

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

TESE

**ESTUDO NEUROBIOLÓGICO DE COMPONENTES DO SONO
EM CODORNAS (*Coturnix japonica*) (Temminck Schlegel, 1849)
(Aves: Galliformes)**

Patrícia de Almeida Polo

2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BÍOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ESTUDO NEUROBIOLÓGICO DE COMPONENTES DO SONO
EM CODORNAS (*Coturnix japonica*) (Temminck Schlegel, 1849)
(Aves: Galliformes)**

PATRÍCIA DE ALMEIDA POLO

Sob a Orientação do Professor
Luis Carlos Reis

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciências**, no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal, Área
de Concentração em Conservação de
Grupos Silvestres.

Seropédica, RJ
Março de 2009

598.627

P778e

T

Polo, Patrícia de Almeida, 1973-
Estudo neurobiológico de componentes do
sono em codornas (*Coturnix japonica*)
(Temminck Schlegel, 1849) (Aves:
Galliformes) / Patrícia de Almeida Polo -
2009.

78 f. : il.

Orientador: Luis Carlos Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal.

Bibliografia: f. 65-78

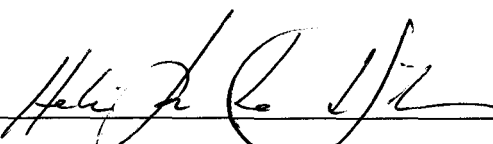
1. Codorna - Comportamento - Teses. 2.
Ave - Comportamento - Teses. 3. Sono -
Aspectos fisiológicos - Teses. 4.
Neurobiologia - Teses. I. Reis, Luis
Carlos, 1952-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Animal. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

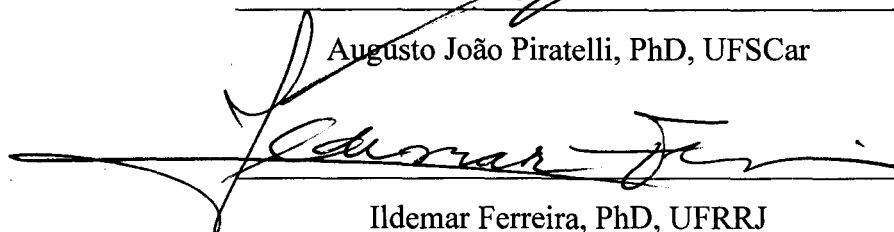
PATRÍCIA DE ALMEIDA POLO

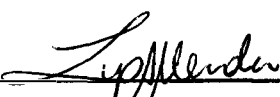
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Conservação
de Grupos Silvestres.

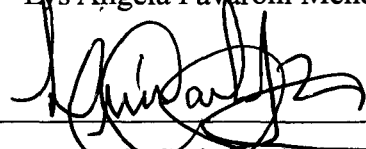
TESE APROVADA EM 06/03/2009.


Hélio Ricardo da Silva, PhD, UFRRJ


Augusto João Piratelli, PhD, UFSCar


Ildemar Ferreira, PhD, UFRRJ


Iys Angela Favaroni Mendes, PhD, USP


Luis Carlos Reis, PhD, UFRRJ

Dedicatória

Ao meu orientador, amigo e Mestre, Luis Carlos Reis.

Agradecimentos

Ao Mestre Luis Carlos Reis por aceitar me orientar nessa jornada, e fazê-lo de forma tão dedicada e amiga.

Ao estudante de Medicina Veterinária da UFRRJ e amigo André de Souza Mecawi por toda ajuda técnico-laboratorial.

Aos técnicos de laboratório Ypojucan P. Souza e Sidney Tunala pelo cuidado com os animais.

Ao Professor Wellington da Silva Côrtes pela colaboração, idéias e incentivo incansáveis.

A minha irmã e amiga de sempre Cláudia Beatriz de Almeida Polo por toda dedicação e paciência nos detalhes finais desse trabalho.

Aos demais amigos que colaboraram de alguma forma com esse trabalho.

Ao meu companheiro, Abelardo José Lauriggio, pai da nossa Ana Rosália, pelo incentivo, paciência e carinho.

RESUMO GERAL

POLO, Patrícia de Almeida. **ESTUDO NEUROBIOLÓGICO DE COMPONENTES DO SONO EM CODORNAS (*Coturnix japonica*) (Temminck Schlegel, 1849) (Aves: Galliformes:).** 2009. 78 p Tese (Doutorado em Biologia Animal, Área de Concentração em Conservação de Grupos Silvestres). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Esse trabalho deu continuidade a um achado incidental do Laboratório de Fisiologia Animal da UFRRJ, no Departamento de Ciências Fisiológicas, no qual, codornas tratadas periféricamente com serotonina, em um estudo sobre comportamento alimentar, apresentaram comportamentos semelhantes ao sono. A partir dessa evidência, a idéia de que a serotonina permeia a barreira hematoencefálica de aves, diferentemente de mamíferos, incitou novas investigações neurofarmacológicas e comportamentais. Foi realizado, primeiramente, um estudo com antagonistas e agonistas de receptores serotoninérgicos, confirmando a permeabilidade da barreira hematoencefálica de codornas à essa amina biogênica e sua participação em mecanismos centrais envolvidos na regulação de comportamentos semelhantes aos do sono. Esse trabalho resultou em uma publicação na *Brazilian Journal of Biology*, em 2007, intitulada “Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves)”. Levando-se em consideração que a serotonina é precursora da melatonina, e que esta última está envolvida no controle do ritmo circadiano, continuou-se a investigação, em torno das alterações séricas de melatonina, mediante administração do precursor da serotonina, L-5-hidróxi-triptofano. Esse estudo resultou na publicação do segundo artigo na *Brazilian Journal of Biology*, em 2007, “Nocturnal plasma levels of melatonin in quails (*Coturnix japonica*) injected with L-5-hydroxy-tryptophan”. Uma vez que os comportamentos relacionados ao sono envolvem uma série de inibições centrais e que o ácido γ -amino-butírico (GABA) é o maior neurotransmissor central do sistema nervoso central, continuou-se a explorar neurofarmacológica e comportamentalmente, o sono em codornas, abordando-se um tipo de receptor gabaérgico, o complexo receptor GABA_A. O estudo resultou na última publicação desse doutoramento, Study of GABA_A receptors on the sleep-like behavior in *Coturnix japonica* (Temminck Schlegel, 1849) (Galliformes: Aves), na *Journal of Comparative Physiology A*, em 2008. O objetivo dessa tese não foi traçar um paralelo filogenético entre aves e mamíferos, entretanto, muitas evidências foram inevitáveis. Certamente, esse trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento científico sobre os elementos estudados. Ainda há muito o que se investigar a respeito do sono, não só em aves, como também em mamíferos.

Palavras-chave: Sono, codornas, comportamento.

GENERAL ABSTRACT

POLO, Patricia de Almeida. STUDY OF NEUROBIOLOGIC COMPONENTS OF THE SLEEP IN QUAILS. (*Coturnix japonica*) (Temminck Schlegel, 1849) (Birds: Galliformes:) 2009. 78 p Dissertation (Doctorate in Animal Biology, Concentration Area of Maintenance of Wild Groups). Institute of Biology, Department of Physiological Sciences, UFRRJ, Seropédica, RJ, 2009.

's work gives continuity to an incidental discovery from the Laboratory of Animal Physiology of UFRRJ, in the Department of Physiologic Science in which quails were treated peripherally by serotonin, in a study of feeding behavior became sleep. From this evidence, the idea of which serotonin permeates the blood-brain barrier (BBB) of the birds, differently to mammals, incited new investigations about neuropharmacology and regarding this issue. Firstly, a study of antagonists e agonists of serotonergic receptors was held, confirming the permeability of the barrier of (BBB) of quails to serotonin and your participation in the central mechanisms involved in the regulation of the similar sleep-like behaviors. This research resulted in a publication of a first in the Brazilian Journal of Biology, in 2007, entitled "Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Cortunix japonica* (Galliformes: Aves). Taking into consideration that the serotonin is the precursor of melatonin and this last one is involved in the control of the circadian rhythm, we continued with the investigation about the plasma levels of melatonin, by means of application of the serotonin precursor, L-5-hydroxy-tryptophan. This study resulted in the publication of a second article in the Brazilian Journal of Biology, in 2007, "Nocturnal plasma levels of melatonin in quails (*Cortunix japonica*) injected with L-5-hydroxy-tryptophan". Once the behaviors related to sleep involves a series of central inhibition and the γ -aminobutyric acid (GABA) is the biggest central inhibitory neurotransmitter of the central nervous system, we continued exploring behavioral and neuropharmacologically broaching the one type of gabaergic receptor, aiming the sleep of quails, the complex receptor GABA_A. This work resulted in the third and last publication of this doctorate work, "Study of GABA_A receptors on the sleep-like behavior in *Cortunix japonica* (Temminck Schlegel, 1849) (Galliformes: Aves)", in the Journal of Comparative Physiology A, in 2008. The aim of this thesis was not to draw a parallel between birds and mammals. However, many evidences were inevitable. Certainly, this research contributed to increase the scientific knowledge of the analysed elements. There is still too much to investigate concerning sleep, not only in birds, but also in mammals.

Key words: Sleep, quails, behavior.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos sub tipos de receptores 5-HT1 em mamíferos

Tabela 2: Características dos sub tipos de receptores 5-HT2 em mamíferos

Tabela 3: Características de outros sub tipos de receptores 5-HT em mamíferos

Tabela 4: Mecanismos de transdução nos sub tipos de receptores 5-HT de mamíferos

Tabela 5: Condições clínicas influenciadas pela função alterada da serotonina em mamíferos

Tabela 6: Efeitos de neurotransmissores de mamíferos que influenciam o bocejo em nível central.

Tabela 7: Efeitos de neuropeptídeos que influenciam o bocejo em nível central

Tabela 8: Incidência de outros padrões de comportamentos apresentados durante o estado “sleep-like” induzidos pela 5-HT e quipazina e suas combinações com antagonistas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática dos receptores GABA_A e GABA_C

Figura 2: Comportamento “sleep-like” de eriçamento das penas e agachamento em codorna

Figura 3: Comportamento “sleep-like” de agachamento e bocejo em codorna

Figura 4: Comportamento “sleep-like” de fechamento dos olhos e eriçamento das penas em codorna

Figura 5: Comportamento “sleep-like” de hipotonia de pescoço em codorna

Figura I.1: Síntese da serotonina

Figura I.2: Frequência de comportamentos associados à reações “sleep-like” induzidas por 5-HT e após tratamento prévio com antagonista 5-HT_{2C}, LY53858 em codornas.

Figura I.3: Frequência de comportamentos associados à reações “sleep-like” induzidas por 5-HT e após tratamento prévio com antagonista 5-HT_{2A/2C}, quetanserina.

Figura I.4: Frequência de comportamentos associados à reações “sleep-like” induzidas por agonista 5-HT_{2A/2C}, quipazina e após tratamento com antagonista 5-HT_{2A/2C}, quetanserina

Figura II.1: Níveis plasmáticos de melatonina em codornas tratadas com L-HTP (25mg.Kg⁻¹, ic, às 18 horas)

Figura III.1: Efeitos do tratamento com TIO (20 mg/kg, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like”

Figura III.2: Efeitos do tratamento com BCC (1 e 4 mg/kg, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like”

Figura III.3: Efeitos do tratamento com PTX (2, 4 e 8 mg/kg, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like”

Figura III.4: Efeitos dos tratamentos com BCC (4 mg/kg, sc) ou PTX (4 mg/kg, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like” induzidos pelo tiopental (20 mg/kg, ic)

LISTA DE ABREVIACÕES

MHPOA - Área pré óptica hipotalâmica média
AOAA - Ácido amino-oxiacético
TPMPA - Ácido metilfosfínico 1,2,5,6-tetraiodopiridina-4-yl
GABA - Ácido γ -amino butírico
5-HIAA - Ácido 5-hidroxiindol acético
BHE - Barreira hematoencefálica
BCC - Bicuculina
EEG - Eletroencefalograma; eletroencefalográficas
HIOMT - Hidroxiindol O-metil transferase
SSRI - Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
LC - Locus coeruleus
L-HTP - L-5-hidroxitriptofano
L-HTPD - L-hidroxitriptofano descarboxilase
L-TRP - L-triptofano
MAO - Monoaminoxidase
MOR - Movimentos orais rápidos
NAT - *N*-acetil transferase
NE - Norepinefrina
NCA - Núcleo central da amígdala
PGO - Ondas ponto-genículo-occipitais
PTX - Picrotoxina
5-HT - Serotonina
OSAS - Síndrome da apnéia obstrutiva do sono
SNC - Sistema nervoso central
REM - Sono de movimento rápido dos olhos
SWS - Sono de ondas lentas
TIO - Tiopental
OCT - Transportador de cátions orgânicos
TPO - Triptofano hidroxilase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I: Evidências Comportamentais e Neurofarmacológicas de que a Serotonina Atravessa a Barreira Hematoencefálica em Codornas <i>Coturnix japonica</i> (Aves: Galliformes)	8
2.1. Resumo	9
2.2. Abstract	10
2.3. Introdução	11
2.4. Revisão de Literatura	12
2.5. Materiais e Métodos	24
2.6. Resultados	26
2.7. Discussão	30
2.8. Conclusão	32
3. CAPÍTULO II: Níveis Plasmáticos Noturnos de Melatonina em Codornas (<i>Coturnix japonica</i>) Injetadas com L-5-hidroxi-triptofano	33
3.1. Resumo	34
3.2. Abstract	35
3.3. Introdução	36
3.4. Revisão de Literatura	37
3.5. Materiais e Métodos	41
3.6. Resultados	43
3.7. Discussão	44
3.8. Conclusão	45
4. CAPÍTULO III: Estudo dos Receptores GABA_A em Comportamentos Semelhantes ao Sono em <i>Coturnix japonica</i> (Temminck Schlegel, 1849) (Aves: Galliformes)	46
4.1. Resumo	47
4.2. Abstract	48
4.3. Introdução	49
4.4. Revisão de Literatura	50
4.5. Materiais e Métodos	55
4.6. Resultados	57
4.7. Discussão	60
4.8. Conclusões	62
CONCLUSÕES GERAIS	63
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

INTRODUÇÃO GERAL

O Papel Fisiológico do Sono

Dormir é um comportamento presente em muitas espécies do reino animal (Smith e Miskiman, 1975; Bobbo *et al.*, 2002; Lyamin *et al.*, 2004).

A maior parte de nosso conhecimento sobre o sono advém de estudos conduzidos em diferentes espécies de vertebrados, especialmente em mamíferos (Gottesmann, *et al.*, 1995; Evarts, *et al.*, 1960; Frank, *et al.*, 2002; Nauta, 1946; Ranson, 1939; Holmes e Jones, 1994).

O sono em vertebrados, tal como qualquer outro processo biológico, se expressa através de padrões comportamentais e eletrofisiológicos mais ou menos elaborados de acordo com o grau de complexidade alcançado pelo encéfalo (Kavanau, 1997).

Uma mínima fração relativa de espécies de vertebrados vivos, como ratos, galinhas e cetáceos, vem sendo estudada quanto ao sono e o critério eletrofisiológico do sono poligráfico tem sido, exclusivamente, tomado de mamíferos e aves (Smith e Miskiman, 1975; Bobbo *et al.*, 2002; Lyamin *et al.*, 2004).

A partir destes estudos, estabeleceu-se que os mamíferos exibem duas fases de sono: o sono de ondas lentas (SWS) e o sono com movimentos oculares rápidos (REM). A primeira fase do sono é caracterizada pela presença de atividade elétrica cerebral constituída de ondas lentas de alta voltagem enquanto que a segunda apresenta ondas de padrão rápido de baixa voltagem e REMs (Kavanau, 1997).

Somente membros dessas duas classes, mamíferos e aves, demonstram uma distinta alternância nos padrões de atividade neural do sono REM e do sono SWS como evidenciado pelo eletroencefalograma (EEG) cortical (Gervasoni *et al.*, 1998; Mascetti e Vallortigara, 2001).

Filogeneticamente, aves e mamíferos são divididos por mais de 270 milhões de anos de evolução independente. Apesar disso, ambos os grupos exibem sinais comportamentais e poligráficos de sono, que não são vistos na mesma extensão por modelos répteis, o grupo de vertebrados que, filogeneticamente, está entre eles (Kavanau, 1997). As similaridades entre o EEG relacionado ao sono de aves e de mamíferos não são baseadas numa organização neocortical similar, o que faz a semelhança entre eles ainda mais interessante (Kavanau, 1997; Baylé *et al.*, 1974; Challet *et al.*, 1996; Dubé e Parent, 1981; Sako *et al.*, 1986; Sharp e Follett, 1968; Cozzi *et al.*, 1991).

O sono REM aviário é caracterizado por alguns dos mesmos segmentos definidores do REM em mamíferos, mas também difere do de mamíferos em vários aspectos de potencial magnitude. Similar aos mamíferos, o sono REM das aves é definido por um EEG de baixa amplitude e alta frequência lembrando bastante o EEG de vigília. Sequências de REMs são frequentemente observadas durante o sono REM das aves, mas em contraste com o de mamíferos (Deboer *et al.*, 1998), ondas ponto-genículo-occipitais (PGO) não têm sido observadas. Atonia de músculos esqueléticos, outro padrão proeminente no sono REM de mamíferos, é virtualmente ausente em muitas espécies de aves, mas sinais eletrofisiológicos e comportamentais (cabeça caída) de hipotonia são encontrados comumente (Kavanau, 1997).

A mais notável diferença entre o sono REM de mamíferos e aves é a duração dos episódios individuais de REM. Os episódios individuais de REM das aves são muito

curtos, durando apenas alguns segundos. Uma noite normal de sono nas aves contém centenas de curtos episódios de REM. Como os mamíferos, a quantidade de sono REM nas aves pode variar consideravelmente durante o curso de uma noite (Kavanau, 1997). Até então, não é claro se o sono REM de aves e de mamíferos são homólogos ou estados convergentes e em que ponto sofrem regulação por mecanismos neurais similares.

Grupos de células monoaminérgicas no tegumento mesopontino têm um papel essencial na regulação de diferentes fenômenos que constituem o sono REM em mamíferos (Data e Siwek, 1997). Há uma hipótese de que uma desinibição monoaminérgica de certas estruturas tronco encefálicas é um passo crítico na iniciação do sono REM em mamíferos (Data e Siwek, 1997; Trulson *et al.*, 1981; Vanni-Mercier *et al.*, 1991). Os sistemas neurotransmissores monoaminérgicos são filogeneticamente antigos e são encontrados em aves assim como em mamíferos (Correale, 1956; Chikazawa *et al.*, 1982; 1983). Surpreendentemente, o envolvimento de grupos celulares monoaminérgicos no sono REM de aves tem recebido pouca atenção, e a natureza da participação do sistema monoaminérgico na regulação do sono REM das aves permanece indeterminada.

A organização topográfica e funcional do sistema serotoninérgico foi altamente conservada de répteis até aves e mamíferos (Ho e LaValley, 1984; Parent, 1981; Parent *et al.*, 1981; Bogdanski *et al.*, 1963; Cozzi *et al.*, 1991; Challet *et al.*, 1996; Janušonis, *et al.*, 1999). De fato, a distribuição filogenética mantida do sistema serotoninérgico tem levado à hipótese de que esse sistema representa um substrato neural integrante de mecanismos similares que permanecem intactos através do Filo Vertebrata (Parent, 1981). De acordo com essa hipótese, um simples neurônio serotoninérgico da rafe mesencefálica projeta fibras axonais para áreas rostrais distantes onde exerce um controle polimodal no loci prosencefálico envolvido na homeostase de funções autonômicas, neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais em vertebrados (Reis e Marinho, 2005; Parent, 1981; Azmitia, 1987).

Em aves, uma densa distribuição de fibras serotoninérgicas vem sendo identificada em regiões diencefálicas conhecidas por estarem envolvidas no controle do comportamento alimentar (Parent, 1981; Reis e Marinho, 2005; Challet *et al.*, 1996). Estudos sobre o papel das vias serotoninérgicas no controle da ingestão alimentar são comuns em várias espécies animais (Hassanain e Levin, 2002; Curzon, 1990, 1991; Blundel, 1984; Leibowitz e Alexander, 1998); entretanto, são raros em aves (Reis e Marinho, 2005; Brun *et al.*, 2001; Stefens *et al.*, 1997; Saadoun e Cabrera, 2002). O papel do sistema serotoninérgico na regulação de diversos comportamentos, inclusive o sono, vem sendo analisado através do uso de precursores da síntese inicial e imediata, liberadores, agonistas e inibidores da recaptação pré-sináptica de serotonina (Bendotti e Samanin, 1987; Jouvet, 1999; Jacobs *et al.*, 1999; Gurtman *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004; Chou-Green *et al.*, 2003; Clénet *et al.*, 2005; MacLeod e Watson, 1993; Hierden *et al.*, 2004; Levine e Jacobs, 1992; Cespuglio, *et al.*, 1992; Graeff *et al.*, 1997).

A serotonina (5-HT) é precursora da melatonina, outra amina de igual interesse no que se refere à regulação circadiana. O ritmo dia/noite é traduzido em oscilações hormonais que governam a fisiologia dos mais derivados organismos. Em mamíferos, a glândula pineal é responsável pela síntese do hormônio melatonina em resposta aos sinais originados do relógio endógeno localizado no núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSH) (Zhdanova, 2005; Zhdanova e Wurtman, 1997; Saletu, 1997).

Muitos estudos envolvendo L-triptofano (L-TRP), precursor da 5-HT, ou demais fatores que podem exercer influência sobre os níveis séricos de melatonina, vêm sendo investigados, com resultados controversos (Cavallo *et al.*, 1987; Namboodiri *et al.*, 1983; McIntyre e Oxenkrug, 1991).

A glândula pineal aviária, como a dos mamíferos, mostra um ritmo circadiano na síntese e na liberação de melatonina. Contudo, a glândula pineal tem um papel proeminente na organização circadiana aviária e difere da que existe em mamíferos de várias formas (Underwood e Siopes, 1984). Uma diferença importante é que a glândula pineal em aves é relativamente autônoma. Além de produzir a melatonina, a pineal aviária contém fotorreceptores e um relógio circadiano (assim, um sistema circadiano completo) dentro de si. Além disso, pineais de aves mantêm suas propriedades circadianas nos órgãos ou em culturas celulares, tornando acessíveis componentes bioquímicos de caminhos regulatórios (Bentley, 2001).

Pinealócitos de aves são diretamente fotossensíveis, e candidatos novos para ftopigmentos não identificados envolvidos na regulação da função do relógio e da produção de melatonina. Os caminhos de transdução e os segundos mensageiros que podem estar envolvidos em efeitos agudos e contínuos, incluindo-se nucleotídeos cíclicos, fluxos de cálcio, e proteínas quinases, têm sido, e continuam a ser, examinados. Além disso, vários genes de relógios, semelhantes aos encontrados em drosófilas e ratos, são expressos e sua dinâmica e interações estão sendo estudadas (Natesan *et al.*, 2002).

Além disso, substâncias que potencializam a neurotransmissão inibitória central, via ácido γ -amino-butírico (GABA), exercem efeitos no sono comparáveis qualitativamente ao descanso circadiano, tanto em ratos como humanos (Lancel e Steiger, 1999; Lancel, *et al.*, 1996; Lancel, 1999; Kaur, *et al.*, 1997). Logo, se a melatonina afeta a função GABAérgica, pode-se esperar sua modulação do sono durante todas as fases circadianas entre as espécies.

No SNC dos vertebrados, o GABA é o neurotransmissor inibitório mais comumente distribuído e participa de estruturas relacionadas ao ciclo sono-vigília (Nitz e Siegel, 1996, 1997a, 1997b; Lin *et al.*, 1989). Inicialmente, o GABA foi descrito como um ativador de canais para cloreto sensíveis a bicuculina e, subsequentemente, foi descoberta a ativação de canais para cátions mediados por GABA. Este achado levou a noção de receptores do tipo GABA_A e GABA_B, que foi introduzida em 1981, por Hill e Bowery (Borman, 2000).

O receptor GABA_A é um canal para cloreto ionóforo e tem sítios de ligação para moduladores benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides e etanol (Gandolfo *et al.*, 1989; Gottesmann *et al.*, 1998; Sieghart, 1995; Bernard *et al.*, 1998) (Figura 2.a, b). Por contraste, os receptores GABA_B são canais para K⁺ e Ca²⁺ ativados via proteína G e sistemas de segundos mensageiros; eles são sensíveis ao baclofen e resistentes a drogas que modulam os receptores GABA_A (Finnimore, 1995; Borman, 2000).

Johnston e colaboradores, em 1975, descobriram que um análogo do GABA, o ácido *cis*-4-aminocrotônico (CACA), ativa, seletivamente, uma terceira classe de receptores GABA no SNC de mamíferos. Estes receptores, que foram, em princípio, designados como GABA_C, são poros para Cl⁻ insensíveis tanto a bicuculina quanto ao baclofen (Borman, 2000; Arnaud, *et al.*, 2001; Feigenspan, 1993) (Figura 1.c).

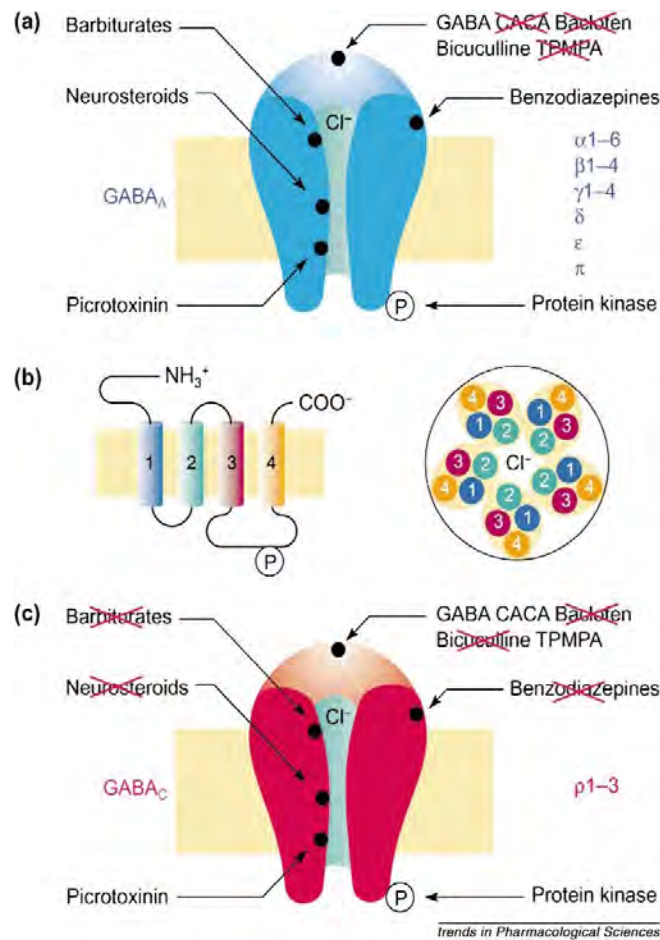


Figura 1: Ilustração esquemática de receptores GABA_A e GABA_C. (a) O receptor GABA_A, que é um poro para Cl⁻, tem sítios de ligação para barbitúricos, benzodiazepínicos e neuroesteróides. As respostas GABA_A são bloqueadas competitivamente pela bicuculina e não-competitivamente pela picrotoxina. O baclofen, agonista do receptor GABA_B é sem efeito, assim como o agonista e o antagonista do receptor GABA_C, CACA e ácido metilfosfínico 1,2,5,6-tetraiodopiridina-4-yl (TPMPA), respectivamente. O receptor GABA_A de vertebrados é construído a partir de várias subunidades, alguns exemplos das quais são mostradas no lado direito. (b) Cada subunidade compreende quatro domínios transmembrana. (c) O receptor GABA_C é ativado pelo CACA e antagonizado pelo TPMPA. É bloqueado pela picrotoxina. Compreende três subunidades (à direita). Ambos os receptores são modulados, intracelularmente, por proteínas quinases.

Fonte: Bormann, J., 2000

Recentemente, tem sido possível estudar estes receptores em subpopulações claramente definidas de neurônios da retina. Na retina de mamíferos, as subunidades ρ de receptores GABA_C se co-localizam em células bipolares, e são funcionalmente distintas dos receptores de glicina e GABA (Arnaud, *et al.*, 2001; Feigenspan, 1993).

Padrões Comportamentais do Sono em nosso Modelo Experimental

Além dos padrões EEG, as aves exibem comportamentos estereotipados relacionados ao sono. Em galináceos, é frequente uma sequência comportamental de preparação para o descanso, composta por empoleiramento, eriçamento de penas, piscadelas, movimentos orais rápidos e “gaping” (componentes do bocejo), até o fechamento dos olhos, que caracteriza o estado de dormir, propriamente (Figuras 2-5).



Figura 2: Comportamento “sleep-like” de eriçamento das penas e agachamento em codorna



Figura 3: Comportamento “sleep-like” de agachamento e bocejo em codorna



Figura 4: Comportamento “sleep-like” de fechamento dos olhos e eriçamento das penas em codorna



Figura 5: Comportamento “sleep-like” de hipotonia de pescoço em codorna

Importância na Pesquisa Básica

No laboratório, muitos desses padrões são facilmente observados podendo ser quantificados e, conseqüentemente, permitindo estudos etológicos e neuroquímicos, geradores de informações básicas sobre o sono em diferentes espécies aviárias. O estudo desses comportamentos estereotipados relacionados ao sono (“sleep-like”) é favorecido em codornas, pois são animais de fácil acomodação, manejo e adaptação às condições laboratoriais.

Esse trabalho baseou-se em quatro premissas:

- O sistema serotoninérgico está envolvido na regulação do sono;
- Administração de precursores de 5-HT influencia níveis séricos de melatonina;
- Substâncias que potencializam a neurotransmissão inibitória central, via receptor GABA_A, exercem efeitos sobre o sono;
- Estudos comportamentais e neuroquímicos, em codornas, são escassos.

Tais premissas geraram as seguintes perguntas:

- A 5-HT, administrada perifericamente, é capaz de permear a barreira hematoencefálica (BHE) de codornas, diferentemente de mamíferos, evocando comportamentos “sleep-like”?
- A administração de L-HTP, precursor da 5-HT, influencia os níveis séricos de melatonina, em codornas, durante todas as fases circadianas?
- O receptor GABA_A está envolvido na regulação de comportamentos “sleep-like” em codornas?

CAPÍTULO I

**Evidências Comportamentais e Neurofarmacológicas de que a Serotonina
Atravessa a Barreira Hematoencefálica em Codornas *Coturnix japonica*
(Aves: Galliformes)**

RESUMO

Este estudo foi desenvolvido objetivando evidenciar reações comportamentais e neurofarmacológicas acerca da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) à serotonina administrada sistemicamente em codornas. A serotonina injetada por via parenteral ($250-1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$, *sc*) produziu uma seqüência de eventos relacionados com um estado semelhante ao sono. Comportamentos semelhantes ao sono começaram com o eriçamento das penas, movimentos orais rápidos, piscadelas e finalmente agachamento e fechamento dos olhos. A administração prévia do antagonista do receptor 5-HT_{2C}, LY53857 (3 mg.kg^{-1} , *sc*) reduziu significativamente os episódios de eriçamento das penas e movimentos orais rápidos, mas não alterou a frequência de piscadelas e fechamento dos olhos. Tratamento com o antagonista do receptor 5-HT_{2A/2C}, quetanserina (3 mg.kg^{-1} , *sc*) não afetou nenhuma das respostas evocadas pela serotonina. A quipazina (5 mg.kg^{-1} , *sc*), um agonista dos receptores 5-HT_{2A/2C/3}, induziu intensa hipomotilidade e longos períodos de comportamentos semelhantes ao bocejo e ao sono. O tratamento prévio com quetanserina suprimiu as reações de bocejo e reduziu a hipomotilidade, os movimentos orais rápidos e as piscadelas, mas foi sem efeito para as demais respostas induzidas pela quipazina. Os resultados mostraram que, diferentemente dos mamíferos, a serotonina atravessa a BHE e ativa mecanismos hipnogênicos em codornas. O estudo com esses agonistas e antagonistas serotoninérgicos revelaram que, entre as ações da serotonina, o eriçamento das penas, os movimentos orais rápidos e o comportamento semelhante ao bocejo foram originados pela ativação de receptores 5-HT₂, enquanto o piscar e o fechamento dos olhos possivelmente requisitaram outros subtipos de receptores.

Palavras-chave: serotonina, barreira hematoencefálica, codornas.

ABSTRACT

This study was carried out aiming to reach behavioral and neuropharmacological evidence of the permeability of the blood-brain barrier (BBB) to serotonin systemically administered in quails. Serotonin injected by a parenteral route ($250-1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$, *sc*) elicited a sequence of behavioral events concerned with a sleeping-like state. Sleeping-like behaviors began with feather bristling, rapid oral movements, blinking and finally crouching and closure of the eyes. Previous administration of 5-HT_{2C} antagonist, LY53857 (3 mg.kg^{-1} , *sc*) reduced the episodes of feather bristling and rapid oral movements significantly but without altering the frequency of blinking and closure of the eyes. Treatment with the 5-HT_{2A/2C} antagonist, ketanserin (3 mg.kg^{-1} , *sc*) did not affect any of the responses evoked by the serotonin. Quipazine (5 mg.kg^{-1} , *sc*) a 5-HT_{2A/2C/3} agonist induced intense hypomotility, long periods of yawning-like and sleeping-like states. Previous ketanserin suppressed gaping responses and reduced hypomotility, rapid oral movements and bristling but was ineffective for remaining responses induced by quipazine. Results showed that unlike mammals, serotonin permeates the BBB and activates hypnogenic mechanisms in quails. Studies using serotonergic agonist and antagonists have disclosed that among the actions of the serotonin, feather bristling, rapid oral movements and yawning-like state originated from activation of 5-HT₂ receptors while blinking and closure of the eyes possibly require other subtypes of receptors.

Key words: serotonin, blood brain barrier, quails.

INTRODUÇÃO

A 5-HT é sintetizada a partir do seu precursor, o aminoácido, L-TRP. O primeiro passo para a síntese de 5-HT requer a participação da L-5-hidroxitriptofano hidroxilase, enzima responsável pela formação do L-HTP (Tyce, 1990; Boadle-Biber, 1993; Cooper *et al.*, 1996). Após isso, o L-HTP é convertido em 5-HT, serotonina, pela ação da L-aminoácido aromático descarboxilase (Tyce, 1990; Boadle-Biber, 1993; Cooper *et al.*, 1996).

Apesar de muitos estudos se preocuparem com a 5-HT cerebral, um pouco menos de 2% dessa indolamina é produzido no sistema nervoso central (SNC), em relação ao organismo todo (Cooper *et al.*, 1996).

A 5-HT neuronal pode atingir a circulação sistêmica; entretanto, ela permeia pobremente a BHE no sentido do encéfalo em mamíferos (Cooper *et al.*, 1996). Todavia, não há estudos a respeito dessa propriedade em aves e suas relações com análises neurofarmacológicas e comportamentais.

Acredita-se que o encéfalo se defende do excesso de 5-HT (e de outras aminas) que escapam da fenda sináptica, bem como modula seu fluxo através da BHE, pois recentemente, foi demonstrado que um transportador de cátions orgânicos extraneural subtipo3 (OCT3) no encéfalo de ratos reconhece a 5-HT. A expressão dessa proteína é regulada pela família de genes relacionada à transportadores de cátions responsáveis por transportar vários cátions orgânicos. Esse sistema de transporte é responsável pela depuração dessa amina no encéfalo por inviabilização metabólica e destoxificação. (Wu *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2003).

Considerando essas observações, procurou-se investigar a evidência da permeabilidade da BHE à 5-HT em codornas. Duas possibilidades de investigação foram tomadas. Primeiramente, 5-HT foi administrada por via sub cutânea (sc) em codornas para se avaliar reações comportamentais. Estudos prévios no nosso laboratório mostraram evidências da ação central da 5-HT injetada sistemicamente na avaliação do seu efeito (e de seu precursor) no comportamento alimentar de codornas (Reis *et al.*, 2005). Nesse estudo, foi mostrado, pela primeira vez, uma ação hipnogênica induzida pela 5-HT sistêmica. Obviamente, essa resposta é dependente da ativação de uma circuitaria neural localizada dentro da BHE.

Como essa referência mostrou outras reações comportamentais (especialmente, respostas hipnogênicas), nesse estudo foi examinada a influência da administração prévia de antagonistas 5-HT₂ nas respostas induzidas pela 5-HT e agonistas 5-HT_{2A/2C}.

REVISÃO DE LITERATURA

A 5-HT permanece, historicamente, o neurotransmissor mais intimamente envolvido com neuropsicofarmacologia. Desde a metade do século XIX, cientistas sabiam que uma substância achada no sangue causava poderosas contrações de órgãos com músculos lisos. Entretanto, mais de 100 anos se passaram antes que cientistas de uma clínica de Cleveland conseguissem isolar a substância como uma das possíveis causadoras de aumentos de pressão arterial (Cooper e Roth, 1996).

Nesta época, investigadores na Itália estavam caracterizando a substância encontrada em grandes quantidades nas células enterocromafins da mucosa intestinal. Este material também causava contrações de órgãos com músculos lisos, especialmente os do esôfago. O material isolado da corrente sanguínea recebeu o nome de “serotonina”, enquanto que o material encontrado na mucosa intestinal recebeu o nome de “enteramina”. Subsequentemente, os dois materiais foram purificados, cristalizados, e mostraram ser 5-HT, que então, pôde ser preparado de modo sintético mostrando possuir todos os aspectos biológicos da substância natural. A natureza indol desta molécula esbarra, com muitas semelhanças, na droga psicodélica L.S.D. (ácido dietilamida lisérgico), que também é mostrada como sendo capaz de interagir com preparações *in vitro* de músculos lisos. A 5-HT é também estruturalmente relacionada a outros agentes psicotrópicos (Cooper e Roth, 1996).

Quando a 5-HT foi, pela primeira vez, encontrada no SNC de mamíferos, levantou-se a teoria de que diversas formas de doenças mentais aconteciam devido a anomalias bioquímicas decorrentes de sua síntese. Esta linha de pensamento foi mais além, quando substâncias tranquilizantes como a reserpina, foram observadas esgotando a 5-HT cerebral; ao longo do completo esgotamento desta, foi observada depressão comportamental profunda. Muitas destas teorias e destas idéias permanecem, apesar de agora termos mais evidências para analisarmos esta substância (Cooper e Roth, 1996).

Em mamíferos, os neurônios serotoninérgicos compreendem um sistema divergente e amplo no interior do sistema nervoso central com uma vasta gama de ações, dependendo das características e da área onde ocorrem suas sinapses (Tabela 1-3).

Os mecanismos pelos quais a interação 5-HT-receptores serotoninérgicos acontecem também são diversos (Tabela 4)

Muitas são as condições clínicas influenciadas pela função alterada da serotonina em mamíferos (Tabela 5).

Tabela 1: Características dos subtipos de receptores 5-HT1 em mamíferos

	Receptores 5-HT1		
	5-HT1A	5-HT1B	5-HT1D
Regiões de alta densidade	Núcleo da rafe Hipocampo	SN GP	GP SN GB
Agonistas seletivos	R(1)8-OH-DPAT 5-CAT Spiperone	5-CAT	Sumatriptan 5-CAT
Antagonistas seletivos	S-(2)-pindolol WAY 100135	Isamoltane	Isamoltane GR 127935
Efeitos na membrana	Hiperpolarização via abertura de canais para K ⁺ Termorregulação	?	?
Outras funções	Hipotensão Comportamento sexual Síndrome do auto-receptor 5-HT (somato dendrítica)	Auto- receptor	Auto-receptor

GB: gânglio basal; 5-CAT: 5-carboxiamidotriptamina; GP: globo pálido e SN: substância negra.

Modificada de: Cooper e Roth, 1996.

Tabela 2: Características dos subtipos de receptores 5-HT2 em mamíferos

	Receptores 5-HT2		
	5-HT2A	5-HT2B	5-HT2D
Regiões de alta densidade	Lâmina IV Córtex Hipocampo NMF	Estômago Fundus Córtex	Plexo coróide Medula Hipocampo
Agonistas seletivos	DOI DOB α -Me5-HT	DOI	DOB α -Me5-HT
Antagonistas seletivos	MDL 100,907 Quetanserina Ritanserina Espiperone	Quetanserina	Quetanserina Espiperone Metergolina
Efeitos na membrana	Despolarização	Despolarização	Despolarização via abertura de canais para Ca^{2+}
Outras funções	?	Vasoconstrição Agregamento plaquetário Edema de membros	

α -Me5-HT: α -metil 5-hidroxitriptamina; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; DOI: 2,5-dimetoxi-4-odoanfetamina; NMF: núcleo motor do nervo facial; NP: neurônios periféricos e SN: substância negra.

Modificada de: Cooper e Roth, 1996.

Tabela 3: Características de outros subtipos de receptores 5-HT em mamíferos

	Outros subtipos de receptores 5-HT			
	5-HT3	5-HT4	5-HT6	5-HT7
Regiões de alta densidade	NP CE Área postrema	Hipocampo Colículo Ileum	Striatum Acumbens Córtex	Tálamo Hipotálamo Amígdala Coração
Agonistas seletivos	α -Me5-HT	SC-53116	5-CAT LSD	LSD
Antagonistas seletivos	Zacopride Odanserton Granisotrom	SDZ 205557	Lisuride Clozapine	Clozapine Amitriptilina
Efeitos na membrana	Despolarização Transmissão da liberação	Relaxamento da musculatura lisa		
Outras funções	Reflexo von Bezold-Jarisch	Ionotrópico		

α -Me5-HT: α -metil 5-hidroxitriptamina; DOB: 2,5-dimetoxi-4-bromoanfetamina; CE: córtex entorrinal; 5-CAT: 5-carboxiamidotriptamina; NMF: núcleo motor do nervo facial e NP: neurônios periféricos.

Modificada de: Cooper e Roth, 1996.

Tabela 4: Mecanismos de transdução nos subtipos de receptores 5-HT de mamíferos

Subtipos de receptores 5-HT de mamíferos e mecanismos de transdução			
Receptores acoplados à proteína G	Subtipo de receptor	Proteína G	Via efetora
Família 5-HT1	5-HT1A	Gi	Inibição da adenilato ciclase
	5-HT1B	Gi	Abertura de canais para K ⁺
		Go	Fechamento de canais para Ca ⁺⁺
		Gi	Inibição da adenilato ciclase
	5-HT1D	Gi	Inibição da adenilato ciclase
5-HT1E	Gi	Inibição da adenilato ciclase	
Família 5-HT2	5-HT2A	Gq	Hidrólise do fosfoinositol
	5-HT2B		Hidrólise do fosfoinositol
	5-HT2C		Hidrólise do fosfoinositol
	5-HT4	Gs	Ativação da adenilato ciclase
Outros	5-HT5A	?	Mecanismo de acoplamento desconhecido
	5-HT5B		
	5-HT6	Gs	Ativação da adenilato ciclase
Canais iônicos acionados por ligantes	5-HT7	Gs	Ativação da adenilato ciclase
	5-HT3	Nenhum	Canal iônico acionado por ligantes

Modificada de: Cooper e Roth, 1996.

Tabela 5: Condições clínicas influenciadas pela função alterada da 5-HT em mamíferos

Distúrbios afetivos e neuroendócrinos devidos a função alterada da 5-HT em mamíferos	
Distúrbios afetivos	Regulação neuroendócrina
Envelhecimento e desordens neurodegenerativas	Desordens obsessivas compulsivas
Desordens de ansiedade	Sensibilidade à dor
Síndrome carcinóide	Síndrome pré-menstrual
Desregulação do ritmo circadiano	Síndrome do estresse pós-traumático
Desordens de desenvolvimento	Esquizofrenia
Desordens alimentares	Desordens sexuais
Emese	Desordens do sono
Enxaqueca	Desordens de estresse
Mioclonia	Abuso de substâncias

Fonte: Cooper e Roth, 1996.

Os neurônios estão amplamente contidos na linha média do núcleo da rafe (Hopwood e Stamford, 2001) que se estende caudalmente do meio do cérebro até a medula (Reis e Marinho, 2005; Parent, 1981; Azmitia, 1987) e são poucos em número, se comparados à totalidade dos neurônios no cérebro. No núcleo da linha média da rafe dorsal, os corpos celulares serotoninérgicos estão agrupados compactadamente (Parent, 1981; Azmitia, 1987), um aspecto que os permitem ser estimulados eletricamente ou seletivamente lesionados (Houdouin *et. al.*, 1991; Wang e Aghajanian, 1977). Esse número limitado de corpos celulares projeta ramificações que atingem praticamente todas as regiões do eixo neural (Azmitia, 1987).

Estudos recentes de microscopia eletrônica também têm revelado que os neurônios serotoninérgicos dentro do núcleo da rafe dorsal emitem fibras finas com muitas varicosidades que formam sinapses difusas, enquanto os do núcleo da rafe mediana emitem axônios mais espessos com varicosidades terminais mais largas que tendem a formar sinapses mais próximas aos neurônios alvo. Estas diferenças estruturais estão associadas com diferentes sensibilidades às neurotoxinas e sugerem diferentes propriedades fisiológicas dentro de subgrupos de neurônios contendo serotonina. Os neurônios serotoninérgicos descendentes são bioquimicamente distintos do sistema de projeção rostral, pois têm peptídeos (ex.: substância P, hormônio liberador de tireotrofinas) associados com a 5-HT (Boadle-biber, 1993).

A 5-HT é formada a partir do aminoácido essencial, L-TRP. Ele sofre uma 5-hidroxilação transformando-se em 5-hidroxitriptofano (L-HTP), seguida de uma descarboxilação rápida que forma a 5-HT, cujo nome reflete a descoberta desta substância no soro e sua habilidade de causar profunda vasoconstrição (Azmitia, 1987; Boadle-biber, 1993).

A primeira reação nesta sequência é catalizada, e de velocidade controlada, pela L-5-hidroxitriptofano hidroxilase. A segunda enzima no caminho da síntese é a L-aminoácido aromático descarboxilase. O L-HTP, que ocorre somente em quantidades do tipo traços, é um dos seus substratos preferidos e é rapidamente descarboxilado a 5-HT nos neurônios serotoninérgicos (Azmitia, 1987; Boadle-biber, 1993) (Figura I.1).

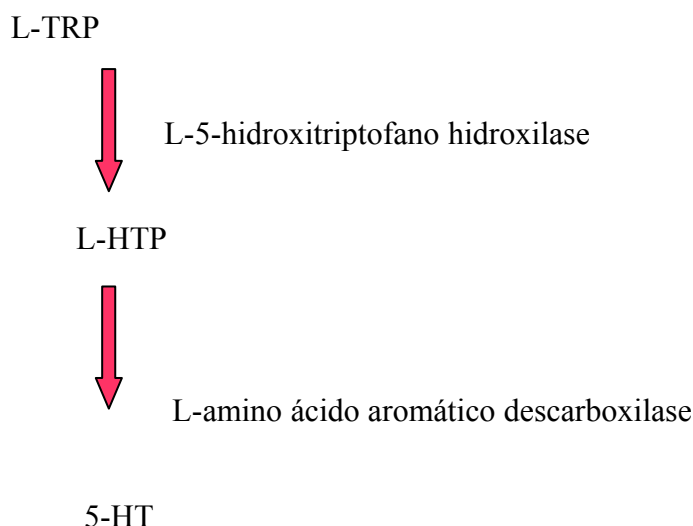


Fig. I.1: Síntese da serotonina

Assim como outros transmissores, a 5-HT é sequestrada em vesículas de armazenamento onde é mantida até sua liberação. A 5-HT que não é sequestrada rapidamente é metabolizada a ácido 5-hidroxi indol acético (5-HIAA) através da monoamina oxidase (MAO), que desamina oxidativamente a amina a 5-hidroxi indol acetato aldeído, e da aldeído desidrogenase que oxida o aldeído ao ácido (Azmitia, 1987; Boadle-biber, 1993).

As células cromafins da mucosa gastrointestinal constituem o maior depósito de 5-HT no corpo, e estimou-se que cerca de 95% da serotonina total no corpo está contida nestas células. Outros importantes depósitos para 5-HT são o cérebro (onde a serotonina age como neurotransmissor), a glândula pineal (onde a serotonina serve como precursora do hormônio melatonina) e plaquetas. A 5-HT também está presente em alguns nervos periféricos, incluindo aqueles nas artérias cerebrais, nos neurônios entéricos, e nos gânglios simpáticos. As células cromafins da medula da adrenal, especialmente as células contendo epinefrina, também contêm 5-HT. Menores quantidades de 5-HT estão presentes em outros tecidos, incluindo-se coração, rim, pâncreas e tireóide, apesar da fonte e da significância da 5-HT nestes tecidos não estar bem definida (Parent, 1981; Correale, 1956; Tyce, 1990).

No cérebro, plaquetas e células enterocromafins, a 5-HT é estocada em vesículas ou grânulos. Uma proteína específica que faz uma ligação forte com a 5-HT, a proteína ligante de serotonina, está estocada com a 5-HT na mesma vesícula, tanto no cérebro quanto nas células enterocromafins (Azmitia, 1987; Boadle-biber, 1993). Além disso, um neuropeptídeo, substância P, está armazenado com a 5-HT em vesículas no cérebro e nas células enterocromafins (Tyce, 1990).

A 5-HT nas células enterocromafins, na glândula pineal, e nos nervos entéricos origina-se da síntese do aminoácido essencial triptofano (Cooper e Roth, 1996; Azmitia, 1987; Boadle-biber, 1993). Plaquetas, contudo, não sintetizam quaisquer quantidades de 5-HT. A 5-HT presente nas plaquetas parece se originar de células cromafins do trato gastrointestinal. A 5-HT é liberada (em conjunto com a substância P) das células cromafins em resposta a vários estímulos, incluindo-se o estímulo do nervo vago, a adição de glicose hipertônica no lúmen do trato gastrintestinal, a acidificação dos conteúdos do lúmen, ou as elevadas concentrações de catecolaminas circulantes. A liberação de 5-HT das células cromafins tanto no lúmen gastrintestinal, mas também além das membranas baso laterais resultam em elevados níveis de 5-HT no sangue venoso porta. No sangue porta, a 5-HT é

tomada pelas plaquetas que têm um rápido processo de captação. Como resultado desta tomada, apenas alguns traços de aminas são normalmente detectados no plasma (Tyce, 1990).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para mensurar as concentrações de 5-HT nos tecidos e nos fluídos corporais. Estes incluem testes biológicos, espectrofotofluorometria, cromatografia líquida de elevada resolução com detecção eletroquímica, métodos radioenzimáticos e testes radio-imunológicos (Rosebrough, 1996; Adell e Artigas, 1999; Levenson *et. al.*, 1999; Chamas *et. al.*, 1999).

Estudos mostram que o nível de 5-HT no sangue é elevado em animais após situações de intenso estresse tais como imobilização, exposição ao sol e natação forçada (Chamas *et. al.*, 1999). Traumas ao cérebro e à espinha dorsal induzem um profundo aumento de 5-HT no sangue. Um aumento de 5-HT no sangue é também encontrado em uma variedade de doenças neurológicas. A significância de tais aumentos para a função e a estrutura do SNC não está clara. Contudo, a 5-HT é uma das aminas vasoativas mais potentes e pode induzir vasoconstrição em vasos cerebrais, aumentar a permeabilidade microvascular levando ao edema e mudanças celulares (Winkler *et. al.*, 1995; Wu *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2003).

Parece razoável que elevados níveis de 5-HT no sangue podem influenciar a função cerebral por causarem um comprometimento da BHE (Winkler *et. al.*, 1995), uma vez que grande número de componentes vasoativos, como leucotrienos, bradicinina e análogos, ácido araquidônico, histamina e poliaminas, aumenta a permeabilidade da BHE em condições patológicas tais como tumores cerebrais, isquemia, e trauma (Black, 1995). Os capilares cerebrais patológicos parecem perder sua habilidade em resistir aos efeitos vasoativos desses compostos; em contraste, em capilares cerebrais normais somente altas doses têm efeitos sobre a permeabilidade da BHE (Duport *et al.*, 1998; Baba *et al.*, 1991; Raymond *et al.*, 1986; Brightman, 1977).

Contudo, o cérebro de mamíferos parece se defender do excesso de 5-HT (e de outras aminas) que escapam da fenda sináptica, bem como modular seu fluxo através da BHE. Trata-se do transportador de cátions orgânicos (OCT) extraneural (Wu *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2003). Os transportadores catiônicos orgânicos (OCTs) foram inicialmente descritos como eliminadores catiônicos em tecidos tais como o fígado e o rim (Wu *et al.*, 1998; Schmitt *et al.*, 2003).

Dois tipos distintos de sistemas de transportes catiônicos têm sido identificados: um sistema de transporte potencialmente sensitivo, que provavelmente faz a mediação da entrada de cátions orgânicos do sangue para as células, e um sistema de transporte dependente do gradiente, que provavelmente faz a mediação da saída de cátions orgânicos de suas células. Uma ação em conjunto destes dois tipos de sistemas resulta numa transferência vetorial de xenobióticos e endobióticos catiônicos do sangue para o fluido luminal nas células tubulares renais ou do sangue para a bile através dos hepatócitos. Um mecanismo semelhante é também percebido operando na eliminação destes componentes no epitélio intestinal e no sincitiotrofoblasto da placenta (Wu *et al.*, 1998).

Até o momento, três diferentes transportadores catiônicos orgânicos potencialmente sensíveis e diferentes entre si (OCTs) têm sido clonados e caracterizados. Por “northern blot”, foi mostrado que OCT1 e OCT2 são expressos, primariamente, no fígado e no rim, e numa extensão menor, em outros tecidos, inclusive intestinos. No cérebro, a expressão OCT1 tem sido detectada até o momento somente pela reação em cadeia da polimerase reversa (RT-PCR), enquanto que o RNAm de OCT3 tem sido detectado pela análise “northern blot” no cérebro, no intestino, no rim, na placenta e em vários outros tecidos (Schmitt *et al.*, 2003).

O OCT3, tanto de ratos como humanos, tem a capacidade de transportar monoaminas, inclusive 5-HT, *in vitro* (Wu *et al.*, 1998). Foi proposto, baseando-se em parâmetros cinéticos, no perfil inibidor e em padrões de expressão, que o OCT3 é o “uptake” 2, o tão conhecido sistema de transporte monoamina extraneural. Contudo, a respeito do termo extraneural,

o OCT3 foi encontrado expresso nos principais neurônios da formação do hipocampo e nos corpos celulares das células de Purkinje no cerebelo, conforme foi avaliado *in situ* por hibridização (Wu *et al.*, 1998). De forma semelhante a OCT3, o OCT1 também é capaz de transportar 5-HT e outras monoaminas através das membranas plasmáticas. Assim, OCT1 e OCT3 têm, provavelmente, um papel crucial a desempenhar no que tange a manutenção da homeostase de neurotransmissores e de neurotoxinas catiônicas no cérebro (Schmitt *et al.*, 2003).

O transportador de 5-HT (5-HTT) (“uptake 2”, OCT3) tem um papel essencial no controle da concentração extracelular de 5HT via captação de alta afinidade. A liberação de 5HT dos terminais serotoninérgicos é seletivamente recaptada da fenda sináptica até estes terminais via 5-HTT (Schmitt *et al.*, 2003).

O OCT3 é de relevância fisiológica e farmacológica para o metabolismo das catecolaminas. A identidade molecular deste sistema de transporte ainda não foi estabelecida. As características distintas do OCT3 incluem a habilidade de transportar catecolaminas de uma maneira independente de sódio e cloreto, a interação com uma variedade de cátions orgânicos, a dependência do potencial de membrana como uma força propulsora, a inibição de esteróides e a expressão em uma grande variedade de tecidos. O sistema OCT3 é de relevância fisiológica e farmacológica para o metabolismo de catecolaminas (Wu *et al.*, 1998).

O OCT3 tem sido implicado em várias desordens psicoterápicas, porque é alvo de antidepressivos, tais como a imipramina e fluoxetina, e de drogas de abusos, incluindo metanfetamina e cocaína (Schmitt *et al.*, 2003). Além disso, polimorfismos do gene promotor do OCT3 têm sido associados à susceptibilidade a desordens afetivas (Meltzer e Lowy, 1987).

As características do transporte e a sensibilidade esteroideal de OCT3 fornecem forte e inequívoca evidência da expressão e da distribuição região específica deste transportador no cérebro (Wu *et al.*, 1998).

A BHE às aminas biogênicas não é totalmente desenvolvida em neonatos de galinhas, até três ou quatro semanas após a eclosão. Entretanto, animas biogênicas penetram no SNC de mamíferos imaturos e aves. Além disso, por administração parenteral, a 5-HT e outras aminas biogênicas penetram no cérebro de galinhas neonatas. Em contraste, a BHE de mamíferos adultos vem sendo considerada impermeável a 5-HT (Hanig e Seifter, 1970).

A participação do sistema serotoninérgico cerebral na regulação da saciedade e apetite, em mamíferos, vem sendo amplamente aceita na literatura, com muitos temas referentes a estudos em roedores (Blundell, 1984; Curzon, 1990; 1991). Em 2005, Reis e colaboradores indicaram evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico na regulação do comportamento alimentar em codornas (*Coturnix japonica*). Nesse estudo, foram usados procedimentos experimentais clássicos, i.e., suplementação da dieta com L-TRP e injeções intra celomáticas L-HTP, que são os precursores inicial e imediato, respectivamente, da síntese de 5-HT neural (Tyce, 1990). Incidentalmente, foram observados comportamentos “sleep-like” que despertaram o interesse na investigação da permeabilidade da BHE à 5-HT nessas aves.

Desde que a administração de 5-HT em galinhas neonatas resultou em sono, investiga-se de que forma esse comportamento está associado com a elevação dos níveis cerebrais de 5-HT feito pela sua penetração no cérebro e suas várias subdivisões (Hanig *et al.*, 1970).

As informações sobre o sono nas aves foram principalmente realizadas em pombos e galinhas, onde padrões de sono semelhantes aos observados em mamíferos são descritos. Apesar de existirem estudos sobre outras espécies de aves, estes estudos são significativamente escassos considerando-se a grande quantidade de espécies vivas (Kavanau, 1997).

Estudos de imunoreatividade da serotonina em pombos (Challet *et al.*, 1996) e galinhas (Ikeda e Gotoh, 1971) revelaram que a organização do sistema serotoninérgico aviário é marcadamente similar ao sistema serotoninérgico de mamíferos, o qual vem sendo demonstrado como efetor de um importante papel na regulação do sono (Levine e Jacobs, 1992; Cespuglio, *et al.*, 1992; Data e Siwek, 1997). Poucos experimentos farmacológicos têm examinado a regulação do sono em aves (Bobbo *et al.*, 2002; Mascetti e Vallortigara, 2001; Huh *et al.*, 1978); entretanto, seus resultados indicam que o sistema serotoninérgico está envolvido nessa regulação.

Em galináceos, uma seqüência de comportamentos estereotipados é frequente quando as aves se preparam para o descanso. Essa seqüência se reproduz em condições laboratoriais, com facilidade, mediante adaptação dos animais às condições de confinamento, alimentação e iluminação, denominada aclimatação.

Alguns desses comportamentos têm a participação do sistema serotoninérgico, como por exemplo, o bocejo (Argiolas e Melis, 1998). O bocejo tem sido descrito desde a antiguidade. Hipócrates descreveu o bocejo como uma exaustão de gases antes da febre. A medicina moderna não deu muita atenção ao bocejo até os anos oitenta, com avanços na neurofarmacologia (Daquin *et al.*, 2001).

Bocejar é um fenômeno facilmente observado e quantificável. Assim, o conhecimento de transmissores e mecanismos envolvidos com o bocejo permite uma investigação sobre drogas mais eficientes que possam modificar o bocejo e as patologias nas quais o bocejo é anormal (Greco *et al.*, 1993).

O bocejo é um evento fisiológico estereotipado, relacionado ao sono que ocorre com elevada freqüência em humanos e animais (Hadidian, 1980). Pode ser observado não somente em mamíferos, mas também em aves e em espécies de répteis. Isso sugere que o bocejo é um vestígio ancestral que sobreviveu ao longo da evolução e que ocorre quando a atenção é baixa e o despertar/estar alerta precisa ser aumentado (Kavanau, 1997; Matsumoto *et al.*, 1989; Greco *et al.*, 1993; Heusner, 1946).

Esse comportamento é caracterizado por uma abertura da boca seguida, por longa inspiração, curta expiração e fechamento da boca; se parece com os reflexos clássicos, porque uma vez iniciado o padrão motor específico, o bocejo se completa com o mínimo de influência de “feed back” sensorial. Contudo, o bocejo não é somente um reflexo de curta duração, mas tem uma complexa organização espaço-temporal com componentes faciais, respiratórios e outros. Suas funções fisiológicas são desconhecidas, apesar de estímulos fisiológicos internos poderem evocar bocejos espontâneos; sabe-se que a troca de O₂-CO₂ fica aumentada no pulmão e que normaliza a pressão interna do ouvido, no alongamento facial, como foi sugerido por Heusner, em 1946.

Em humanos, este comportamento estereotipado pode ser facilmente deflagrado no instante em que se vê uma pessoa bocejando (o bocejo é “contagioso”), ou simplesmente por ler sobre este ou pensar acerca deste, ou por estar envolvido em tarefas entediantes. Sua maior ocorrência é ao se ir para cama ou no despertar e em outros momentos e situações cansativas do dia (Schino e Aureli, 1989; Lal *et al.*, 1987). O bocejo também poderá ser observado em outras circunstâncias, por exemplo, antes de comer, em presença de náusea, cínese, tumores cerebrais ou lesões, hemorragias e encefalite, ou após manipulações neurofarmacológicas severas (Greco *et al.*, 1993).

O bocejo está sob o controle de vários neurotransmissores e neuropeptídeos em nível central (Tabelas 6 e 7). Destes, os mais conhecidos são a adrenocorticotropina (ACTH), α -hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) e peptídeos relacionados, acetilcolina, dopamina, 5-HT, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO), ocitocina, GABA e peptídios opióides (Argiolas *et al.*, 2000; Melis, *et al.*, 1989; 1996; Doger *et al.*, 1989).

Tabela 6: Efeitos de neurotransmissores de mamíferos que influenciam o bocejo agindo em nível central

Neurotransmissores que influenciam o bocejo				
Neurotransmissor	Efeito sobre o bocejo	Receptor envolvido	Área cerebral envolvida	Sistemas neurais envolvidos
Dopamina	Facilitatório	D2	PVN, CN, Se	Incertohipotalâmico, nigrostriatal
Serotonina	Facilitatório	5-HT _{2C}	Não conhecidas	Não conhecidos
	Inibitório	5-HT _{1A}	Não conhecidas	Não conhecidos
	Inibitório	5-HT ₂	Não conhecidas	Não conhecidos
Acetilcolina	Facilitatório	M1, M2	HI, outras	Septo hipocampal
Aminoácidos excitatórios	Facilitatório	NMDA	PVN	Não conhecidos
Óxido nítrico	Facilitatório	n.a.	PVN	Ocitocinérgico
GABA	Inibitório	GABA-B	Não conhecidas	Não conhecidos
Noradrenalina	Facilitatório	α	Não conhecidas	Não conhecidos
	Inibitório	β	Não conhecidas	Não conhecidos

PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; HI: hipocampo; CN: núcleo caudado; Se: septum.

Modificado de: Argiolas e Melis, 1998.

Tabela 7: Efeitos de neuropeptídeos que influenciam o bocejo agindo em nível central

Neuropeptídeos que influenciam o bocejo			
Neuropeptídeo	Efeito sobre o bocejo	Receptor envolvido	Área cerebral envolvida
ACTH/MSH peptídeos	Facilitatório	n.a.	HY
Peptídeos opióides	Inibitório	II	PVN, outros
Ocitocina	Facilitatório	Tipo uterino	PVN, HI, MO, ponte
Neurotensina	Inibitório	n.a.	n.a.
LH-RH	Inibitório	n.a.	n.a.
Prolactina	Facilitatório	n.a.	CN

ACTH-MSH: hormônios estimulantes do córtex da adrenal e do melanócito; LH-RH: hormônio de liberação das gonadotrofinas; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; HI: hipocampo; HY: hipotálamo, CN: núcleo caudado; MO: medula oblonga. Modificado de: Argiolas e Melis, 1998.

Evidências experimentais recentes mostram que o bocejo e a ereção peniana também podem ser induzidos em ratos machos por fármacos que modificam a transmissão da 5-HT, em especial, agonistas do receptor 5-HT_{1C} (Stancampiano *et al.*, 1994).

Além disso, também foi mostrado que m-clorofenilpiperazina (mCPP), um metabólito do trazodone, age em ambos os receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} (Gleeson *et al.*, 1992), induzindo bocejo. Entretanto, no decorrer de estudos sobre S 14506, um agonista 5-HT_{1A} altamente potente, foi observado inibição do bocejo induzido por apomorfina (Protais, *et al.*, 1995).

A quipazina foi originalmente descrita por agir como um agonista serotoninérgico em várias preparações de músculo liso; entretanto, também pode agir como um antagonista da 5-HT em certas preparações de gânglios e de músculo liso (Trulson *et al.*, 1982).

A quipazina vem sendo descrita como tendo múltiplos efeitos no sistema serotoninérgico central, incluindo uma estimulação direta nos receptores 5-HT_{3/2A/2C} (Valencia-Flores *et al.*, 1990), inibição da recaptação de 5-HT e inibição da MAO, bem como diminuição na síntese e “turnover” da 5-HT. Estes últimos efeitos são considerados secundários a uma ação primária de aumento na atividade funcional no sistema serotoninérgico central por ativação direta do receptor.(Trulson *et al.*, 1982).

Interessantemente, a serotonina vem sendo implicada na mediação de todos esses processos comportamentais. O interesse em conduzir esse estudo foi baseado na importante participação em mecanismos do sono atribuída a 5-HT por muitos pesquisadores (Jouvet, 1999; Fuchs *et al.*, 2006; Oswald, 1968).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais usados e procedimentos experimentais

Foram usadas codornas machos (*Coturnix japonica*) pesando 130-175g, (três a quatro meses de idade). As aves foram mantidas em gaiolas individuais sob controle do ciclo claro:escuro (luz acesa às sete horas e luz apagada às 19 horas) e foi oferecido água e ração *ad libitum*.

Três séries de estudos foram feitas. Primeiramente, foi administrado 5-HT nas doses zero, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, *sc* (N = 9 para cada grupo). Numa segunda série de estudos, salina isotônica (0.1 mL/100 g) ou antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C}, LY53857 e 5-HT_{2A/2C}, quetanserina (3 mg.kg^{-1} , *sc*, para ambas as drogas) foram administrados 30 minutos antes da salina ou 5-HT (500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, *sc*) (N = 7 para cada grupo). Em uma terceira condição, salina ou o antagonista serotoninérgico, quetanserina (3 mg.kg^{-1} , *sc*) foram administrados 30 minutos antes do agonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C}, quipazina (5 mg.kg^{-1} , *sc*). Os grupos salina+salina, salina+quipazina e quetanserina+quipazina foram constituídos por sete, dez e sete aves, respectivamente.

SÉRIES DE ESTUDOS:

1ª série: N = 9 para cada grupo

Grupo 1: 5-HT na dose zero $\mu\text{g.kg}^{-1}$, <i>sc</i>		30 minutos	
Grupo 2: 5-HT na dose 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, <i>sc</i>		30 minutos	
Grupo 3: 5-HT na dose 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, <i>sc</i>		30 minutos	
Grupo 4: 5-HT na dose 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, <i>sc</i>		30 minutos	

2ª série: N = 7 para cada grupo

Grupo 1: salina isotônica (0.1 mL/100 g), <i>sc</i>		30 minutos	
+ salina isotônica (0.1 mL/100 g), <i>sc</i>		30 minutos	

Grupo 2: salina isotônica (0.1 mL/100 g), <i>sc</i>		30 minutos	
+ 5-HT (500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, <i>sc</i>)		30 minutos	

Grupo 3: antagonista do receptor 5-HT _{2C} , LY53857, (3 mg.kg^{-1} <i>sc</i>)		30 minutos	
+ 5-HT (500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, <i>sc</i>)		30 minutos	

Grupo 4:

antagonista do receptor 5-HT_{2A/2C}, quetanserina (3 mg.kg⁻¹, sc) |————— 30 minutos ———|
+ 5-HT (500 µg.kg⁻¹, sc) |————— 30 minutos ———|

3ª série

Grupo 1: N = 10

salina isotônica (0.1 mL/100 g), sc |————— 30 minutos ———|
+ agonista 5-HT_{3/2A/2C}, quipazina (5 mg.kg⁻¹, sc) |————— 30 minutos ———|

Grupo 2: N = 7

quetanserina (3 mg.kg⁻¹, sc) |————— 30 minutos ———|
+ quipazina (5 mg.kg⁻¹, sc) |————— 30 minutos ———|

Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: serotonina (3-[aminoetil]-5-hidroxiindol, sulfato de creatinina complexo), quipazina (2-[piperazin]-quinolina, maleato sal), quetanserina (3[2-{4-[4-fluorobenzoil]-1-piperidinil} etil]-2,4[1H.3H]-quinazolinediona, tartarato sal) provenientes da Sigma, St. Louis, U.S.A. e Ly53857 (6-metil-1-[1-methylethil]-ergolina-carboxílico ácido), adquirido da Eli Lilly Company, Indianapolis, U.S.A.

Análises comportamentais

Foram feitas observações comportamentais durante 30 minutos imediatamente após a administração de 5-HT ou quipazina. As seguintes respostas comportamentais foram observadas: eriçamento das penas, movimentos orais rápidos, agachamento, piscadelas e fechamento dos olhos. Essas reações são típicas da fase de sonolência e elas precedem o período de comportamentos “sleep-like” no qual as aves permanecem com os olhos fechados.

Análises estatísticas

Dados das frequências de eriçamento das penas, movimentos orais rápidos e piscadelas foram analisados por ANOVA “one-way” e Neuman-Keuls como pós-teste. O teste T-Student não pareado foi usado para comparar as médias entre dois grupos de comportamentos. As análises foram feitas com o “software” Graph Pad Prism (versão 4, Inc., San Diego, USA). Os dados foram considerados significantes quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

A 5-HT injetada sistemicamente estimulou o desenvolvimento de um estado hipnogênico. Primeiramente, as aves mostraram movimentos orais rápidos alternados por eriçamento e tremores das asas, seguidos por episódios de piscadelas e fechamento dos olhos. A fase de movimentos orais rápidos foi precedida por um curto período de “gaping”, uma característica padrão do bocejo. Durante a fase de estado semelhante ao sono, as aves persistentemente ficaram paradas por períodos de dois a 20 minutos.

Com uma dose de 250 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, as aves apresentaram eriçamento, “gaping”, movimentos orais rápidos, piscadelas e raramente elas pararam ou dormiram. Com a dose de 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, as aves aumentaram a frequência de eriçamento, movimentos orais rápidos, piscadelas e 50% delas pararam continuamente com pálpebras fechadas por dois a oito minutos. Na dose de 1,000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, as aves expressaram todos os estágios de preparação para o sono, mas em uma frequência menor que das aves tratadas com doses menores. Entretanto, 100% delas dormiram antes e persistiram com olhos fechados por um período de cinco a 20 minutos.

O tratamento com o antagonista 5-HT_{2C}, LY53857, 3 mg.kg^{-1} , reduziu, significativamente, as frequências de eriçamento e movimentos orais rápidos induzidas pela 5-HT, 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ($p < 0.05$) mas, sem afetar os episódios de piscadelas e fechamento dos olhos (Figura I.2). Nessa condição, os curtos episódios de “gaping” que foram expressos antes dos movimentos orais rápidos foram abolidos. Por outro lado, o antagonista 5-HT_{2A/2C}, quetanserina, 3 mg.kg^{-1} , foi inefetivo para todos os parâmetros analisados (Figura I.3).

O tratamento com o agonista 5-HT_{3/2A/2C}, quipazina, 5 mg.kg^{-1} , induziu hipomotilidade em todas as aves durante 15 a 28 minutos com latência de 0,5-3 minutos. Um estado semelhante ao sono foi manifestado durante o período de observação, no qual as aves permaneceram com seus bicos abertos por um longo tempo. Episódios de movimentos cloacais e fechamento dos olhos foram frequentes durante as observações. Similarmente a 5-HT, a quipazina causou um aumento nas frequências de eriçamento, movimentos orais rápidos e piscadelas (Figura I.4).

O tratamento prévio com quetanserina reduziu as frequências dos movimentos orais rápidos e dos eriçamentos significativamente, mas foi inefetivo para a resposta de piscadelas ($P < 0.05$) (Figura I.4). Além disso, a quetanserina suprimiu a resposta de “gaping” e não modificou a hipomotilidade e os movimentos cloacais.

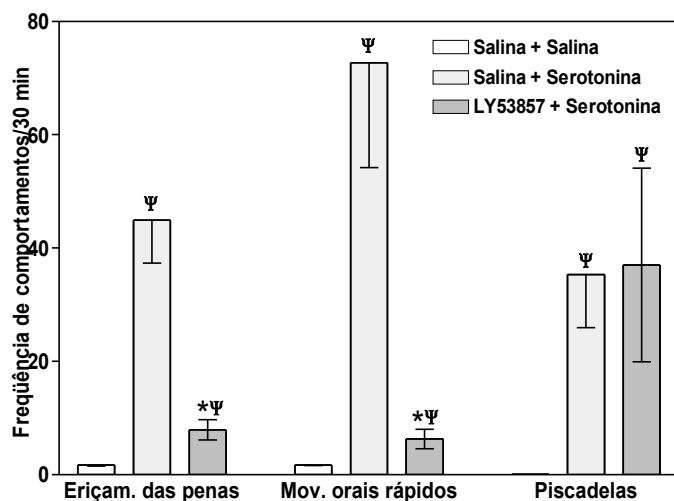


Figura I.2: Frequência de comportamentos associados à reações “sleep-like” induzidos por 5-HT e após tratamento prévio com antagonista 5-HT_{2C}, LY53858 em codornas. Resultados expressos em média ± erro padrão. *p<0,05 comparados com o grupo salina+5-HT.

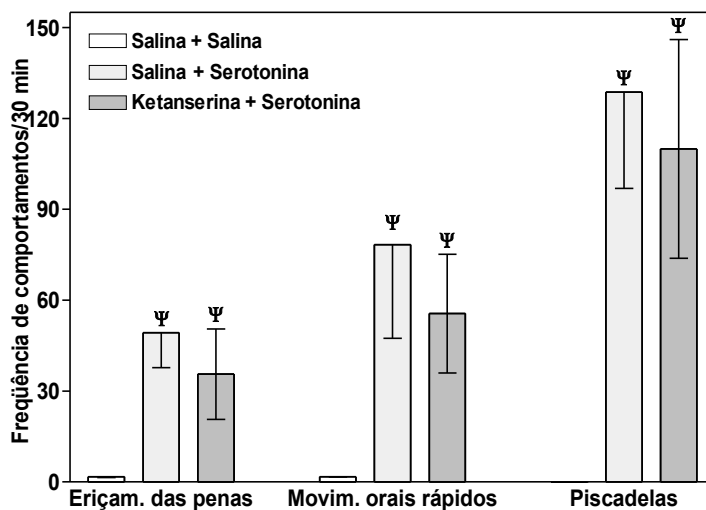


Figura I.3: Frequência de comportamentos associados à reações “sleep-like” induzidos por 5-HT e após tratamento prévio com antagonista 5-HT_{2A/2C}, ketanserina. Resultados expressos em média ± erro padrão. *p<0,05 comparados com o grupo salina+5-HT.

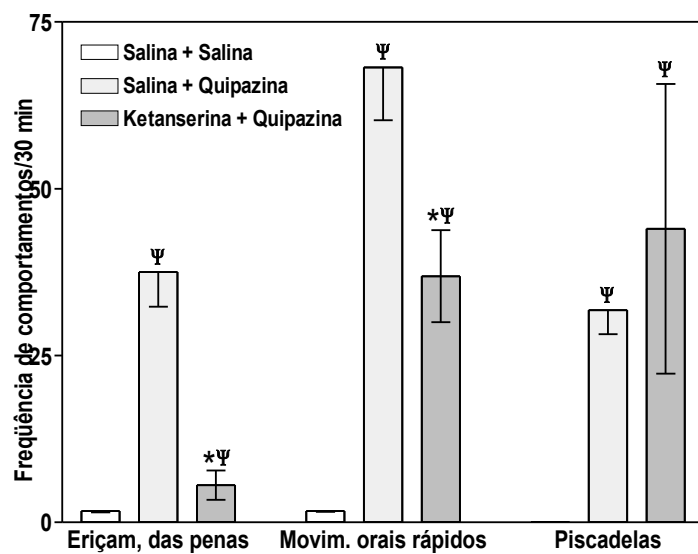


Figura 1.4: Frequência de comportamentos associados à reações “sleep-like” induzidos por agonista 5-HT_{2A/2C}, quipazina e após tratamento com antagonista 5-HT_{2A/2C}, ketanserina. Resultados expressos em média ± erro padrão. *p<0,05 comparados com o grupo salina+5-HT.

A tabela 8 relaciona a incidência de outros padrões de comportamentos apresentados durante o estado “sleep-like” induzidos pela 5-HT e quipazina comparativamente às suas combinações com antagonistas.

Tabela 8: Incidência de outros padrões de comportamentos apresentados durante o estado “sleep-like” induzidos pela 5-HT e quipazina e suas combinações com antagonistas.

Tratamentos	Comportamentos					
	Bocejo	Movimento cloacal	Hipomotilidade	Bicar	Hipotonia do pescoço	Fechamento dos olhos
Salina + Salina	-	-	-	+++	-	-
Salina + 5-HT	++	++	++++	+	-	+++++
LY53857 + 5-HT	-	-	+++	+	-	+++++
Quetanserin a + 5-HT	-	-	+++	++	-	+++++
Salina + Quipazina	+++++	+++	+++++	-	++	++++
Quetanserin a + Quipazina	-	+++	+++++	+	-	++++

DISCUSSÃO

Vem sendo evidenciado que aminas, particularmente a 5-HT, permeiam pobremente a BHE em mamíferos (Cooper et al., 1996). Ao contrário, cérebros de mamíferos devem desenvolver mecanismos de defesa contra a excessiva concentração de 5-HT extracelular (Wu et al., 1998; Schmitt et al., 2003). Em estudo prévio foi demonstrado pela primeira vez que a 5-HT administrada perifericamente permeia a BHE em codornas (Reis et al., 2005).

No presente estudo, evidências comportamentais e neurofarmacológicas dessa resposta foram investigadas. A seqüência de comportamentos mostrada pelas codornas foi caracterizada por reações hipnogênicas típicas dos galináceos (Ayala-Guerrero et al., 2003). Os episódios de sonolência apresentaram latência menor que dois minutos. Aspectos dessa seqüência durante o sono natural foram descritos em perus (Ayala-Guerrero et al., 2003). Entretanto, esses autores se interessaram nas análises eletrofisiológicas do sono, não abordando o tempo de curso dos eventos comportamentais e autonômicos.

Somente um estudo investigou a permeabilidade da BHE à 5-HT no gênero dos galináceos, Hanig et al., 1970. Nesse trabalho, injeções parenterais com altas doses de 5-HT (8 mg.kg⁻¹) causaram um aumento no seu conteúdo no tronco encefálico de galinhas neonatas. O aumento da permeabilidade da BHE à 5-HT foi correlacionado com sua conversão a ácido 5-hidroxiindol acético no tronco encefálico e respostas “roosting”. O “roosting” é um comportamento característico, que é expresso durante a alternância entre sono e vigília, entretanto, outros comportamentos não foram relatados.

Nesse estudo, a administração prévia do antagonista 5-HT_{2C}, LY53857, reduziu a frequência de episódios de eriçamento das penas e movimentos orais rápidos, entretanto, ele não interferiu nas respostas de piscadelas e fechamento dos olhos.

Em mamíferos, o bocejo é um dos estágios preparatórios para o sono (Daquin et al., 2001). Essa reação possui um componente serotoninérgico, bloqueado por antagonista 5-HT_{2C} em ratos (Stancampiano et al., 1994; Protais et al., 1995; Argiolas and Melis, 1998; Beale and Murpree, 2000; Daquin et al., 2001). Movimentos orais rápidos e “gaping” foram observados em todas as aves antes do estado “sleep-like”, similarmente ao bocejo em mamíferos. O comportamento semelhante ao bocejo (“yawning-like”) induzido pela quipazina foi completamente bloqueado pelo antagonista 5-HT_{2A}, quetanserina. Essas observações são similares aquelas relatadas em gatos (Trulson et al., 1982). Esses autores descreveram uma supressão da resposta de “gaping” evocada pela quipazina após pré tratamento com o antagonista 5-HT_{2A}, metisergida e cinanserina.

Movimentos orais rápidos foram considerados como expressões dependentes da ativação de receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{2A}. De fato, essa resposta representa um componente associado ao comportamento “yawning-like” induzido por 5-HT e quipazina. Os movimentos orais rápidos são acompanhados por atividade motora sincronizada da cloaca durante o estágio preparatório para o sono. Esses comportamentos se alternam com “gaping”, conseqüentemente, ambos são componentes do bocejo. Movimentos orais rápidos induzidos por 5-HT foram novamente suprimidos pelo LY53857, enquanto aqueles evocados por quipazina foram somente atenuados pela quetanserina. A esse respeito, deve-se considerar que a quetanserina liga-se preferencialmente ao 5-HT_{2A} em comparação aos receptores 5-HT_{2C} (López-Giménez et al., 2001; Glennon et al., 2002).

Outras reações comportamentais evocadas pela 5-HT, ou seja, eriçamento das penas, piscadelas e fechamento dos olhos possivelmente requerem a ativação de receptores 5-HT_{2C}. Entretanto, a participação de receptores 5-HT_{2A} não teve sucesso porque administração prévia de quetanserina não alterou qualquer resposta induzida pela 5-HT.

A longa duração da ação central da 5-HT pode representar uma dificuldade no transporte e “clearance” metabólica da indolamina em codornas. Futuras investigações precisam examinar essa questão. Talvez exista, em codornas, uma deficiência no transporte extraneural de 5-HT ao aumento da sua concentração cerebral. Evidências recentes mostraram um aumento na permeabilidade da BHE à 5-HT em ratos anestesiados. Nessa condição, infusão intravenosa de 5-HT diminui a amplitude do eletroencefalograma que é prevenida pelo agonista 5-HT₂, ciproheptadina. Esse efeito parece ser dado pela sua habilidade de penetrar no cérebro por induzir um curto período de quebra na BHE, possivelmente via receptores 5-HT₂. (Black, 1995; Winkler et al., 1995) No presente estudo, a administração de antagonistas 5-HT_{2C} reduziu a frequência de algumas respostas induzidas por via parenteral enquanto tratamento com antagonistas 5-HT_{2A} foram sem efeito. Isso pode significar que esses antagonistas não afetam a permeabilidade da BHE à 5-HT. Conseqüentemente, postulou-se que antagonistas 5-HT_{2C} inibem os efeitos da 5-HT por bloquearem os receptores localizados dentro da BHE.

Devido à clara influência da 5-HT circulante (após administração sistêmica) na indução de um estado “sleep-like” em codornas, seu mecanismo funcional precisa ser elucidado. O objetivo do presente trabalho não foi analisar os padrões do sono em codornas nem estabelecer correlação filogenética com comportamentos do sono de mamíferos. Conseqüentemente, futuros estudos precisam investigar as propriedades fisiológicas do sono em codornas. Adicionalmente, serão necessários estudos para elucidar as ações serotoninérgicas naturais concernentes à ativação de mecanismos autonômicos e somáticos para iniciação e estimulação do sono em codornas, ou seja, eriçamento das penas, piscadelas e fechamento dos olhos.

CONCLUSÃO

Receptores 5-HT_{2C} e 5-HT_{2A}, em codornas, preservam características semelhantes aos de mamíferos, uma vez que a serotonina e quipazina tiveram suas respostas bloqueadas por LY53857 e quetanserina.

CAPÍTULO II

Níveis Plasmáticos Noturnos de Melatonina em Codornas (*Coturnix japonica*) Injetadas com L-5-hidroxi-triptofano

RESUMO

Este trabalho objetivou demonstrar a influência da administração sistêmica de L-5-hidroxi-triptofano (L-HTP) sobre os níveis plasmáticos de melatonina durante o período noturno em codornas. Ao longo do período claro, os níveis plasmáticos de melatonina não diferiram significativamente, oscilando entre $110,2 \pm 15,8$ pg.mL⁻¹ e $157,4 \pm 34,8$ pg.mL⁻¹, de 8 às 16 horas. L-HTP (25 mg.kg⁻¹, via intracelomática), administrado às 18 horas atenuou significativamente a elevação noturna dos níveis plasmáticos de melatonina (controles, $327,3 \pm 20,1$ e $315,8 \pm 20,9$ pg.mL⁻¹ vs. $242,1 \pm 24,8$ e $217,5 \pm 21$ pg.mL⁻¹, respectivamente, às 20 e 24 horas, $P < 0,05$). Os resultados obtidos mostraram que a administração de L-HTP reduziu a liberação noturna de melatonina, possivelmente por suscitar um aumento da síntese e liberação sináptica de serotonina na pineal. Portanto, a transmissão serotoninérgica da rafe para a pineal constituiria um mecanismo de modulação da síntese e/ou liberação de melatonina em codornas.

Palavras-chave: melatonina, L-5-hidroxi-triptofano, *Coturnix japonica*.

ABSTRACT

This study aimed to demonstrate the influence of the systemic administration of l-5-hydroxytryptophan (L-HTP) on the plasma levels of melatonin during the dark period in quails. Throughout daylight, the plasma levels of melatonin did not differ significantly, oscillating between $110,2 \pm 15,8 \text{ pg.mL}^{-1}$ and $157,4 \pm 34,8 \text{ pg.mL}^{-1}$, from 8 to 16 hours. L-HTP (25 mg.kg^{-1} , through the intracelomic route) administered at 8 hours lessened significantly the nocturnal increase of the plasma levels of melatonin (controls, $327,3 \pm 20,1$ e $315,8 \pm 20,9 \text{ pg.mL}^{-1}$ vs. $242,1 \pm 24,8$ e $217,5 \pm 21 \text{ pg.mL}^{-1}$, respectively, at 20 and 24 hours, $P < 0.05$). The results obtained showed that the administration of L-HTP reduced the nocturnal melatonin release, possibly by bringing about an increase in serotonin synthesis and synaptic release in the pineal. Therefore, the serotonergic transmission from the raphe towards the pineal would constitute a mechanism of modulation of the synthesis and melatonin release in quails.

Keywords: melatonin, L-5-hydroxy-tryptophan, *Coturnix japonica*.

INTRODUÇÃO

A melatonina é uma indolamina neuro-hormonal sintetizada pela glândula pineal, localizada na rafe diencefálica (Hadley, 1996). A síntese da melatonina é dependente do ritmo da liberação de norepinefrina por neurônios pós-ganglionares projetados do gânglio cervical superior. A estimulação noradrenérgica dos pinealócitos é feita por uma excitação retiniana por ausência de luz, conseqüentemente, a glândula pineal é considerada um transdutor foto-neuroendócrino.

A síntese da melatonina é iniciada através do seu precursor, L-triptofano (L-TRP), após sua captação pelos pinealócitos. O L-TRP é convertido em L-5-hidroxi-triptofano (L-HTP) pela enzima L-triptofano hidroxilase (TPO). A enzima L-5-hidroxi-triptofano descarboxilase (L-HTPD) age no L-HTP, produzindo 5-HT, que é convertida a N-acetil-serotonina, catalizada pela N-acetil-transferase (NAT) cuja atividade é muito aumentada durante o ciclo noturno. A N-acetil-serotonina é O-metilada pela hidroxindol-O-metoxitriptamina (HIOMT) para produzir a N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) (Hadley, 1996; Foulkes *et al.*, 1997; Natesan *et al.*, 2002)

Nesse estudo, foi investigada a influência da administração sistêmica de L-HTP nos níveis plasmáticos de melatonina durante o período noturno. Esse modelo experimental é amplamente usado para avaliar a produção cerebral de serotonina e o aumento subsequente da transmissão serotoninérgica (Fernstrom, 1983; Badauê-Passos *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2005). A TPO é considerada uma enzima controladora da velocidade da síntese de serotonina em neurônios serotoninérgicos (Tyce, 1990; Boadle-Biber, 1993). A administração de precursores da serotonina (e então levando à síntese de melatonina) tem dado margem a resultados controversos: alguns autores encontram aumento, e outros diminuição, da melatonina sistêmica ou glandular (Namboodiri *et al.*, 1983; Sugden *et al.*, 1985; Cavallo *et al.*, 1987; Reiter *et al.*, 1990; McIntyre and Oxenkrug, 1999; Nathan *et al.*, 1998; Steardo *et al.*, 2000; Huether *et al.*, 1993). Entretanto, esses modelos não foram empregados em aves para avaliar o efeito dos precursores serotoninérgicos na síntese de melatonina.

REVISÃO DE LITERATURA

Há muita especulação sobre o papel da glândula pineal humana e seu hormônio melatonina na saúde e na doença (Pontes *et al.*, 2006; Cós *et al.*, 1998; Reiter, 1992, 1998; Reiter *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 1997; Karasek e Winczyk, 2006; Hardeland e Poeggeler, 2003). Muitos autores têm relacionado essa glândula com funções pituitária-hipotalâmicas e com desordens afetivas (Karasek e Winczyk, 2006; Cavallo *et al.*, 1987).

A melatonina é sintetizada do L-triptofano, que é convertido sequencialmente para 5-hidroxitriptofano (L-HTP), 5-HT, *N*-acetil serotonina, e, finalmente, melatonina. A conversão de 5-HTP para serotonina é dependente da L-aminoácido descarboxilase (L-HTPD), uma enzima que não é considerada limitadora da via. A síntese de melatonina a partir da serotonina é dependente da *N*-acetil transferase (NAT), uma enzima que parece ser um fator limitante da síntese de melatonina (Karasek e Winczyk, 2006; Cavallo *et al.*, 1987).

Em mamíferos, a glândula pineal produz e libera melatonina em um ritmo circadiano, com os maiores níveis ocorrendo durante a noite (Zhdanova, 2005; Karasek e Winczyk, 2006). Um oscilador central localizado no núcleo supraquiasmático hipotalâmico direciona a elevação noturna da liberação de norepinefrina (NE) de terminações nervosas simpáticas projetadas do gânglio cervical superior para a glândula (Karasek e Winczyk, 2006). Durante a fase escura, o aumento da liberação de NE leva, via estimulação de β 1-adrenoceptores, a um aumento dos níveis intracelulares de cAMP, que por sua vez ativam a *N*-acetiltransferase (NAT), a enzima limitadora da via, controlando a síntese de melatonina (Karasek e Winczyk, 2006). Além disso, a estimulação do α 1-adrenoceptor, que ativa a via do fosfoinositol e aumenta a concentração intracelular de cálcio, é conhecidamente envolvida na potencialização dos efeitos estimulatórios do β 1-adrenoceptor (Nathan *et al.*, 1998; Steardo *et al.*, 2000).

Até o presente momento, há crescentes evidências sugerindo que, adicionalmente a modulação noradrenérgica, a função da pineal está sobre um controle mais complexo, pois relatos têm revelado que múltiplos receptores para aminoácidos, peptídeos, e aminas biogênicas, além da NE, estão localizados nos pinealócitos de mamíferos (Steardo *et al.*, 2000).

Até agora, não se conhece completamente o papel desses receptores. Contudo, como se encontram em significantes concentrações na pineal de ratos, sugere-se a hipótese que eles podem estar envolvidos na regulação fisiológica de eventos celulares que incluem a síntese de melatonina. Por isso, sua significância funcional está correntemente sob extensiva pesquisa. Há algumas sugestões que, na glândula pineal, a 5-HT age não somente como um precursor da melatonina, mas também tem um papel na modulação da atividade bio sintética da pineal (Steardo *et al.*, 2000).

Nathan e colaboradores, em 1998 investigaram se aumentos agudos nas concentrações de 5-HT poderiam ser usados para manipular a melatonina noturna e diurna. Ao encontrarem influência do sub tipo de receptores 5-HT_{1A} na mediação das concentrações de melatonina noturna, sugeriram uma possível função serotoninérgica acoplada aos β 1-adrenoceptores na glândula pineal.

Sítios de ligação 5-HT₂ também foram identificados na glândula pineal de mamíferos levando a idéia de que esses receptores podem ter um papel potencial na regulação da síntese de melatonina. Com relação a isso, era de se esperar que estudos prévios tenham descrito que concentrações de 5-HT na pineal, as mais altas no cérebro, levavam a flutuações circadianas, que eram paralelas a seus níveis extracelulares e foi demonstrado que a 5-HT é

secretada da glândula em resposta a estimulação noradrenérgica. Além disso, os achados que a 5-HT adicionada à pinealócitos de rato em cultura primária amplificou a ativação da NAT induzida por estimulação de β 1-adrenoceptores, falhando, por outro lado, no aumento da atividade enzimática basal, tem provido suporte adicional para se assumir que a 5-HT extracelular pineal pode estar envolvida como um dos fatores fisiológicos moduladores da síntese de melatonina, possivelmente através da ativação de sítios específicos de receptores (Steardo *et al.*, 2000).

Em ovelhas, a disponibilidade do substrato parece ser o fator limitante na síntese de melatonina durante o dia (Namboodiri *et al.*, 1983). Essa hipótese foi baseada no aumento marcado e sustentado (mais do que sete vezes em cerca de 2 horas) nas concentrações de melatonina séricas observado após administração de 5-HTP em ovelhas durante o dia. Esse resultado também sugere que a administração de 5-HTP pode ser usada como base para testes clínicos da função pineal e que a melatonina pode mediar alguns dos efeitos clínicos do 5-HTP (Cavallo *et al.*, 1987).

No passado, a síntese de neurotransmissores cerebrais geralmente era considerada como um fenômeno firmemente controlado. Nem sempre é assim. Pelo menos para um dos transmissores, 5-HT, o controle da taxa de síntese não parece envolver apreciável fim de produção ou inibição de “feedback”. Ao invés disso, a enzima regulatória chave é insaturada com o seu substrato, L-HTP, de modo que a síntese de 5-HT varia prontamente com as alterações do fornecimento de seu precursor (Evans *et al.*, 2002; Fernstrom, 1983; Lenzinger *et al.*, 1999; Tohyama *et al.*, 2001).

Estudos mostram que esta relação precursor-produto permanece fisiologicamente assim como farmacologicamente e patofisiologicamente. Acredita-se que os incrementos na síntese de 5-HT produzidos por mudanças nas funções fisiológicas são parcialmente controladas por neurônios 5-HT no cérebro (sugerindo melhorias na liberação de 5-HT assim como a síntese) (Fernstrom, 1983).

Dadas as variações no fornecimento de triptofano influenciarem a formação e a liberação de 5-HT, a pergunta é até que ponto, ou se em nenhum, esta relação é empregada pelo cérebro como um canal para fornecer informações para regular os processos fisiológicos. As hipóteses oferecidas são baseadas em dados limitados. Esta discussão inclui a possibilidade de que neurônios 5-HT participam de circuitos cerebrais que influenciam fenômenos metabólicos diversos, inclusive a síntese de melatonina na pineal (Huether *et al.*, 1992, 1993; Fernstrom, 1983).

Como a síntese de 5-HT pode ser tão prontamente influenciada pelo fornecimento de seu precursor, subsequentes investigações foram tentadas para determinar se a taxa de síntese de outros transmissores também era afetada pela disponibilidade do precursor. Surpreendentemente, efeitos limitados sobre a taxa de formação de catecolaminas foram encontrados após a administração de tirosina (Fernstrom, 1983).

Aparentemente, a disponibilidade da tirosina deve ser incluída no grupo de fatores que governam a taxa de síntese de catecolaminas. Contudo, está menos claro para tirosina do que para L-HTP o quanto variações fisiológicas na disponibilidade do cérebro participam nos sistemas regulatórios controlando as funções do corpo (Evans *et al.*, 2002; Huether *et al.*, 1992; Fernstrom, 1983; Lenzinger *et al.*, 1999).

Tanto o L-HTP quanto a tirosina ganham acesso ao cérebro através de um carreador competitivo que eles dividem com outros aminoácidos neurais grandes (LNAA). Estudos fisiológicos, farmacológicos e patofisiológicos iluminam a extraordinária extensão a qual esta captação pelo carreador, localizada na barreira hematoencefálica, determina o acesso de ambos estes aminoácidos no cérebro. Nestes processo, as taxas de síntese das monoaminas são claramente afetadas. Assim, esta linha de investigação fornece, talvez, um dos mais importantes argumentos de que o sistema de transporte competitivo para LNAA

por si só é naturalmente influenciado por eventos bioquímicos dentro do cérebro (Fernstrom, 1983).

Para se verificar o impacto que uma alteração na disponibilidade de 5-HT citossólica causaria na formação da melatonina, Huether *et al.*, (1993) estudaram os efeitos de precursores da 5-HT, liberadores e inibidores da recaptação de 5-HT e inibidores da monoamina oxidase (MAO), sozinhos e em combinação. A administração de 5-HTP e de drogas liberadoras de 5-HT (fenfluramina, \pm 3,4-metileno-dióxi-metanfetamina) a ratos, causaram uma elevação dose e tempo-dependente nos níveis de melatonina circulante durante o dia e a noite. A inibição da MAO também produziu aumento na melatonina. O aumento da melatonina plasmática causado por drogas liberadoras de 5-HT foi prevenido por administração prévia de fluoxetina. Inibidores da MAO e fluoxetina, sozinhos, não tiveram efeitos sobre os níveis de melatonina circulante (Huether *et al.*, 1993).

Esses achados indicam que a administração de agonistas de receptores 5-HT, agindo indiretamente no aumento do “pool” de 5-HT livre citoplasmática podem também elevar os níveis de melatonina circulantes. Os resultados desse estudo sugerem que a síntese de melatonina na pineal é dependente do “pool” livre citoplasmático de 5-HT nos pinealócitos e que a elevação desse “pool”, induzida por drogas, estimulam a formação de melatonina e aumenta os níveis de melatonina circulantes (Huether *et al.*, 1993).

Pelo menos alguns dos efeitos da ação indireta de agonistas de receptores 5-HT, isto é, sono, humor, ingestão alimentar, percepção da dor e secreção neuroendócrina, podem, dessa forma, ser mediados pela elevação da melatonina circulante e a subsequente ativação dos receptores centrais de melatonina (Huether *et al.*, 1993).

Na glândula pineal de ratos, a atividade NAT e a concentração de melatonina são, normalmente, altas à noite; pelo contrário, a concentração de serotonina (5-HT), precursora da melatonina, é baixa. Uma vez que, a administração de L-HTP aumenta a concentração de 5-HT pineal à noite, Reiter e colaboradores, em 1990, examinaram seus efeitos na produção de melatonina.

Nesse estudo, o L-HTP, administrado durante à noite, levou a aumentos substanciais no 5-HTP pineal, no ácido 5-hidróxindol acético (5-HIAA) e 5-HT, mas a uma significativa redução na atividade da NAT em comparação aos controles injetados com salina. Em contraste com outros “indols” mensurados, os níveis de melatonina também foram, significativamente, diminuídos pela administração de L-HTP. A administração de L-HTP não alterou os níveis noturnos altos de norepinefrina (Reiter *et al.*, 1990).

A idéia de que altas concentrações de 5-HT podem levar a uma substrato-inibição da atividade da NAT não foi suportada pelas análises cinéticas de controle dos níveis de NAT versus atividade da NAT (inibida pelo triptofano), sobre concentrações variadas de substrato. A hipótese para explicar esses resultados inclui a possibilidade de que a inibição da síntese de melatonina pelo triptofano é mediada pela liberação de 5-HT dos pinealócitos e sua subsequente ação autócrina sobre a produção de melatonina (Reiter *et al.*, 1990).

Em outro estudo, McIntyre e Oxenkrug, em 1991, descreveram os efeitos da administração de 5-HTP sobre a síntese de melatonina pela pineal em ratos jovens e velhos. O 5-HTP, por si só, aumentou os níveis de melatonina pineal em ratos idosos, mas não mudou as concentrações de melatonina em ratos jovens mantidos sob condições de 12hs/12hs de luz/escuro.

Após uma continua exposição à luz por 72hs, o 5-HTP induziu um aumento significativo nos níveis de melatonina em animais jovens, mas não provocou alterações na melatonina de animais velhos (McIntyre e Oxenkrug, 1991).

Por estes resultados, consideraram uma alterada regulação de β -receptores pela luz em animais velhos, e sugeriram que a síntese de melatonina diminui em função da idade,

não estando inteiramente relacionada com mudanças na máquina enzimática para a sua síntese (Mcintyre e Oxenkrug, 1991).

Fatores de transcrição também modulam os níveis oscilatórios de melatonina de forma auto regulatória além de controlarem a amplitude das oscilações de NAT, a enzima cuja taxa é limitante da síntese de melatonina. Em contraste, pinealócitos de galinhas possuem um marcapasso circadiano endógeno que direciona a expressão rítmica da NAT. (Foulkes *et al.*,1997).

Além disso, projeções neuronais do sistema da rafe mesencefálica para o núcleo supraquiasmático e para o complexo pineal foram mapeadas no ramister dourado, sustentando as indicações fisiológicas de uma influência da serotonina no sistema circadiano fotorreceptivo do encéfalo (Leander *et al.*,1998).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram usadas codornas macho pesando 145-175g, mantidas sob condições laboratoriais e sob controle fotoperiódico (luz acesa às 7 horas, luz apagada às 19 horas). Duas séries de experimentos de cinco grupos de oito aves cada foram constituídos para determinação dos níveis plasmáticos de melatonina às oito, 12, 16, 20 e 24 horas.

Procedimentos experimentais

Na primeira série de cinco grupos, L-5-hidróxi-triptofano (L-HTP, 25 mg.kg⁻¹, por via intra celômica, ic) foi administrado às 18 horas. Uma segunda série de cinco grupos foi tratada com salina isotônica (1mL.kg⁻¹, ic) na mesma forma. Foram coletadas amostras de sangue heparinizadas (2mL) da veia cervical, após decapitação das aves. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm para separação do plasma. A coleta de amostras de sangue durante o período noturno foi feita sob iluminação infravermelha.

SÉRIES DE ESTUDOS:

1ª série: N = 8 para cada grupo

		2mL de sangue da veia cervical
Grupo 1: L-HTP, 25 mg.kg ⁻¹ , ic às 18 h	●●→	às oito horas
Grupo 2: L-HTP, 25 mg.kg ⁻¹ , ic às 18 h	●●→	às 12 horas
Grupo 3: L-HTP, 25 mg.kg ⁻¹ , ic às 18 h	●●→	às 16 horas
Grupo 4: L-HTP, 25 mg.kg ⁻¹ , ic às 18 h	●●→	às 20 horas
Grupo 5: L-HTP, 25 mg.kg ⁻¹ , ic às 18 h	●●→	às 24 horas

2ª série: N = 8 para cada grupo

		2mL de sangue da veia cervical
Grupo 1: salina isotônica (1mL.kg ⁻¹ , ic) às 18 h	●●→	às oito horas
Grupo 2: salina isotônica (1mL.kg ⁻¹ , ic) às 18 h	●●→	às 12 horas
Grupo 3: salina isotônica (1mL.kg ⁻¹ , ic) às 18 h	●●→	às 16 horas
Grupo 4: salina isotônica (1mL.kg ⁻¹ , ic) às 18 h	●●→	às 20 horas
Grupo 5: salina isotônica (1mL.kg ⁻¹ , ic) às 18 h	●●→	às 24 horas

Determinação dos níveis plasmáticos de melatonina

A determinação dos níveis plasmáticos de melatonina foi feita por radio imuno ensaio direto (para maiores detalhes, ver Stokkan et al., 1991). Brevemente, 250 µL de amostra

ou padrão foram usados (nas concentrações de 2 pg.mL⁻¹ a 1000 pg.mL⁻¹) combinados com 100mL de anticorpo (diluição inicial de 1:9000; Batch G/S/704-8483, Stockgrand Ltd. Guilford, UK) e 100μL de ³[H]-melatonina (TRK 789, Amersham, aproximadamente 2000 cpm/tubo). Os resultados foram expressos em pg.mL⁻¹.

Análises estatísticas

As análises estatísticas das médias foram feitas usando ANOVA. Para comparações entre as médias obtidas em 20 e 24 horas dos grupos tratados com salina vs. grupos tratados com L-HTP, foi usado teste T-Student pareado. As análises foram feitas com o “software” Graph Pad Prism (versão 4, Inc., San Diego, USA). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Os níveis plasmáticos de melatonina durante o dia (tempo pré-injeção) não foram diferentes entre as duas séries experimentais (controles, $110,2 \pm 15,8$; $110,5 \pm 18,9$ e $157,4 \pm 34,8$ pg.mL^{-1} vs. L-HTP, $119,5 \pm 20,4$; $132,1 \pm 21,3$ e $138,2 \pm 23,1$ pg.mL^{-1} , às 8, 12 e 16 horas, respectivamente). Ao contrário, após tratamento com L-HTP, foi observada uma significativa redução nos níveis de melatonina plasmática noturna (controles, $327,3 \pm 20,1$ e $315,6 \pm 20,9$ pg.mL^{-1} , vs. L-HTP, $242,1 \pm 24,8$ e $217,5 \pm 21$ mg.mL^{-1} , às 20 e 24 horas, respectivamente, $P < 0,05$) (Figura II.1)

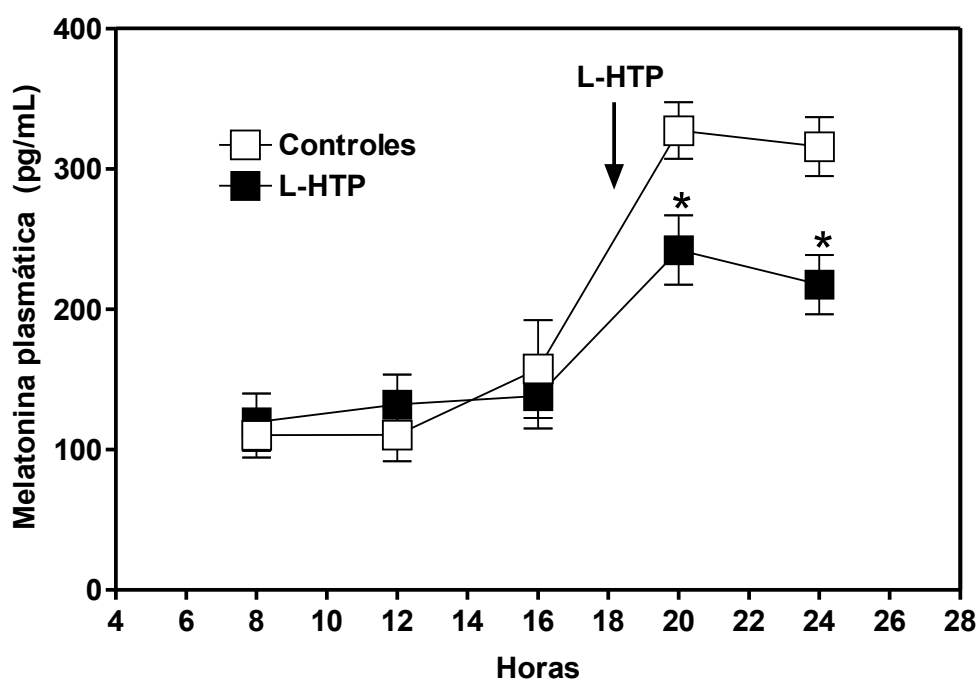


Figura II.1: Níveis plasmáticos de melatonina em codornas tratadas com L-HTP (25mg.Kg^{-1} , ic, às 18 horas). Dados apresentados como médias \pm SEM às 8, 12, 16, 20 e 24 horas. * $p < 0,05$ para diferenças entre as médias dos controles vs. tratados com L-HTP, às 20 e 24 horas.

DISCUSSÃO

Nas nossas observações, a administração sistêmica de L-HTP reduziu, significativamente, os níveis plasmáticos de melatonina durante o período noturno. O L-HTP disponível após a ação da TPO e o aumento na concentração do produto (5-HT) não dá margem para o “feedback” negativo ser tão eficiente quanto o operado por catecolaminas na tirosina hidroxilase (Tyce, 1990; Boadle-Biber, 1993).

Observações similares às nossas, foram feitas por Reiter et al. (1990), que notaram um aumento no conteúdo glandular de L-HTP, 5-HT e 5-HIAA após sobrecarga noturna de L-TRP em ratos. Os autores atribuíram essa observação à ação autócrina da 5-HT (derivada de um aumento de disponibilidade do precursor) que atuou no pinealócito, inibindo a síntese de melatonina. Alternativamente, em lugar da ação autócrina, o mecanismo originado pela 5-HT pode ser feito pelos neurônios serotoninérgicos da rafe mesencefálica (Matsuura e Sano, 1983; Leander et al., 1998). Conseqüentemente, a serotonina sintetizada pela administração de L-HTP e liberada nas sinapses da pineal pode ser a mediadora para as respostas descritas por Reiter et al., 1990.

Os resultados alcançados nesse estudo revelaram diferentes dados comparativamente a outros reportados na literatura. A administração sistêmica de L-TRP ou liberador de serotonina aumentam os níveis plasmáticos de melatonina durante as 24 horas do dia e períodos noturnos em ratos (Huether et al., 1993). Os autores imputaram o aumento da síntese de melatonina ao aumento do pool de serotonina livre no citoplasma do pinealócito. Além disso, a administração de L-HTP após contínua exposição à luz por 72 horas, aumenta a síntese de melatonina em ratos jovens (McIntyre e Oxenkrug, 1991). Nesse sentido, a administração de L-HTP (20 ou 200 mg.kg⁻¹, ip) em ovinos, durante o período claro, induz um aumento do conteúdo glandular e níveis plasmáticos de melatonina (Namboodiri et al., 1983; Sugden et al., 1985). Esses resultados sugerem o uso desse modelo como base para testes clínicos para investigar a função da pineal. Entretanto, atentos nesse sentido, o modelo em humanos não teve sucesso (Cavallo et al., 1987). É preciso enfatizar que nesse estudo, os autores usaram a via oral e menores doses de L-HTP (5 a 12 mg.kg⁻¹, ip). Por outro lado, Steardo et al. (2000) evidenciaram um aumento na atividade da NAT e do conteúdo glandular de melatonina durante o período noturno em ratos tratados com agonistas 5-HT_{2C} e portanto, sugeriram que esses receptores estão, provavelmente, envolvidos na modulação serotoninérgica da atividade pineal.

CONCLUSÃO

Caso essa hipótese esteja correta, ou seja, a administração sistêmica de L-HTP reduz, significativamente, os níveis plasmáticos de melatonina durante o período noturno, o rendimento serotoninérgico liberado da rafe mesencefálica para a pineal pode constituir um mecanismo de modulação noturna da atividade da NAT e, conseqüentemente, da síntese de melatonina, em codornas.

CAPÍTULO III

**Estudo dos Receptores GABA_A em Comportamentos Semelhantes ao Sono
em *Coturnix japonica* (Temminck Schlegel, 1849) (Aves: Galliformes)**

RESUMO

O presente estudo preocupou-se em investigar a influência do GABA na sinalização de comportamentos semelhantes ao sono (“sleep-like”) através da administração sistêmica de bicuculina e picrotoxina (antagonistas de receptores GABA_A) e tiopental (um modulador alostérico). A injeção de tiopental (20 mg.kg⁻¹) aumentou a frequência de fechamento dos olhos comparada ao grupo controle. As aves dormiram rapidamente com uma baixa frequência dos estágios comportamentais iniciais, como movimentos orais rápidos (MOR), eriçamento das penas e piscadelas. A administração de bicuculina (1 e 4 mg.kg⁻¹) não modificou a frequência das respostas de eriçamento das penas, MOR, fechamento dos olhos ou piscadelas. Uma baixa dose de picrotoxina (2 mg.kg⁻¹) estimulou um estado de vigília ativa, enquanto uma dose intermediária (4 mg.kg⁻¹) desenvolveu um estado de vigília moderada, que foi associado a um aumento na frequência de MOR, piscadelas e fechamento dos olhos. Sob uma dose maior (8 mg.kg⁻¹), as aves exibiram comportamentos semelhantes a termorregulação e convulsões, imediatamente após à injeção. Interessantemente, a picrotoxina (4 mg.kg⁻¹) intensificou o fechamento dos olhos quando dada em combinação com o tiopental (20 mg.kg⁻¹). As respostas “sleep-like” induzidas pelo barbiturato e pela picrotoxina tiveram as mesmas propriedades neurofarmacológicas comportamentais, possivelmente porque estão correlacionadas com ações em sítios idênticos no receptor GABA_A.

Palavras-chave: Comportamento “sleep-like”; antagonista GABAérgico; codornas

ABSTRACT

The present study was carried out to investigate the influence of GABA_A signaling on sleep-like behaviors through systemic administration of bicuculline and picrotoxin (GABA_A antagonists) and thiopental (an allosterical modulator). A thiopental (20 mg.kg⁻¹) injection increased the eye closure frequency compared to the control group. The birds quickly became sleepy with a low frequency of early behavioral stages, such as rapid oral movement (ROM), feather ruffling and blinking. A bicuculline administration (1 and 4 mg.kg⁻¹) did not modify the frequency of feather ruffling, ROM, eye closure or blinking responses. A lower dose of picrotoxin (2 mg.kg⁻¹) stimulated an active awakening status, while an intermediate dose (4 mg.kg⁻¹) elicited a moderate awakening status, which was associated with an increase in the frequency of ROM, blinking and eye closure. At the higher dose (8 mg.kg⁻¹), the birds exhibited thermoregulatory-like behaviors and convulsions immediately after the injection. Interestingly, picrotoxin (4 mg.kg⁻¹) intensified the eye closures when given in combination with thiopental (20 mg.kg⁻¹). Both barbiturate and picrotoxin induced sleep-like responses have the same behavioral neuropharmacological properties, conceivably because they are correlated with action at an identical site on the GABA_A receptor.

Keywords: Sleep-like behavior; GABAergic antagonist; quails

INTRODUÇÃO

Dormir é um comportamento regulado homeostaticamente, altamente complexo e tem alguns componentes que ainda não são completamente compreendidos (Taheri e Mignot, 2002; Rattenborg *et al.*, 2008). Um papel fisiológico para o sono vem sendo amplamente estabelecido através de estudos que mostram que animais que são completamente privados de dormir apresentam distúrbios fisiológicos severos (Rechtschaffen and Bergmann, 2002). Além disso, de acordo com Taheri e Mignot (2002), a conservação desse comportamento no curso da evolução indica que o sono é um comportamento adaptativo.

O sono, em vertebrados, exhibe padrões comportamentais e eletrofisiológicos de acordo com a complexidade evolucionária adquirida pelo encéfalo (Ayala-Guerrero *et al.*, 2003; Campbell e Tobler, 1984). O bocejo é um componente comportamental que é associado ao sono e é altamente preservado em vertebrados, particularmente, a aparência mandibular (Lehmann, 1979; Argiolas e Melis, 1998). O seu papel não é compreendido ainda; entretanto, este fenômeno semi-voluntário parece constituir um comportamento ativador quando o sono está iminente (Daquin *et al.*, 2001).

Apesar de numerosos estudos classificarem o sono como um mecanismo reparador para o metabolismo cerebral ou manutenção da memória, seu preciso papel fisiológico permanece não esclarecido (Taheri e Mignot, 2002; Cirelli e Tononi, 2008). De um ponto de vista neuroquímico, o ácido γ -amino butírico (GABA) representa o maior neurotransmissor inibitório no cérebro (Gottesmann, 2002; Sanford *et al.*, 2002). Takagi *et al.* (2001; 2003) demonstraram em *Gallus domesticus* que injeções intra cérebro ventriculares de agonistas de receptores GABA_A ou GABA_B atenuaram a ingestão alimentar e comportamentos “sleep-like” induzidos pelo ácido L-pipecólico, um liberador de GABA produzido no cérebro através da conversão da L-lisina. Nesse contexto, achados paralelos concordam que mecanismos GABAérgicos através do receptor GABA_A estimulam a alimentação em *Meleagris gallopavo* e *Gallus domesticus* (Denbow, 1991; Jonaidi *et al.*, 2002).

O GABA age através de dois diferentes receptores farmacologicamente identificados: o receptor GABA_A, que é sensível à bicuculina, e o receptor GABA_B, que é insensível à bicuculina (MacDonald e Twyman, 1992; Bormann 2000; Jonaidi *et al.*, 2002; Glykys e Mody, 2007).

O complexo receptor GABA_A é localizado, principalmente, em sítios pós-sinápticos, onde ele medeia a maioria das transmissões inibitórias (Adachi *et al.*, 2006). Ele contém um canal para íons cloreto (cuja permeabilidade é ativada pelo GABA) e sítios de reconhecimento para barbituratos, benzodiazepínicos, neuroesteróides e picrotoxina (Gottesmann, 2002).

Há algumas diferenças entre receptores GABAérgicos de mamíferos e aves. Em mamíferos, a ativação farmacológica GABAérgica produz efeitos hipnagênicos distintos; em aves, entretanto, eles não são definidos em detalhes, especialmente, os componentes iniciais do sono (Gottesmann, 2002; Takagi *et al.*, 2003; Polo *et al.*, 2007). O neurotransmissor GABA e receptores GABAérgicos vêm sendo identificados no cérebro de galinhas (Van Luijtelar *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 2000).

Nesse estudo, foi pesquisado o envolvimento de receptores GABA_A em comportamentos “sleep-like”, particularmente, seus componentes preliminares, em codornas. Foram utilizados, através da administração sistêmica, bicuculina e picrotoxina (antagonistas GABA_A) e tiopental sódico, um típico barbiturato (modulador alostérico).

REVISÃO DE LITERATURA

Existem muitos estudos acerca da duração do sono ou do descanso em mais de 150 espécies (relatos de duração de sono num período de 24 horas). Contudo, o entendimento da evolução do sono por estes estudos denota inadequações quanto ao tamanho das amostras, condições experimentais não específicas e algumas vezes critérios vagos para a definição do sono (Campbell e Tobler, 1984).

Do ponto de vista eletrofisiológico, vegetativo e comportamental, o sono nos mamíferos, é caracterizado por alteração cíclica de duas diferentes fases. O sono começa com atividade generalizada de ondas eletroencefalográficas (EEG) lentas através de todo o cérebro (fase telencefálica ou de SWS); ela é seguida pela fase do sono rombencefálico ou paradoxal (REM), caracterizada por atividade teta regular no hipocampo e dessincronização do corticograma, aparecendo depois de um período transitório de ondas corticais (Radil-Weiss e Stýblová, 1967).

Na espécie humana, assim como em outros mamíferos, é conhecido que durante o período de sono, o SWS diminui enquanto o REM e a sonolência tendem a aumentar. Além disso, durante o sono de animais ativos tanto de noite quanto de dia, ondas delta mais largas são notadas, geralmente, no começo em comparação com as horas finais do período de sono. Essa decrescente atividade delta é equivalente ao SWS, mais profundo nas primeiras horas de sono e mais suave no final. A redução da atividade delta ou derivações desse parâmetro através da noite têm um papel crucial nos modelos correntes e teorias sobre a regulação do sono (Van Luitelaar *et al.*, 1987).

Aves e mamíferos têm sono REM semelhantes em vários aspectos. Entretanto, a questão sobre em que ponto o sono REM tem um ancestral evolucionário em aves e mamíferos vem sendo bastante explorada (Campbell e Tobler, 1984; Van Luitelaar *et al.*, 1987).

As regiões cerebrais e sistemas neurotransmissores envolvidos na geração do sono REM de mamíferos são, filogeneticamente, antigas e são também encontradas atualmente em pássaros e répteis (Fuchs, *et al.*, 2006).

Muitos experimentos farmacológicos em aves indicam que substratos neurais similares estão envolvidos na regulação do sono de aves e mamíferos. Entretanto, uma vez que as drogas usadas nesses estudos, geralmente, resultam em perdas de sono não específicas, a regulação neuroquímica do sono REM nas aves, em particular, permanece incerta (Fuchs, *et al.*, 2006).

Estudos indicam que a 5-HT pode ter uma função similar no controle do sono REM de aves e mamíferos. Para investigar o possível papel da serotonina na regulação do sono REM das aves, foram registradas alterações no eletroencefalograma (EEG) do sono e no comportamento de pombos após a administração de uma dose aguda de zimelidina, um inibidor seletivo da recaptação (SSRI) de 5-HT (Fuchs, *et al.*, 2006).

A zimelidina é conhecida por reduzir o sono REM em mamíferos. Os resultados demonstraram que os efeitos da zimelidina no sono REM das aves são comparáveis àqueles observados em mamíferos (Fuchs, *et al.*, 2006).

Um estudo eletrofisiológico e comportamental foi realizado em galinhas com eletrodos para EEG e eletromiograma (EMG) (Van Luitelaar *et al.*, 1987). Foram observadas cinco posturas comportamentais e determinadas as porcentagens de sonolência, sono e presumivelmente, sono REM durante a terceira e sexta hora do período escuro.

Foi encontrada concordância substancial entre os comportamentos e as fases do sono, com exceção da postura agachada ou erguida com pelo menos um olho aberto. Durante dois terços dessa postura comportamental, o EEG mostrou ondas lentas de larga amplitude indistinguíveis do SWS. Também foram observadas as características do sono REM: períodos pequenos, com porcentagem aumentada durante a noite. Além disso, não foi encontrada atonia no EMG (Van Lujtelaar *et al.*, 1987).

Apesar da grande similaridade existente, também foram encontradas diferenças em algumas propriedades do sono de aves que o tornam único e que são um convite para futuros estudos (Van Lujtelaar *et al.*, 1987).

A contribuição de componentes genéticos para patologias de distúrbios do sono está em crescente reconhecimento. Estudos genéticos têm identificado genes que podem ser importantes na regulação dos ritmos circadianos, que determinam o tempo de sono e vigília (Taheiri e Mignot, 2002).

Estudos genéticos de narcolepsia em um modelo canino e em camundongos “knock-out” levaram à identificação de um sistema neurotransmissor de hipocretina (orexina) hipotalâmico como uma chave de ligação para a narcolepsia humana. A contribuição dos fatores genéticos na síndrome da apnéia obstrutiva do sono (OSAS) tem levado a um melhor entendimento dessa desordem complexa que pode ser parte de uma síndrome maior associada à disfunção respiratória, cardiovascular e metabólica (Taheiri e Mignot, 2002).

A insônia é uma das reclamações mais encontradas num consultório médico. Apesar de estar mais relacionada à ansiedade, comumente reflete uma falha/ausência de processos inibitórios centrais. Bubnoff e Heidenhain, em 1881, parecem ter sido os primeiros a descrever tais processos inibitórios centrais. Eles mostraram que estímulos corticais e periféricos de baixa intensidade eram capazes de inibir as atividades motoras induzidas por estimulação cortical (Gottesman, 2002).

Para comportamentos dormir-acordar, foi Hess, em 1931 que primeiro disse que dormir envolvia processos inibitórios: “o essencial mecanismo de sono não pode ser explicado senão por inibição ativa de algumas funções do organismo.” Apesar de Creutzfeldt *et al.*, (1956), terem observado um verdadeiro fenômeno inibitório em nível celular cortical, foi Evarts *et al.* (1960) que estudaram a recuperação do ciclo dos potenciais evocados no córtex por estimulação, via radiação, e demonstraram os mecanismos inibitórios durante o comportamento de dormir-acordar.

Do ponto de vista neuroquímico, desde o trabalho pioneiro de Kernjevic *et al.*, em 1966, foi descoberto que o GABA é o principal transmissor inibitório, e hoje em dia, estima-se que pelo menos 20% dos neurônios cerebrais são GABAérgicos (Parades e Agmo, 1992).

O receptor pentamérico ionotrópico GABA_A foi o primeiro a ser identificado, com várias classes de subunidades. A influência do GABA sobre o seu próprio sítio de ligação tem sido mais estudada pelo seu antagonista bicuculina (BCC) e seu agonista muscimol (Sieghart, 1995; Gottesmann, 2002).

O GABA é essencial para o balanço geral entre a excitação neuronal e sua inibição, através da interação com receptores específicos de membrana. Receptores GABA_A, principalmente localizados pós-sinapses, medeiam a maior parte da transmissão sináptica inibitória no SNC (Adachi *et al.*, 2006).

O segundo receptor identificado foi o receptor GABA_B (Hill e Bowery, 1981) que se acopla a canais iônicos para Ca²⁺ e K⁺ e funciona por um caminho metabotrópico com segundo mensageiro. A afinidade do GABA por receptores GABA_B é menor do que para receptores GABA_A. Este receptor foi primeiro bloqueado pelo faclofen e o agonista mais comumente usado é o baclofen (Gottesmann, 2002).

O terceiro receptor identificado é o GABA_C. De fato, em 1975, Johnston et al, e em 1992, Parades e Agmo, descreveram que alguns análogos do GABA atuam sobre receptores insensíveis tanto à bicuculina quanto ao baclofen. Estes receptores foram primeiramente observados na retina. Compreendem um canal para Cl⁻ ionóforo de várias subunidades (b1,b2,b3). É um receptor mais sensível ao GABA do que o receptor GABA_A e sua dessensibilização também é diferente: enquanto a amplitude das correntes mediadas por receptores GABA_A se reduzem notavelmente na presença dos agonistas, a duração (o tempo) da resposta dos receptores GABA_C é mais sustentada. Até o momento, a insônia tem sido tratada, principalmente, por compostos que atuam no nível dos receptores GABA_A (Gottesmann, 2002).

Há crescentes evidências de que a amígdala modula o estado de alerta, com a maior parte dos trabalhos focando seu papel sobre o sono REM. A maioria destas evidências advém das manipulações farmacológicas feitas diretamente no núcleo central da amígdala (NCA) (Sanford *et al.*, 2002).

Em ratos, 5-HT infundida na amígdala durante o sono REM induz uma rápida mudança de estado, enquanto que ao se antagonizar a ação da 5-HT, aumenta-se o sono total e são liberadas ondas PGO, o que ocorre tipicamente em sono REM, e não-REM (NREM) (Deboer *et al.*, 1998).

Outros neurotransmissores também têm ação sobre o sono quando relacionados ao NCA. O agonista colinérgico, carbacol, micro infundido no NCA aumenta o estado de alerta e reduz REM em ratos. Interessantemente, em gatos, micro injeções tanto de carbacol quanto de peptídeo intestinal vasoativo no NCA parecem produzir aumentos prolongados na quantidade de REM assim como a atividade das ondas PGO durante o NREM (Sanford *et al.*, 2002).

A amígdala pode influenciar também o NREM. Micro injeções de prolactina no NCA reduzem o NREM com efeitos mínimos no REM e no estado de alerta. Além disso, a destruição eletrolítica da amígdala baso lateral tem sido relatada como melhoradora do NREM e do REM.

A estimulação elétrica da amígdala pode aumentar o REM subsequente, e estimular eletricamente o NCA durante o REM melhora a ocorrência de ondas PGO em gatos e aumenta a amplitude dessas ondas em ratos. Além disso, a estimulação elétrica treinada do NCA suprime a atividade dos neurônios adrenérgicos no locus coeruleus (LC), o que pode facilitar o REM através da redução da inibição noradrenérgica (Sanford *et al.*, 2002).

A ativação espontânea da amígdala durante o sono REM tem sido relatada, usando-se tomografias com emissão de positrons para mapeamento cerebral em humanos. Evidências sugerem que a atividade no NCA poderia promover REM e seus fenômenos relacionados, uma vez que o estudo comportamental e farmacológico realizado em ratos produz alterações no estado de alerta, o que sugere uma redução específica relativa no sono REM. Estes podem ser devido aos efeitos inibitórios no NCA. No momento, a serotonina parece inibir os neurônios da amígdala e o carbacol bloquear as respostas sinápticas excitatórias na amígdala baso lateral de ratos (Sanford *et al.*, 2002).

Como o GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e ele, assim como outros neurotransmissores inibitórios, regulam a eferência descendente do NCA, sugere-se que a regulação inibitória GABAérgica do NCA pode estar envolvida no papel de modulação do estado comportamental (Sanford *et al.*, 2002).

Vem sendo descrito que a porção medial do hipotálamo pré-óptico anterior (mHPOA) é uma área hipnogênica, mais efetiva nessa regulação do que a porção lateral (Ali *et al.*, 1999). Apesar do papel das projeções adrenérgicas, colinérgicas e histaminérgicas na mHPOA no sono-vigília vir sendo investigado, o papel do GABA é desconhecido; entretanto a

liberação de GABA nessa área é alterada por aplicação de agonistas GABA_A (Ali *et al.*, 1999).

Os níveis de GABA no hipotálamo posterior e septum se alteram através dos estados sono-vigília. Recentemente, vem sendo proposto que o GABA na mHPOA, possivelmente, tem um papel modulatório na regulação do sono REM; entretanto evidências experimentais diretas foram insuficientes (Ali *et al.*, 1999).

O papel do GABA na mHPOA, na regulação do sono-vigília espontâneo e sono REM foi investigada por Ali *et al.*, em 1999. Micro injeção local de picrotoxina (PTX), antagonista GABA_A, nessa área, aumentou a sonolência quieta, mas reduziu significativamente, o sono profundo e o sono REM. Tanto a frequência de geração quanto a duração dos episódios de sono REM foram significativamente reduzidos. Baseado nesses resultados, Ali *et al.* concluíram que a neurotransmissão GABAérgica, na mHPOA, é espontaneamente ativa na modulação da função hipnagênica, incluindo o sono REM, e sua ação é mediada pelo receptor GABA_A.

No SNC de mamíferos, as sinapses GABA foram bem conhecidas por gerarem atividade inibitória rápida e precisa na forma de correntes pós sinápticas inibitórias (IPSCs ou inibição fásica). Mas, através da última década, a transmissão inibitória difusional mediada por receptores GABA_A localizados fora das sinapses e ativados por níveis de GABA presentes no espaço extracelular tem despertado grande interesse (Glykys e Mody, 2007).

Esses receptores GABA_A são ativados por baixos níveis de transmissores presentes no espaço extracelular geram uma condutância ininterrupta referida como tônica. Essa condutância tônica é altamente sensível a todos os fatores, regulando a quantidade de GABA ao redor dos neurônios. Somente poucos receptores GABA_A com combinações particulares de subunidades são bem sucedidos em mediar a condutância tônica. Esses mesmos receptores constituem alvos importantes e específicos para vários compostos neuro ativos endógenos e exógenos e possíveis alternativas terapêuticas (Glykys e Mody, 2007).

A melatonina pode exercer uma ação hipnótica direta. Alguns dados indicam que a melatonina interage com o complexo receptor GABA_A. Pesquisas *in vivo*, revelaram que a melatonina, assim como barbituratos, benzodiazepínicos hipnóticos e esteróides anestésicos, potencializam a ligação do GABA e análogos do GABA ao receptor GABA_A que ocorre mesmo em baixas concentrações. A melatonina também potencializa os efeitos do GABA na atividade neuronal cortical. Além disso, parece que a melatonina inibe a ligação de benzodiazepínicos (Langebartels *et al.*, 2001).

Os efeitos da melatonina na indução ao sono e no EEG do sono, em humanos, são reminiscentes àqueles evocados por hipnóticos benzodiazepínicos. Além disso, a melatonina facilita a descontinuidade da terapia benzodiazepínica em usuários de longo tempo (Langebartels *et al.*, 2001)..

A progesterona vem sendo citada por exercer efeitos “benzodiazepine-like” no sono, que sugere que eles são mediados por uma modulação agonística do funcionamento do receptor GABA_A. Para acessar o envolvimento dos receptores GABA_A, Lancel *et al.*, em 1999, investigaram as respostas de sono para uma dose de PTX (1.5 mg.kg⁻¹), antagonista GABA_A, e progesterona (90 mg.kg⁻¹), administradas via intra abdominal em oito ratos, sozinhas e em combinação, durante as primeiras quatro horas pós-injeção.

Comparada com o veículo, a PTX aumentou a latência para o sono NREM e conseqüentemente, diminuiu todos os estados do sono, mas afetou fracamente a atividade EEG dentro do sono NREM. A progesterona encurtou significativamente a latência para o NREM, aumentou o pré- REM, deprimiu a atividade de baixa frequência EEG (≤ 8 Hz) e aumentou a atividade EEG de alta frequência dentro do NREM. Exceto pelas alterações na atividade EEG de alta frequência, a PTX atenuou todos os efeitos da progesterona,

suportando a idéia de que receptores GABA_A desempenham um importante papel nos efeitos da progesterona no sono (Lancel *et al.*, 1999).

Em 1983, Wambebe estudou os efeitos do GABA, BCC e ácido amino-oxiacético (AOAA) sobre o sono induzido por nitrazepam em galinhas jovens. Nesse estudo, o GABA (200-3200 mg.kg⁻¹) induziu uma sedação marcada. Também potencializou o sono induzido por nitrazepam (1,6 mg.kg⁻¹). A BCC (1,25 – 5,00 mg.kg⁻¹) antagonizou o sono induzido por nitrazepam e a potencialização pelo GABA (1,6 mg.kg⁻¹) do sono induzido pelo nitrazepam. O AOAA (2,5-7,5 mg.kg⁻¹) retardou o início do sono induzido por nitrazepam, mas prolongou sua duração.

O GABA (1600 mg.kg⁻¹) sincronizou o EEG do hiperstriatum, tectum óptico e formação reticular enquanto a atividade EMG foi reduzida. Em galinhas pré-tratadas com nitrazepam (1,6 mg.kg⁻¹) induziu a dessincronização do EEG do hiperstriatum, e sincronizou o EEG da formação reticular. Além disso, reduziu a atividade EMG (Wambebe, 1983).

A BCC (5 mg/kg) ativou o EEG do hiperstriatum; este efeito foi antagonizado pelo GABA (1600 mg.kg⁻¹). Similarmente, o GABA (1600 mg.kg⁻¹) que induziu a redução na atividade EMG, sincronização do EEG do tectum óptico e da formação reticular foi antagonizado pela BCC. Com esses resultados, Wambebe sugeriu que o GABA potencializou o sono EEG e comportamental induzido por nitrazepam.

O ácido L-pipecólico (L-PA) é o principal metabólito intermediário da L-lisina (L-Lis) no cérebro de mamíferos e galinhas. Estudos neurofisiológicos anteriores sugerem uma possível relação entre o L-PA e sinapses GABAérgicas em neurônios corticais e hipocampais, por afetar o disparo neuronal através do aumento da liberação e inibição da recaptação de GABA (Takagi *et al.*, 2001).

Takagi, et al. demonstraram que L-PA injetado intracerebroventricularmente (i.c.v.), tem várias ações fisiológicas, incluindo redução da ingestão alimentar e indução de comportamentos semelhantes ao sono em galinhas neonatas. Isso pode ser resultado do aumento da ação do GABA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Codornas macho (*Coturnix japonica*) pesando entre 130 e 160g (três a quatro meses de idade) foram usadas. As aves foram alojadas em gaiolas individuais sobre ciclo 12/12 h de claro/escuro a temperatura ambiente entre 25 e 30°C, com água e ração alimentar (Purina para codornas, 16% de proteína pura) dadas *ad libitum* através do período de adaptação as condições do laboratório.

Preparação das drogas

A picrotoxina (PTX, Sigma, St Louis, USA) foi diluída em NaCl 0,9% e NaOH 0,1 N e o pH foi ajustado para 7,0 com adição de HCl 0,1 N para injeções subcutâneas (sc) (Khisti et al., 1998).

A bicuculina (BCC, Biosynth Chemistry & Biology, Staad, Switzerland) foi diluída em dimetil sulfoxido e NaCl 0,9% (1:9, v/v) para injeção sc, e o tiopental sódico (TIO, Cristália, Itapira, SP, Brasil) foi diluído em salina 0,9% para administração sc e intra celomática (ic).

Procedimentos experimentais

Quatro séries de estudos foram desenvolvidas:

1. TIO (20 mg.kg⁻¹), um agonista alostérico de receptores GABA_A, ou salina 0,9% foi administrado para avaliar os comportamentos “sleep-like” produzidos por um barbiturato (sono barbitúrico) (*N* = 6 para cada grupo).
2. BCC (1,0 e 4,0 mg.kg⁻¹, *N* = 5 e 11, respectivamente), um antagonista de receptores GABA_A, ou veículo (*N* = 11) foram injetados para acessar a influência do GABA_A no comportamento de vigília.
3. PTX (2, 4 e 8 mg.kg⁻¹, *N* = 4, 9 e 9, respectivamente), um antagonista de receptores GABA_A, ou veículo (*N* = 8) foram administrados para avaliar a influência do GABA no comportamento de vigília.
4. Veículo, BCC (4 mg.kg⁻¹) ou PTX (4 mg.kg⁻¹) foram administrados 10 min antes do TIO (20 mg.kg⁻¹) como se segue: salina mais TIO (*N* = 6), PTX mais TIO (*N* = 9) e BCC mais TIO (*N* = 11). Esse protocolo foi designado para acessar a ação alostérica dos antagonistas do receptor GABA_A, PTX e BCC e seus efeitos nas reações “sleep-like” do barbiturato.

Todas as sessões experimentais foram conduzidas entre 8:00 e 11:00 da manhã.

SÉRIES DE ESTUDOS:

1ª série: *N* = 6 para cada grupo

Grupo 1: salina (0,9%, sc)		30 minutos	
Grupo 2: TIO (20 mg.kg ⁻¹ , ic)		30 minutos	

2ª série:

Grupo 1: salina (0,9%, sc), N=11	<u>30 minutos</u>
Grupo 2: BCC (1 mg.kg ⁻¹ , sc), N=5	<u>30 minutos</u>
Grupo 3: BCC (4 mg.kg ⁻¹ , sc), N=11	<u>30 minutos</u>

3ª série:

Grupo 1: salina (0,9%, sc), N=8	<u>30 minutos</u>
Grupo 2: PTX (2 mg.kg ⁻¹ , sc), N=4	<u>30 minutos</u>
Grupo 3: PTX (4 mg.kg ⁻¹ , sc), N=9	<u>30 minutos</u>
Grupo 4: PTX (8 mg.kg ⁻¹ , sc), N=9	<u>30 minutos</u>

4ª série

Grupo 1 (N = 6): salina (0,9%, sc) + TIO (20 mg.kg ⁻¹ , ic)	<u>10 minutos</u> <u>10 minutos</u>
	<u>10 minutos</u> <u>10 minutos</u>

Grupo 2 (N = 9): PTX (4 mg.kg ⁻¹ , sc) + TIO (20 mg.kg ⁻¹ , ic)	<u>10 minutos</u> <u>10 minutos</u>
	<u>10 minutos</u> <u>10 minutos</u>

Grupo 3 (N = 11): BCC (4 mg.kg ⁻¹ , sc) + TIO (20 mg.kg ⁻¹ , ic)	<u>10 minutos</u> <u>10 minutos</u>
	<u>10 minutos</u> <u>10 minutos</u>

Acesso aos comportamentos de sono:

As observações comportamentais foram feitas durante os primeiros 20 min de administração das drogas. As análises foram feitas em sessões de 10 min (0-10 min e subsequentes 10-20 min). As seguintes respostas comportamentais foram observadas: eriçamento das penas, movimentos orais rápidos (MOR), bocejo, piscadelas e fechamento dos olhos (como relatado por Polo et al., 2007). Essas reações são típicas do estado de sonolência do começo do sono em codornas, e eles anunciam o desenvolvimento do sono.

Análises estatísticas

Os dados foram analisados por análise de variância “one-way” (ANOVA) e Bonferroni como pós-teste. O teste T-Student não pareado foi usado para comparar dois grupos. As análises foram feitas com o “software” Graph Pad Prism (versão 4, Inc., San Diego, USA). Em todas as comparações, o nível de significância foi considerado como $p < 0,05$.

RESULTADOS

A administração de TIO aumentou a frequência de fechamento dos olhos comparada ao controle com salina ($0,0 \pm 0,0$ vs. $8,2 \pm 1,9$, $p < 0,001$, em 0–10 min; Figura III.1). As aves dormiram rapidamente (em menos de 1 min), e ocorreu uma baixa frequência dos estágios comportamentais preliminares, como MOR, eriçamento das penas e piscadelas.

Nenhuma dose administrada de BCC alterou a frequência das respostas de eriçamentos, MOR, piscadelas ou fechamento dos olhos (Figura III.2).

Em baixa dose, a PTX (2 mg.kg^{-1}) provocou um estado de vigília ativa caracterizado por comportamentos como bicadas, movimentação, cabeça para fora da gaiola e esticamento contínuo do corpo e pescoço (dados não mostrados).

Uma dose intermediária de PTX (4 mg.kg^{-1}) fez com que as aves exibissem um estado de vigília moderada associado com aumento de MOR ($1,5 \pm 0,6$ vs. $7,7 \pm 1,5$, $p < 0,05$), piscadelas ($2,2 \pm 1,6$ vs. $17,7 \pm 3,5$, $p < 0,01$) e fechamento dos olhos ($0,0 \pm 0,0$ vs. $7,0 \pm 2,1$, $p < 0,05$) após 0–10 min de avaliação (Figura III.3). Respostas similares foram observadas aos 10–20 min de observação.

Com uma dose maior (8 mg.kg^{-1}), as aves apresentaram comportamentos semelhantes a termorregulação imediatamente após a injeção, como abrir o bico, taquipnéia e crises epiléticas. Aproximadamente três minutos após a injeção de PTX, as aves bateram na grade da gaiola e apresentaram um andar cambaleante seguido por intenso tremor. Convulsões foram facilmente provocadas por estímulo sonoro.

Tratamento prévio com BCC (4 mg.kg^{-1}) não modificou as respostas de eriçamento, MOR ou piscadelas seguidas à administração de TIO (Figura III.4 a–c). A BCC atenuou o fechamento dos olhos induzido pela administração do TIO aos 0–10 min ($8,2 \pm 1,0$ vs. $3,0 \pm 1,0$, $p < 0,05$).

A PTX não modificou as respostas de eriçamento, MOR ou piscadelas seguidas à administração de TIO (Figura III.4 a–c). Curiosamente, a PTX intensificou o fechamento dos olhos quando combinada com a administração de TIO aos 0–10 min ($8,2 \pm 1,0$ vs. $17,8 \pm 1,5$, $p < 0,01$) e aos 10–20 min ($2,3 \pm 1,3$ vs. $12,4 \pm 2,7$, $p < 0,01$) (Figura III.4 d).

Uma alta frequência de bocejos foi observada através das ações hipnagógicas do TIO e após a dose intermediária de PTX (dados não mostrados).

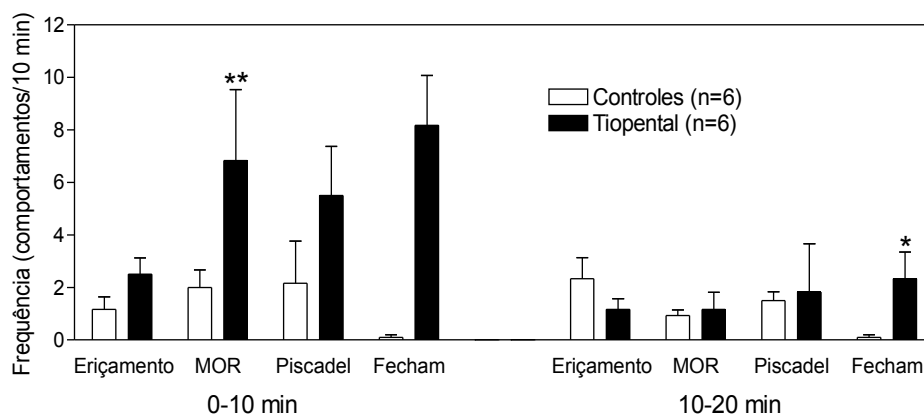


Figura III.1: Efeitos do tratamento com TIO (20 mg.kg⁻¹, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like”. Dados apresentados como média ± SEM. * $P < 0.05$ e ** $P < 0.01$ comparados ao grupo controle (teste “*t*” de Student não pareado)

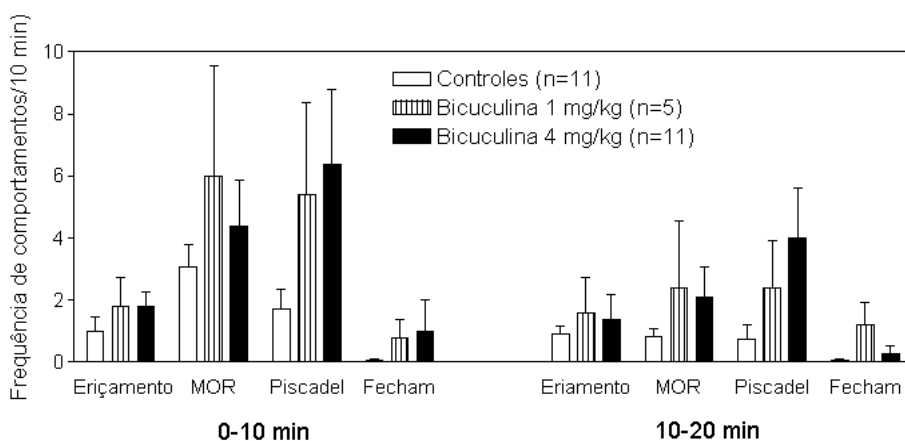


Figura III.2: Efeitos do tratamento com BCC (1 e 4 mg.kg⁻¹, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like”. Dados apresentados como média ± SEM. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos (ANOVA “one-way”)

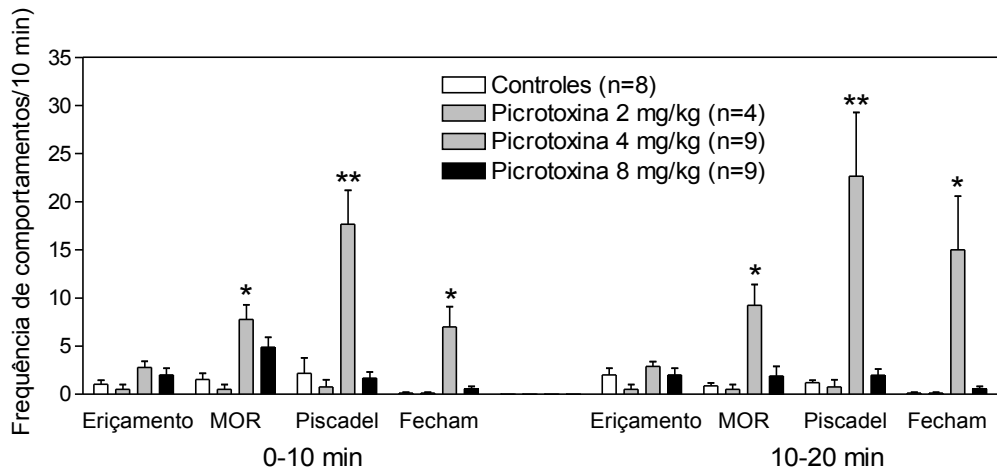


Figura III.3: Efeitos do tratamento com PTX (2, 4 e 8 mg.kg⁻¹, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like”. Dados apresentados como média ± SEM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparados ao grupo controle (ANOVA “one-way”)

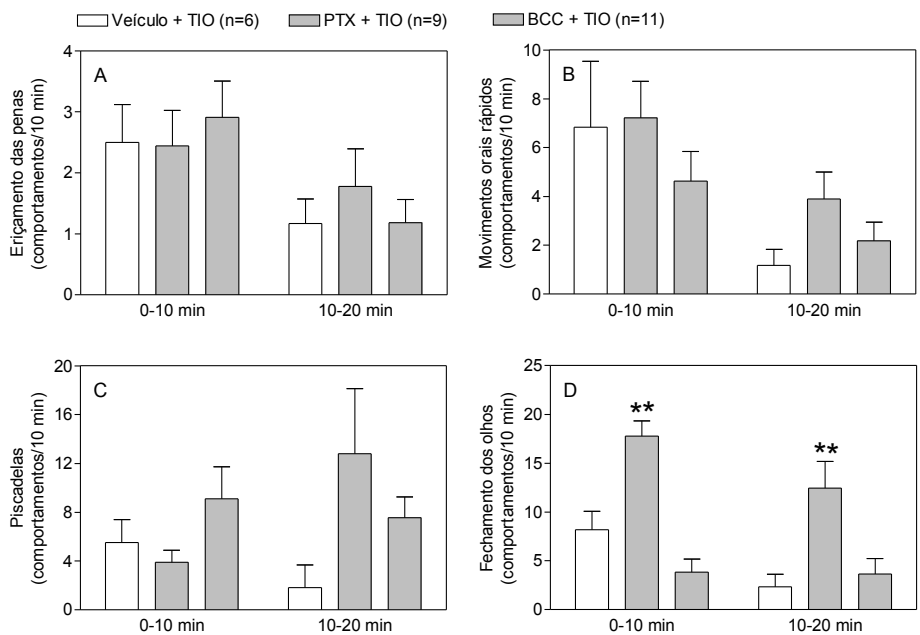


Figura III.4: Efeitos dos tratamentos com BCC (4 mg.kg⁻¹, sc) ou PTX (4 mg.kg⁻¹, sc) sobre a frequência de comportamentos “sleep-like” induzidos pelo tiopental (20 mg.kg⁻¹, ic). Dados apresentados como média ± SEM. ** $p < 0.01$ comparados ao grupo controle (ANOVA “one-way”)

DISCUSSÃO

Estudos sobre os efeitos da sinalização do GABA em comportamentos do sono em aves têm, frequentemente, envolvido o antagonista bicuculina e o agonista muscimol. A maioria dos estudos têm registrado parâmetros de eletromiografia e eletroencefalografia (Colom and Saggau, 1994; Bormann, 2000; Gottesmann, 2002). No entanto, em nosso estudo, foi estudado o papel do receptor GABA_A em comportamentos relacionados ao sono “sleep-like” pelo uso de um modulador alostérico e antagonistas em codornas.

Os efeitos de indução hipnogênica do TIO foram confirmados em codornas, semelhantes àqueles observados em mamíferos (Radil-Weiss and Stýblová, 1967; Yamamoto, 2005). Na dose utilizada, o barbiturato induziu um aumento na frequência de fechamento dos olhos com raros comportamentos preliminares associados ao sono, como aqueles provocados pela serotonina, uma amina biogênica que atravessa a barreira hematoencefálica em codornas após administração periférica (Polo *et al.*, 2007).

Durante repouso diurno, as codornas exibem alguns componentes do sono, como MOR e piscadelas, em intervalos regulares. Sonolência também vem sendo descrita em outras aves diurnas (Fuchs *et al.*, 2006; Malleau *et al.*, 2007). O tratamento com BCC não afetou significativamente esses breves episódios de estágio preliminar do sono no presente estudo. Logo, foi visto que no descanso diurno, a BCC não exerceu uma ação antagonista GABA_A intrínseca em codornas.

A BCC combinada com o tiopental, não afetou as respostas ativadas pelo barbiturato nos MOR e fechamento dos olhos. No frango doméstico, uma dose comparável de BCC antagonizou o sono induzido pelo GABA e benzodiazepínicos. Além disso, o decréscimo induzido pelo GABA na atividade eletromiográfica e sincronização na eletroencefalografia em galinhas foram antagonizados pela BCC (Wambebe, 1983).

O tratamento com PTX (um antagonista do receptor GABA_A) exibiu resultados intrigantes e paradoxais. Um efeito convulsivo foi observado com altas doses, como descrito para ratos e galinhas (Jayakumar *et al.*, 1999), enquanto uma dose intermediária produziu comportamentos “sleep-like”. Estes efeitos controversos da PTX, provavelmente, indicam que existem dois diferentes sítios de receptores GABA_A no cérebro de codornas com distintos níveis de ativação. Nesse contexto, não se pode descartar a hipótese de que a PTX age em duas diferentes áreas cerebrais ou circuitos neuronais implicados em mecanismos de controle opostos.

De acordo com os resultados do tiopental, é interessante notar que a dose utilizada (20 mg.kg⁻¹) causou efeitos hipnóticos apenas nos primeiros dez minutos, enquanto a mesma dose é anestésica para galinhas quando administrada por via intra óssea (Valverde *et al.*, 1993). Em outro galináceo, o pavão, injeção de tiopental por via intra celômica demanda uma alta dose (50 mg.kg⁻¹) para causar um efeito anestésico (Ayala-Guerrero *et al.*, 2003).

Takagi *et al.* (2003) investigaram as interações entre o ácido pipecólico (o maior metabólito intermediário da lisina que aumenta a liberação e inibe a recaptção de GABA) e a PTX em galinhas neonatas. Esses autores mostraram que o ácido pipecólico estimula o fechamento dos olhos enquanto as aves mantêm uma posição de agachamento e diminuem a frequência de abertura dos olhos em uma posição de pé (relacionadas ao sono e a vigília, respectivamente). A administração de PTX atenuou significativamente as respostas comportamentais “sleep-like”. No nosso estudo, a interação entre PTX e tiopental foi examinada por observação de outras categorias de comportamentos. Em contraste

aos resultados de Takagi et al. (2003), nós observamos que altas doses de PTX agem como um agente excitatório.

Existe uma dose limite crítica para os protocolos com PTX. Uma alta dose foi claramente excitatória, exemplificada por convulsões; essa dose convulsivante da PTX resultou em um aumento do alerta e concomitante decréscimo em todos os estados do sono (Langebartels *et al.*, 2001), em acordo com dados anteriores de Ali *et al.* (1999) e Lancel *et al.* (1999).

No nosso estudo foi mostrado, pela primeira vez, que em codornas comportamentos “sleep-like” são expressos sob ativação de receptores GABA_A. Por outro lado, não podemos descartar a probabilidade de que outros mediadores hipnogênicos sem propriedades GABAérgicas podem induzir comportamentos “sleep-like” em codornas. O tiopental induziu comportamentos “sleep-like”, semelhantes aqueles evocados por administração periférica de serotonina (Polo *et al.*, 2007). É necessário determinar como a ação do tiopental, a atividade GABAérgica e a estimulação serotoninérgica interagem e, além disso, como um bloqueio farmacológico individual influencia o efeito de uma ativação seguinte de receptores tanto serotoninérgicos como GABA_A.

Analisando os dados sobre os comportamentos, podemos hipotetizar que receptores GABA_A em codornas expressam diferentes sítios para PTX, ainda não descritos para mamíferos. As respostas “sleeping-like” induzidas tanto pelo barbiturato quanto pela PTX mostraram as mesmas propriedades neurofarmacológico-comportamentais, talvez porque elas estejam correlacionadas com ação em sítios idênticos do receptor GABA_A.

CONCLUSÕES

É possível que receptores GABA_A em codornas expressem diferentes sítios para PTX, ainda não descritos para mamíferos.

Como as respostas “sleeping-like” induzidas tanto pelo barbiturato quanto pela PTX mostraram as mesmas propriedades neurofarmacológico-comportamentais, talvez estejam correlacionadas com ação em sítios idênticos do receptor GABA_A.

CONCLUSÕES GERAIS

A 5-HT, administrada perifericamente, é capaz de permear a barreira hematoencefálica de codornas (BHE), diferentemente de mamíferos, evocando comportamentos “sleep-like”;

Antagonistas 5-HT_{2A} foram sem efeito, podendo significar que não afetam a permeabilidade da BHE à 5-HT;

Antagonistas 5-HT_{2C} podem inibir os efeitos da 5-HT, possivelmente por bloquearem os receptores localizados dentro da BHE;

A administração de L-HTP, precursor da 5-HT, não influenciou os níveis séricos de melatonina, em codornas, durante todas as fases circadianas; apenas promoveu redução nos níveis de melatonina plasmática noturna;

Os resultados indicam que L-HTP está envolvido na regulação fisiológica da biossíntese de melatonina, contribuindo para expandir o conhecimento atual sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na atividade pineal em codornas;

O rendimento serotoninérgico liberado da rafe mesencefálica para a pineal pode constituir um mecanismo de modulação noturna da atividade da NAT e, conseqüentemente, da síntese de melatonina

O receptor GABA_A está envolvido na regulação de comportamentos “sleep-like” em codornas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Futuros estudos precisam investigar as propriedades fisiológicas do sono em codornas, uma vez que esse trabalho se limitou a aspectos comportamentais e neuroquímicos.

É necessário elucidar as ações serotoninérgicas naturais concernentes a ativação de mecanismos autonômicos e somáticos para iniciação e estimulação do sono em codornas, quanto aos comportamentos eriçamento das penas, piscadelas e fechamento dos olhos.

É necessário determinar como a ação do TIO, a atividade GABAérgica e a estimulação serotoninérgica interagem e, além disso, como um bloqueio farmacológico individual influencia o efeito de uma ativação seguinte de receptores tanto serotoninérgicos como GABA_A.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADACHI, N.; TOMONAGA, N.; TACHIBANA, T.; DENBOW, D.M.; FURUSE, M. Epigallocatechin gallate attenuates acute stress responses through GABAergic system in the brain. *Eur J Pharmacol* v. 631, p.171–175, 2006.

ADELL, A.; ARTIGAS, F. Regulation of the Release of 5-hydroxytryptamine in the Median raphe nucleus of the rat by Catecholaminergic Afferents. *European Journal of Neuroscience*. v. 11, p. 2305-2311, 1999.

ALI, M.; JHA, S.K.; KAUR, S.; MALLICK, B.N. Role of GABA: a receptor in the preoptic area in the regulation of sleepwakefulness and rapid eye movement sleep. *Neurosci Res* v. 33, p. 245–250. 1999.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M.R.. The neuropharmacology of yawning. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 343, p. 1-16, 1998.

ARGIOLAS, A.; MELIS, M.R.; MURGIA, S.; SCHIÖTH, H.B. ACTH- and α -MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain Research Bulletin*. v. 51, n. 5, p. 425-431, 2000.

ARNAUD, C.; GAUTHIER, P.; GOTTESMANN, C.. Study of a GABA_C receptor antagonist on sleep-waking behavior in rats. *Psychopharmacology*, v. 154, p. 415-419, 2001.

AYALA-GUERRERO, F.; MEXICANO, G.; RAMOS, J.J. Sleep characteristics in the turkey *Meleagris gallopavo*. *Physiol. Behav.*, v. 78, p. 435-440, 2003.

AZMITIA, E. C. The CNS serotonergic system: progression toward a collaborative organization, p. 61-73. In: MELTZER, H. Y. (ed), *Psychopharmacology: Third Generation of Progress*, New York: Raven Press, 1987.

BABA, T.; BLACK, K.L.; IBEZAKI, K.; CHEN, K.; BECKER, D.P.. Intracarotid Infusion of Leukotriene C₄ selectively increases blood-brain barrier permeability after focal ischemia in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. v. 11, p. 638-643, 1991.

BADAUÊ-PASSOS JR., D.; VENTURA, R.R.; SILVA, L.F.S.; OLIVARES, E.L.; REIS, L.C. Effect of brain serotonergic stimulation on sodium appetite in euthyroid and hypothyroid rats. *Exp. Physiol.*, v. 88, p. 251-260, 2003.

BAYLÉ, J.D.; RAMADE, F.; OLIVER, J. Stereotaxic topography of the brain of the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Physiol*. v. 68, p. 219-241, 1974.

BEALE, M.D.; MURPHREE, T.M. Excessive yawning and SSRI therapy. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, v. 3, p. 275-276, 2000.

BENDOTTI, C.; SAMANIN, R. The Role of Putative 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the control of feeding in rats. *Life Science*, v. 41, n. 5, p. 635-642, 1987.

BENTLEY, G.E. Unraveling the enigma: the role of melatonin in seasonal process in birds. *Microsc. Res. Tech.*, v. 53, n. 1, p. 63-71, 2001.

BERNARD, E.A.; SKOLNICK, P.; OLSEN, R.W.; MOHLER, H.; SIEGHART, W.; BIGGIO, G.; BRAESTRUP, C.; BATESON, A.N.; LANGER, S.Z. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews*. v. 50, n. 2, p. 291-313, 1998.

BLACK, KL. Biochemical opening of the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 15, p. 37-52, 1995.

BLUNDEL, J.E. Serotonin and appetite. *Neuropharmacology*. v. 23, n. 12B, p. 1537-1551, 1984.

BOADLE-BIBER, MC. Regulation of serotonin synthesis. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, v. 60, p. 1-15, 1993.

BOBBO, D.; GALVANI, F.; MASCETTI, G.G.; VALLORTIGARA, G. Light exposure of the chick embryo influences monocular sleep. *Behavioural Brain Research*. v. 134, p. 447-466, 2002.

BOGDANSKI, D.F.; BONOMI, L.; BRODIE, B.B. Occurrence of serotonin and catecholamines in brain and peripheral organs of various vertebrate classes. *Life Sciences*. n. 1, p. 80-84, 1963.

BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, v. 21, p.:16-19, 2000.

BRIGHTMAN, M. W. Morphology of blood-brain interfaces. *Exp. Eye Res.*, v. 76, p. 87-96, 1977.

BUBNOFF, N., HEIDENHAIN, R., Ueber Erregungs-hemmungsvorgänge innerhalb der motorischen hirncentren. In: Pflüger, E.F.W. (Ed.), *Arch. Gesam. Physiol.* Bonn: Emil Strauss Verlag, 1881, p. 137-202.

BRUN, S.R.M.; LUZ, V.; FERNANDEZ, M.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Atypical angiotensin receptors may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. *Regulatory Peptides*. v. 98, p. 127-135, 2001.

CAMPBELL, S.S.; TOBLER, I. Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 8, p.269-300, 1984.

CAVALLO, A.; RICHARDS, G.E.; MEYER, W.J.; WALDROP, R.D. Evaluation of 5-hydroxytryptophan administration as a test of pineal function in humans. *Horm. Res.*, v. 27, p. 69-73, 1987.

- CESPUGLIO, R.; HOUDOUIN, F.; OULERICH, M.; EL MANSARI, M.; JOUVET, M. Axonal and somato-dendritic modalities of serotonin release: their involvement in Sleep Preparation, Triggering and Maintenance. *J Sleep Res.* vol. 1, n. 3, p. 150-156, 1992.
- CHALLET, E.; MICELI, D.; PIERRE, J.; REPÉRANT, J. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the brain of the Pigeon (*Columba livia*). *Anat Embriol.* v. 193, p. 209-227, 1996.
- CHAMAS, F.; SEROVA, L.; SABBAN, E.L. Tryptophan hydroxylase mRNA levels are elevated by repeated immobilization stress in rat raphe nuclei but not in pineal gland. *Neuroscience Letters.*, v. 267, p. 157-160, 1999.
- CHIKAZAWA, H.; FUJIOKA, T.; WATANABE, T. Catecholamine-containing neurons in the mesencephalic tegmentum of the chicken. Light, fluorescence and electron microscopic studies. *Anatomy and Embryology.*, v. 164, p. 303-313, 1982.
- CHIKAZAWA, H.; FUJIOKA, T.; WATANABE, T. Bulbar catecholaminergic neurons projecting to the thoracic spinal cord of the chicken. Evans blue labeling study in combination with catecholamine histofluorescence. *Anatomy and Embryology*, v. 167, p. 411-423, 1983.
- CHOU-GREEN, J.M.; HOLSCHER, T.D.; DALLMAN, M.F.; AKANA, S.F. Repeated stress in young and old 5-HT_{2C} receptor knockout mice. *Physiology & Behavior*, v. 79, p. 217-226, 2003.
- CIRELLI, C.; TONONI, G. Is sleep essential? *PLoS Biol.*, v.6, p.1605–1611, 2008.
- CLÉNET, F.; HASCOËT, M.; FILLION, G.; GALONS, H.; BOURIN, M. Role of GABA-ergic and serotonergic systems in the anxiolytic-like mechanism of action of a 5-HT-moduline antagonist in the mouse elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, v. 158, p. 339-348, 2005.
- COLOM, L.V.; SAGGAU, P. Spontaneous interictal-like activity originates in multiple areas of the CA2-CA3 region of hippocampal slices. *J Neurophysiol.*, v 71, p.1574–1585, 1994.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Serotonin (5-Hydroxytryptamine) and Histamine. In: BLOOM, F. E. et al. (Eds.). *The Biochemical basis of neuropharmacology*, 7th ed., New York: University Press, 1996. p. 352-409.
- CORREALE, P. The Occurrence and Distribution of 5-hydroxytryptamine (Enteramine) in the Central Nervous System of Vertebrates. *Journal of Neurochemistry.* v. 1, p. 22-31, 1956.
- COS, S.; FERNÁNDEZ, R.; GÜÉZMES, A.; SANCHES-BARCELÓ, E.J. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research.*, v. 58, p. 4383-4390, 1988.
- COZZI, B.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; ASTE, N.; PANZICA, G.C. The serotonergic system in the brain of the Japanese quail. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, v. 263, p. 271-284, 1991.

CREUTZFELDT, O.; BAUMGARTNER, G.; SCHOEN, L. Reaktionen einzelner neurons des senso-motorischen cortex nach elektrischen reizen. I hemmung und eregung nach direkten und contralateralen einzelreizen. *Arch. Psychiat. Nervenkrankh.*, v. 194, p.597-619, 1956.

CURZON, G. Serotonin and appetite: neuropharmacology of serotonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 600, p. 521-531, 1990.

CURZON, G. Effects of Tryptophan and of 5-hydroxytryptamine receptor subtype agonists on feeding. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 294, p. 377-388, 1991.

DAQUIN, G.; MICALLEF, J.; BLIN, O. Yawning. *Sleep Med. Rev.*, v. 5, p. 299-312, 2001.

DATTA, S.; SIWEK, A.D. Excitation of the brain stem pedunculo-pontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *J. Neurophysiol.*, v. 77, p. 2975-2988, 1997.

DEBOER, T.; SANFORD, L.D.; ROSS, R.J.; MORRISON, A.R. Effects of electrical stimulation in the amygdala on ponto-geniculo-occipital waves in rats. *Brain Research.*, v. 793, p. 305-310, 1998.

DENBOW, D.M. Induction of food intake by a GABAergic mechanism in the turkey. *Physiol Behav.*, v. 49, p.485-488, 1991.

DOGER, E.; UBBÁ-HOLMGREN, R.; EGUIBAR, J.R.; HOLMGREN, B. GABAergic modulation of yawning behavior. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 34, p. 237-240, 1989.

DUBÉ, L.; PARENT, A. The Monoamine-containing neurons in avian brain I. A study of the brain stem of the chicken (*Gallus domesticus*) by means of fluorescence and acetylcholinesterase histochemistry. *The Journal of Comparative Neurology.*, v. 196, p. 695-708, 1981.

DUPORT, S.; ROBERT, F.; MULLER, D.; GRAU, G.; PARISI, L.; STOPPINI, L. An *In Vitro* blood-brain barrier model: cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 1840-1845, 1998.

EVANS, L.; GOLSHAN, S.; KELSOE, J.; RAPAPORT, M.; RESOVSKY, K.; SUTTON, L.; GILLIN, J.C. Effects of rapid tryptophan depletion on sleep electroencephalogram and mood in subjects with partially remitted depression on bupropion. *Neuropsychopharmacology*, v. 27, n. 6, p. 1016-1026, 2002.

EVARTS, E.V.; FLEMING, T.C.; HUTTENLOCHER, P.R. Recovery cycle of visual cortex of the awake and sleeping cat. *Am. J. Physiol.*, v. 199, n. 2, p. 373-376, 1960.

FERNSTROM, J.D. Role of precursor availability in control of monamine biosynthesis in brain. *Pharmacol. Rev.*, v. 63, p. 484-546, 1983.

FIGENSPAN, A.; WÄSSLE, H.; BORMANN, J. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature*, v. 361, p. 159-162, 1993.

FINNIMORE, A.J.; ROEBUCK, M.; SAJKOV, D.; MCEVOY, R.D. The Effects of the GABA agonist, baclofen, on sleep and breathing. *European Respiratory Journal*, v. 8, p. 230-234, 1995.

FOULKES, N.S.; WHITMORE, D.; SASSONE-CORSI, P. Rhythm transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Biol. Cell*, v. 89, p. 487-494, 1997.

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

FUCHS, T.; SIEGEL, J.J.; BURGDORF, J.; BINGMAN, V.P. A selective serotonin reuptake inhibitor reduces REM sleep in the homing pigeon. *Physiol Behav.*, v. 87, p.575–581, 2006.

GANDOLFO, G.; SCHERSCHLICHT, R.; GOTTESMANN, C. Benzodiazepines promote the intermediate stage at the expense of paradoxical sleep in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 49, n. 4, p. 921-927, 1994.

GARCÍA, J.J.; REITER, R.J.; GUERRERO, J.M.; ESCAMES, G.; YU, B.P.; OH, C.S.; MUÑOZ-HOYOS, A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.*, v. 408, n. 3, p. 297-300, 1997.

GERVASONI, D.; DARRACQ, L.; FORT, P.; SOULIÈRE, F.; CHOUVET, G.; LUPPI, P-H. Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, p. 964-970, 1998.

GLEESON, S.; WEISSMAN, B.A.; SEGCEL, M.R.; BARRETT, J.E. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. *European Journal of Pharmacology*, v. 229, p. 109-115, 1992.

GLENNON, R.A.; METWALLY, K.; DUKAT, M.; ISMAIEL, A.M.; DE LOS ANGELES J.; HERNDON, J.; TEITLER, M.; KHORANA, N. Ketanserin and spiperone as templates for novel serotonin 5-HT (2A) antagonists. *Curr. Top.Med. Chem.*, v. 2, p. 539-558, 2002.

GLYKYS, J.; MODY, I. Activation of GABA_A receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron.*, v. 56, p.763–770, 2007.

GOTTESMAN, C.; GANDOLFO, G.; ARNAUD, C.; GAUTHIER, P. The Intermediate stage and paradoxical sleep in the rat: influence of three generations of hypnotics. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, p. 409-414, 1998.

GOTTESMANN, C. GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience*, v. 111, p.231–239, 2002.

GOTTESMANN, C.; GANDOLFO, G.; ZERNICKI. Sleep-Waking cycle in chronic rat preparations with brain stem transected at the caudopontine level. *Brain Research Bulletin*, v. 36, n. 6, p. 573-580, 1995.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 21, n. 6, p. 791-799, 1997.

GRECO, M.; BAENNINGER, R.; GOVERN, J. On the context of yawning: when, where, and why? *The Psychological Record.*, v. 43, p. 175-183, 1993.

GURTMAN, C.G.; MORLEY, K.C.; LI, K.M.; HUNT, G.E.; MCGREGOR, I.S. Increased anxiety in rats after 3,4-methylenedioxymethamphetamine: association with serotonin depletion. *European Journal of Pharmacology*, v. 446, p. 89-96, 2002.

HADIDIAN, J. Yawning in an old world monkey *Macaca nigra* (Primates: Cercopithecidae). *Behaviour*, v. 75, n. 136, p. 133-147, 1980.

HADLEY, Mac E. Endocrine role of the pineal gland. In: _____ (Ed.). *Endocrinology*. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice-Hall, Inc., 1996. 518p.

HANIG, J.P.; AIELLO, E.; SEIFTER, J. Permeability of the blood-brain barrier to parenteral 5-hydroxytryptamine in the neonate chick. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 12, p. 180-182, 1970.

HARDELAND, R.; POEGGELER, B. Non-vertebrate Melatonin. *J Pineal Res.*, v. 34, n. 4, p. 233-241, 2003.

HASSANAIN, M.; LEVIN, B.E.. Dysregulation of hypothalamic serotonin turnover in diet-induced obese rats. *Brain Research.*, v. 929, p. 175-180, 2002.

HAYASHI, A.; SONODA, R.; KIMURA, Y.; TAKASU, T.; SUZUKI, M.; SASAMATA, M.; MIYATA, K. Antiobesity effect of YM348, a novel 5-HT_{2C} receptor agonist, in Zucker rats. *Brain Research.*, v. 1011, p. 221-227, 2004.

HESS, W.R.. Le sommeil. *C.R. Soc. Biol.*, v.107, p.1333-1364, 1931.

HEUSNER, P.A.. Yawning and associated phenomena. *Physiol Rev.*, v. 26, p. 156-168, 1946.

HIERDEN, Y.M.V.; KOOLHAAS, J.M.; BOER, S.F.; KORTE, S.M. The control of feather pecking by serotonin. *Behavioral Neuroscience.*, v. 118, n. 3, p. 575-583, 2004.

HILL, D.R.; BOWERY, N.G. 3^H-baclofen and 3^H-GABA bind to bicuculine insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature*, v. 290, p. 149-152, 1981.

HO, R.H.; LAVALLEY, A.L. 5-hydroxytryptamine in the spinal cord of the domestic fowl. *Brain Research Bulletin*, v. 13, p. 427-431, 1984.

HOLMES, C.J.; JONES, B.E. Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience*, v. 62, n. 4, p. 1179-1200, 1994.

HOPWOOD, S.E.; STAMFORD, J.A. Multiple 5-HT₁ autoreceptor subtypes govern serotonin release in dorsal and median raphe nuclei. *Neuropharmacology*, v. 40, p. 508-519, 2001.

HOUDOUIN, F.; CESPUGLIO, R.; JOUVET, M. Effects induced by the electrical stimulation of the nucleus raphe dorsalis upon hypothalamic release of 5-hydroxyindole compounds and sleep parameters in the rat. *Brain Res.*, v. 565, n. 1, p. 48-56, 1991.

HUETHER, G.; POEGGELER, B.; ADLER, L.; RUTHER, E. Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 238, p. 249-254, 1993.

HUETHER, G.; POEGGELER, B.; REIMER, A.; GEORGE, A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci.*, v. 51, n. 12, p. 945-953, 1992.

HUH, S.; KIM, K.H.; HONG, S.S. Effect of β -adrenergic blockers on experimentally-induced convulsion and narcosis. *Yonsei Medical Journal.*, v. 19, n. 1, p. 25-31, 1978.

IKEDA, H.; GOTOH, J. Distribution of monoamine-containing cells in the central nervous system of the chicken. *Japan. J. Pharmacol.*, v. 21, p. 763-789, 1971.

JACOBS, B.L.; FORNAL, C.A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology.*, v. 21, n. 25, p. 9S-15S, 1999.

JANUŠONIS, S.; FITE, K.V.; FOOTE, W. Topographic organization of serotonergic dorsal raphe neurons projecting to the superior colliculus in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *The Journal of Comparative Neurology.*, v. 413, p. 342-355, 1999.

JAYAKUMAR, A.R.; SUJATHA, R.; PAUL, V.; PUVIARASAN, K.; JAYAKUMAR, R. Involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase activity in anticonvulsive action. *Brain Res Bull.*, v. 48, p. 387-394, 1999.

JONAIIDI, H.; BABAPOUR, V.; DENBOW, D.M. GABAergic control of food intake in the meat-type chickens. *Physiol Behav.*, v. 76, p. 465-468, 2002.

JOHNSTON, G.A.R.; CURTIS, D.R.; BEART, P.M.; GAME, C.J.A.; MCCULLOCH, R.M.; TWITCLIN, B. Cis- and Trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J. Neurochem.*, v. 24, p. 157-160, 1975.

JOUVET, M. Sleep and Serotonin: Na Unfinished Story. *Neuropsychopharmacology.*, v. 21, n. 25, p. 24S-27S, 1999.

KARASEK, M.; WINCZYK, K. Melatonin in humans. *Journal of Physiology and Pharmacology.*, v. 57, supp. 5, p. 19-39, 2006.

KAUR, S.; SAXENA, R.N.; BIRENDRA, N.; MALLICK, N. GABA in locus coeruleus regulates spontaneous rapid eye movement sleep by acting on GABA_A receptors in freely moving rats. *Neuroscience Letters.*, v. 223, p. 105-108, 1997.

KAVANAU, J.L. Origin and evolution of sleep: roles of vision and endothermy. *Brain Research Bulletin.*, v. 42, n. 4, p. 245-264, 1997.

- KHISTI, R.T.; MANDHANE, S.N.; CHOPDE, C.T. The neurosteroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one induces catalepsy in mice. *Neurosci Lett.*, v. 251, p.85–88, 1998.
- KRNJEVIC, K.; RANDIC, M.; STRAUGHAN, D.W. Pharmacology of cortical inhibition. *J. Physiol.* (London), v. 184, p. 78-105, 1966.
- LAL, S.; GRASSINO, A.; THAVUNDAYIL, J.X.; DUBROVSKY, B. A simple method for the study of yawning in man induced by the dopamine receptor agonist, apomorphine. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiat.*, v. 11, p. 223-228, 1987.
- LANCEL, M.; FAULHABER, J.; HOLSBOER, F.; RUPPRECHT, R. The GABA(A) receptor antagonist picrotoxin attenuates most sleep changes induced by progesterone. *Psychopharmacology* (Berl), v. 141, p.213–219, 1999.
- LANCEL, M.; STEIGER, A. Sleep and its modulation by drugs that affect GABA_A receptor function. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 111, p. 2852-2864, 1999.
- LANCEL, M. Role of GABA_A receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. *Sleep.*, v. 22, n. 1, p. 33-42, 1999.
- LANCEL, M.; CRÖNLEIN, T.A.M.; FAULHABER, J. Role of GABA_A receptors in sleep regulation. Differential effects of muscimol and midazolam on sleep in rats. *Neuropsychopharmacology.*, v. 15, n. 1, p. 63-74, 1996.
- LANGEBARTELS, A.; MATHIAS, S.; LANCEL, M. Acute effects of melatonin on spontaneous and picrotoxin-evoked sleepwake behaviour in the rat. *J Sleep Res.*, v. 10, p.211–217, 2001.
- LEANDER, P.; VRANG, N.; MOLLER, M. Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Comp. Neurol.*, v. 399, p. 73-93, 1998.
- LEHMANN, H.E. Yawning: a homeostatic reflex and its physiological significance. *Bull Meninger Clinic.*, v. 43, p.123–136, 1979.
- LEIBOWITZ, S.F.; ALEXANDER, J.T. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size and body weight. *Biol Psychiatry.*, v. 44, p. 851-864, 1998.
- LENZINGER, E.; NEUMEISTER, A.; PRASCHAK-RIEDER, N.; FUCHS, K.; GERHARD, E.; WILLEIT, M.; SIEGHART, W.; KASPER, S.F.; HORNIG, K.; ASCHAUER, H.N. Behavioral effects of typtophan dpletion in sasonal afective disorder associated with the serotoniin transporter gene. *Psychiatry Research.*, v. 85, p. 241-246, 1999.
- LEVENSON, J.; BYRNE, J.H.; ESKIN, A. Levels of serotonin in the hemolymph of *Aplysia* are modulated by light?dark cycles and sensitization training. *The Journal of Neuroscience.*, v. 19, n. 18, p. 8094-8103, 1999.

- LEVINE, E.S.; JACOBS, B.L. Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *The Journal of Neuroscience.*, v. 12, n. 10, p. 4037-4044, 1992.
- LIN, J.; SAKAI, K.; VANNI-MERCIER, G.; JOUVET, M. A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Research.*, v. 479, p. 225-240, 1989.
- LIU, R.; JOLA, T.; AGHAJANIAN, G. Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.*, v. 873, p.34-45, 2000.
- LÓPEZ-GIMÉNEZ, J.F.; VILARÓ, M.T.; PALACIOS, J.M.; MENGOD, G. Mapping of 5-HT_{2A} receptors and their mRNA in monkey brain: [³H]MDL100,907 autoradiography and in situ hybridization studies. *J. Comp. Neurol.*, v. 429, p. 571-589, 2001.
- LYAMIN, O.I.; MUKHAMETOV, L.M.; SIEGEL, J.M. Relationship between sleep and eye state in cetaceans and pinnipeds. *Archives Italiennes de Biologie.*, v. 142, p. 557-568, 2004.
- MACDONALD, R.L.; TWYMAN, R.E. Kinetic properties and regulation of GABA_A receptor channels. *Ion Channels*, v. 3, p.315-343, 1992.
- MACLEOD, M.G.; WATSON, A. Thermogenic, thermoregulatory and effects of feneluramine, a 5-hydroxytryptamine agonist, in immature domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.*, v. 104, n. 2, p. 365-371, 1993.
- MALLEAU, A.E.; DUNCAN, I.J.H.; WIDOWSKI, T.M.; ATKINSON, J.L. The importance of rest in young domestic fowl. *Appl Anim Behav Sci.*, v.106, p.52-69, 2007.
- MASCETTI, G.G.; VALLORTIGARA, G. Why do birds sleep with one eye open? Light exposure of the chick embryo as a determinant of monocular sleep. *Current Biology.*, v. 11, p. 971-974, 2001.
- MATSUMOTO, S.; YAMADA, K., NAGASHIMA, M.; MATSUO, N.; SHIRAKAWA, K.; FURUKAWA, T. Potantiation by serotonergic inhibition of yawning induced by dopamine receptor agonists in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior.*, v. 32, p. 815-818, 1989.
- MATSUURA, T.; SANO, Y. Distribution of monoamine-containing nerve fibers in the pineal organ of untreated and sympathectomized dogs. Fluorescence and immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res.*, v. 234, p. 519-531, 1983.
- McINTYRE, I.M.; OXENKRUG, G.F. Efeect of ageing on melatonin synthesis induced by 5-hydroxytryptophan and constant light in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v. 15, p. 561-566, 1991.
- MELIS, M.R.; ARGIOLAS, A.; GESSA, G.L. Evidence that apomorphine induces penile erection and yawning by releasing oxytocin in the central nervous system. *European Journal of Pharmacology.*, v. 164, p. 565-570, 1989.

- MELIS, M.R.; SALVATORA, S.; ARGIOLAS, A. Dopamine agonists increase nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: correlation with penile erection and yawning. *European Journal of Neuroscience.*, v. 8, p. 2056-2063, 1996.
- MELTZER, H.Y.; LOWY, M. The serotonin hypothesis of depression. In: _____. (Eds). *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Raven Press, 1987. p. 513-523.
- NAMBOODIRI, M.A.; SUGDEN, D.; KLEIN, D.C.; MEFFORD, I.N. 5-Hydroxytryptophan elevates serum melatonin. *Science*, v. 221, p. 659-661, 1983.
- NATESAN, A.; GEETHA, L.; ZATZ, M. Rhythm and soul in the avian pineal. *Cell Tissue Res.*, v. 309, p. 35-45, 2002.
- NATHAN, P.J.; BURROWS, G.; NORMAN, T. R. Evidence for 5-HT_{1A} receptor control of pineal melatonin concentrations in the rat. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, v. 8, p. 183-186, 1998.
- NAUTA, W.J.H. Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J. Neurophysiol.*, v. 9, p. 285-316, 1946.
- NITZ, D.; SIEGEL, J.M. GABA release in posterior hypothalamus across sleep-wake cycle. *Am. J. Physiol.*, v. 271, n. 40, p. R1707-R1712, 1996.
- NITZ, D.; SIEGEL, J.M. GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience.*, v. 78, n. 3, p. 795-801, 1997a.
- NITZ, D.; SIEGEL, J.M. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am. J. Physiol.* v. 273, n. 42, p. R451-R455, 1997b.
- OSWALD, I. Drugs and sleep. *Pharmacological Reviews.*, v. 20, n. 4, p. 273-303, 1968.
- PARADES, R.G.; AGMO, A. GABA and behavior: the role of receptor subtypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 16, p.145-170, 1992.
- PARENT, A. Comparative anatomy of serotonergic systems. *J. Physiol. (Paris)*. v. 77, p. 147-156, 1981.
- PARENT, A.; DESCARRIES, L.; BEAUDET, A. Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [³H]5-hydroxytryptamine. *Neuroscience.*, v. 6, p. 115-138, 1981.
- POLO, P.A.; REIS, R.O.; CEDRAZ-MARCEZ, P.L.; CAVALCANTE-LIMA, H.R.; OLIVARES, E.L.; MEDEIROS, M.A.; CÔRTEZ, W.S.; REIS, L.C. Behavioral and neuropharmacological evidence that serotonin crosses the blood-brain barrier in *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves). *Braz J Biol*, v. 67, p. 167-171, 2007.

PONTES, G.N.; CARDOSO, E.C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; MARKUS, R.P. Injury switches melatonin production source from endocrine (Pineal) to paracrine (Phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J. Pineal Res.*, v.41, p. 136-141, 2006.

PROTAIS, P.; WINDSOR, M.; MOCAER, E.; COMOY, E. Post-synaptic 5-HT_{1A} receptor involvement in yawning and penile erections induced by apomorphine, physostigmine and mCPP. *Psychopharmacology* (Berl), v. 120, p. 376-383, 1995.

RADIL-WEISS, T.; STÝBLOVÁ, V. Influence of thiopental on sleep cycles in rats. *Psychopharmacologia*, v.11, p.52–64, 1967.

RANSON, S.W. Somnolence caused by hypothalamic lesions in the monkey. *Archives of Neurology and Psychiatry.*, v. 41, n. 1, p 1-23, 1939.

RATTENBORG, N.C.; MARTINEZ-GONZALEZ, D.; LESKU, J.A. Avian sleep homeostasis: convergent evolution of complex brains, cognition and sleep functions in mammals and birds. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 33, n.3, p. 253-70, 2009.

RAYMOND, J. J.; ROBERTSON, D. M.; DINSDALE, H.B. Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier. *Can. J. Neurol. Sci.*, v. 13, p. 214-220, 1986.

RECHTSCHAFFEN, A.; BERGMANN, B.M. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep*, v. 25, p.18–24, 2002.

REIS, L.C.; MARINHO, V.R. Influence of 5-HT_{1A} agonist on the feeding behavior of *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves). *Braz. J. Biol.* v. 65, n. 4, p. 675-681, 2005.

REIS, L.C.; ALMEIDA, A.C.; CEDRAZ-MERCEZ, P.; OLIVARES, E.L.; MARINHO, JR, A.; THOMAZ, C.M. Evidence indicating participation of the serotonergic system in controlling feeding behavior in *Coturnix japonica* (Galliformes: Aves). *Braz. J. Biol.*, v. 65, p. 353-361, 2005.

REITER, R.J. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays.* v. 14, n. 3, p. 169-175, 1992.

REITER, R.J. Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News Perspect.* vol. 11, n. 5, p. 291-296, 1998.

REITER, R.J.; KING, T.S.; STEINLECHNER, S.; STEGER, R.W.; RICHARDSON, B.A. Tryptophan administration inhibits nocturnal N-acetyltransferase activity and melatonin content in the rat pineal gland. Evidence that serotonin modulates melatonin production via a receptor-mediated mechanism. *Neuroendocrinology*, v. 52, p. 291-296, 1990.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; PILAR, T.M.; FLORES, L.J.; KOPPISEPI, S. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci.*, v. 52, p. 11-28, 2007.

ROSEBROUGH, R.W. Crude protein and supplemental dietary tryptophan effects on growth and tissue neurotransmitter levels in the broiler chicken. *British Journal of Nutrition.*, v. 76, p. 87-96, 1996.

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

SAKO, H.; KOJIMA, T.; OKADO, N. Immunohistochemical study on the development of serotonergic neurons in the chick: I. Distribution of cell bodies and fibers. *The Journal of Comparative Neurology.*, v. 253, p. 61-78, 1986.

SALETU, B. Melatonin: a natural hypnotic? *Wien klin wochenschr.*, v. 109, n. 18, p. 714-721, 1997.

SANFORD, L.D.; PARRIS, B.; TANG, X. GABAergic regulation of the central nucleus of the amygdala: implications for sleep control. *Brain Res.*, v. 956, p. 276-284, 2002.

SCHINO, G.; AURELI, F. Do men yawn more than women? *Ethology and Sociobiology.*, v. 10, p. 375-378, 1989.

SCHMITT, A.; MÖSSNER, R.; GOSSMANN, A.; FISCHER, I.G.; GORBOULEV, V.; MURPHY, D.L.; KOEPESELL, H.; LESCH, K.P. Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice. *J. Neurosci. Res.*, v. 71, p. 701-709, 2003.

SHARP, P.J.; FOLLETT, B.K. The distribution of monoamines in the hypothalamus of the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Zeitschrift für Zellforschung.*, v. 90, p. 245-262, 1968.

SIEGHART, W. Structure and pharmacology of γ -aminobutyric Acid_A receptor subtypes. *Pharmacological Reviews.* v. 47, n. 2, p. 181-234, 1995.

SMITH, C.T.; MISKIMAN, D.E. Increases in paradoxical sleep as a result of amygdaloid stimulation. *Physiology and Behavior.* v. 15, p. 17-19, 1975.

STANCAMPIANO, R.; MELIS, M.R.; ARGIOLAS, A. Penile erection and yawning induced by 5-HT_{1C} receptor agonists in male rats: relationship with dopaminergic and oxytocinergic transmission. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 261, p. 149-155, 1994.

STEARDO, L.; MONTELEONE, P.; CANNIZZARO, C.; MAJ, M.; CUOMO, V. Serotonergic modulation of the rat pineal gland activity: In vivo evidence for a 5-hydroxytryptamine (2C) receptor involvement. *J. Pharmacol. Exp Ther.*, v. 295, p. 266-273, 2000.

STEFFENS, S.M.; CASAS, D.C.; MILANEZ, B.C.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A.; MARINO-NETO, J. Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons. *Brain Research Bulletin.*, v. 44, n. 6, p. 681-688, 1997.

STOKKAN, K.A.; REITER, R.J.; NONAKA, K.O.; LERCHL, A.; YU, B.P.; VAUGHAN, M.K. Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain Res.*, v. 545, p. 66-72, 1991.

SUGDEN, D.; NAMBOODIRI, M.A.; KLEIN, D.C.; GRADY JR., R.K.; MEFFORD, I.N. Ovine pineal indoles: effects of l-tryptophan or l-5-hydroxytryptophan administration. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 769-772, 1985.

TAHERI, S.; MIGNOT, E. The genetics of sleep disorders. *Lancet Neurol.*, v.1, p. 242–250, 2002.

TAKAGI, T.; ANDO, R.; OHGUSHI, A.; YAMASHITA, T.; DOBASHI, E.; HUSSAIN-USUF, H.; ONODERA, R.; BUNGO, T.; SATO, H.; FURUSE, M. Intracerebroventricular injection of pipercolic acid inhibits food intake and induces sleeping-like behaviors in the neonatal chick. *Neurosci Lett*, v. 310, p. 97–100, 2001.

TAKAGI, T.; BUNGO, T.; TACHIBANA, T.; SAITO, E.S; SAITO, S.; YAMASAKI I.; TOMONAGA, S.; DENBOW, D.M.; FURUSE, M. Intracerebroventricular administration of GABA-A and GABA-B receptor antagonists attenuate feeding and sleeping-like behavior induced by L-pipercolic acid in neonatal chicks. *J Neurosci Res*, v. 73:270–275, 2003.

TOHYAMA, Y.; YAMANE, F.; MERID, M.F.; DIKSIC, M. Effects of selective 5-HT1A receptor antagonists on regional serotonin synthesis in the rat brain: an autoradiographic study with α -[¹⁴C] methyl- L- tryptophan. *European Neuropsychopharmacology.*, v. 11, p. 193-202, 2001.

TRULSON, M.E.; JACOBS, B. L.; MORRISON, A. R. Raphe unit activity during REM sleep in normal cats and in pontine lesioned cats displaying REM sleep without atonia. *Brain Research.*, v. 226, p. 75-91, 1981.

TRULSON, M.E.; BRANDSTETTER, J.W.; CRISP, T.; JACOBS, B.L. Behavioral effects of quipazine in the cat. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 78, p. 295-305, 1982.

TYCE, G.M. Origin and metabolism of serotonin. *J.Cardiovasc. Pharmacol.*, v. 16, p. S1-S7, 1990.

UNDERWOOD, H.; SIOPE, T. Circadian organization in Japanese quail. *J. Exp. Zool.* v. 323, n. 3, p. 557-566.

VALVERDE, A.; BIENZLE, D.; SMITH, D.A.; DYSON, D.H.; VALLIANT, A. E. Intraosseous cannulation and drug administration for induction of anesthesia in chickens. *Vet Surg*, v.22, p.240–244, 1993.

VALENCIA-FLORES, M.; CAMPOS-SEPULVEDA, E.; GALINDO-MORALES, J.A.; LUJAN, M.; COLOTLA, V.A. Behavioral and biochemical correlates of chronic administration of quipazine. *PharmacologyBiochemistry & Behavior.* v. 36, p. 299-304, 1990.

VAN LUIJTELAAR, E.L.J.M; VAN DER GRINTEN, C.P.M.; BLOKHUIS; H.J.; COENEN, A.M.L. Sleep in the domestic hen (*Gallus domesticus*). *Physiol Behav*, v. 41:p. 409–414, 1987.

VANNI-MERCIER, G.; SAKAI, K.; LIN, J.S.; JOUVET, M. Carbachol microinjections in the mediodorsal pontine tegmentum are unable to induce paradoxical sleep after caudal pontine and prebulbar transections in the cat. *Neuroscience Letters.*, v. 130, p. 41-45, 1991.

WAMBEBE, C. Influence of some GABAergic agents on nitrazepam-induced sleep in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Jpn J Pharmacol* , v. 33p. 1111–1118, 1983.

WANG, R.Y.; AGHAJANIAN, G.K. Inhibition of neurons in the amygdala by dorsal raphe stimulation: mediation through a direct serotonergic pathway. *Brain Res.*, v. 120, p. 85-102, 1977.

WINKLER, T.; SHARMA, H.S.; STALBERG, E.; OLSSON, Y.; DEY, P.K. Impairment of blood-brain barrier function by serotonin induces desynchronization of spontaneous cerebral cortical activity: Experimental observations in the anaesthetized rat. *Neuroscience*, v. 68, p. 1097-1104, 1995.

WU, X.; KEKUDA, R.; HUANG, W.; FEI, YJ.; LEIBACH, FH.; CHEN, J.; CONWAY, S.J.; GANAPATHY, V. Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake 2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 32776-32786, 1998.

YAMAMOTO, I. Studies on the structure-activity relationship of allyl substituted oxypyrimidines searching for the novel antagonist or agonist of barbiturates to the sleep mechanism based on the uridine receptor theory-barbituric acid to uridine (part I). *Yakugaku Zasshi* , v. 125, p. 73–120, 2005.

ZDANOVA, I.V. Melatonin as a hypnotic: Pro. *Sleep Medicine Reviews*. V. 9, p. 51-65, 2005.

ZDANOVA, I.V.; WURTMAN, R.J. Efficacy of melatonin as a sleep-promoting agent. *Journal of Biological Rhythms.*, v. 12, n. 6, p. 644-650, 1997.