



TIAGO SOUZA DOS SANTOS

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E SOBRE A EXPRESSÃO DA
PROTEINA Fos EM NEURÔNIOS SEROTONÉRGICOS APÓS
INJEÇÕES INTRACEREBROVENTRICULARES DE SEROTONINA EM
POMBOS (*Columba livia*)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FLORIANÓPOLIS (SC)

02/2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E SOBRE A EXPRESSÃO DA
PROTEINA Fos EM NEURÔNIOS SEROTONÉRGICOS APÓS
INJEÇÕES INTRACEREBROVENTRICULARES DE SEROTONINA EM
POMBOS (*Columba livia*)**

TIAGO SOUZA DOS SANTOS

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ MARINO NETO

Dissertação apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre.

FLORIANÓPOLIS (SC)

02/2010

Dedicatória

À minha mãe...

Agradecimentos

Estes não são simples agradecimentos. São acima de tudo a minha confissão de cumplicidade a todos aqueles que me apoiaram, inspiraram, cativaram, ensinaram, aguentaram durante todo este tempo. Levarei comigo um pouquinho do que aprendi e vivi com cada um: dos meus amigos de laboratório com os quais dividi agruras, descobertas e acima de tudo, amizade: Alexandre, “o chofer não teve “curpa” Iracema...”, Crispim, “se essa for a primeira vez que essa tela azul apareceu não esquenta, se não for, chame o...”, Fernando, “porra bixo, pára de cantarolar essa música chata! Vou fumar um caretinho”, Cris, “pra você, pode comer que você tá muito magrinho!”, Cris Meneghelli, “Tiago, espera só um pouquinho que eu já tô indo lá ver o que tu fez de errado”, Martina, “o que eu faço com um rato que só uma orelha?”, as meninas que trabalharam comigo, Marília, Grasi, Camila, Anita, Hilda, Bia, “calma, explica tuuudo de volta”, Eduardo, “eu jurava que ele tava vivo!”; os amigos com os quais dividi apartamento, quarto, copo, comida, ombro...: Washington, “fala mané! O que ta rolando?!”, Cássio (frango), “é sempre bom ter alguém pra morar contigo, assim você sempre tem alguém pra xingar”, Bismark, “2 da manhã: entoces, cafesito?”, Jesus (o peruano), “Jesus, eu troco esta revista pela carteirinha do RU, fechado?”, Jairo, “porca miséria!”, Daniel, “upa tio!”. Ao S. Carlão, “ooo Tiaguinho, abre aí na pg central do jornal, abre...”, dona Vilma, “pode tomar sim, passei agorinha”, Sandrinha, “Tiago, não esquece a minha toca!”, Nivaldinho, “não esquece, não esquece, o teu prazo ta acabando!”.

Agradeço especialmente a algumas pessoas que tornaram tudo isso possível: minha família, pela educação que eu tive, pelo carinho e humildade que herdei de minha mãe, pela capacidade, orgulho e vontade de lutar do meu pai e que eu trago comigo, aos meus irmãos por me acompanhar nos desafios de nossa infância e nos diferentes caminhos que escolhemos. À minha namorada, Fernanda, a pessoa doa um significado todo especial a tudo o que eu faço, penso e espero, e acima de tudo por estar ao meu lado e fortalecer meus sonhos a cada momento que estamos juntos, te amo gatinha! Ao meu sempre orientador e amigo, professor Édison, quem me empurrou da beira para dentro desse precipício fascinante que é a neurociências; Ao Alexandre, sempre por perto, incentivador, instrutor, lobista, cuja ajuda e acolhimento foram imprescindíveis durante o meu estágio, obrigado meu velho! À Cris Meneghelli, pela paciência com que me ensinava a imuno e sobretudo pela amizade que temos desde a época da graduação. À professora Cilene (CUIDADO!! Cilene!), pelas dicas e principalmente pela preocupação em pensar sobre os meus resultados e o prazer em discuti-los.

E ao professor Marino, lembro até hoje o dia em que abri o meu email e li: “tenho o prazer de anunciar que entre os 8 candidatos, você foi um dos escolhidos a estagiar no meu laboratório”. Professor, o prazer foi e continua sendo todo meu. Muito obrigado por tudo que aprendi, principalmente por entender que...

“As palavras mais calmas são aquelas que trazem a tempestade, pensamentos que se aproximam em passos de pomba dirigem o mundo...”

F. Nietzsche, em *Assim falou Zaratustra*

Epígrafe

“Deixa eu lhe contar, meu pequeno Vishnu, sobre um espírito iogue chamado Jeev. Um espírito iogue chamado Jeev nasceu novecentos e noventa mil vezes.

Vishnu se detém nos degraus para ouvir. Qual das histórias de Jeev sua mãe vai lhe contar?

Há muitos e muitos séculos, no tempo em que os Pandava e os Kaurava estavam vivendo o Mahabharata, Jeev tinha acabado de deixar de ser inseto. Às vezes, renascia como pássaro e algumas poucas vezes até como um pequeno animal. Brahma tinha acordado do seu sono e acabado de exalar o universo recentemente. O ar ainda era novo, os riachos tinham água fresca e clara; havia na terra florestas encantadas e até as árvores tinham espíritos vivendo dentro delas. As vidas que o pequeno Jeev levou foram fáceis: ele saltava, corria, usando suas pequenas quantidades de ar puro e água que precisava para a sua existência. Passou por muitas mortes e ressurreições, é verdade, mas quando se é pequeno não é muito doloroso renascer.”

Manil Suri, trecho do livro *A morte de Vishnu*

RESUMO

Em mamíferos, os circuitos serotoninérgicos têm sido relacionados à modulação de comportamentos ingestivos e dos estados de sono e vigília. No presente trabalho, foram examinadas as respostas comportamentais e ingestivas e também o padrão de expressão da proteína Fos no tronco encefálico, após injeção intracerebroventricular de serotonina (5-HT, 50, 150 ou 300 nmol/2µl) em pombos (*Columba livia*) com livre acesso à água e alimento. As injeções de 5-HT provocaram marcante sequência comportamental que consistiu em veemente ingestão de água dentro dos primeiros 15 minutos após os tratamentos, seguida por comportamentos de manutenção e então por prolongados períodos de comportamentos típicos de sono. Estes efeitos foram de curto-prazo: os padrões de ingestão de água foram similares entre animais tratados com 5-HT ou veículo 2, 3 e 24 h após as injeções. Nenhum efeito consistente foi observado sobre a ingestão de alimento. A densidade de células imunorreativas à Fos (Fos+) ou tanto à Fos e a triptofano hidroxilase (Fos+/TPH+) foram examinadas em seis áreas do tronco encefálico rostral em pombos com livre acesso à água e alimento que foram tratados com 5-HT (5-HTW) ou veículo. Um grupo controle adicional foi tratado com 5-HT, mas não teve acesso à água nas duas horas seguintes à injeção (5-HTØ). Na rafe pontina, a densidade Fos+ foi positivamente correlacionada com índices de comportamentos típicos de sono e aumentou tanto nos animais 5-HTW como nos animais 5-HTØ. No núcleo da linha média pontomesencefálica, o linearis caudalis, as marcações Fos+ e Fos+/TPH+ foram negativamente correlacionadas com os comportamentos típicos de sono e foram reduzidas nos animais 5-HTØ. Na área de A8, a densidade de Fos+/TPH+ foi reduzida

em ambos os grupos tratados com 5-HT e foi positivamente correlacionada com a ingestão de alimento e negativamente correlacionada com o sono. Estes dados indicam que efeitos hiperdípsicos e hipnóticos de injeções ICV de 5-HT em pombos com livre acesso à água e alimento resultam da inibição da atividade tônica de neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico. Além disso, indicam que pode existir em aves, semelhante a mamíferos, uma influência inibitória de neurônios serotoninérgicos sobre o comer, o beber e sobre o sono, possivelmente relacionados à sequência de saciedade pós-prandial e que a coordenação deste cenário fisiológico por circuitos serotoninérgicos pode representar um atributo altamente preservado no encéfalo de amniótas.

Palavras chave: comer, beber, sono, rafe, serotonina, evolução.

ABSTRACT

In mammals, serotonergic circuits have been shown to play important roles in the control of ingestive behaviors and sleep-waking states. In the present work, the behavioral and ingestive responses as well as the pattern of Fos-like activity in the brainstem following intracerebroventricular (ICV) injections of serotonin (5-HT at 50, 150 or 300 nmol/2 μ l) were examined in free-feeding/free-drinking pigeons (*Columba livia*). 5-HT injections evoked a remarkable behavioral sequence that consists of vehement drinking behavior within the first 15 min after injections, followed by preening and then by prolonged periods of sleep-like behavior. These effects are short-lived: the patterns of ingestive behavior are similar in 5-HT- and vehicle-treated animals at 2, 3 and 24 h after treatments. No consistent effect on feeding behavior was observed. The density of cells immunoreactive to Fos (Fos+) or to both Fos and tryptophan hydroxylase (Fos+/TPH+) were examined in six areas of the rostral brainstem of free-feeding/free-drinking birds treated with 5-HT (5-HTW) or vehicle. An additional control group was treated with 5-HT without access to water during the 2 hours after the treatment (5-HT \emptyset). In the pontine raphe, Fos+ density positively correlated to sleep behavioral indexes and increased in both 5-HTW and 5-HT \emptyset animals. In the midline nucleus linearis caudalis, Fos+ and Fos+/TPH+ labeling negatively correlated to sleep-like behaviors and were reduced in 5-HT \emptyset animals. In the A8 area, Fos+/TPH+ cell density was reduced in both 5-HTW and 5-HT \emptyset animals and was positively correlated to food intake whereas negatively correlated to sleep. These data indicate that hyperdipsic and hypnotic effects of ICV 5-HT in free-feeding pigeons results from inhibition of the tonic activity of serotonergic neurons in brainstem. Moreover, it indicates that it may exist in

birds, as in mammals, an inhibitory influence of serotonergic neurons on feeding, drinking and sleep behaviors, possibly related to the postprandial Behavioral Satiety Sequence and that the coordination of this physiological set by central 5-HT circuits may represent a highly conserved attribute of the amniote brain.

Keywords: feeding, drinking, sleep, raphe, serotonin, evolution

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia demonstrativa do correto posicionamento da cânula guia no sistema ventricular.....33

Figura 2: Efeitos de injeções ICV de 5-HT (50, 150 e 300 nmol) e veículo sobre a ingestão de água e alimento na primeira, segunda e terceira hora após as injeções, sobre a quantidade acumulada ingerida de água e alimento em 2, 3 e 24 h, e também sobre a razão entre a ingestão de água/alimento na primeira, terceira e 24 h após os tratamentos.....34

Figura 3: Efeitos de injeções ICV de 5-HT (0, 50, 150 ou 300 nmol) sobre a latência, duração e frequência dos comportamentos ingestivos, típicos de sono e exploratórios durante a primeira hora após os tratamentos em pombos com livre acesso à água e alimento.....38

Figura 4: Efeitos de injeções ICV de 5-HT sobre a distribuição temporal da duração e da frequência dos comportamentos ingestivos e de sono durante a primeira hora após os tratamentos em pombos com livre acesso à água e alimento.....40

Figura 5: Sequência de comportamentos apresentados por pombos alimentados livremente após o tratamento com 5-HT (150 nmol) ou veículo. Somente os comportamentos que sofreram alterações estatisticamente significantes são mostrados.....41

Figura 6: Fotomicrografia ilustrando a expressão de Fos em um campo de contagem representativo (o núcleo AnI); desenhos esquemáticos de secções frontais do tronco encefálico do pombo mostrando a localização dos campos de quantificação em cada um dos núcleos e regiões estudadas e desenhos esquemáticos de secções frontais do tronco encefálico do pombo mostrando a distribuição relativa das diferentes marcações pelos núcleos aqui estudados.....43

Figura 7: Fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em 6 núcleos serotoninérgicos do tronco encefálico do pombo, 2 horas após injeção ICV de 5-HT (150 nmol) em pombos com livre acesso à água e alimento (5-HTW), com acesso à alimento, mas

privados de água (5-HTØ) ou em pombos tratados com veículo com livre acesso à água e alimento após as injeções.....45

Figura 8: gráficos de correlação entre índices de sono (duração e frequência) e diferentes tipos de marcação para diferentes núcleos investigados.....46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Esquema em quadrado latino dos tratamentos (doses) administrados a cada pombo de acordo com a semana de experimento..... 19
- Tabela 2: Catálogo com a descrição de cada comportamento do pombo usado na avaliação e quantificação da análise comportamental.....21
- Tabela 3: Efeitos de injeções ICV de 5-HT sobre a latência, duração e frequência dos comportamentos ingestivos, exploratórios, típicos de sono e de manutenção na primeira hora após os tratamentos em pombos com livre acesso à alimento e água..... 38
- Tabela 4: Efeitos das injeções de 5-HT ou veículo sobre a expressão Fos em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos da rafe pontomesencefálica em pombos com acesso (5-HTW) ou privados (5-HTØ) de água após as injeções. Os dados são apresentados em porcentagem de células duplamente marcadas (Fos+/TPH+) do total de células Fos+ ou do total de células TPH+, em cada núcleo investigado.....47

ABREVIATURAS

Anl, núcleo annularis

A6, (ou LoC, núcleo locus ceruleus, parte caudal)

A8, (ou LoC, núcleo locus ceruleus, parte rostral)

BC, brachium conjunctivum

BCD, brachium conjunctivum descendens

CS, núcleo central superior

DBC, decussação do brachium conjunctivum

flm, fascículo longitudinal medial

GCt, substância cinzenta central

LC, núcleo linearis caudalis

nIV, núcleo do nervo troclear

PrV, núcleo sensorial principal do nervo trigêmeo

R, núcleo rafe pontis

TIO, trato istmo-óptico

Zp-flm, zona peri-fascículo longitudinal medial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1 Experimento 1	17
2.1.1 Animais e cirurgia.....	17
2.1.2 Drogas e injeções.....	18
2.1.3 Procedimentos experimentais	19
2.1.4 Análise histológica.....	22
2.1.5 Análise de dados.....	22
2.2.1 Experimento 2	23
2.2.2 Análise de dados.....	31
3. Resultados	32
3.1 Experimento 1	32
3.2. Experimento 2	42
4. Discussão.....	49
5. Referências	63

1. Introdução

Na busca por um fator presente no sangue possivelmente relacionado à hipertensão, um grupo de pesquisadores liderados por Irvine Page conseguiu em 1948 isolar e caracterizar uma substância presente no soro sanguíneo bovino com propriedades vasoconstritoras (Rapport et al., 1948); eles chamaram esta substância de serotonina usando as palavras latina *serum* (soro) e grega *tonic* (tônus) para batizá-la, graças à sua presença no soro e ao seu efeito sobre o tônus vascular. Antes disso, em 1937, o italiano Victorio Erspamer, extraiu uma substância das células enterocromafins do trato gastrointestinal responsáveis pela contração do músculo liso e a chamou de enteramina. Mais tarde, foi verificado que ambas se tratavam da mesma substância e passou a ser chamada apenas de serotonina (Espamer e Asero, 1952) (para revisão ver: Barnes e Sharp, 1999; Mohammad-Zadeh et al., 2008).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é uma monoamina evolutivamente antiga, encontrada em algumas espécies de invertebrados (Csaba, 1993) e presente no sistema nervoso da lampreia, peixe pertencente ao grupo de vertebrados mais primitivo existente, o Agnatha (aproximadamente 500 milhões de anos) (Pierre et al., 1992; Abalo et al., 2007).

A descoberta da 5-HT no tecido nervoso em 1953 pela Dra. Betty Mack Twarog, e do seu envolvimento na modulação da contração dos músculos lisos do mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), responsáveis pelo seu deslocamento (para revisão ver: Whitaker-Azmitia, 1999), e do seu possível papel como

neurotransmissor (Brodie e Shore, 1957), fomentou a busca por mecanismos fisiológicos, bioquímicos e neuroanatômicos na tentativa de entender o papel da 5-HT no sistema nervoso.

A 5-HT participa de uma gama variada de funções cerebrais, e o desequilíbrio do sistema serotoninérgico está implicado na patogênese de muitas desordens psiquiátricas e neurológicas (Kennet et al., 1987; Mansbach et al., 1988; Connors et al., 2006; Monti e Jantos, 2008;). Embora a 5-HT participe do controle de vários processos fisiológicos e comportamentais, ela não parece ser essencial para nenhum deles. Esta aparente contradição é remediada pelo conceito de que os circuitos serotoninérgicos exercem uma influência modulatória tônica em seus mais diversos alvos (Jacobs e Azmitia, 1992).

De acordo com este seu papel modulatório está a sua organização anatômica e morfológica, baseada no arranjo dos corpos celulares na ou próximos da linha média do tronco mesencefálico, e expansiva e densa projeção axonal. Além disso, seus axônios são caracterizados pelo alto número de varicosidades (Moukhles et al., 1997), que são equivalentes a terminais nervosos contendo vesículas serotoninérgicas ao longo de sua ramificação que amplificam o poder de interação da 5-HT (Grimaldi e Fillion, 2000).

A primeira localização histológica da 5-HT foi realizada com técnicas de histofluorescência, que revelaram a localização de neurônios serotoninérgicos na linha média do tronco encefálico (Dahlström e Fuxe, 1964). A análise destes neurônios serotoninérgicos foi subsequentemente refinada pelo desenvolvimento de técnicas de imuno-histoquímica para visualização tanto da triptofano hidroxilase

(TPH, a enzima de síntese da 5-HT) (Joh et al., 1975) como da própria 5-HT (Steinbusch, 1981).

Em mamíferos, os neurônios serotonérgicos são encontrados em agrupamentos designados de B1 – B9 (Dahlström e Fuxe, 1964) espalhados pela ou próximos à linha média do tronco encefálico, divididos em dois grupos baseados na sua distribuição e principais projeções: grupo rostral (B5 – B9), confinados ao mesencéfalo e ponte, com maiores projeções para o prosencéfalo, e um grupo caudal (B1 – B4), localizados desde a parte caudal da ponte à parte caudal do bulbo, projetando-se para o tronco encefálico caudal e para a medula (Hornung, 2003; Tork, 1990).

A presença de neurônios serotonérgicos concentrados na linha média do tronco encefálico dorsomedial é um dos mais conservados atributos anatômicos presentes no encéfalo dos vertebrados, o que caracteriza a importância filogenética da 5-HT (Parent, 1981; Azmitia, 2007). Neurônios imunorreativos a 5-HT foram encontrados nestas mesmas regiões na lampreia (Abalo et al., 2007) e em outras espécies de peixes (Ekström e Ebbesson, 1989), em anfíbios (Muñoz et al., 2001), em répteis (Rodrigues et al., 2008) e em aves (Yamada et al., 1984; Alesci e Bagnoli, 1988; Cozzi et al., 1991; Challet et al., 1996; Häckl et al., 2005; Meneghelli et al., 2009).

A primeira descrição dos neurônios serotonérgicos realizada em aves foi feita utilizando o método de fluorescência induzida por formaldeído (Fuxe e Ljunggren, 1965), o mesmo método utilizado na primeira descrição de neurônios serotonérgicos em mamíferos (Dahlström e Fuxe, 1964). Neurônios serotonérgicos, identificados pela fluorescência de cor amarela, apresentavam

padrão de distribuição similar ao apresentado por mamíferos, localizados principalmente na região da rafe do tronco encefálico (Fuxe e Ljunggreen, 1965). Por causa de limitações desta técnica histoquímica, poucos detalhes puderam ser observados da tipologia dos neurônios e da distribuição das fibras serotoninérgicas. Descrições mais detalhadas do circuito serotoninérgico de aves (Yamada e Sano, 1985; Cozzi et al., 1991 Häckl et al., 2005; Meneghelli et al., 2009) puderam ser feitas, embaladas pelo avanço dos métodos imuno-histoquímicos utilizados em mamíferos (Steinbusch et al., 1978). Além disso, a utilização de métodos imuno-histoquímicos de dupla marcação para neurônios serotoninérgicos e marcadores de ativação neuronal, tem sido usada com sucesso para demonstrar a distribuição de neurônios serotoninérgicos que participam em uma série de mecanismos comportamentais (Staub et al., 2005; Abrams et al., 2005; Spiga et al., 2006).

Recentemente, nosso laboratório descreveu em detalhes a distribuição de neurônios e fibras serotoninérgicas no tronco encefálico e no diencéfalo do pombo (*Columba lívia*) usando métodos imuno-histoquímicos de simples e dupla marcação para a 5-HT e TPH, cromogênicos e fluorescentes (Meneghelli et al., 2009). A grande maioria dos grupos de neurônios serotoninérgicos observados está situada na linha média do tronco encefálico, estendendo-se de níveis caudais do bulbo até níveis hipotalâmicos mediais. Esta foi a primeira descrição de corpos celulares e processos imunorreativos a TPH em aves. Os resultados de dupla marcação apresentaram colocalização de ambas as marcações na maioria dos pericários do tronco encefálico, denotando que esses neurônios duplamente marcados são de fato, neurônios serotoninérgicos verdadeiros e ativos sintetizadores de 5-HT. Em certas regiões hipotalâmicas, apenas neurônios que

contatavam o espaço ventricular (de regiões circunventriculares) apresentaram-se imunorreativos tanto a TPH quanto a 5-HT. Estes neurônios parecem idealmente posicionados nestas regiões para afetar a composição do fluído cérebro espinhal de acordo com certas aferências hipotalâmicas e/ou influenciar funções neuroendócrinas, a partir de sinais presentes no fluído cérebro espinhal, via hipotálamo (Calas, 1975).

Outro fator em consonância com a abrangente ação da 5-HT é o seu grande número de receptores, que excede o de qualquer outro sistema transmissor. Os receptores serotoninérgicos são classificados em sete famílias (5-HT₁ a 5-HT₇), todas pertencentes à grande família de receptores acoplados à proteína G, exceto a família 5-HT₃ que são canais iônicos dependentes de ligante (Hoyer, 1994).

A diversidade de receptores de 5-HT participa da habilidade do sistema serotoninérgico em interagir diferentemente com outros neurotransmissores, permitindo a grande variação na sintonização das funções do sistema nervoso pela atividade da 5-HT (Grimaldi e Fillion, 2000). Um argumento para esta grande variedade de receptores, é que a 5-HT aparentemente tem sido usada como um neurotransmissor ou neuromodulador há muito tempo, estando presente em organismos muito antigos [moluscos (Newcomb et al., 2006), animais existentes desde o fim da era paleozóica entre 540 a 245 milhões de anos atrás]. Assim, a multiplicidade destes receptores pode representar mecanismos evolucionários que ao longo do tempo permitiram à 5-HT modular múltiplas funções (Jacobs e Azmitia, 1992; Turlejski, 1996).

Neurônios produtores de 5-HT desempenham importantes papéis relacionados a mecanismos fisiológicos fundamentais nos sistemas nervoso, cardiovascular e gastrintestinal, e são importantes na modulação de funções cerebrais cruciais, incluindo o controle do despertar e fenômenos relacionados ao ciclo sono e vigília (Jacobs e Fornal, 1999; Sakai e Crochet, 2001; Steriade e McCarley, 2005; Datta e MacLean, 2007; Monti et al., 2008), do aprendizado, memória e mecanismos de humor (King et al., 2008; González-Burgos e Feria-Velasco, 2008), assim como comportamentos defensivos/agressivos (Graeff et al., 1996; de Boer e Koolhaas, 2005) e ingestivos (de alimento, água, sal e álcool) (e.g., Blundell, 1986; Tomkins et al., 1994; Simansky 1996; De Vry e Schreiber, 2000; De Gobbi et al, 2005; Margatho et al., 2002).

Dentre as funções exercidas pela 5-HT, está a modulação dos comportamentos ingestivos. Em mamíferos, circuitos serotoninérgicos estão envolvidos de forma crucial no controle da ingestão de diversas substâncias e nutrientes, incluindo alimentos sólidos, água, sódio e álcool. Por exemplo, manipulações farmacológicas que reduzem a neurotransmissão serotoninérgica central estimulam a ingestão de alimentos, enquanto aumentos na atividade de circuitos centrais que liberam 5-HT inibem este comportamento (Simansky, 1996).

Os efeitos hipofágicos da 5-HT e de seus agonistas parecem ser mediados por diversos subtipos de receptores pós-sinápticos em circuitos hipotalâmicos (Samanin e Grignaschi, 1996). Em linha com estes dados, um volume crescente de evidências aponta para a idéia de que alterações na atividade serotoninérgica central possam cumprir um importante papel na fisiopatologia de distúrbios da

ingestão de alimentos em humanos (e.g., Leibowitz, 1990; Weltzin et al., 1994). A ação inibitória de circuitos serotoninérgicos centrais parece decorrer tanto de ações fásicas (ou dependentes de estímulos transientes originados pela própria ingestão de alimentos), quanto de atividades tônicas (mantendo baixa a probabilidade de um episódio ingestivo ser iniciado durante o estado de saciedade).

Em apoio à existência desta função inibitória tônica, a injeção de metergolina (um antagonista não-seletivo de receptores 5-HT_{1/2}) no núcleo basolateral posterior da amígdala ou a ativação de receptores 5-HT_{1A} (que diminui a atividade de neurônios serotoninérgicos) desencadeiam aumento de ingestão de alimentos em animais saciados (Coscina et al., 1994; Currie e Coscina, 1996; Parker e Coscina, 2001; Parker et al., 2001). Além disso, a injeção de d-fenfluramina (um potencializador da liberação e inibidor da recaptção de 5-HT) no núcleo parabraquial lateral de ratos com livre acesso à água e com alimento restituído após quatro horas de privação, diminui de maneira dose-dependente a ingestão de alimento 30 minutos após os tratamentos (Simanski e Nicklous, 2002).

Mecanismos serotoninérgicos centrais também cumprem funções importantes no controle da ingestão de água e sódio em mamíferos. A ativação de receptores 5-HT_{2A/2C} por via intracerebroventricular (ICV) reduz a ingestão de água induzida por privação e pela injeção ICV de carbacol ou angiotensina II em ratos (Reis et al., 1990 a; Reis et al., 1990 b) enquanto que lesões do núcleo dorsal da rafe ou depleção de 5-HT provocada por injeções sistêmicas de p-clorofenilalanina (PCPA, inibidor da TPH que diminui a síntese de 5-HT) aumentam a ingestão de água e de sódio em ratos (Cavalcante-Lima et al., 2005 a; Cavalcante-Lima et al.,

2005 b), e a administração sistêmica de 8-hidroxi-2 (di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT, um agonista de receptores 5-HT_{1A/7}) desencadeia aumento no consumo de água e de salina hipertônica (Cooper e Desa, 1987; Cooper et al., 1988; Cooper e Ciccocioppo, 1993; Cooper e Barber, 1993).

Por outro lado, a ativação de receptores 5-HT_{1D} inibe a ingestão de água induzida pela estimulação de circuitos centrais colinérgicos, angiotensinérgicos e adrenérgicos central (De Castro e Silva et al., 1997), e o bloqueio de receptores 5-HT₄ potencializa o efeito dipsogênico da ANGII e inibe a ingestão de água induzida pela ativação de receptores colinérgicos centrais (Castro et al., 2000). Além disso, a ativação de receptores 5-HT_{2C} e 5-HT₃ centrais bloqueia a ingestão de água produzida por diferentes estímulos fisiológicos, bem como a ingestão de salina hipertônica induzida por depleção de sódio (Castro et al., 2002a; 2002b; 2003; Cooper e Desa, 1987; Cooper et al., 1988; Cooper e Ciccocioppo, 1993; Cooper e Barber, 1993; Neil e Cooper, 1989). Estes dados indicam que tais circuitos serotoninérgicos podem estar envolvidos de forma crucial nos mecanismos de controle da osmolaridade e do volume do meio interno em mamíferos.

Circuitos cerebrais envolvidos na regulação dos estados de alerta e nas alterações gerais de atividade elétrica de diferentes regiões cerebrais durante as várias fases do ciclo sono-vigília, também parecem estar sob a influência inibitória tônica da 5-HT. Em ratos acordados, neurônios serotoninérgicos apresentam padrão rápido e regular de descarga. Esta atividade gradualmente declina ao longo do ciclo sono-vigília e praticamente silencia durante o sono profundo (Jacobs e Fornal, 1999). Ratificando estes achados, a perfusão de 8-OH-DPAT no núcleo

dorsal da rafe de ratos aumentou em 4 vezes o sono REM (rapid eye movements, movimento rápido dos olhos), possivelmente atuando em autoreceptores pré-sinápticos, enquanto a injeção sistêmica aumentou a vigília e reduziu o sono de ondas lentas, possivelmente por atuar em receptores 5-HT_{1A/7} pós-sinápticos (Bjorvatn et al., 1997). Além disso, antagonistas 5-HT₂, como a ritanserina, promovem intenso aumento do sono de ondas lentas em roedores e humanos, efeitos mediados por receptores 5-HT_{2A} e/ou 5-HT_{2C} (Kantor et al., 2004).

Nosso laboratório vem acumulando evidências a respeito do papel dos circuitos serotoninérgicos envolvidos nas alterações comportamentais provocadas pela 5-HT em pombos (Steffens et al., 1997; Brun et al., 2001; Da Silva et al., 2004; Häckl et al., 2005; Da Silva et al., 2007; Dos Santos et al., 2009; Campanella et al., 2009). Os resultados têm demonstrado que, assim como em mamíferos, a 5-HT participa substancialmente da modulação dos comportamentos ingestivos e dos estados de alerta em ave.

A administração ICV ou sistêmica de 5-HT em pombos privados de alimento por 24 h, produziram forte redução da ingestão de alimentos durante a primeira hora após os tratamentos, marcada pela intensa alteração do comportamento ingestivo: diminuição da duração e frequência de episódios ingestivos, e aumento da latência para o primeiro episódio (Steffens et al., 1997). Além disso, o tratamento ICV com 5-HT (155 nmol) aboliu o efeito hiperfágico da adrenalina ICV (30 nmol). O efeito hipofágico da 5-HT foi parcialmente mimetizado pelo DOI, um agonista 5-HT_{2A/2C} (Steffens et al., 1997). Efeitos hipofágicos de longo prazo estão associados ao tratamento sistêmico com 8-OH-DPAT em pombos com livre

acesso à água e alimento (Dos Santos et al., 2009), enquanto injeções ICV (Dos Santos et al., 2010, em preparação) e em núcleos serotoninérgicos da linha média da rafe pontomesencefálica (Häckl et al., 2007) produziram moderado efeito hiperfágico. Em pombos, contrário do que acontece com ratos, a metergolina (20 nmol) injetada no núcleo paraventricular magnocelular do hipotálamo (PVN), assim como em certos núcleos hipotalâmicos (o medial posterior e o lateral posterior) aumentou rapidamente a ingestão de alimento (Da Silva et al., 2007). A metergolina também aumentou a ingestão de alimento em pombos com livre acesso à água e alimento quando injetada diretamente no núcleo taeniae da amígdala, estrutura comparável à amígdala medial de mamíferos (Campanella et al., 2009).

Em aves, assim como em mamíferos, a 5-HT também interfere na modulação dos comportamentos relacionados aos estados de alerta. Injeções de 5-HT ICV ou no hipotálamo de galinhas, provocaram o aparecimento de sono entre 5 a 30 minutos após as injeções (Marley e Nistico, 1975). Em pombos, injeções de 155 e 300 nmol de 5-HT aumentaram o aparecimento de posturas típicas de sono (Steffens et al., 1997). Injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT aumentaram a duração e a ocorrência de comportamentos típicos de sono, associados ao aumento na atividade eletrográfica hipocampal relacionada ao sono de ondas lentas; estas respostas hipnogênicas foram bloqueadas pelo pré-tratamento com WAY 100635 (antagonista 5-HT_{1A}) (Dos Santos et al., 2009), e a zimelidina (um inibidor seletivo da recaptação da 5-HT) diminuiu o tempo gasto em sono REM (Fuchs et al., 2006).

O efeito mais substancial dos tratamentos com 5-HT em pombos é a marcante resposta dipsogênica que leva o animal privado de alimento por 24 h a beber uma quantidade de água equivalente a aproximadamente 10% de seu peso corporal durante os primeiros 15 minutos após injeções ICV (Steffens et al., 1997). Este efeito é comparável à intensa ingestão de água induzida por injeções ICV de angiotensina II em pombos, e foi bloqueado por antagonistas peptidérgicos não-específicos ao receptor da angiotensina II (Brun et al., 2001). O bloqueio de receptores 5-HT_{1/2} e a ativação de receptores 5-HT_{1B} pela metergolina e pelo GR 46611 (agonista 5-HT_{1B/D}), respectivamente, no arcopallium intermédio do pombo, aumentaram a ingestão de água em pombos com livre acesso à água e alimento.

O único tratamento capaz de mimetizar o intenso efeito dipsogênico provocado pelo tratamento ICV de 5-HT, que faz o pombo privado de alimento por 24 h beber aproximadamente 35 - 40 ml na primeira hora após as injeções (Steffens et al., 1997; Brun, et al., 2001), foi a administração ICV de 8-OH-DPAT (Steffens et al., 1997) ou, em menor proporção, intra-rafe (Häckl et al., 2005). A densidade de receptores 5-HT_{1A} no encéfalo humano é alta em regiões límbicas, notável no hipocampo, septo lateral, áreas corticais e também nos núcleos da rafe mesencefálica. Nesta última região, eles são somatodendríticos e atuam como autoreceptores inibindo o disparo celular (Barnes e Sharp, 1999), além disso, os neurônios desta região respondem a 5-HT exógena com inibição da taxa espontânea e conseqüente redução local da liberação do neurotransmissor, providenciando evidências para a operação de um feedback negativo regulando a liberação da 5-HT (Kalsner e Abdali, 2002). Em ratos, a ativação de receptores 5-

HT_{1A} nos núcleos dorsal e mediano da rafe pelo 8-OH-DPAT diminuiu a liberação de 5-HT nestes locais, efeito prevenido pelo antagonista destes receptores WAY 100635 (Hopwood e Stamford, 2001).

Isso gerou a especulação de que a intensa ingestão hídrica provocada pela 5-HT estava sendo possibilitada pela diminuição na atividade de neurônios serotoninérgicos situados na rafe pontomesencefálica mediante a ativação dos autoreceptores 5-HT_{1A}, que similar ao que acontece em mamíferos, em pombos diminui o conteúdo de 5-HT e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no fluído cerebrospinal, um efeito compatível com a redução da atividade destes neurônios (Gleeson et al., 1992).

Uma maneira de estudar as alterações no padrão de atividade de diferentes tipos neuronais é o emprego dos genes de resposta imediata (GRI). Eles foram descritos como uma classe de genes expressos de forma rápida e transitória em diferentes áreas do sistema nervoso após estimulação específica (Morgan e Curran, 1991; Sng et al., 2004). O uso destes genes proporciona uma excelente ferramenta experimental para identificar os diferentes padrões de atividade neuronal que acompanham um evento comportamental específico, e tem sido empregado com sucesso na investigação destes padrões nas maiores classes de vertebrados (mamíferos: Hess et al., 1995; Vann et al., 2000; aves: Mello et al., 1992; Balthazart et al., 1998; Mello e Ribeiro, 1998; Smulders e DeVoogd, 2000; Jarvis et al., 2000; Tlemçani et al., 2000; anfíbios: Cobellis et al., 1999; Burmeister et al., 2008; e peixes: Baraban et al., 2005; Salierno et al., 2006).

Particularmente importante para este trabalho, o produto do GRI *c-fos*, a proteína Fos, tem sido aplicada com sucesso na verificação das alterações neuronais relacionadas aos diferentes aspectos do comportamento alimentar tanto em roedores (Franchini et al., 2002; Yang et al., 2009; Takase e Nogueira, 2008; Stratford, 2005), como em aves (Boswell e Li, 1998; Cline et al., 2009; Layne et al., 2009). Embora o uso dos GRIs e seus produtos, a Fos entre estes, tenha se tornado comum na identificação de regiões cerebrais envolvidas na expressão de funções fisiológicas específicas em mamíferos, o uso desta abordagem em aves foi limitado pela falta de anticorpos que apresentassem reação cruzada com a proteína Fos em aves.

O gene *c-fos* de galinhas foi clonado, e a sequência de aminoácidos da Fos de galinha foi identificada na década de 1980 (Fujiwara et al., 1987; Mölders et al., 1987); um alto grau de conservação da sequência de aminoácidos (ou de homologia) existe em 3 dos 5 domínios da Fos de ave, quando comparada às seqüências correspondentes da Fos de camundongos e humanos. No entanto, os dois domínios remanescentes revelaram-se mais variáveis e exibiram menor similaridade com as seqüências de mamíferos. Um anticorpo policlonal específico à porção C-terminal da Fos de aves foi introduzido na década passada (Sharp et al., 1995; 1996), e usado com sucesso em uma série de espécies de aves (rolinha, *Streptopelia risória*; codorna, *Coturnix japonica* e mandarim, *Taeniopygia guttata*) para estudar ativação neuronal em resposta a vários desafios homeostáticos e situações comportamentais relevantes. No entanto, por motivos técnicos este

anticorpo só podia ser produzido em quantidades muito limitadas, e tornou-se, portanto, pouco acessível.

Mais recentemente foi introduzido outro anticorpo contra um fragmento sintético do gene *c-fos* de galinha (*Gallus domesticus*; D'Hondt et al., 1999); este anticorpo foi validado também em várias espécies de aves (galinha; codorna; estorninho-comum, *Sturnus vulgaris*; e no mandarim), incluindo a rolinha (*Streptopelia risoria*), também um membro da mesma família que o pombo (Columbiforme). Este anticorpo revelou-se de forma intensa em neurônios de regiões cerebrais discretas, após uma série de protocolos experimentais bem conhecidos, com diversos estímulos farmacológicos e comportamentais, incluindo respostas a injeções intraperitoneais de soluções hipertônicas de NaCl (D'Hondt et al, 1999). A Fos é uma proteína nuclear que pode ser detectada nos neurônios por técnicas imuno-histoquímicas de 20 – 90 minutos após a ativação neuronal (Boswell e Li, 1998; Burmeister et al., 2008) desaparecendo dentro de 4 – 16 h após o estímulo (D'Hondt, 1999; Williams et al., 1990). Este anticorpo está disponível em quantidades substanciais e torna possível o uso deste instrumento para mapear a atividade neuronal em aves de forma semelhante a que tem sido realizada em mamíferos. Este anticorpo foi recentemente (março de 2007) e gentilmente cedido ao nosso laboratório pela Dra. Lut Arckens, chefe do Laboratory of Neuroplasticity and Neuroproteomics, Department of Animal Physiology and Neurobiology, K.U, Leuven, Bélgica; que desenvolveu e produz este anticorpo.

Pombos são animais não selecionados intencionalmente para um fenótipo ingestivo ou reprodutivo particular, apresentam mecanismos serotoninérgicos de controle ingestivo similares aos observados em mamíferos, com aspectos funcionais e anatômicos destes sistemas que parecem ter sido bastante conservados durante a evolução dos amniotas. O pombo é uma espécie comumente usada em estudos farmacológicos comportamentais, de anatomia comparada e psicologia experimental (Reiner et al., 2004; Reiner et al., 2005) e pode ser relevante para a busca por atributos gerais ou plesiomórficos do encéfalo das aves. No entanto, a participação de circuitos serotoninérgicos do tronco cerebral em comportamentos ingestivos e do sono de aves tem sido pouco investigada, e poderia elucidar aspectos fundamentais, filogeneticamente antigos e preservados nos amniotas, dos sistemas de regulação do balanço hidroeletrólítico e do balanço energético, discriminando-os daqueles aspectos meramente espécie-específicos.

A marcante sequência comportamental induzida pela injeção ICV de 5-HT em pombos foi examinada, na maioria das vezes, em animais privados de alimento (Steffens et al., 1997); em aves livremente alimentadas, os efeitos da 5-HT foram estudados somente em curto prazo (1 h) e limitados aos comportamentos ingestivos e a uma única dose (Brun et al., 2001). A privação de alimentos está associada à diminuição da ingestão de água (Zeigler et al., 1972) e também afeta mecanismos relacionados ao sono em pombos (Phillips e Berger, 1989a; Phillips e Berger, 1991) e, portanto, pode confundir a interpretação dos dados que dizem respeito às alterações induzidas pela droga sobre os comportamentos ingestivos e de sono.

Como justificativa adicional para investigações sobre o papel de circuitos serotoninérgicos em pombos, deve ser ressaltada a relevância deste animal como um modelo sensível para o exame de efeitos ansiolíticos de agonistas 5-HT_{1A} e dos modelos experimentais para testes de ansiolíticos neste animal utilizarem a ingestão de alimentos como recompensa em esquemas operantes (Barrett et al, 1994 a; Kleven e Koek, 1996; Kleven e Koek, 1999; Schreiber et al., 1995). Apesar disto, é surpreendente a exiguidade dos dados a respeito de mecanismos serotoninérgicos envolvidos nos comportamentos relacionados à ingestão de alimentos e sono nesta espécie.

Assim, o presente estudo teve por objetivos 1) descrever os perfis comportamentais agudos (1 h) e respostas ingestivas de curto (1, 2 e 3h) e longo prazo (24h) em pombos com livre acesso à água e alimento após o tratamento ICV com 5-HT e 2) verificar o padrão de ativação de neurônios serotoninérgicos e não-serotoninérgicos de determinadas regiões da rafe pontomesencefálica após injeções ICV de 5-HT em pombos com livre acesso à água e alimento até os experimentos.

2. Material e métodos

2.1 Experimento 1: Efeitos ingestivos e comportamentais de injeções ICV de 5-HT

Foram investigados os efeitos comportamentais agudos e ingestivos de curto e longo prazo de injeções ICV de 5-HT (50, 150 e 300 nmol) em pombos (N= 8) com livre acesso à água e ração.

2.1.1 Animais e cirurgia

Todos os procedimentos experimentais descritos a seguir foram conduzidos em estrita aderência às recomendações encontradas em “Principles of animal care” (NIH, 1985) e foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina sob o protocolo: 23080.0383262/2008-65. Pombos adultos de ambos os sexos (*Columba livia*, 390 – 480 g), mantidos em gaiolas individuais em ambiente climatizado (22 – 24 °C), com ciclo claro/escuro de 12: 12h (luzes acessas às 7h) e com livre acesso à água e ração foram utilizados. Ao menos 14 dias antes dos experimentos, cada animal foi anestesiado com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e estereotaxicamente implantados com cânulas guias de aço inoxidável (26G) direcionadas ao ventrículo lateral direito de acordo com as coordenadas (1,0 mm lateral à linha média, 6,0 mm anterior à linha interaural e 6,0 mm abaixo da superfície dorsal do cérebro) derivadas do atlas do encéfalo de pombo (Karten e Hodos, 1967). O posicionamento da cânula no espaço intracerebroventricular foi

verificado pela queda da coluna líquida (soro fisiológico estéril) do manômetro acoplado a ela, e em seguida ancorada ao crânio com parafusos de joalheiros, fixada com cimento odontológico e sua luz mantida íntegra por um mandril interno removível feito de agulha odontológica. Após sete dias da cirurgia e sete dias antes do início dos experimentos, foi feita a verificação farmacológica do posicionamento da cânula guia com uma injeção de Angiotensina II (1 nmol em 2 μ l). O efeito esperado e positivo para o correto posicionamento da cânula guia era a intensa ingestão de água dentro dos 10 primeiros minutos após a injeção, conforme verificado anteriormente em nosso laboratório (Brun et al., 2001).

2.1.2 Drogas e injeções

As injeções foram feitas através de uma cânula interna (33G) estendendo-se 1 mm além da ponta da cânula guia, e conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa de Hamilton (5 μ l). O volume injetado (2 μ l) foi administrado ao longo de 2 minutos e a cânula injetora foi mantida no local por 2 minutos adicionais de modo que a solução difundisse da ponta da cânula e para prevenir possíveis refluxos. Cada animal foi testado com veículo (ácido ascórbico 5% em água destilada) e todas as doses de serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina hidrocloreto, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; doses 50, 150 ou 300 nmol dissolvidas em ácido ascórbico 5% em água destilada). A escolha destas doses foi baseada em trabalhos anteriores do nosso laboratório (Steffens et al., 1997; Brun et al., 2001) onde doses similares às utilizadas aqui provocaram alterações comportamentais e ingestivas significantes em animais privados ou com livre

acesso à água e alimento. Cada animal foi tratado seguindo a ordem de tratamento especificada para cada animal de acordo com o esquema amostral em quadrado latino (Tabela 1). Foi respeitado intervalo de no mínimo sete dias entre os diferentes tratamentos.

Pombos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
1	0	50	150	300
2	50	150	300	0
3	150	300	0	50
4	300	0	50	150
5	0	50	150	300
6	50	150	300	0
7	150	300	0	50
8	300	0	50	150

Tabela 1: esquema em quadrado latino dos tratamentos (doses) administrados a cada pombo de acordo com a semana de experimento.

2.1.3 Procedimentos experimentais

Os experimentos foram realizados entre as 10 e 16 h. Durante este período, o comportamento ingestivo é estável e baixo (veja a ingestão de alimento e água dos animais tratados com veículo durante três horas consecutivas na Figura 1. Os animais estavam sem contato visual durante todo o tempo de experimento (4 semanas). No momento do tratamento eles eram retirados da gaiola, contidos

suavemente (com o corpo enrolado em jornal com a cabeça livre para receber a injeção) e levados a outra sala onde eram administrados os tratamentos. Após as injeções os animais eram devolvidos às suas respectivas gaiolas e o registro experimental começava. Durante um dia de experimento eram tratados 4 pombos individual e sequencialmente. Quando acabava o período de registro do primeiro, repetia-se todo o procedimento para o segundo animal e assim sucessivamente. Durante a primeira hora após as injeções eram feitos registros de vídeo digital (Sony Handycam MiniDV DCR-HC15) dos pombos e a latência para o primeiro evento, assim como a duração total e a frequência dos comportamentos de beber, comer, auto-limpeza, locomoção, exploração, imobilidade alerta e de comportamentos típicos de sono foram gravadas. Estes vídeos foram armazenados em disco rígido e posteriormente analisados com os comportamentos (Tabela 2) avaliados e classificados usando um software localmente desenvolvido (EthoWatcher®, Crispim et al., 2010; em preparação disponível em ethowatcher.ufsc.br). A definição e o uso destas unidades comportamentais (Tabela 2) foi descrita em trabalhos anteriores de nosso laboratório (Steffens et al., 1997; Häckl et al., 2005; Da Silva, 2007; Da Silva et al., 2008; Dos Santos et al., 2009) e são mostrados em um clipe de vídeo disponível na internet (Da Silva et al., 2008) em sua versão online no doi: 10.1016/j.regpep.2007.12.003.

A ração foi disponibilizada em comedouros feitos com garrafas plásticas (500 ml) com um orifício de 6,0 x 8,0 cm em seu terço médio, localmente projetada na tentativa de diminuir a quantidade de ração que cai do comedouro, e a água foi providenciada em bebedouros padrão (para aves). Ao final do período de registro, os péletes de ração que eventualmente caíam do comedouro foram recuperados e pesados juntos com a ração que restava no comedouro. O consumo de ração e água foi quantificado 1, 2, 3 e 24 h após os tratamentos.

Comer	A ave bica a ração, esteja ela no comedouro ou no chão da gaiola, apresentando necessariamente movimentos de deglutição acompanhados por movimentos de extensão do pescoço.
Beber	A ave insere o bico dentro do bebedouro, e mergulha-o na água sugando-a.
Comportamentos Típicos de sono	A ave permanece com os olhos fechados, cabeça retrusa entre os ombros e apoiada sobre o peito, apresenta eriçamento das penas, eventualmente apoiada sobre apenas uma das patas ou com a parte ventral totalmente apoiada sobre o chão da gaiola.
Imobilidade Alerta	A ave permanece imóvel, no chão da gaiola ou no poleiro, com a cabeça elevada, olhos abertos e fixos, com movimentos de piscar rápidos e constantes.
Explorar	A ave explora a gaiola com as patas ou com o bico, sem apresentar locomoção, movimentando constantemente a cabeça em várias direções.
Locomoção	A ave desloca-se pela gaiola: desce ou sobe no poleiro, dirige-se ao comedouro ou ao bebedouro.
Auto-limpeza	Movimento de esfregar o bico ou as patas nas penas.

Tabela 2: catálogo com a descrição de cada comportamento do pombo usado na avaliação e quantificação da análise comportamental.

2.1.4 Análise histológica

Ao final dos experimentos, os pombos foram profundamente anestesiados e perfundidos transcordialmente com salina (NaCl 0,9%) seguida por uma solução de formalina 10%. O corante azul de Evans (1% em água destilada, 1 μ l) foi injetado através da cânula guia para verificar o sucesso do posicionamento da cânula no ventrículo lateral direito, então os encéfalos foram dissecados e cortados transversalmente (100 μ m) em vibrátomo (Vibratome 11500 Sectioning System). As secções foram coradas com cresil violeta e examinadas em microscópio óptico e o posicionamento correto da cânula guia verificado pela presença do corante (azul de Evans) no sistema ventricular.

2.1.5 Análise de dados

Os dados ingestivos (consumo de água e ração) foram analisados pela ANOVA de uma via para medidas repetidas usando as doses de 5-HT (veículo, 50, 150 e 300 nmol) para cada período analisado (1, 2 ou 3 h e acumuladas em 2 e 3 e 24 h). Testes ANOVA de uma via também foram usados para comparar os dados comportamentais, com as doses de 5-HT como fator. Os efeitos comportamentais da dose de 150 nmol de 5-HT também foram avaliados em segmentos de 15 minutos durante a primeira hora. Estes dados foram avaliados pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas com as doses de 5-HT (veículo ou 150 nmol) e os períodos (intervalos de 15 minutos) como fatores. Todos estes testes foram seguidos, quando apropriado, pelo teste *post-hoc* de Duncan, e um

valor de $p < 0,05$ foi aceito como sendo estatisticamente significante para estes procedimentos. Todos os dados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM).

2.2 Experimento 2: Efeitos de injeções ICV de 5-HT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotonérgicos e não serotonérgicos de regiões pontinas e mesencefálicas

Nove pombos adultos de ambos os sexos (380 – 430 g), foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura de 22 – 24 °C, sob ciclo claro escuro 12: 12h (luzes acendidas às 7h) e com livre acesso à água e ração até os experimentos. Estes animais foram submetidos à cirurgia de canulação intracerebroventricular como descrito acima. Sete dias após as cirurgias, eles foram aleatoriamente divididos em três grupos (N= 3 por grupo) que **1)** receberam injeção ICV de 5-HT (150 nmol) e retornaram às suas gaiolas com livre acesso à ração e água nas duas horas seguintes (animais **5-HTW**), **2)** receberam o mesmo tratamento, mas não tiveram acesso à água (com livre acesso à ração) nas duas horas seguintes (animais **5-HTØ**), ou **3)** receberam injeção ICV de veículo e foram mantidos com livre acesso à água e alimento nas duas horas seguintes (animais **Veículo**). O grupo 5-HTØ foi utilizado para controle do intenso comportamento de beber que ocorre logo nos 10 primeiros minutos após o tratamento com 5-HT. Os animais tiveram seus comportamentos registrados durante a primeira hora após os

tratamentos como descrito no experimento 1, e a quantidade de alimentos (água e ração) foi quantificada ao final deste período.

Duas horas após as injeções os animais foram profundamente anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e perfundidos transcordialmente com heparina (uma injeção intraventricular de 1500 IU), solução de sacarose (9,25% em tampão fosfato (PB) 0,02 M pH 7,2 a 37 °C), seguido por paraformaldeído 4% em PB 0,02 M pH 7,2. Os encéfalos foram removidos do crânio e pós-fixados por toda a noite no mesmo fixador, e então transferidos para uma solução de tampão salina fosfato (PBS) 0,01 M por no mínimo 12h. Os encéfalos foram incluídos em gelatina 10% e cortados transversalmente em espessura de 40 µm em vibrátomo (Vibratome 11500 Sectioning System). As secções foram armazenadas em solução anticongelante (PB 0,02 M 18,23%; H₂O destilada 21,87%; Propilenoglicol 34,9%; 25%) a -20 °C até serem processadas imuno-histoquimicamente.

Para os experimentos de dupla marcação, as secções foram inicialmente lavadas em três trocas de PBS 0,01 M pH 7,2 por 15 minutos para remover o anticongelante e então incluídas em uma solução contendo 0,05% de soro normal de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA), 1% de soro albumina bovina (Sigma), 0,1% de Triton X-100, 0,1% de gelatina e 0,01% de azida em PBS 0,01M pH 7,2 em temperatura ambiente (TA) por 25 minutos na tentativa de bloquear a atividade da peroxidase endógena.

As secções foram então colocadas em uma solução contendo o anticorpo primário anti-Fos diluído 1: 3000 em 1% de soro albumina bovina, 0,1% de gelatina e 0,01% de azida em PBS 0,01M pH 7,2. As secções foram então incubadas nesta solução por 48h (em câmara úmida, a 4 °C) sob suave agitação.

Este anticorpo, descrito por D'Hondt et al., (1999), é um anticorpo originalmente feito no coelho e direcionado contra um fragmento sintético correspondente ao resíduo carboxiterminal 21 (KGSSSNEPSSDSLSSPTLLAL; Fujiwara et al., 1987) do produto do gene *c-fos* de galinha. A expressão de Fos, como revelado por este anticorpo, mostrou-se sensível a estímulo dipsogênico (injeção i.p. de solução salina hipertónica) em galinha (*Gallus domesticus*), em mandarim (*Taeniopygia guttata*) e em estorvão comum (*Sturnus vulgaris*) duas horas após as injeções, assim como aos efeitos produzidos pelo metrazole na galinha (D'Hondt et al.,1999), e a estímulos sexuais em codornas (*Coturnix coturnix*; D'Hondt et al.,1999; Tlemçani et al., 2000; Taziaux et al., 2008). Após a incubação no anticorpo primário, as secções foram lavadas em três trocas de PBS 0,01M pH 7,2 por 15 minutos, a peroxidase endógena bloqueada por 40 minutos com 0,3% de H₂O₂ em 50% de metanol, e em seguida lavadas novamente por 15 minutos em três trocas de PBS 0,01M pH 7,2. As secções foram então incubadas por 2h em TA com o anticorpo secundário biotinilado anti-coelho feito na cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, diluição 1:1000) seguidas por incubação por 90 minutos com o complexo ABC (complexo avidina-biotina, Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluído em 1: 1500 em PBS 0,01M pH 7,2. Após serem lavadas em três trocas de PBS 0,01M pH 7,2 por 15 minutos, as secções

foram incubadas na solução do cromógeno contendo 0,05% de DAB (3, 3'-Diaminobenzidina, Sigma- Aldrich. St Lois, MO, USA) e 0,015% de H₂O₂ em PBS 0,01 M intensificada com 0,05% de sulfato de níquel amônio e 0,05% de cloreto de cobalto por 10 minutos, resultando numa coloração marrom escura dos núcleos celulares que expressaram imunorreatividade à proteína Fos.

As secções foram subseqüentemente lavadas em três trocas de PBS 0,01M pH 7,2 por 15 minutos e a atividade da peroxidase endógena bloqueada novamente por 25 minutos da mesma maneira descrita previamente. As secções foram então colocadas em uma solução contendo o anticorpo primário anti-TPH (Chemicon International, AB 1541, feito em ovelha) diluído em 1: 2000 em 1% de soro albumina bovina, 0,1% de gelatina e 0,01% de azida em PBS 0,01M pH 7,2. Este anticorpo policlonal foi feito em ovelha e produzido para a TPH recombinante de coelho, isolada como corpo de inclusão da *E. coli* e purificada por separação por eletroforese de gel em poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Kruger et al., 2002; Benarroch et al., 2002; 2007). Este anticorpo revelou imunorreatividade a TPH também no hipotálamo de roedores e em neurônios da rafe dorsal e medial, em fibras da pituitária (Weissmann et al., 1987; Belin et al., 1991; Saland et al., 1993; Vanhatalo e Soinila, 1999; Allers e Sharp, 2003) e no tronco encefálico de humanos (Benarroch et al., 2002; 2007). Além disso, este anticorpo foi recentemente utilizado no pombo (Meneghelli et al., 2009), e revelou neurônios no tronco encefálico que também apresentaram imunorreatividade a 5-HT, sendo, portanto, adequado para revelar a localização de neurônios que sintetizam e armazenam 5-HT nesta ave.

As secções foram incubadas por toda à noite nesta solução (em câmara úmida, a 4 °C) sob suave agitação. A seguir elas foram incubadas por 2h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotilado anti-ovelha feito em cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, diluição 1:1000) e em seguida incubadas por 90 minutos com o complexo ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluído 1: 1500 em PBS 0,01 M pH 7,2. Finalmente, após serem lavadas em três trocas de PBS 0,01M pH 7,2 por 15 minutos, e incluídas na solução do cromógeno contendo 0,05% de DAB e 0,015% de H₂O₂ em PBS 0,01M pH 7,2 por 10 minutos resultando em coloração marrom clara do citoplasma de células neuronais que expressam TPH. As secções foram lavadas em seguida em água destilada por 5 minutos.

Após os procedimentos imuno-histoquímicos, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas com alúmen de cromo, secas ao ar livre por 48 h e então desidratadas em uma série graduada de álcoois e xilóis antes de serem cobertas por lamínula com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Controle negativo imuno-histoquímico consistiu na omissão do anticorpo primário ou do anticorpo secundário das soluções pertinentes; nenhuma marcação foi visualizada nestas secções. Controles positivos foram realizados pela inclusão de secções frontais do tronco encefálico de rato contendo núcleos da rafe medial e dorsal juntas com as secções de pombos na mesma reação imuno-histoquímica.

As secções foram analisadas em microscópio com uma câmara (PixeLINK, Ontário, Canadá) acoplada (Olympus, BH-2) para identificação de corpos celulares e fibras positivas à TPH e de núcleos positivos à Fos. Fotomicrografias digitais

foram feitas de secções representativas (veja definição das áreas de contagem abaixo) usando o software PixelINK (edição de captura padrão). O nível de brilho e contraste foi ajustado com o software PhotoImpact SE. As regiões encefálicas foram identificadas e nomeadas de acordo com o atlas estereotáxico para o encéfalo de pombo de Karten e Hodos (1967) e com a revisão da nomenclatura para o prosencéfalo realizado pelo Fórum de Nomenclatura para o Encéfalo de Aves (Reiner et al., 2004).

Todas as secções foram qualitativamente analisadas para identificar as áreas do tronco encefálico que apresentaram marcação Fos, TPH ou neurônios duplamente marcados. Um único pesquisador, cego às condições de tratamento, realizou a contagem das células imunorreativas e a tabulação dos dados. De acordo com a análise qualitativa preliminar, secções representativas de níveis rostrocaudais pré-determinados, de cada animal dos diferentes grupos experimentais, foram selecionadas para a contagem (veja a Figura 4). Células Fos+, TPH+ ou Fos+/TPH+ foram quantificadas em seis áreas do tronco encefálico que estão esquematicamente ilustradas na Figura 4. Essas regiões apresentaram densa marcação tipo TPH e 5-HT, apresentada no trabalho mais recente do nosso laboratório (Meneghelli et al., 2009). Em cada área, o número de células Fos+, TPH+ ou Fos+/TPH+ foi mensurado em 3 – 6 campos fotomicrográficos inteiros (objetiva 20x; largura, 0,37 mm; altura, 0,27 mm), tomados de maneira padronizada baseada em marcos anatômicos pré-definidos nas secções (e.g., borda de ventrículo ou trato de fibras proeminente). O número de campos de contagem foi variável dependendo da área do núcleo, mas fixo para

cada área através dos animais experimentais. A densidade foi calculada como o número de células por unidade de área (mm²). A contagem das diferentes marcações foi feita manualmente com o software ImageJ (www.rsweb.nih.gov/ij/).

Para assegurar que as secções representavam o mesmo nível rostrocaudal comparado entre os diferentes animais, secções de cada área foram identificadas e escolhidas pela posição relativa a marcos específicos para cada núcleo encefálico. As células Fos+, TPH+ e Fos+/TPH+ foram quantificadas nas seguintes áreas (Figura 4):

Núcleo *raphe pontis* (R): quatro campos de quantificação, em secções correspondentes aproximadamente ao nível A 1,00 do atlas para encéfalo de pombo (Karten e Hodos, 1967), foram posicionados de modo a cobrir inteiramente este núcleo, ao nível onde o núcleo sensorial principal do trigêmeo (PrV) alcança sua maior extensão e o *brachium conjunctivum* (BC) seu nível mais rostral. Dois campos foram posicionados horizontalmente equidistantes da linha média na parte mais ventral do núcleo. Os outros dois campos foram posicionados imediatamente acima dos primeiros e alinhados verticalmente à linha média (Figura 4B e D).

A6 (correspondente ao *locus coeruleus*, formalmente referida como LoC caudal; Reiner et al., 2004): foi examinado e analisado no mesmo nível em que o R foi analisado (Figura 4B e D). Três campos de quantificação foram posicionados entre a borda ventromedial do fascículo longitudinal medial (flm), o BC dorsolateralmente e o assoalho do IV ventrículo dorsalmente. Os campos foram posicionados de maneira tal que o vértice superior direito do campo mais ventral

coincidissem com o vértice esquerdo inferior do campo logo acima dele e assim por diante.

Núcleo *linearis caudalis* (LC): neste e nos três núcleos a seguir, as secções analisadas correspondiam ao nível A 2,25 do atlas para encéfalo de pombo (Karten e Hodos, 1967), onde o nervo troclear (nIV) alcança seu nível mais rostral. Cinco campos de quantificação foram posicionados verticalmente sobre as duas colunas de células TPH+ na linha média que caracterizam o LC. Esta região compreende também o núcleo central superior (CS) que é lateralmente adjacente ao LC, e delimitado bilateralmente pelas fibras do *brachium conjunctivum descendens* (BCD) e dorsalmente pelas fibras da *decussatio brachiorum conjunctivum* (DBC). O primeiro campo de quantificação foi posicionado exatamente sobre as células TPH+ mais ventrais do LC, e os outros quatro campos alinhados verticalmente acima do primeiro (Figura 4C). O CS apresentou robusta marcação Fos+, mas raramente apresentou corpos celulares TPH+ ou células duplamente marcadas; assim, a marcação nesta área não foi quantificada.

A8 (formalmente conhecida como *locus coeruleus* parte rostral, ou LoC rostral; Reiner et al., 2004): esta área está localizada lateralmente adjacente ao flm, ventromedial ao trato istmo óptico (TIO) e ventrolateral à substância cinzenta central (GCt). Quatro campos de quantificação, justapostos, foram colocados nesta área; ventrais ao TIO e ventromediais a GCt, horizontalmente alinhados ao nIV (Figura 4C e E).

Núcleo *anularis* (AnI): os campos de quantificação foram posicionados imediatamente ventrais ao flm ao longo de sua inteira extensão horizontal, e dorsalmente às fibras do DBC. Os seis campos foram alinhados horizontalmente adjacentes um ao outro e concentricamente alinhados ao assoalho do IV ventrículo (Figura 4C).

Zona peri-fascículo longitudinal medial (Zp-flm): a área Zp-flm ocupa a região dorsolateral do AnI, e estende-se dorsalmente, passando através e circundando a banda de fibras do flm ao nível do nIV. Os campos de quantificação foram arranjados com um campo localizado lateralmente ao IV ventrículo e medialmente ao flm. Outro campo ocupou o espaço imediatamente acima do primeiro, dorsomedial ao flm e lateral ao IV ventrículo. O terceiro foi posicionado lateralmente adjacente ao segundo e dorsal ao flm e o quarto foi colocado de maneira tal que seu vértice superior esquerdo coincidissem com o vértice inferior direito do terceiro, lateralmente ao flm (Figura 4C).

2.2.2 Análise de dados

A densidade das diferentes marcações, i.e. núcleos imunorreativos à Fos (Fos+), e corpos neuronais imunorreativos à TPH (TPH+) e aquelas células duplamente marcadas (Fos+/TPH+), foram analisadas separadamente para cada núcleo pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis tendo o tratamento como fator, seguido, quando apropriado, pelo teste *post-hoc* de Mann-Whitney. Correlações entre os dados comportamentais e ingestivos e aqueles relacionados

às diferentes marcações, foram realizadas pelo coeficiente não-paramétrico de correlação de Spearman (rho de Spearman), comparando os diferentes grupos. Em todos os testes o valor de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

3 Resultados

3.1 Experimento 1: Efeitos ingestivos e comportamentais de injeções ICV de 5-HT em pombos com livre acesso à água e alimento.

A injeção de 5-HT consistentemente evocou marcante sequência comportamental caracterizada pelo intenso comportamento de ingestão de água, seguido por comportamentos de manutenção e então por aumento na incidência de postura típicas de sono. Esta resposta dipsogênica levou o animal a beber aproximadamente 3,5% de seu peso corporal (ou 9,1 – 14,4ml/ pombo nas duas maiores doses), o que foi equivalente a um aumento de 8 vezes na quantidade de água consumida pelos animais controles. A ANOVA de uma via indicou efeitos significantes das diferentes doses de 5-HT utilizadas [$F(3, 28) = 95,83, p < 0,000001$] sobre a ingestão de água na primeira hora após as injeções. Este efeito não foi observado em nenhuma das outras duas horas subsequentes, mas foi verificado na análise da ingestão de água acumulada ao final das duas [$F(3, 28) = 86,34, p < 0,0001$] e das três horas de experimento [$F(3, 28) = 74,24, p < 0,0001$]. Na primeira hora, todas as doses de 5-HT aumentaram significativamente o

volume de água ingerida pelos animais em comparação àqueles tratados com veículo ($0,23 \pm 0,6$ ml/ 100g de peso corporal - pc, Figura 2); estes efeitos foram particularmente interessantes nas doses de 150 ($3,42 \pm 0,1$ ml/ 100g pc) e 300 nmol ($3,11 \pm 0,24$ ml/ 100g pc) (Figura 2). Todas as doses de 5-HT aumentaram de forma significativa a duração [$F(3, 28) = 70,41, p < 0,000,1$] e frequência do beber [$F(3, 28) = 7,65, p = 0,000,6$], assim como reduziram a latência para o primeiro episódio ingestivo [$F(3, 28) = 62,77, p < 0,0001$] (Figura 3 e Tabela 3).



Figura 1: fotomicrografia demonstrativa do correto posicionamento da cânula guia no sistema ventricular. Barra de escala: 100 μ m.

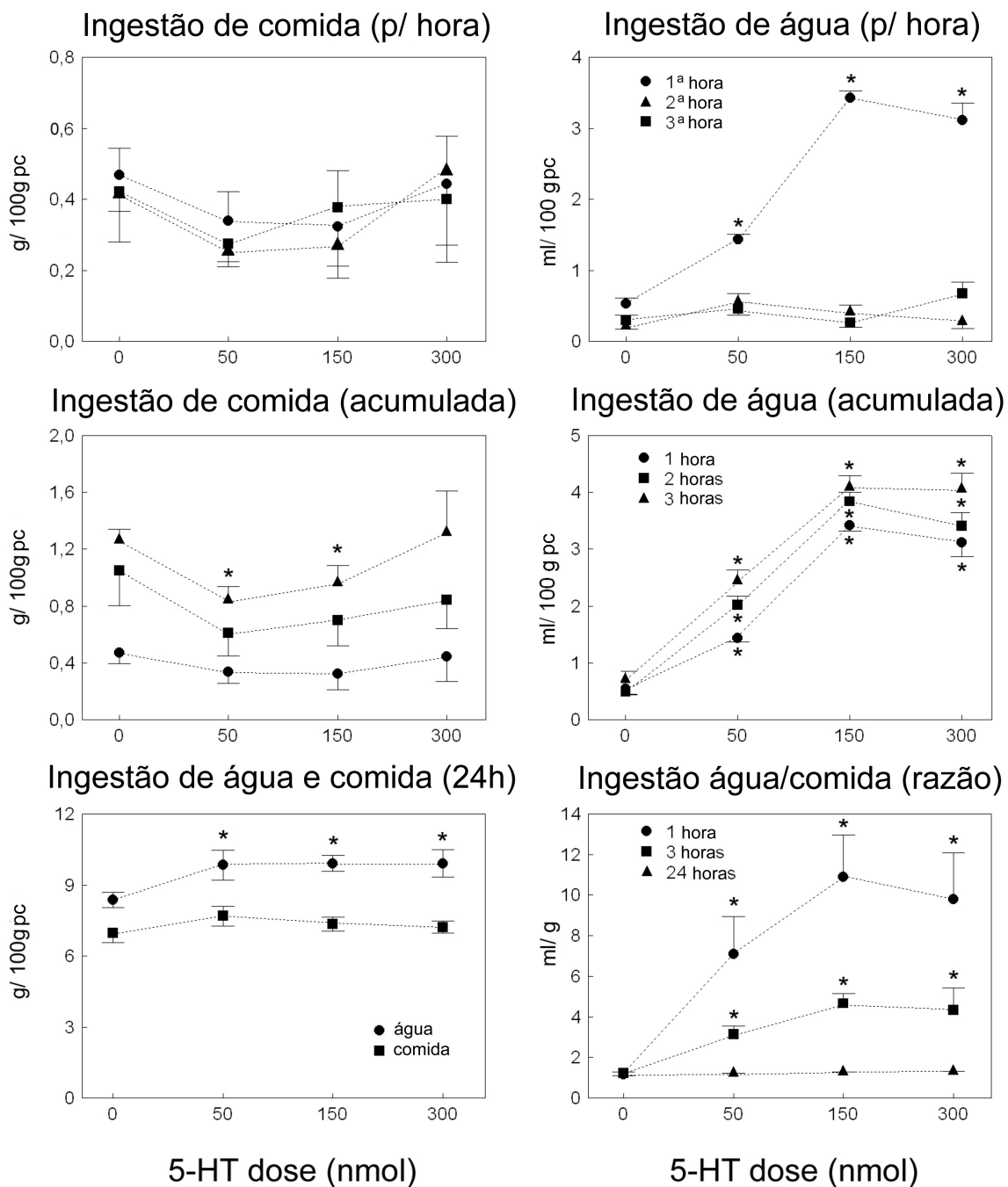


Figura 2: Efeitos de injeções ICV de 5-HT (50, 150 e 300 nmol) e veículo sobre a ingestão de água e alimento na primeira, segunda e terceira hora após as injeções, sobre a quantidade acumulada ingerida de água e alimento em 2, 3 e 24 h, e também sobre a razão entre a ingestão de água/alimento na primeira, terceira e 24 h após os tratamentos. Todos os dados são expressos em média \pm EPM. Valores (*), $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com veículo.

Estes efeitos foram de curta duração: todo o efeito dipsogênico ocorre dentro dos primeiros 15 minutos após as injeções. Quando o comportamento de beber é analisado a cada intervalo de 15 minutos durante a primeira hora, tanto a duração (fatores dose: $F(1, 56) = 29,28$, $p < 0,0001$; período: $F(3, 56) = 38,07$, $p < 0,0001$) e a frequência do beber (fatores dose: $F(1, 56) = 31,74$, $p < 0,0001$; período: $F(3, 56) = 21,66$, $p < 0,0001$) foram maiores que os valores apresentados pelos animais controle no primeiro segmento ($p < 0,0001$ tanto para duração quanto para frequência do beber), o que não aconteceu nos três períodos subsequentes (Figura 4 e 5). Além do mais, embora a ingestão de água acumulada pelos animais tratados com 5-HT (em todas as doses) tenha permanecido significativamente maior do que nos animais controle na 2^a [$F(3, 28) = 86,34$, $p < 0,0001$], na 3^a [$F(3, 28) = 74,24$, $p < 0,0001$], e na 24^a h [$F(3, 28) = 5,26$, $p = 0,005$] após os tratamentos, os valores de ingestão absoluta foi estatisticamente similar aos animais controles na 2^a e na 3^a hora (Figura 2).

As injeções de 5-HT não afetaram a ingestão de alimento em cada uma das horas analisadas, mas significativamente alteraram a quantidade ingerida acumulada (fator tratamento: [$F(3, 84) = 4,34$, $p = 0,006$]; fator período: [$F(2, 84) = 25,25$, $p < 0,0001$]) ao longo das horas. As doses de 50 ($p = 0,041$) e 150 nmol ($p = 0,045$) reduziram a ingestão de alimento acumulada ao final da 3^a hora após os tratamentos; este efeito hipofágico não foi verificado na análise de 24h (Figura 2). Os efeitos das injeções de 5-HT sobre o comportamento de comer foram inconsistentes: a dose de 150 nmol reduziu a duração [$F(3, 28) = 3,47$, $p = 0,03$] e frequência [$F(3, 28) = 3,01$, $p = 0,04$], enquanto a dose de 300 nmol afetou

somente a latência para começar a comer ([F (3, 28) = 3,18, p= 0,043]; Figura 3, Tabela 3), com os animais que receberam este tratamento comendo mais tarde que os animais controle (p= 0,041). Na análise dos resultados da dose de 150 nmol a cada segmento de 15 minutos, efeitos significantes sobre a duração [F (1, 56) = 12,12, p= 0,001] e frequência do comer [F (1, 56) = 7,22, p< 0,009] foram observados, com diminuição destes parâmetros nos dois últimos segmentos. O impacto destas alterações na razão entre a quantidade de água e a quantidade de alimento ingerida (água/alimento) foi intenso na primeira hora. Já nas quantidades ingeridas ao final da 3^a hora este efeito foi menor, mas ainda significativo. 24h após as injeções este efeito desaparece: a razão entre água/alimento é idêntica entre animais tratados com 5-HT e controles neste período de registro (Figura 2).

Outro efeito marcante das injeções de 5-HT foi o aumento dos comportamentos típicos de sono: testes com ANOVA de uma via indicaram efeitos significantes sobre a duração [F (3, 28) = 37,06, p< 0,0001], latência [F (3, 28) = 6,46, p= 0,001] e frequência [F (3, 28) = 13,18, p< 0,0001] das posturas típicas de sono. As duas maiores doses significativamente aumentaram a duração e frequência, e diminuíram a latência destes comportamentos (Figura 3; tabela 3). Quando examinada em intervalos de 15 minutos, a dose de 150 nmol de 5-HT significativamente afetou a duração [fatores tratamento: F (1, 56) = 61,97, p< 0,0001; período: F (3, 56) = 16,11, p< 0,0001; interação: F (3, 56) = 15,64 p< 0,0001] e frequência do sono [fator tratamento: F (1, 56) = 14,85, p= 0,0003; fator período: F (3, 56) = 5,72, p= 0,001; interação: F (3, 56) = 3,87, p= 0,013] (Figuras 4 e 5).

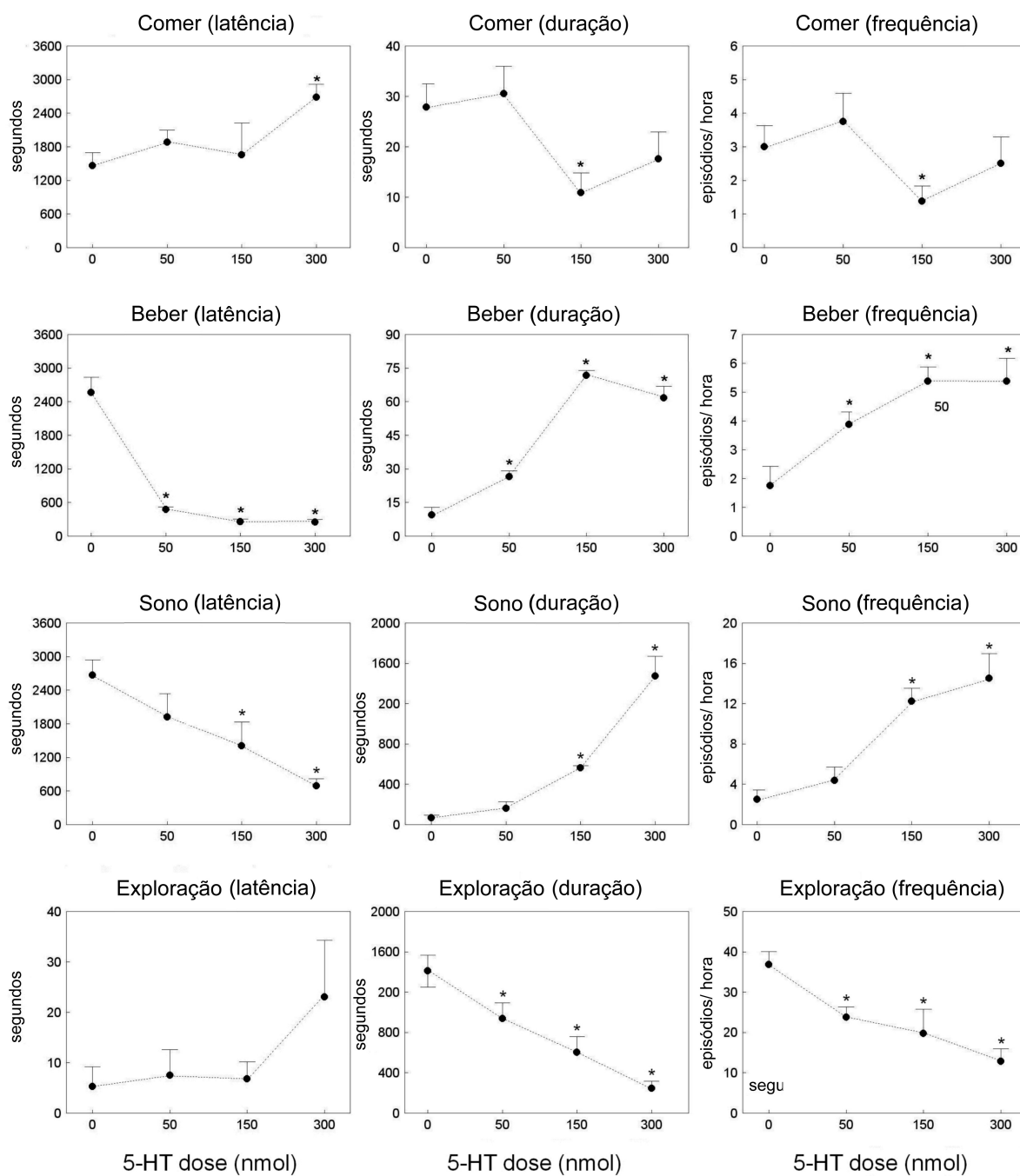


Figura 3: Efeitos de injeções ICV de 5-HT (0, 50, 150 ou 300 nmol) sobre a latência, duração e frequência dos comportamentos ingestivos, típicos de sono e exploratórios durante a primeira hora após os tratamentos em pombos com livre acesso à água e alimento. Todos os dados são expressos em média \pm EPM. Valores (*), $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com veículo.

5-HT dose (nmol)	0	50	150	300
Comer				
Duração	27,8 ± 4,6	30,5 ± 5,5	10,8 ± 3,9 *	17,6 ± 5,3
Frequência	3 ± 0,6	3,7 ± 0,8	1,3 ± 0,4 *	2,5 ± 0,8
Latência	1461 ± 235	618,7 ± 134,9	1863,2 ± 569,7	2685,6 ± 235,7 *
Beber				
Duração	9,3 ± 3,4	26,6 ± 2,5 *	70,5 ± 1,2 *	61,7 ± 5,1 *
Frequência	1,7 ± 0,6	3,8 ± 0,4 *	5,3 ± 0,5 *	5,3 ± 0,8 *
Latência	2665 ± 271	478 ± 44,5 *	228,8 ± 49,7 *	251,6 ± 47,03 *
Comp. típicos sono				
Duração	67,3 ± 25,8	162,1 ± 67,9	562,2 ± 23,6 *	1097,6 ± 11,1 *
Frequência	2,5 ± 0,9	4,3 ± 1,3	12,2 ± 1,3 *	14,5 ± 2,4 *
Latência	2666,7 ± 274,1	1939,3 ± 401	1409,6 ± 421,4 *	692,5 ± 130 *
Exploração				
Duração	1409,1 ± 157,8	938,2 ± 154 *	602,1 ± 156,6 *	246 ± 72,7
Frequência	36,8 ± 3,2	23,7 ± 2,5 *	19,2 ± 5,7 *	12,1 ± 3,1 *
Latência	5,2 ± 3,9	7,5 ± 5,1	6,7 ± 3,4	23 ± 11,2
Imobilidade alerta				
Duração	973,1 ± 279,9	1261,6 ± 206	1608,8 ± 319,8	1376,7 ± 59,1
Frequência	11,8 ± 1,9	18,8 ± 2,6 *	19,3 ± 3,7 *	20,2 ± 1,5 *
Latência	739,2 ± 217,5	522,7 ± 156	581,8 ± 282,3	97,1 ± 67
Auto-limpeza				
Duração	865,8 ± 108,8	1031,3 ± 154	695,3 ± 175,3	564,5 ± 211,7
Frequência	16,5 ± 3,7	20,3 ± 3,4	14,2 ± 1,7	13,5 ± 2,9
Latência	377,2 ± 78,1	536,6 ± 129,9	176,7 ± 39,2	478,2 ± 168,9
Locomoção				
Duração	247,2 ± 35,1	149,5 ± 32,4	187 ± 60,7	73,2 ± 25,7 *
Frequência	21,37 ± 3	15,3 ± 2,4	13,8 ± 3,7	6,1 ± 2,3 *
Latência	65,8 ± 20,7	79,3 ± 44,6	46,5 ± 11,9	793,6 ± 285,7 *

Tabela 3: Efeitos de injeções ICV de 5-HT sobre a latência, duração e frequência dos comportamentos ingestivos, exploratórios, típicos de sono e de manutenção na primeira hora após os tratamentos em pombos com livre acesso à alimento e água. Todos os dados são expressos em média ± EPM. Valores (*), $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com veículo.

A duração aumentou em todos os segmentos e a frequência do sono foi maior que nos animais controles nos dois últimos (Figura 4 e 5). Estes dois parâmetros chegaram ao pico entre 30 – 45 minutos, e depois caíram significativamente, ainda assim, ficando acima dos valores apresentados pelos animais controles (Figura 4 e 5). A duração e frequência do comportamento exploratório foram significativamente reduzidas pela 5-HT; o comportamento de auto-limpeza não foi afetado (Figura 5). Estes comportamentos concentraram-se principalmente no segmento precedente àquele em que os animais tratados com 5-HT passaram a maior parte do tempo dormindo (dados não mostrados).

Em resumo, a 5-HT provocou intenso efeito dipsogênico logo após as injeções e que se extingue após 10 a 15 minutos. Os animais bebem por mais tempo, mais vezes e mais cedo que os controles. Este efeito também foi visto no acumulado em 2, 3 e 24h após as injeções, mas parece que o aumento da ingestão verificada nestes momentos seja devido ao intenso efeito na 1^a h, pois a análise na 2^a e na 3^a h não mostrou nenhum efeito da 5-HT sobre a ingestão de água. Após beberem, os animais adotaram posturas típicas de sono, e passaram dormindo praticamente todo o período entre 30 a 45 minutos (dose de 150 nmol). A 5-HT não afetou a ingestão de alimento na primeira hora. Foi capaz, entretanto, de diminuir a ingestão ao final de 3h após a injeção. A 5-HT desestabilizou a relação entre o beber/comer na primeira hora. Esta relação, ainda está desequilibrada na 3^a h, mas vai voltando aos valores estáveis ao longo do tempo e estabiliza-se totalmente 24h após as injeções, mais um indicativo de que o potente efeito da 5-HT sobre a ingestão de água concentra-se na primeira hora.

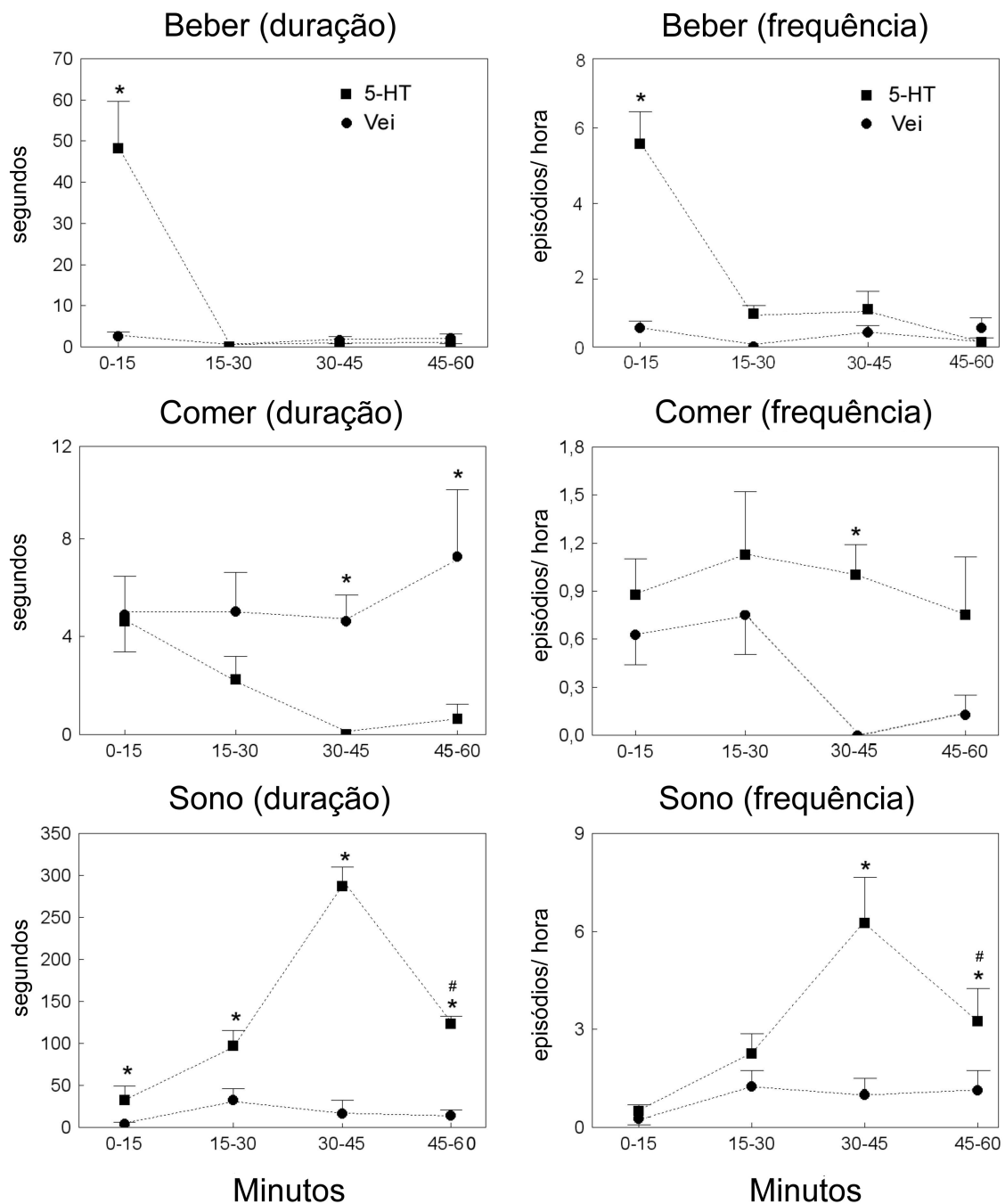
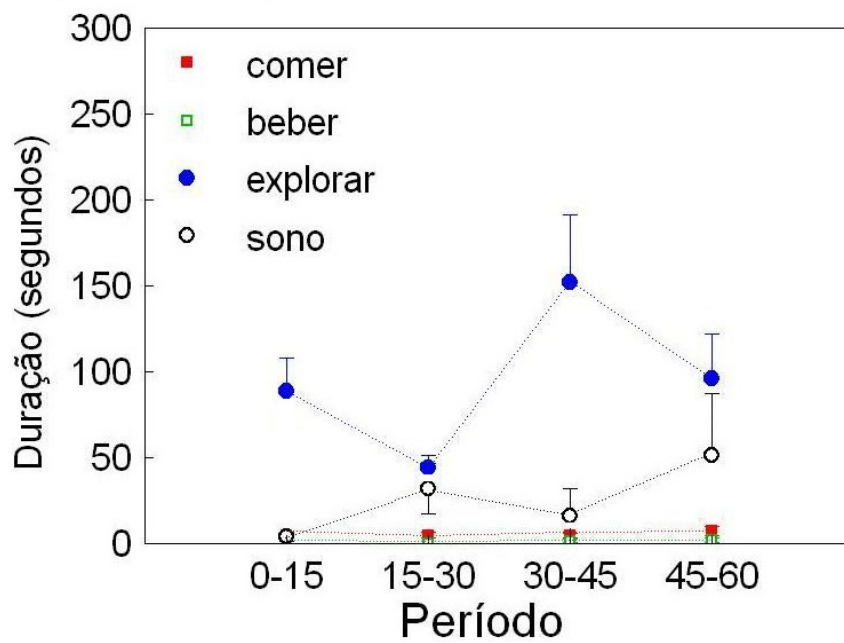


Figura 4: Efeitos de injeções ICV de 5-HT sobre a distribuição temporal da duração e da frequência dos comportamentos ingestivos e de sono durante a primeira hora após os tratamentos em pombos com livre acesso à água e alimento. Todos os dados são apresentados em períodos consecutivos de 15 minutos e todos os dados são expressos em média \pm EPM. Valores (*), $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com veículo. Valores (#), $p < 0,05$ comparados aos animais tratados 150 nmol de 5-HT entre 30-45 minutos.

Seqüência comportamental animais tratados com veículo



Seqüência comportamental animais tratados com 5-HT

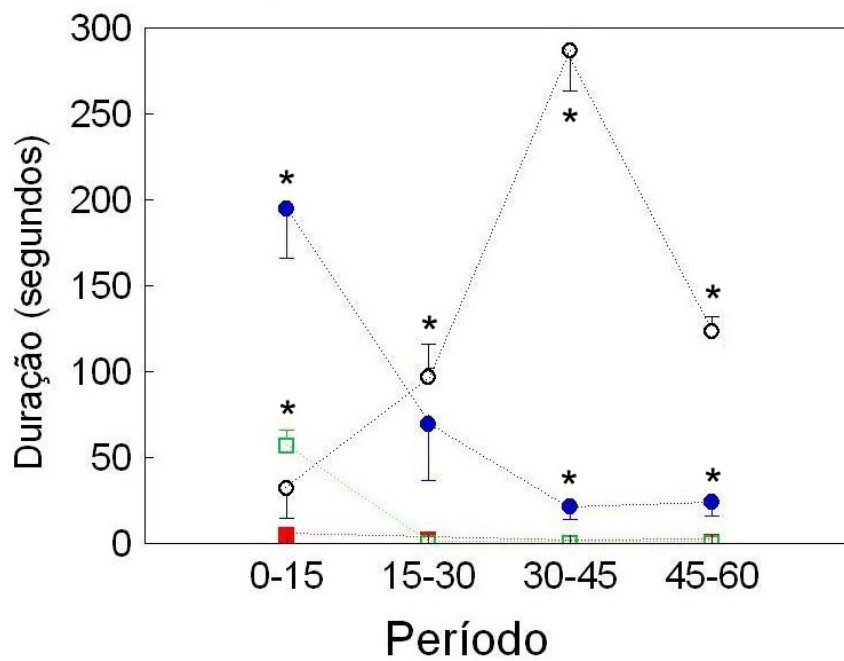


Figura 5: seqüência de comportamentos apresentados por pombos alimentados livremente após o tratamento com 5-HT (150 nmol) ou veículo. Somente os comportamentos que sofreram alterações estatisticamente significantes são mostrados. Todos os dados são expressos em média \pm EPM. Valores (*), $p < 0,05$ comparado ao mesmo comportamento avaliado nos animais tratados com veículo em períodos equivalentes.

3.2 Experimento 2 Efeitos de injeções ICV de 5-HT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos de regiões pontinas e mesencefálicas

Nestes experimentos, os comportamentos dos animais tratados com veículo e daqueles tratados com 5-HT com acesso à água e alimento (animais 5-HTW), foram indistinguíveis daqueles dos animais do experimento 1. Os animais 5-HTW beberam vigorosamente ($3,42 \pm 0,3$ ml/100g pc) e mostraram intensos sinais de sono (duração do sono: $747,66 \pm 39,79$ segundos). Os animais 5-HTØ (tratados com 5-HT, mas sem acesso à água) apresentaram intensa atividade exploratória (duração $1156,66 \pm 169,48$ segundos; frequência: $17,33 \pm 2,96$) e não exibem nenhum episódio relacionado ao comportamento de comer.

A Figura 6 apresenta a localização das áreas de contagem e o padrão geral de distribuição das células marcadas com Fos, TPH ou duplamente marcadas no tronco encefálico do pombo. Na Figura 7, amostras de cada área duplamente marcadas para Fos e TPH são mostradas, acompanhadas com os resultados das contagens para cada condição experimental. A densidade média dos corpos celulares TPH+ para cada núcleo analisado entre os diferentes grupos experimentais foi similar, sugerindo que a amostragem destas células foi estável, abolindo qualquer possível diferença tendenciosa para alguma situação experimental específica. Por outro lado, as densidades das marcações Fos+ e Fos+/TPH+ foram afetadas pelos diferentes tratamentos.

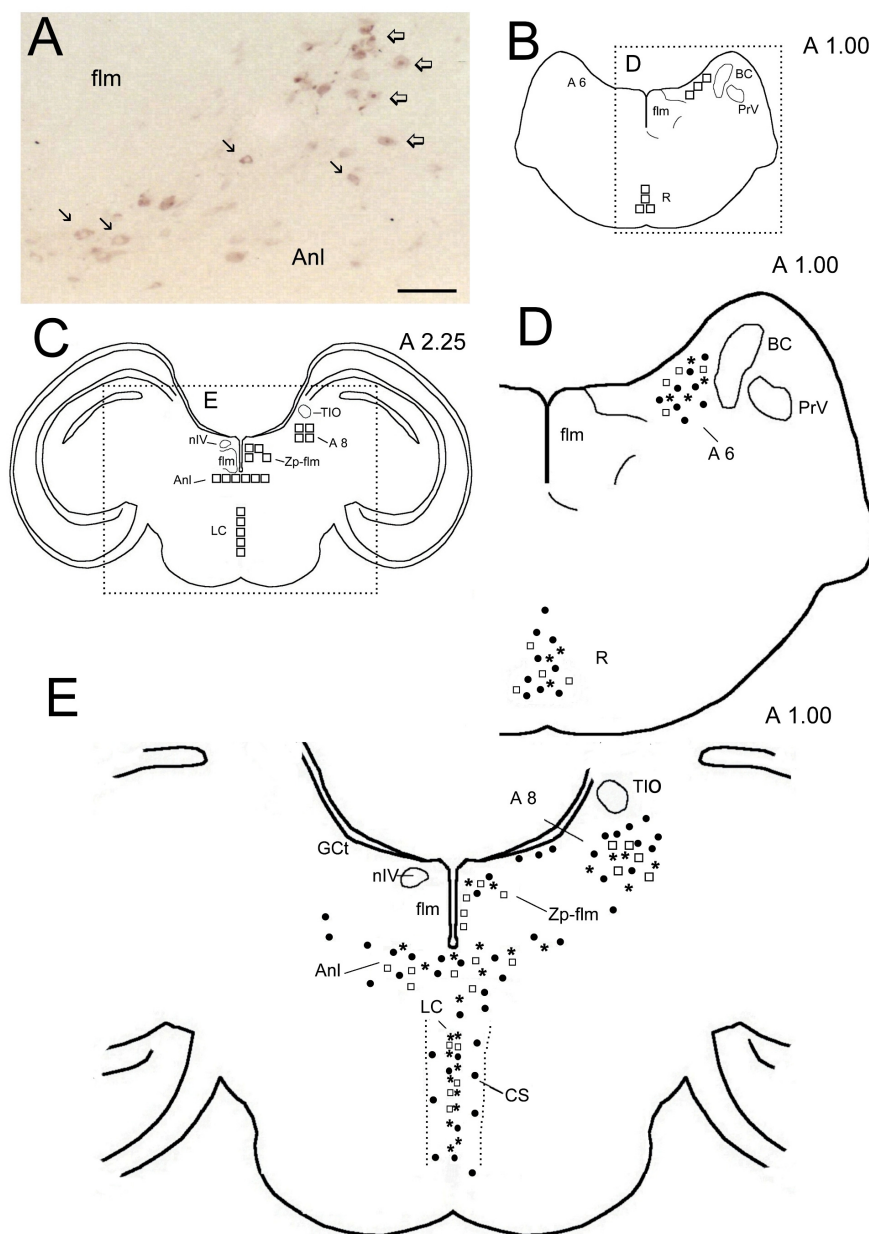


Figura 6: A) fotomicrografia ilustrando a expressão de Fos em um campo de contagem representativo (o núcleo Anl), indicando células TPH+ (\leftarrow), e células Fos+/TPH+ (\blacktriangleleft). Barra de escala = 50 μ m; B e C) desenhos esquemáticos de secções frontais do tronco encefálico do pombo mostrando a localização dos campos de quantificação em cada um dos núcleos e regiões estudadas; D e E) desenhos esquemáticos de secções frontais do tronco encefálico do pombo mostrando a distribuição relativa das diferentes marcações pelos núcleos aqui estudados: TPH+ (círculos vazios); Fos+ (círculos preenchidos) e Fos+/TPH+ (estrelas). Níveis rostrocaudais do atlas do encéfalo do pombo de Karten e Hodós, 1967, são indicados no canto superior direito de cada desenho. Para abreviações, ver lista.

No núcleo R, a densidade de células Fos+ aumentou após as injeções de 5-HT [H (2, 9) = 7,2, p = 0,03], tanto nos animais que receberam (5-HTW) quanto nos animais que não receberam água (5-HTØ) após as injeções, e não houve nenhuma alteração significativa na densidade de células Fos+/TPH+ entre os grupos analisados (Figura 7). A fração do total de células Fos+ que também foram imunorreativas à TPH reduziu significativamente [H (2, 9) = 5,79, p= 0,05] tanto nos animais 5-HTW (p= 0,49) quanto nos animais 5-HTØ (p= 0,49), enquanto a alta porcentagem de células TPH+ (cerca de 70%) que foram duplamente marcadas, não sofreu nenhuma alteração significativa diante os diferentes tratamentos (Tabela 4). Os testes de correlação de Spearman indicaram que a densidade de células Fos+ (mas não Fos+/TPH+) nos animais 5-HTW, 5-HTØ e nos animais tratados com veículo foi forte e positivamente correlacionada com a duração (R: 0,85, p = 0,003) e frequência (R: 0,88, p= 0,001) do comportamentos típicos de sono, e negativamente correlacionada com a latência para o primeiro episódio destes comportamentos (R: -0,88, p= 0,009) (Figura 8).

No núcleo LC, o total de células imunorreativas à Fos [H (2, 9) = 5,06, p= 0,05; teste *post-hoc* Mann-Whitney: p = 0.049] e todas as células duplamente marcadas [H (2, 9) = 5.60, p = 0.04; teste *post-hoc* Mann-Whitney: p= 0.048] foram significativamente reduzidas nos animais 5-HTØ (Figura 7). Além disso, a porcentagem do total de células TPH+ que também foram imunorreativas à Fos, também foi significativamente reduzida neste grupo de animais [H (2, 9) = 6.25, p= 0.043], tanto em relação aos animais 5-HTW (p= 0,049) como em relação aos animais veículo (p= 0,047) (Tabela 4).

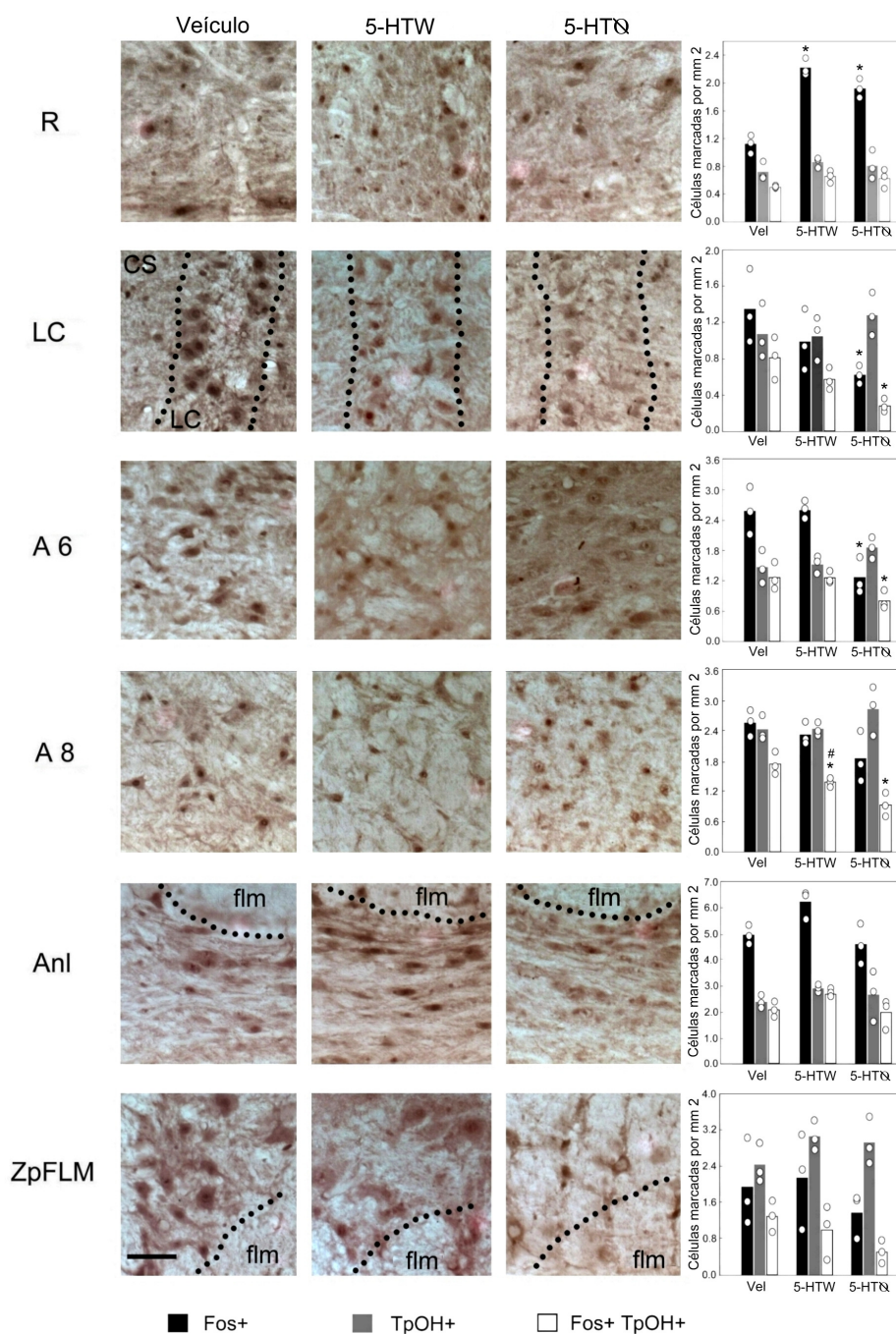


Figura 7: fotomicrografias ilustrando a expressão de Fos em 6 núcleos serotoninérgicos do tronco encefálico do pombo (para abreviações ver lista), 2 horas após injeção ICV de 5-HT (150 nmol) em pombos com livre acesso à água e alimento (5-HTW), com acesso à alimento, mas privados de água (5-HTØ) ou em pombos tratados com veículo com livre acesso à água e alimento após as injeções. Barra de escala 50 μ m. Os gráficos em coluna à direita mostram a média (barra vertical) e a densidade individual de marcação (círculos vazios) para cada condição e núcleo estudados. (*) $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com veículo. (#) $p < 0,05$ comparados aos animais do grupo (5-HTØ).

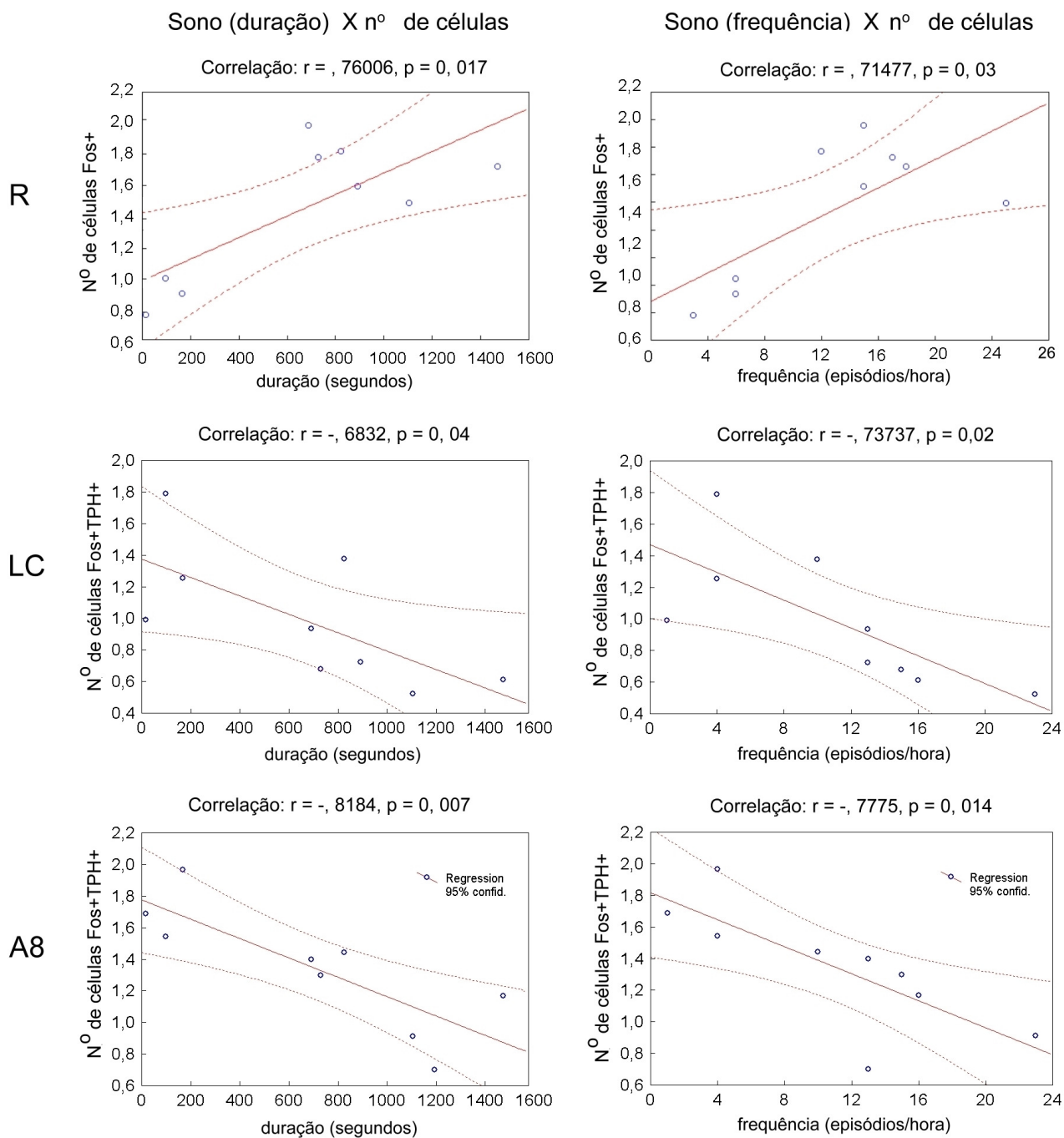


Figura 8: gráficos de correlação entre índices de sono (duração e frequência) e diferentes tipos de marcação para diferentes núcleos investigados.

Os testes de correlação indicaram que a densidade de células duplamente marcadas em todos os grupos estudados foi negativamente correlacionada com a duração (R: - 0,74, $p= 0,02$) e frequência do sono (R: - 0,78, $p= 0,01$), e positivamente correlacionada com a latência para o primeiro episódio (R: 0,71, $p = 0,03$); e foi negativamente correlacionada com o total de água ingerida pelos animais 5-HTW e controles (R: - 0,92, $p= 0,01$).

Núcleo	R	LC	A 6	A 8	Anl	Zp-flm
% Fos+/TPH+ do total de células Fos+						
Veículo	44,3 ± 2,3	60 ± 3	48,6 ± 1,3	67,8 ± 1,4	41 ± 3,6	71,6 ± 8,8
5-HTW	29 ± 2 *	58,6 ± 5,2	48,3 ± 2,9	59,6 ± 2,7	43 ± 3	47,3 ± 8,1
5-HTØ	32 ± 3,7 *	46 ± 8,4	63,3 ± 3,3 *	50 ± 1 *	42,3 ± 5,4	36,3 ± 4,9
% Fos+/TPH+ do total de células TPH+						
Veículo	71 ± 8	75,6 ± 4,8	86,6 ± 1,6	71,6 ± 2,4	87,3 ± 1,7	50 ± 3,2
5-HTW	75 ± 2,3	57,6 ± 10,7	81,6 ± 5,2	56,6 ± 3,3 *	92,3 ± 2,3	35,3 ± 12,3
5-HTØ	77,6 ± 3,8	21,6 ± 2* #	42,3 ± 3 *	32 ± 3,7 * #	75,6 ± 4,8	18 ± 5,8

Tabela 4: efeitos das injeções de 5-HT ou veículo sobre a expressão Fos em neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos da rafe pontomesencefálica em pombos com acesso (5-HTW) ou privados (5-HTØ) de água após as injeções. Os dados são apresentados em porcentagem de células duplamente marcadas (Fos+/TPH+) do total de células Fos+ ou do total de células TPH+, em cada núcleo investigado. Todos os dados são expressos em média ± EPM. Valores (*) $p < 0,05$ comparados aos animais tratados com veículo. Valores (#) $p < 0,05$ comparados aos animais to 5-HTW. Para abreviações ver lista.

Em A8, as injeções de 5-HT afetaram somente a densidade de células Fos+/TPH+ [H (2, 9) = 7,2, $p= 0,03$], que foi significativamente reduzida nos animais tratados 5-HT comparados aos animais controles (Figura 7). A

porcentagem do total de células TPH+ que também foram Fos+, também foi reduzida nos dois grupos tratados com 5-HT [H (2, 9) = 7, 26, p= 0,02] comparados aos animais tratados com veículo; a porcentagem de células Fos+ que também foram TPH+, foi diminuída nos animais do grupo 5-HTØ em relação aos animais controles [H (2, 9) = 6,25, p= 0,044; Tabela 4]. A densidade de células Fos+/TPH+ foi positivamente correlacionada com a ingestão de alimento (R = 0,74, p = 0,02), com a duração (R = 0,83, p = 0,003) e frequência (R = 0, 76, p = 0,03) do comer, assim como com a latência para o primeiro episódio de sono (R = 0, 73, p = 0, 01), e foi negativamente correlacionada com a duração (R = - 0,80, p= 0,004) e frequência (R = - 0,83, p = 0,004) do sono (Figura 7).

Efeitos marginalmente significantes da 5-HT foram observados em A6. A densidade das células Fos+ [H (2, 9) = 5,42, p= 0,066] e das Fos+/TPH+ [H (2, 9) = 5,60, p= 0,061] sugeriram leve redução no total de células Fos+ (p= 0,05) e Fos+/TPH+ (p= 0,049) nos animais 5-HTØ comparados aos animais controles (Figura 7). A porcentagem de células duplamente marcadas do total de células Fos+ foi significativamente aumentada nos animais 5-HTØ [H (2, 9) = 5,51, p = 0,05; teste *post-hoc* Mann-Whitney: p= 0,043], enquanto a porcentagem de células duplamente marcadas do total de células TPH+ foi reduzida [H (2, 9) = 5,85, p = 0,05; teste *post-hoc* Mann-Whitney: p = 0,046] (Tabela 4). Não foi encontrada nenhuma correlação significativa entre os parâmetros analisados dos comportamentos ingestivos e de sono em relação aos diferentes tipos de marcação observadas em A6. A 5-HT não causou qualquer alteração significativa entre as marcações encontradas nas áreas do núcleo AnI e na Zp-flm.

4. Discussão

O tratamento com 5-HT provocou potente efeito dipsogênico em pombos com livre acesso à água e alimento. Aumentou consideravelmente o tempo em que os animais passam bebendo (aproximadamente 8x) e o número de episódios ingestivos. Esse efeito caracteriza-se pelo seu início rápido e curtíssimo prazo de duração. A resposta dipsogênica observada levou os animais a beberem quantidades correspondentes a aproximadamente de 3 – 4,2% de seu peso corporal (cerca de 9,1 – 16,4 ml/ pombo nas duas maiores doses), o equivalente a um aumento de 8x na quantidade de água ingerida pelos animais veículo na primeira hora após os tratamentos.

Estes dados diferem daqueles obtidos em pombos privados de alimento por 24h (Steffens et al., 1997), em que doses comparáveis de 5-HT produziram ingestão de água mais vigorosa (27 – 41ml/pombo 1h após o tratamento ICV com 5-HT, 155 nmol). Entretanto, esta quantidade de água ingerida foi somente 3x maior do que a quantidade de água consumida pelos animais veículo privados de alimento por 24h. A privação de alimento é acompanhada pela diminuição na quantidade de água ingerida em pombos e intensa ingestão de água ocorre quando a ingestão de alimento é restabelecida após o jejum (Zeigler et al., 1972), sugerindo que a injeção de 5-HT pode ter potencializado a ingestão de água induzida pela privação de alimento, mas que a ingestão de água induzida pela 5-HT é proporcionalmente maior em animais com livre acesso à água e alimento que em animais privados de alimento por 24h. A ingestão de água retornou ao seu

nível usualmente baixo e comportamentalmente similar ao apresentado pelos animais controles ao final da primeira hora. A ingestão de água manteve-se baixa nas duas horas subsequentes, mas a quantidade de água ingerida verificada ao final das 24h de experimento pelos animais tratados com 5-HT (todas as doses) foi maior que os animais-controle. O efeito dipsogênico observado neste período se deve ao grande volume de água ingerido na primeira hora após os tratamentos: a razão entre o beber/comer foi alterada pelos tratamentos com 5-HT neste período. 24h depois voltou ao normal (semelhante ao apresentado por animais controles), sugerindo um retorno ao nível habitual de ingestão tanto de alimento quanto de água.

Em ratos com livre acesso à água e alimento, injeções sistêmicas de 5-HT ou de seu precursor, o 5-HTP (5-hidroxitriptofano) (e.g., Fregly et al., 1980; Rowland et al., 1987), induziram o aumento na ingestão de água mediada pelo sistema renina-angiotensina dentro dos primeiros 60 minutos após os tratamentos. Efeitos dipsogênicos também foram observados após doses hipofágicas de fenfluramina ou fluoxetina junto da fenfluramina em ratos (McCann et al., 1997). Injeções ICV de 5-HTP (25 μ g) induziram ingestão hídrica em ratos saciados, e metergolina (10-30 μ g) atenuou a ingestão de água induzida por injeções sistêmicas de 5-HTP (Rowland et al., 1987). Um papel inibitório dos circuitos centrais de 5-HT e dos neurônios da rafe sobre o controle da ingestão de água parece estar presente em mamíferos (e.g., Johnson e Thunhorst, 1997; Wirtshafter, 2001; Margatho et al., 2002).

Efeitos hiperdipsicos foram observados após injeções ICV do agonista aos receptores 5-HT_{1A/7}, 8-OHD-PAT em pombos com livre acesso à água e alimento e em pombos privados de alimento por 24h (Steffens et al., 1997; Da Silva et al., 2004), e também após injeções deste mesmo agonista em grupos de neurônios da linha média do tronco encefálico rostral imunorreativos a 5-HT (Häckl et al., 2005). Neste último trabalho este efeito que foi atenuado pelo p-MPPI (um antagonista de receptores 5-HT_{1A}). Como em mamíferos, o 8-OH-DPAT parece atuar pré-sinápticamente para reduzir a atividade de neurônios serotoninérgicos e os níveis de 5-HT extracelular no pombo (Gleeson et al., 1992), sugerindo que a ingestão de água induzida por esta droga possa ser secundária à redução da atividade de neurônios serotoninérgicos localizados na linha média do tronco encefálico de pombos. Aumento na ingestão de água também foi observado após injeção de metergolina e GR 46611 no arcopallium intermédio e de GR 46611 no núcleo taeniae da amígdala de pombos com livre acesso à água e alimento; estas estruturas fazem parte do complexo amidalóide do pombo (Campanella et al., 2009).

Estes dados indicam a existência de uma influência tônica inibitória sobre o comportamento de ingestão hídrica, exercida por aferências serotoninérgicas dirigidas ao complexo amidalóide do pombo, sugerindo que a ingestão de água produzida pela 5-HT aqui relatada, pode estar associada à redução da atividade de neurônios serotoninérgicos, mediada pelos receptores 5-HT_{1A} da linha média pontomesencefálica. Tal inibição tônica pode atuar sobre mecanismos angiotensinérgicos relacionados à ingestão de água no pombo, uma vez que o

pré-tratamento com [Sar¹,Ile⁸]-ANGII (Saralasin), um antagonista não-específico ao receptor ANGII atenuou de forma dose-dependente a ingestão hídrica induzida pela 5-HT em pombos com livre acesso à água e alimento (Brun et al., 2001).

O surgimento da alta ingestão de água foi seguido, após os tratamentos com as duas maiores doses de 5-HT, pelo aumento na duração e frequência das posturas típicas de sono (associado à diminuição da locomoção e dos comportamentos exploratórios). Os níveis mais altos de incidência e duração dos episódios típicos de sono concentraram-se entre 30 – 45 minutos após as injeções, diminuindo ao final de uma hora de registro. A ocorrência dos comportamentos típicos de sono parece ser relativamente independente da intensa ingestão hídrica prévia, dado o fato de que os animais tratados com 5-HT sem acesso à água, no experimento 2, apresentaram sono intenso sem ter bebido previamente. Além do mais, a menor dose de 5-HT provocou efeito dipsogênico, mas não alterou de forma significativa o sono. Por outro lado, em animais privados de alimento por 24h, a ausência de água após as injeções de 5-HT preveniu o surgimento de sono na primeira hora seguinte aos tratamentos (Steffens et al., 1997). Além de afetar os mecanismos relacionados à ingestão hídrica, a privação de alimento também provoca profundas alterações no sono, e em fenômenos metabólicos e térmicos, tanto em pombos como em mamíferos (Phillips e Berger, 1989b; Phillips e Berger, 1991), que são domínios funcionais importantemente modulados pelos circuitos serotoninérgicos. Estes resultados sugerem que o jejum pode afetar a resposta dos mecanismos relacionados aos comportamentos ingestivos e de sono sensíveis a 5-HT no pombo e que a privação pode não ser

uma abordagem adequada para estudar os circuitos que integram estes comportamentos.

Extensas evidências neurofisiológicas, neuroquímicas e neurofarmacológicas indicam que a atividade de neurônios serotoninérgicos influencia o ciclo de sono e vigília e a expressão de sono de ondas lentas e sono REM em mamíferos (e.g., Sakai e Crochet, 2001; Steriade e McCarley, 2005; Monti et al., 2008). Em mamíferos, neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe estão continuamente ativos durante a vigília, mas o disparo destes neurônios é reduzido durante o sono de ondas lentas e chega quase a parar durante o sono REM, sugerindo que uma atividade tônica de certo neurônios serotoninérgicos contribuem para a manutenção da vigília (Jacobs e Fornal, 1999). Similarmente ao observado neste trabalho, injeções ICV de 5-HT no boi (*Bos taurus*), causou marcante sedação (Findlay e Thompson, 1968).

Em galinhas, sono prolongado foi observado após injeções intravenosas de 5-HT (Hehman et al., 1961; Dewhurst e Marley, 1965), e também ICV e intra-hipotalâmicas (Marley e Whelan 1975; Marley e Nistico, 1975; Zhang et al., 2004). Na codorna, injeções sistêmicas de hidroxitriptofano, 5-HT ou quipazina (agonista 5-HT_{2A/2C/3}) produziram aumento do sono (Reis et al., 2005; Polo et al., 2007).

Estes efeitos hipnogênicos da 5-HT podem ser mediados por receptores 5-HT_{1A}. Nós recentemente observamos que injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT em pombos com livre acesso à água e alimento, aumentaram a duração e incidência das posturas típicas de sono (Dos Santos et al., 2009). Estes efeitos foram

bloqueados pelo pré-tratamento com o WAY100635 (antagonista 5-HT_{1A}). Quando injetado sozinho, o WAY100635 diminui a frequência das posturas típicas de sono e aumenta a latência para o primeiro episódio. Como demonstrado pelas análises visual e espectral da atividade eletrográfica hipocampal, o efeito hipnagênico do 8-OH-DPAT em pombos está associado com o aumento específico na frequência e duração dos episódios de sono de ondas lentas, eletrograficamente similar ao perfil do sono diurno que ocorre nos animais controle. Além de aumentar a ingestão de água (Da Silva et al., 2004), injeções ICV de 8-OH-DPAT (em doses maiores que as necessárias para evocar respostas dipsogênicas) também aumentaram o sono (Dos Santos et al., 2010, em preparação). Estes dados podem sugerir que, similar ao observado com o comportamento de beber, o sono pode estar sob uma influência inibitória tônica de neurônios serotoninérgicos, ao menos durante a fase luminosa do dia nesta espécie. Esta influência tônica inibitória sobre o sono não parece ser mediada por receptores 5-HT₁ ou 5-HT₂ pós-sinápticos, já que a metergolina bloqueia o efeito da 5-HT em aumentar a duração e frequência dos comportamentos típicos de sono, mas não afeta o sono quando injetada sozinha (Dos Santos et al., 2010, em preparação). Assim, é possível conjecturar que a injeção de 5-HT pode ter provocado o sono por uma ação em receptores 5-HT_{1A} (reduzindo o efluxo de 5-HT em distritos-alvo, similar ao efeito do 8-OH-DPAT). Este efeito pode ter sido bloqueado pela metergolina pela sua atuação nestes receptores como um antagonista em 5-HT_{1A}.

Uma possibilidade adicional é a presença de diferentes ações exercidas por circuitos serotoninérgicos separados sobre o sono. Esta suposição pode ser

levantada pela observação dos diferentes padrões de atividade neuronal nos núcleos serotoninérgicos aqui investigados. Todas as regiões apresentaram densidade de dupla marcação negativamente correlacionada com os índices de comportamentos típicos de sono apresentados pelos animais, indiferentemente se estes animais foram ou não tratados com 5-HT ou se beberam ou não após as injeções. Entretanto, a região do núcleo rafe pontis (R) foi a única que apresentou aumento no padrão de expressão Fos em neurônios não serotoninérgicos nos animais tratados com 5-HT, privados ou com livre acesso à água após as injeções. Este padrão de atividade foi positivamente correlacionado como a duração e a frequência das posturas típicas de sono apresentadas pelos animais.

A baixa ingestão de alimento do pombo no período diurno em que estes estudos foram realizados, pode explicar a ausência de efeitos hipofágicos claros dos tratamentos com 5-HT. O comportamento de ingestão de alimento esteve ausente somente durante o intervalo em que os animais passavam a maior parte do tempo dormindo (intervalo de 30 – 45 minutos, dose de 150 nmol).

Em ratos com livre acesso à água e alimento, efeitos hiperfágicos foram observados após administração sistêmica ou intra-rafe de 8-OH-DPAT (mediados pela diminuição da atividade serotoninérgica induzida pelos autoreceptores 5-HT_{1A}, e.g., Bendotti e Samanin, 1986; Currie e Coscina, 1993) e por injeção de metergolina sistêmica ou diretamente na amígdala (Fletcher, 1988; Coscina et al., 1994), sugerindo a existência de uma atividade serotoninérgica inibitória tônica que pode atuar restringindo o comportamento alimentar em animais com livre acesso à água e alimento.

Em pombos injeções de zimelidina (um inibidor seletivo da recepção da 5-HT; Güntürkün et al., 1989) e injeções ICV de 5-HT em doses semelhantes às usadas aqui, foram capazes de reduzir a ingestão de alimento e a duração do comer induzida pela privação de alimento por 24h e também pela injeção ICV de adrenalina. Em animais privados de alimento por 24h, a injeção ICV de DOI (um agonista 5-HT_{2A/2C}), diminuiu a ingestão de alimento e a duração do comer (Steffens et al., 1997). O tratamento sistêmico com ciproheptadina (antagonista 5-HT₂) aumentou a ingestão em pombos privados de alimento por 24h (Güntürkün et al., 1989). Injeções de 8-OH-DPAT aumentaram a ingestão de alimento tanto quando administradas ICV (em doses maiores que aquelas suficientes para produzirem aumento da ingestão de água e sono) (Dos Santos et al., 2010, em preparação), como quando injetadas em grupos de neurônios imunorreativos a 5-HT da linha média pontomesencefálica (principalmente do LC, Häckl et al., 2005). Efeitos hiperfágicos também foram encontrados em pombos com livre acesso à água e alimento após injeções ICV de GR 46611 e metergolina no núcleo paraventricular magnocelular (PVN), nos núcleos hipotalâmicos posteriores medial e lateral (PMH/PML), no núcleo pré-óptico magnocelular (Da Silva et al., 2007), e no núcleo taeniae da amígdala (Campanella et al., 2009). Desse modo, similar ao especulado acima para a ingestão hídrica e para o sono, parece que aferências serotoninérgicas tônicas inibitórias dirigidas a distritos hipotalâmicos e amidalóides, relacionados à ingestão de alimento, estejam ativos em pombos, e que estes mecanismos ingestivos são mediados por receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/D} e 5-HT₂. Entretanto, injeções de 5-HT não aumentaram a ingestão de alimento, sugerindo que este circuito ativo tonicamente e que inibe a ingestão de alimento (ao menos

aqueles que controlam os autoreceptores 5-HT_{1A}, e cuja ativação reduz o efluxo de 5-HT) pode não ser vulnerável a 5-HT injetada ICV. Esta conjectura é fortalecida pelo fato de que injeções ICV de 5-HT podem afetar principalmente mecanismos pós-sinápticos inibitórios à ingestão de alimento, possivelmente receptores 5-HT_{2/7}, devido ao fato de que o pré-tratamento ICV com metergolina ter bloqueado respostas ingestivas da 5-HT injetada ICV, e quando administrada sozinha, aumenta a ingestão de alimento (Santos et al., 2010, em preparação).

O envolvimento da 5-HT na modulação dos comportamentos ingestivos e de sono apresentados aqui, fundamentam a teoria de que a 5-HT parece orquestrar diversos processos fisiológicos e comportamentais relacionados ao balanço energético (Tecott, 2007).

O padrão de atividade de neurônios serotoninérgicos do rombencéfalo rostral pode estar associado a situações relevantes fisiologicamente para a homeostase energética, térmica e hidromineral nos vertebrados. Os eventos desencadeados pelas injeções de 5-HT (beber, então auto-limpeza, então sono, em um cenário de baixa ingestão de alimento) relembram a sequência comportamental de saciedade (Behavioral Satiety Sequence), ou sucessão, depois de comer, de atividades de manutenção e limpeza, e finalmente descanso, comumente observadas em mamíferos no período após a ingestão alimentar (e.g., Danguir et al., 1979; Halford et al., 1998). O sono pós-prandial parece ser uma consequência das alterações ocasionadas pela alimentação, no nível de combustíveis circulantes e associado a fatores regulatórios, e também estar relacionado à taxa de utilização dos metabólitos fornecedores de energia (Danguir e Nicolaidis, 1985).

O aumento na temperatura corpórea central após a ingestão de alimento também foi sugerido como um sinal para o sono pós-prandial, que por sua vez, diminui a termogênese e a temperatura corporal (Zammit et al., 1992). Em mamíferos e aves, o sono é substancialmente relacionado a homeostase de energia e conservação calórica (Phillips e Berger, 1989a; Phillips e Berger, 1991), e no pombo, a intensa ingestão de alimento após um período de 96 h de jejum é seguido pelo aumento de atividades de auto-limpeza e então por prolongados e eletrograficamente documentados episódios de sono de ondas lentas e de sono REM (Dario et al., 1996).

A ingestão de água não foi registrada nestes experimentos, mas beber água é essencialmente um fenômeno peri-prandial, dirigido e reciprocamente conectado à ingestão de alimento (Kraly, 1983) em aves (rolinhas: McFarland e Wright, 1969; pombos: Zeigler et al., 1972) e em espécies mamíferas, incluindo humanos (De Castro, 1988), cabras (Rossi e Scharrer, 1992), cachorros (Robinson e Adolph, 1943) e ratos (Fitzsimons e Le Magnen, 1969; Kissileff, 1969). Nestes últimos estudos e também em humanos com livre acesso à alimento (Engell, 1988), foi observado que mais de 2/3 do total da água ingerida diariamente está temporalmente associada ao comer. Estas e outras evidências são tomadas para indicar que o beber pode ser um dos maiores marcadores para definir uma refeição (e assim a sequência comportamental de saciedade subsequente) no rato (e.g. Zorrilla et al., 2005).

A sequência comportamental de saciedade parece ser, desta forma, a contraparte comportamental de um mecanismo integrado evolutivamente

conservado, crucial para a homeostasia energética, hidromineral, térmica e relacionada a estados de vigília. Talvez, não coincidentemente, esta resposta é fortemente influenciada pela atividade de outro aspecto ostensivamente antigo na organização do sistema nervoso periférico e central dos vertebrados: os circuitos serotoninérgicos.

Os efeitos das injeções de 5-HT sobre a expressão da proteína Fos em neurônios serotoninérgicos podem apoiar algumas destas especulações, e podem indicar importantes papéis adicionais das células produtoras de 5-HT das regiões pontinas e mesencefálicas no controle dos comportamentos ingestivos e de sono em pombos. No *linearis caudalis* (o local mais sensível ao efeito dipsogênico do 8-OH-DPAT; Häckl et al., 2005), na região da linha média pontomesencefálica, as marcações Fos+ e Fos+/TPH+ foram reduzidas nos animais tratados com 5-HT impedidos de beber (grupo 5-HTØ), e foram negativamente correlacionados com a ingestão de água e com os comportamentos típicos de sono. Esta diminuição parece acontecer relativa e especificamente em neurônios serotoninérgicos deste núcleo, e estar relacionada à ausência da ingestão hídrica nesta situação, uma vez que estes animais apresentaram comportamentos típicos de sono intenso. Assim é possível que a “sede” induzida pelas injeções de 5-HT esteja associada à redução na atividade de neurônios serotoninérgicos do LC, e esta atividade seja restaurada por sinais pós-ingestivos possivelmente relacionados à saciedade.

No núcleo pontino da rafe (R), a densidade de células Fos+ aumentou após as injeções de 5-HT, indiferente dos animais beberem ou não após as injeções, a densidade deste tipo de marcação foi positivamente correlacionada somente com

os índices de sono. Além disso, as injeções de 5-HT induziram sono intenso em ambos os grupos de animais, mas falharam em afetar a expressão Fos em neurônios serotonérgicos deste núcleo, sugerindo assim, que a ativação induzida pela 5-HT em neurônios não-serotonérgicos neste núcleo pode estar associada ao sono observado nestes animais. Por outro lado, no núcleo mais rostral e lateral contendo neurônios serotonérgicos, o A8, as injeções de 5-HT seletivamente reduziram a densidade de células duplamente marcadas tanto nos animais 5-HTW quanto nos 5-HTØ. Assim, este efeito, aparentemente, não está relacionado a intensa ingestão de água nos animais tratados com 5-HT com acesso à água, nem à “sede” daqueles animais tratados com 5-HT e impedidos de beber. Além disso, o número de células serotonérgicas Fos+ foi negativamente correlacionado com a duração e frequência do sono, sugerindo que a redução na atividade de neurônios serotonérgicos neste núcleo fundamenta a expressão de sono apresentada pelos animais. Entretanto, é interessante notar que a injeção tanto de veículo, como de 8-OH-DPAT na coluna lateral mesencefálica contendo neurônios serotonérgicos (envolvendo a região do A8), tende a produzir a diminuição específica de comportamentos típicos de sono e aumentar a duração de períodos de imobilidade alerta, comparados aos comportamentos apresentados pelos animais controles (Häckl et al., 2005).

Estes dados indicam que neurônios serotonérgicos da região de A8 podem estar relacionados à expressão de sono em pombos, mas sua atividade não está diretamente associada à indução de sono causada por auto-receptores 5-HT_{1A} (como sugerido pelos experimentos com 5-HT e 8-OH-DPAT). A possível redução

da atividade de neurônios serotoninérgicos mediada por receptores 5-HT_{1A}, utilizada para explicar o sono produzido pela 5-HT, pode ocorrer em populações serotoninérgicas não examinadas neste estudo.

Parece que a marcante sequência comportamental induzida pela 5-HT está associada ao aumento na atividade de definidas populações de neurônios não serotoninérgicos e a diminuição da atividade de algumas particulares populações de neurônios serotoninérgicos nos núcleos rostrais da rafe do pombo. Alterações dependentes de comportamentos ingestivos na expressão da proteína Fos em neurônios da rafe rostral também foram observadas no rato (Takase e Nogueira, 2008): a antecipação da ingestão, a busca pela alimento, ingestão e estados de saciedade foram acompanhados por diferentes padrões de ativação nos núcleos da rafe. No momento, nós não podemos comparar cada núcleo da rafe da ave a regiões possivelmente correspondentes no mamífero, mas como no pombo, estes dados revelam complexas inter-relações acontecendo nos núcleos da rafe ao longo do cenário peri-prandial.

Estes dados sugerem que, tanto em aves quanto em mamíferos, alterações na atividade dos circuitos serotoninérgicos podem orquestrar o sono, a ingestão de água e de alimento e outros fenômenos pós-prandiais. Indicam ainda que a associação a um padrão funcional específico da 5-HT sobre a sequência comportamental de saciedade pode representar um atributo funcional conservado do encéfalo dos amniotas. Deve ser notado, entretanto, que os mecanismos particulares pelos quais esta coordenação é alcançada, podem diferir entre as diferentes classes de animais. Estas especializações funcionais ou características

apomórficas podem indicar que apesar das similaridades gerais, tanto a sequência comportamental de saciedade e possivelmente os mecanismos serotoninérgicos subjacentes, relacionados ao balanço energético, à homeostasia hidromineral e ao sono possam ser vulneráveis às extensivas alterações durante sua evolução.

5. Referências

ABALO XM, VILLAR-CHEDA B, MELÉNDEZ-FERRO M. Development of the serotonergic system in the central nervous system of the sea lamprey. **J Chem Neuroanat**, 34 (1-2): 29-46, september, 2007.

ABRAMS JK., JOHNSON PLA., HAY-SCHMIDT BJD., MIKKELSEN BCA., SHEKHARD ECA., LOWRY A. 2005. Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs. *Neuroscience*. 133, 983–997.

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

ALLERS KA, SHARP T. Neurochemical and anatomical identification of fast and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labeling methods in vivo. **Neuroscience** 122 (1): 193-204, 2003.

AZMITIA EC. Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. **Int Rev Neurobiol** 77: 31-56, 2007.

BALTHAZART J, ABSIL P, GERARD M, APPELTANTS D, BALL GF. Appetitive and consummatory male sexual behavior in japanese quail are differentially regulated by subregions of the preoptic medial núcleo. **J Neurosci**, 18: 6512-6527, 1998.

BARABAN SC, TAYLOR MR, CASTRO MP, BAIER H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience** 131 (3): 759-768, 2005.

BARNES NM, SHARP T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology** 38 (8): 1083-1152, august, 1999.

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** 18 (1): 73-83, 1994.

BELIN MF, FEVRE-MONTANGE M, REBOUL A, DIDIER-BAZES M, EHRET M, MAITRE M, TARDY M. Primary dissociated cell culture of embryonic rat metencephalon: presence of GABA in serotonergic neurons. **Neurosci Lett**, 29: 101-106, 1991.

BENARROCH EE, SCHMEICHEL AM, PARISI JE. Depletion of mesopontine cholinergic and sparing of raphe neurons in multiple system atrophy. **Neurology** 59: 944-946, 2002.

BENARROCH EE, SCHMEICHEL AM, LOW PA, PARISI JE. Depletion of putative chemosensitive respiratory neurons in the ventral medullary surface in multiple system atrophy. **Brain** 130 (2): 469-475, 2007.

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

BJORVATN B, URSIN R. Changes in sleep and wakefulness following 5-HT_{1A} ligands given systemically and locally in different brain regions. **Rev Neurosci** 9: 265-273, 1998.

BLUNDELL JE. Serotonin manipulations and the structure of feeding behaviour. **Appetite** (Suppl 7): 39-56, 1986.

BOSWELL T, LI Q. Cholecystokinin induces fos expression in the brain of the japanese quail. **Horm Behav** 34 (1): 56-66, august, 1998.

BRODIE, BB, SHORE PA. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. **Ann N Y Acad Sci** 66 (3): 631-642, 1957.

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** 98: 127-135, 2001.

BURMEISTER SS, MANGIAMELE LA, LEBONVILLE CL. Acoustic modulation of immediate early gene expression in the auditory midbrain of female túngara frogs. **Brain Res** 1190: 105-114, 2008.

CALAS A. The avian median eminence as a model for diversified neuroendocrine routes. In **Brain-endocrine Interaction II. The Ventricular System in Neuroendocrine Mechanisms** (ed. K. M. Knigge, D. E. Scott & A. Weindl), pp. 54-69. Basel: Karger, 1975.

CAMPANELLA LCA, DA SILVA AA, GELLERT DS, PARREIRA C, RAMOS MC, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J. Tonic serotonergic control of ingestive behaviours in the pigeon (*Columba livia*): the role of the arcopallium. **Behav Brain Res** 205 (2): 396-405, december, 2009.

CASTRO L, DE CASTRO E SILVA E, LIMA AKS, SOUZA FS, MALDONADO I, MACEDO DF, FERREIRA MG, SANTAMARÍA GF, BANDEIRA IPV, AMOR ALM, CARVALHO FLQ, ROCHA JR MA, OLIVEIRA IR, FREGONEZE JB. Central 5-HT₄ receptors and drinking behavior. **Pharmacol Biochem Behav** 66: 443-8, 2000.

CASTRO L, MALDONADO I, CAMPOS I, VARJÃO B, ÂNGELO AL, ATHANAZIO RA, BARBETTA MC, RAMOS AC, FREGONEZE JB, DE CASTRO E SILVA E. Central administration of m-CPP, a serotonin 5-HT_{2B/2C} agonist, decreases water intake in rats. **Pharmacol Biochem Be** 72: 891-8, 2002a.

CASTRO L, VARJÃO B, MALDONADO I, CAMPOS I, DUQUE B, FREGONEZE JB, OLIVEIRA IR, DE CASTRO E SILVA E. Central 5-HT₃ receptors and water intake in rats. **Physiol Behav** 77: 349-59, 2002b.

CASTRO L, ATHANAZIO R, BARBETTA M, RAMOS AC, ÂNGELO AL, CAMPOS I, VARJÃO B, FERREIRA HS, FREGONEZE JB, DE CASTRO E SILVA E. Central

5-HT_{2B/2C} and 5-HT₃ receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. **Brain Res** 981: 151-9, 2003.

CAVALCANTE-LIMA HR; BADAUÊ-PASSOS DJr; DE-LUCCA Jr W; LIMA HRC; COSTA-E-SOUZA RH; OLIVARES EL; CEDRAZ-MERCEZ PL; REIS RO; MEDEIROS MA; CÔRTEZ WS; REIS LC. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neurosci Lett** 374:5-10, 2005a.

CAVALCANTE-LIMA, HR; LIMA, HRC; COSTA-E-SOUZA, RH; OLIVARES, EL; CEDRAZ-MERCEZ, PL; REIS, RO; BADAUÊ-PASSOS, DJr; DE-LUCCA Jr., W; MEDEIROS, MA; CÔRTEZ, WS; REIS, LC. Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Braz J Med Biol Res** 38:1669-75, 2005b.

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

CLINE MA, CALCHARY WA, NANDAR W. Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP) on avian appetite-related processes. **Behav Brain Res** 196 (2): 242-247, January, 2009.

COBELLIS G, VALLARINO M, MECCARIELLO R, PIERANTONI R, MASINI MA, MATHIEU, PERNAS-ALONSO R, CHIEFFI P, FASANO S Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of the frog, *rana esculenta*, Brain: An Analysis Carried Out in Parallel with GnRH Molecular Forms. **J Neuroendocrinol** 11: 725-735, 1999.

CONNORS SL, MATTESON KJ, SEGA GA, LOZZIO CB, CARROLL RC, ZIMMERMAN AW. Plasma Serotonin in Autism. **Pediatr Neurol** 35 (3): 182-186, 2006.

COOPER SJ, DESA A. Benzodiazepines and putative 5-HT_{1A} agonists increase hypertonic saline consumption in rehydrating rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 28: 187-191, 1987.

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** 43: 533-537, 1988.

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

COOPER SJ, CICCOCIOPPO R. Effects of selective 5-HT_{1C} agonist in water-deprived rats on salt intake in two-choice tests. **Pharmacol Biochem Behav** 45: 513–518, 1993.

COSCINA DV, FEIFEL D, NOBREGA JN, CURRIE PJ. Intraventricular but not intraparaventricular núcleo metergoline elicits feeding in satiated rats. **Am J Physiol** 266: R1562-R1567, 1994.

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

CRISPIM CF JR, PEDERIVA C, BOSE R, MARINO-NETO, J. Ethowatcher®: Validation of a tool for behavior record and animal activity video-tracking analysis. In preparation, 2010.

CSABA G. Presence in and effect of pineal indoleamines at very low level of phylogeny. **Experientia** 49: 627-634, 1993.

CURRIE PJ, COSCINA DV. Diurnal variations in the feeding response to 8-OH-DPAT injected into the dorsal or median raphe. **Neuroreport** 4: 1105-1107, 1993.

CURRIE PJ, COSCINA DV. Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine. **Pharmacol Biochem Behav** 53 (4): 1023-1028, april, 1996.

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

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

DANGUIR J, NICOLAIDIS S. Feeding, metabolism and sleep: Peripheral and central mechanisms of their interaction. In McGinty DJ, Drucker-Colin R, Morrison A, Parmeggiani PL (eds), **Brain mechanisms of sleep**. Raven Press, New York, 1985.

DANGUIR J, NICOLAIDIS S, Gerard H. Relations between feeding and sleep patterns in the rat. **J Comp Physiol Psychol** 93 (5): 820-830, 1979.

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** 39: 249-254, 1996.

DA SILVA RA, DA SILVA ASS, POFFO MJ, RIBAS DC, FARIA MS, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA. Feeding behavior after metergoline or GR-46611 injections into the paraventricular núcleo of the hypothalamus in the pigeon. **Behav Brain Res** 179: 248-257, 2007.

DA SILVA RA, DE OLIVEIRA ST, HACKL LPN, SPILERE CI, FARIA MS, MARINO-NETO J, PASCHOALINI MA. Ingestive behaviors and metabolic fuels after central injections of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D/1B} receptors agonists in the pigeon. **Brain Res** 1026 (2): 275-283, november, 2004.

DA SILVA ES, DOS SANTOS TV, HOELLER AA, DOS SANTOS TS, PEREIRA GV, MENEGHELLI C, PEZLIN AI, DOS SANTOS MM, FARIA MS, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J. Behavior and metabolic effects of central injections of orexins/hypocretins in pigeon (*Columba livia*). **Regul Pept** 147 (1-3): 9-18, april, 2008.

DATTA S, MACLEAN RR. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. **Neurosci Biobehav Rev** 31 (5): 775-824, 2007.

DE BOER SF, KOOLHAAS JM. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor agonists and aggression: a pharmacological challenge of the serotonin deficiency hypothesis. **Eur J Pharmacol** 526 (1-3): 125-139, december, 2005.

DE CASTRO JM. A microregulatory analysis of spontaneous fluid intake by humans: evidence that the amount of liquid ingested and its timing is mainly governed by feeding. **Physiol Behav** 43 (6): 705-714, 1988.

DE CASTRO E SILVA E, SARMENTO C, NASCIMENTO TA, LUZ CP, SOARES T, MARINHO C, CUNHA M, BULCÃO C, DE OLIVEIRA IR, FREGONEZE JB. Effect of third ventricle administration of L-694-247, a selective 5-HT_{1D} receptor agonist, on water intake in rats. **Pharmacol Biochem Behav** 57: 749-54, 1997.

DE GOBBI JI, BARBOSA SP, DE LUCA LA JR, THUNHORST RL, JOHNSON AK, MENANI JV. Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. **Brain Res** 1066 (1-2): 1-9, 2005.

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

DEWHURST WG, MARLEY E. Action of sympathomimetic and allied amines on the central nervous system of the chicken. **Br J Pharmac Chemother** 25 (3): 705-727, 1965.

DOS SANTOS MM, HOELLER AA, DOS SANTOS TS, FELISBINO MB, HERDT MA, DA SILVA ES, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J. Behavioural and electroencephalographic effects of systemic injections of 8-OH-DPAT in the pigeon (*Columba livia*). **Behav Brain Res** 201 (2): 244-256, 2009.

DOS SANTOS TS, MASTROCOLA M, HOELLER AA, DUARTE AMC, LINO-DE-OLIVEIRA C, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J. Serotonin-induced behaviors in the pigeon II: - The role 5-HT_{1/2} and 5-HT_{1A} receptors. In preparation, 2010.

EKSTROM P, EBBESSON SO. Distribution of serotonin-immunoreactive neurons in the brain of sockeye salmon fry. **J Chem Neuroanat** 2: 201-213, 1989.

ERSPAMER V, ASERO B. Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffin cells, as 5-hydroxytryptamine. **Nature** 169: 800-801, 1952.

FINDLAY JD, THOMPSON GE. The effect of intraventricular injections of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, acetylcholine and tranylcypromine on the ox (*Bos taurus*) at different environmental temperatures. **J Physiol** 194: 809-816, february, 1968.

FITZSIMONS TJ, LE MAGNEN J. Eating as a regulatory control of drinking in the rat. **J Comp Physiol Psychol** 67 (3): 273-283, 1969.

FLETCHER PJ. Increased food intake insatiated rats by the 5-HT antagonists methysergide, metergoline and ritanserin. **Psychopharmacology** 96: 237-242, 1988.

FRANCHINI LF, JOHNSON AK, OLMOS J, VIVAS L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **Am J Physiol-Reg** 282: R235-R243, 2002.

FREGLY MJ, CONNOR TM, KIKTA DC, THREATTE RM. Dipsogenic effect of L-hydroxytryptophan in rats. **Brain Res Bull** 5 (6): 719-724, 1980.

FUCHS T, SIEGEL JJ, BURGDORF J, BINGMAN VP. A selective serotonin reuptake inhibitor reduces REM sleep in the homing pigeon. **Physiol Behav** 87 (3): 575-581, 2006.

FUJIWARA KT, ASHIDA K, NISHIMA H, IBA H, MIYAJIMA N, NISHIZAWA M, KAWAI S. The chicken *c-fos* gene: cloning and nucleotide sequence analysis. **J Virol** 61 (12): 4012-4018, december, 1987.

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

GLEESON S, WEISSMAN BA, SEGCEL MR, BARRETT JE. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. **Eur J Pharmacol** 229: 109-115, 1992.

GONZÁLEZ-BURGOS I, FERIA-VELASCO A. Serotonin/dopamine interaction in memory formation. **Prog Brain Res** 172: 603-623, 2008.

GRAEFF FG, GUIMARAES FS, DE ANDRADE TG, DEAKIN JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav** 54:129-141, 1996.

GRIMALDI B, FILLION G. 5-HT-moduline controls serotonergic activity: implication in neuroimmune reciprocal regulation mechanisms. **Progr Neurobiol** 60 (1): 1-12, january, 2000.

GÜNTÜRKÜN O, GROTHUES A, HAUTKAPPE A, WAWRZYNIAK N, ZWILLING U. Serotonergic modulation of ingestive behavior in pigeons. **Pharmacol Biochem Behav** 32 (2): 415-420, 1989.

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** 1035: 154-167, 2005.

HALFORD JC, WANNINAYAKE SC, BLUNDELL JE. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav** 61:159-168, 1998.

HEHMAN BS, VONDERAHE AR, PETERS JJ. Effect of serotonin on behaviour, electrical activity of the brain, and seizure threshold of the newly hatched chick. **Neurology** 11: 1011-1016, 1961.

HESS US, LYNCH G, GALL CM. Regional patterns of c-Fos mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well learned discrimination. **J Neurosci**, 15 (12): 7796-7809, 1995.

HOPWOOD SE, JONATHAN A. STAMFORD Multiple 5-HT₁ autoreceptor subtypes govern serotonin release in dorsal and median raphe nuclei. **Neuropharmacology** 40 (4): 508-519, march, 2001.

HORNUNG JP. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **J Chem Neuroanat** 26 (4): 331-343, december, 2003.

HOYER D, CLARKE DE, FOZARD JR, HARTIG PR, MARTIN GR, MYLECHARANE EJ, SAXENA PR, HUMPHREY PPA.VII. International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacological Reviews**, 46 (2): 157-203.

JACOBS BL, AZMITIA EC. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiol Rev** 72: 165-228, january, 1992.

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

JARVIS ED, RIBEIRO S, DA SILVA ML, VENTURA D, VIELLIARD J, MELLO CV Behaviourally driven gene expression reveals song nuclei in hummingbird brain. **Nature** 406 (6796): 628-632, august, 2000.

JOH TH, SHIKIMI T, PICKEL VM, REIS DJ. Brain tryptophan hydroxylase: Purification of, production of antibodies to, and cellular and ultrastructural localization in serotonergic neurons of rat midbrain. **Proc Nat Acad Sci USA** 72: 3575-3579, 1975.

JOHNSON AK, THUNHORST RL. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrin** 18 (3): 292-353, 1997.

KALSNER S, ABDALI SA. Rate-independent inhibition of 5-HT release by 5-HT in the somadendritic regions of raphe neurons. **Brain Res Bull**, 58 (3): 289-294, 2002.

KANTOR S, JAKUS R, BODIZS R, HALASZ P, BAGDY GA. Acute and long-term effects of the 5-HT receptor antagonist 2 ritanserin on EEG power spectra, motor activity, and sleep: changes at the light–dark phase shift. **Brain Res** 943: 105-111, 2002.

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

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

KING MV, MARSDEN CA, FONE KCF. A role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory. **Trends Pharmacol Sci** 29 (9): 482-492, September, 2008.

KISSILEFF HR. Food-associated drinking in the rat. **J Comp Physiol Psychol** 67 (3): 284-300, March, 1969.

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** 276: 388-397, 1996.

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** 284 (1): 238-249, January, 1998.

KRALY FS. Histamine plays a part in induction of drinking by food intake. **Nature** 302: 5-66, March, 1983.

KRUGER GM, MOSHER JT, BIXBY S, JOSEPH N, IWASHITA T, MORRISON S. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. **Neuron** 35 (4): 657-669, 2002.

LAYNE JE, HUNT KE, TRUE T, GILL RS, COMBOS VE, CLINE MA. Central calcitonin exerts anorectic effects via the hypothalamus in chicks. **Pharmacol Biochem Behav** 92 (2): 433-438, 2009.

LEIBOWITZ SF. The role of serotonin in eating disorders. **Drugs**, 39: 33-48, 1990.

MANSBACH RS, HARROD C, HOFFMANN SM, NADER MA, LEI Z, WITKIN JM, BARRET JE. Behavioral studies with anxiolytic drugs. V. Behavioral and in vivo neurochemical analyses in pigeons of drugs that increase punished responding. **J Pharmacol Exp Ther** 246 (1): 114-20, july, 1988.

MARGATHO LO, BARBOSA SP, DE LUCA JR LA, MENANI JV. Central serotonergic and adrenergic/imidazoline inhibitory mechanisms on sodium and water intake. **Brain Res** 956 (1): 103-109, 2002.

MARLEY E, NISTICO G. Tryptamines and some other substances affecting waking and sleep in fowls. **Br J Pharmacol** 53 (2): 193-205, february, 1975.

MARLEY E, WHELAN JE. Some central effects of 5-hydroxytryptamine in young chickens at and below thermoneutrality. **Br J Pharmacol** 53 (1): 37-41, january, 1975.

MCCANN UD, YUAN J, HATZIDIMITRIOU G, RICAURTE GA. Selective serotonin reuptake inhibitors dissociate fenfluramine's anorectic and neurotoxic effects: importance of dose, species and drug. **J Pharmacol Exp Ther** 281 (3):1487-1498, june, 1997.

MCFARLAND D, WRIGHT P. Water conservation by inhibition of food intake. **Physiol Behav** 4 (1): 95-99, january, 1969.

MELLO CV, RIBEIRO S. ZENK protein regulation by song in the brain of songbirds. **J Comp Neurol**, 393: 426-438, 1998.

MELLO CV, VICARIO DS, CLAYTON DF. Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. **P Natl Acad Sci USA** 89 (15): 6818-6822, august, 1992.

MENEGHELLI C, ROCHA NH, MENGATTO V, HOELLER AA, SANTOS TS, LINO-DE-OLIVEIRA C, MARINO-NETO J. Distribution of tryptophan hydroxylase-immunoreactive neurons in the brainstem and diencephalon of the pigeon (*Columba livia*). **J Chem Neuroanat** 38 (1): 34-46, september, 2009.

MOHAMMAD-ZADEH LF, MOSES L, GWALTNEY-BRANT SM. Serotonin: a review. **J Vet Pharmacol Therap** 31 (3): 187-199, april, 2008.

MONTI JM, JANTOS H, MONTI D. Serotonin and sleep-wake regulation. In MONTI JM, PANDI-PERUMAL SR, SINTON CM (eds) **Neurochemistry of sleep and wakefulness**, Cambridge University Press, Cambridge, pp: 244-279, 2008.

MONTI JM, JANTOS H. Activation of the serotonin 5-HT₃ receptor in the dorsal raphe núcleo suppresses REM sleep in the rat. **Prog Neuro-Psychoph** 32 (4): 940-947, 2008.

MOLDERS H, JENUWEIN J, ADAMKIEWICZ J, MULLER R. Isolation and structural analysis of a biologically active *c-fos* DNA: identification of evolutionary conserved domain in Fos protein. **Oncogene** 1 (4): 377-85, 1987.

MORGAN J, CURRAN T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. **Annu Rev Neurosci** 14: 421-51, 1991.

MOUKHLES H, BOSLER O, BOLAM JP, VALLÉE A, UMBRIACO D, GEFFARD M, DOUCET G. Quantitative and morphometric data indicate precise cellular interaction between serotonin terminals and postsynaptic targets in rat substantia nigra. **Neuroscience** 76: 1159-1171, 1997.

MUÑOZ M, MARTÍNEZ A, CUTTITTA F, GONZÁLEZ A. Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the central nervous system of the frog. **J Chem Neuroanat** 21: 105-123, 2001.

NEILL JC, COOPER SJ. Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats. Evidence for possible 5-HT_{1C} receptor mediation. **Psychopharmacology (Berl)** 99: 196-201, 1989.

NEWCOMB LM, FICKBOHM DJ, KATZ PS. Comparative mapping of serotonin-immunoreactive neurons in the central nervous systems of Nudibranch Molluscs. **J Comp Neurol** 499:485–505, 2006.

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

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

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

PIERRE J, REPERANT J, WARD R, VESSELKIN NP, RIO JP, MICELI D, KRATSKIN L The serotonergic system of the brain of the lamprey (*Lampræta fluviatilis*): an evolutionary perspective. **J Chem Neuroanat** 5 (3): 195-219, may-june, 1992.

PHILLIPS NH, BERGER RJ. Caloric and photic modulation of circadian rhythms of body temperature, metabolism and sleep. In Malan A, Canguilhem B (eds) **Living in the cold II**. John Libbey Eurotext, Montrouge, p, 419-427, 1989 a.

PHILLIPS NH, BERGER RJ. Metabolism and body temperature during circadian sleep in the fed and fasting pigeon. In Reinertsen RE, Bech C (eds) **Physiology of cold adaption in birds**. Plenum, New York. Pp, 255-264, 1989 b.

PHILLIPS NH, BERGER RJ. Regulation of body temperature, metabolic rate, and sleep in fasting pigeons diurnally infused with glucose or saline. **J Comp Physiol** 161: 311-318, 1991.

POLO PA, REIS RO, CEDRAZ-MERCEZ PL, CAVALCANTE-LIMA HR, OLIVARES EL, MEDEIROS MA, CÔRTEZ WS, REIS LC. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes; Aves). **Braz J Biol** 67 (1): 167-171, 2007.

RAPPORT MM, GREEN AA, PAGE IH. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization. **J Biol Chem** 176 (3): 1243-51, june, 1948.

REINER A, YAMAMOTO K, KARTEN HJ. Organization and evolution of the avian forebrain. **Anat Rec** 287A: 1080-1102, 2005.

REINER A, PERKEL DJ, BRUCE L, BUTLER AB, CSILLAG A, KUENZEL W, MEDINA L, PAXINOS G, SHIMIZU T, STRIEDTER GF, WILD M, BALL GF, DURAND S, GUNTURKUN O, LEE DW, MELLO CV, POWERS A, WHITE SA, HOUGH G, KUBIKOVA L, SMULDERS TV, WADA K, DUGAS-FORD J, HUSBAND S, YAMAMOTO K, YU J, SIANG C, JARVIS ED. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. **J Comp Neurol** 473 (3): 377-414, may, 2004.

REIS LC; RAMALHO MJP; ANTUNES-RODRIGUES J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by water deprivation: effect of a serotonergic agonist (MK-212) administered intracerebroventricularly. **Braz J Med Biol Res** 23:1335-1338, 1990a.

REIS LC; RAMALHO MJP; ANTUNES-RODRIGUES J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by angiotensin II, and carbachol in normally hydrated rats: effect of intracerebroventricular injection of MK-212. **Braz J Med Biol Res** 23: 1339-1342, 1990b.

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.** 65 (2): 353-361, may, 2005.

ROBINSON EA, ADOLPH EF. Pattern of normal water drinking in dogs. **Am J Physiol** 139: R39-R44, 1943.

RODRIGUES SL, MASEKO BC, IHUNWO AO, FUXE K, MANGER PR. Nuclear organization and morphology of serotonergic neurons in the brain of the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*. **J Chem Neuroanat** 35 (1): 133-145, january, 2008.

ROSSI R, SCHARRER E. Circadian patterns of drinking and eating in pygmy goats. **Physiol Behav** 51 (5): 895-897, may, 1992.

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

SAKAI K, CROCHET S. Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake-sleep states. **Neuroscience** 104 (4): 1141-1155, 2001.

SALAND LC, SAMORA A, SANCHEZ P, CHAVEZ G. Immunocytochemical studies of tryptophan hydroxylase, tyrosine hydroxylase, and serotonin innervation in the aging rat neurointermediate pituitary. **Exp Neurol** 121 (1): 119-126, may, 1993.

SALIERNO JD, SNYDER NS, MURPHYC AZ, POLI M, HALL S, BADEN D, KANEA AS. Harmful algal bloom toxins alter *c-Fos* protein expression in the brain of killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Aquat Toxicol** 78 (4): 350-357, 2006.

SAMANIN R; GRIGNASCHI G. Role of 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in satiety and animal models of eating disorders. in: **Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behaviour**. S J Cooper e P G Clifton (eds.), cap. 3, pp. 39-58, London: Academic Press, 1996.

SCHREIBER R, BROCCO M, DE LADONCHAMPS BL, MILLAN MJ. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the anxiolytic action of S 14671 in the pigeon conflict test. **Pharmacol Biochem Behav** 51: 211-215, 1995.

SHARP PJ, LI Q, TALBOT RT, BARKER P, HUSKISSON N, LEA RW. Identification of hypothalamic nuclei involved in osmoregulation using Fos immunocytochemistry in the domestic hen (*Gallus domesticus*), ring dove (*Streptopelia risoria*), Japanese quail (*Coturnix japonica*) and Zebra finch (*Taenopygia guttata*). **Cell Tissue Res** 282: 351-61, 1995.

SHARP PJ, LI Q. Expression of Fos-like immunoreactivity in the hypothalamus of the ring dove (*Streptopelia risoria*) at the onset of incubation. **J Neuroendocrinol** 8: 291-298, 1996.

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

SIMANSKY KJ, NICKLOUS DM. Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake Blockade by the 5-HT_{1B} antagonist SB-216641. **Pharmacol Biochem Behav** 71 (4): 681-690, april, 2002.

SMULDERS TV, DEVOOGD TJ. Expression of immediate early genes in the hippocampal formation of the black-capped chickadee (*Poecile atricapillus*) during a food-hoarding task. **Behav Brain Res** 114 (1): 39-49, september, 2000.

SNG JCG, TANIURA H, YONEDA Y. A Tale of Early Response Genes. **Biol Pharm Bull** 27 (5): 606-612, 2004.

SPIGA F, LIGHTMAN ASL, SHEKHAR AA, LOWRY CA. Injections of Urocortin 1 Into the Basolateral Amygdala Induce Anxiety-Like Behavior and c-Fos Expression In Brainstem Serotonergic Neurons. **Neuroscience** 138: 1265-1276, 2006.

STAUB DR, F SPIGA, LOWRY CA. Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. **Brain Res** 1044: 176-189, 2005.

STEFFENS SM, CASAS DC, MILANEZ BC, FREITAS CG, PASCHOALINI MA, MARINO-NETO J (1997) Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons (*Columba livia*). **Brain Res Bull** 44 (6): 681-688.

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

STERIADE M, MCCARLEY, RW. **Brain Control of Wakefulness and Sleep**. Springer, New York. 2005

STRATFORD R. Activation of feeding-related neural circuitry after unilateral injections of muscimol into the núcleo accumbens shell. **Brain Res** 1048 (1-2): 241-250, 2005.

TAKASE LF, NOGUEIRA MI. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behavior. **Brain Res** 1200: 10-18, march, 2008.

TAZIAUX M, KELLER M, BALL GF, BALTHAZART J. Site-specific effects of anosmia and cloacal gland anesthesia on Fos expression induced in male quail brain by sexual behavior. **Behav Brain Res** 194 (1): 52-65, june, 2008.

TECOTT LH. Serotonin and the Orchestration of Energy Balance. **Cell Metabol** 6: 352-361, november, 2007.

TLEMÇANI O, BALL FG, D'HONDT E, VANDESANDE F, SHARP PJ, BALTHAZART J. Fos induction in the Japanese quail brain after expression of appetitive and consummatory aspects of male sexual behavior. **Brain Res Bull** 52: 249-262, 2000.

TOMKINS DM, SELLERS EM, FLETCHER PJ. Median and dorsal raphe injections of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, and the GABAA agonist, muscimol, increase voluntary ethanol intake in Wistar rats. **Neuropharmacology** 33 (3-4): 349-58, mar-april, 1994.

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

TURLEJSKI K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development . **Acta Neurobiol Exp** 56: 619-636, 1996.

Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. **Am J Physiol** 175:157-161, 1953.

VANHATALO S, SOINILA S. Inducible expression of tryptophan hydroxylase without serotonin synthesis in hypothalamic dopaminergic neurons. **Exp Neurol** 157 (2): 305-316, 1999.

VANN, S. D., BROWN, M. W., ERICHSEN, J. T., & AGGLETON, J. P. Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial environments. **J Neurosci** 20 (7): 2711-2718, april, 2000.

WEISSMANN D, BELIN MF, AGUERA M, MEUNIER C, MAITRE M, CASH CD, EHRET M, MANDEL, PUJOL JF. Immunohistochemistry of tryptophan hydroxylase in the rat brain. **Neuroscience** 23 (1): 291-304, october, 1987.

WELTZIN TE, FERNSTROM MH, KAYE WH. Serotonin and bulimia nervosa. **Nutr Rev**, 52: 399-408, 1994.

WHITAKER-AZMITIA PM. The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience **Neuropsychopharmacology** 21 (2S): 1S-8S, 1999.

WILLIAMS S, EVAN GI, HUNT SP. Changing patterns of c-fos induction in spinal neurons following thermal cutaneous stimulation in the rat. **Neuroscience** 36: 73-81, 1990.

WIRTSHAFTER D. The control of ingestive behavior by the median raphe núcleo. **Appetite** 36: 99-105, 2001.

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

YANG X, YAN J, LU B, ZHAO X, LEI Q, YANG D, CHEN K, ZHAO S, ZHU G. Fos expression and hormone changes following electrical stimulation of the posterodorsal amygdala and the effects on food intake in conscious female rats. **Brain Res** 1273: 83-91, 2009.

ZAMMIT GK, ACKERMAN SH, SHINDLEDECKER R, FAUCI M, SMITH GP. Postprandial sleep and thermogenesis in normal men. **Physiol Behav** 52 (2): 251-259, 1992.

ZEIGLER HP, GREEN HL, SIEGEL J. Food and water intake and weight regulation in the pigeon. **Physiol Behav** 8:127-34, 1972.

ZHANG R, TACHIBANA T, TAKAGI T, KOUTOKU T, DENBOW DM, FURUSE M. Serotonin modifies corticotropin-releasing factor-induced behaviors of chicks **Behav Brain Res** 151 (1-2): 47-52, may, 2004.

ZORRILLA EP, INQUE K, FEKETE EM, TABARIN A, VALDEZ GR, KOOB GF. Measuring meals structure of prandial food and water intake of rats. **Am J Physiol** 288: R1450-R1467, 2005.