds*. New York: Plenum; 1989. p. 265–74.
- [67] Phillips NH, Berger RJ. Regulation of body temperature, metabolic rate, and sleep in fasting pigeons diurnally infused with glucose or saline. *J Comp Physiol* 1991;161:311–8.
- [68] Polo PA, Reis RO, Cedraz-Mercez PL, Cavalcante-Lima HR, Olivares EL, Medeiros MA, et al. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). *Braz J Biol* 2007;67(1):167–71.
- [69] Portas CM, Thakkar M, Rainnie D, McCarley RW. Microdialysis perfusion of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OHDPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. *J Neurosci* 1996;16:2820–8.
- [70] Price GW, Roberts C, Watson J, Burton M, Mulholland K, Middlemiss DN, et al. Species differences in 5-HT autoreceptors. *Behav Brain Res* 1996;73:79–82.
- [71] Rashotte ME, Pastukhov IF, Poliakov EL, Henderson RP. Vigilance states and body temperature during the circadian cycle in fed and fasted pigeons (*Columba livia*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998;275:R1690–702.
- [72] Rattenborg NC, Amlaner CJ, Lima SL. Unilateral eye closure and interhemispheric EEG asymmetry during sleep in the pigeon (*Columba livia*). *Brain Behav Evol* 2001;58(6):323–32.
- [73] Reis LC, Almeida AC, Cedraz-Mercez PL, Olivares EL, Marinho Jr A, Thomaz CM. Evidence indicating participation of the serotonergic system in controlling feeding behavior in *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves). *Braz J Biol* 2005;65(2):353–61.
- [74] Reis LC, Marinho VR. Influence of 5-HT_{1A} agonist on the feeding behavior of *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves). *Braz J Biol* 2005;65(4):675–81.
- [75] Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, et al. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 2000;417(2):181–94.
- [76] Ritters LV, Erichsen JT, Krebs JR, Bingman VP. Neurochemical evidence for at least two regional subdivisions within the homing pigeon (*Columba livia*) caudolateral neostriatum. *J Comp Neurol* 1999;412:469–87.
- [77] Saadoun A, Cabrera MC. Effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on food and water intake in chickens. *Physiol Behav* 2002;75:271–5.
- [78] Sakai K, Crochet S. Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake–sleep states. *Neuroscience* 2001;104(4):1141–55.
- [79] Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 2005;28(3):152–7.
- [80] Seifritz E, Gillin JC, Rapaport MH, Kelsoe JR, Bhatti T, Stahl SM. Sleep EEG response to muscarinic and serotonin-1A receptor probe in patients with major depression and normal controls. *Biol Psychiatry* 1998;44:21–33.
- [81] Shimizu T, Karten HJ. Immunohistochemical analysis of the visual Wulst of the pigeon *Columba livia*. *J Comp Neurol* 1990;300:346–69.
- [82] Simansky KJ. 5-HT receptor subtypes influencing feeding and drinking: focus on the periphery. In: Cooper SJ, Clifton PG, editors. *Drug receptor subtypes and ingestive behaviour*, cap 4. London: Academic Press; 1996. p. 59–98.
- [83] Sørensen E, Grønli J, Bjorvatn B, Ursin R. The selective 5-HT_{1A} receptor antagonist p-MPPI antagonizes sleep–waking and behavioural effects of 8-OH-DPAT in rats. *Behav Brain Res* 2001;121:181–7.
- [84] Stefanski R, Palejko W, Bidzinski A, Kostowski W, Plaznik A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of midazolam and 5-HT_{1A} receptor agonists. *Neuropharmacology* 1993;32:977–85.
- [85] Steffens SM, Casas DC, Milanez BC, Freitas CG, Paschoalini MA, Marino-Neto J. Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections. *Brain Res Bull* 1997;44:681–8.
- [86] Steriade M, McCarley RW. Brain control of wakefulness and sleep. New York: Springer; 2005, 728 pp.
- [87] Stowe RL, Barnes NM. Selective labelling of 5-HT₇ receptor recognition sites in rat brain using [³H]5-carboxamidotryptamine. *Neuropharmacology* 1998;37:1611–9.
- [88] Toledo CA, Hamassaki-Britto DE, Britto LR. Serotonergic afferents of the pigeon accessory optic nucleus. *Brain Res* 1995;705:341–4.
- [89] Tomkins DM, Sellers EM, Fletcher PJ. Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABA_A agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. *Neuropharmacology* 1994;33:349–58.
- [90] Van Twyver H, Allison T. A polygraphic and behavioral study of sleep in the pigeon (*Columba livia*). *Exp Neurol* 1972;35:138–53.
- [91] Vicentic A, Li Q, Battaglia G, Van De Kar LD. WAY-100635 inhibits 8-OH-DPAT-stimulated oxytocin, ACTH and corticosterone, but not prolactin secretion. *Eur J Pharmacol* 1998;346:261–6.
- [92] Walker JM, Berger RJ. Sleep in the domestic pigeon (*Columba livia*). *Behav Biol* 1972;7:195–203.
- [93] Wirtshafter D. The control of ingestive behavior by the median raphe nucleus. *Appetite* 2001;36:99–105.
- [94] 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. *Biorg Amines* 1985;2:21–36.
- [95] Zeigler HP, Green HL, Siegel J. Food and water intake and weight regulation in the pigeon. *Physiol Behav* 1972;8:127–34.