

VERÔNICA SANDRA VALENTINUZZI 235

Variação circadiana na Habituação da Resposta Exploratória
a Estímulos Sonoros em Pombos (Columba livia), Submetidos
a Condições de Claro-escuro e de Claro Constante.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Verônica Sandra Valentinuzzi
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
a obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas na área de Fisiologia.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Elenice A. de Moraes [Ferrari]

UNICAMP

1993

A Máximo Valentinuzzi, mi abuelo.

Agradecimentos

A Prof. Dra. Miriam Marques, por ter me dado a primeira noção de Cronobiologia em sua aula de graduação.

Ao Prof. Dr. Jacques Viellard, por sua contínua disponibilidade.

Aos professores do Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos (GMDRB), pela indispensável base teórica.

Aos professores e funcionários do Depto de Fisiologia e Biofísica pela permanente disposição.

Aos Doutores Miriam Marques, Regina C. Spadari e J. Cipolla-Neto por suas valiosas sugestões.

Ao CNPq, porque possibilitou a realização deste trabalho.

A Marcia e Marise, pela sua contínua presença.

Aos "porteños" Maria e Mauricio, pela sua amizade.

A Suzete, por ter me recebido de braços abertos.

Ao Washington, pela colaboração técnica.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurociências e Comportamento, pelo agradável ambiente de trabalho.

A meus pais e minha irmã.

A José "Pepe" Puglisi, sem o qual teria sido impossível esta realização.

E especialmente a Prof. Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari, que além de ser excelente orientadora, com paciência infinita e permanente bom humor, é uma verdadeira amiga.

ORGANIZAÇÃO

- I. Introdução
- II. Objetivos
- III. Experimentos
 - III.1. Experimento 1
 - III.1.1. Objetivos
 - III.1.2. Materiais e Métodos
 - III.1.3. Resultados
 - III.1.4. Discussão
 - III.2. Experimento 2
 - III.2.1. Objetivos
 - III.2.2. Materiais e Métodos
 - III.2.3. Resultados
 - III.2.4. Discussão
 - III.3. Experimento 3
 - III.3.1. Objetivos
 - III.3.2. Materiais e Métodos
 - III.3.3. Resultados
 - III.3.4. Discussão
- IV. Discussão Geral
- V. Abstract
- VI. Resumo
- VII. Referências Bibliográficas
- VIII. Apêndice

I INTRODUÇÃO

Um dos comportamentos de fundamental importância para a sobrevivência de um organismo é o comportamento exploratório. Esta classe de comportamento é diretamente relacionada com respostas de orientação a estímulos ambientais externos que possuem um grau de novidade física ou funcional. O comportamento exploratório inclui uma ou várias reações motoras e também componentes vegetativos. A finalidade deste comportamento é identificar, localizar e avaliar qualquer mudança significativa do meio ambiente (Buzsáki, 1982). Assim, tem um importante valor adaptativo já que seria parte de um padrão comportamental de aproximação à mudança ambiental (estímulo) que sinaliza informações positivas, como alimento, água, um parceiro sexual, ou de um padrão de fuga, frente a estímulos sinalizadores de um perigo potencial, como um predador, ou de eventos aversivos, como um choque elétrico. Em 1927, Pavlov interpretou este comportamento da seguinte forma:

"Este reflexo permite que homens e animais respondam imediatamente às menores mudanças no ambiente que os rodeia, de forma que eles orientam imediatamente o órgão-receptor apropriado à qualidade e ao agente da mudança perceptível, investigando-os completamente" (Em: Buzsáki, p.462,1982).

Todas as classes de comportamentos são constituídas por diferentes padrões de reações, com componentes não aprendidos e aprendidos. Os primeiros são pré-programados geneticamente e atuam na adaptação da espécie ao meio, refletindo a história filogenética. Os

comportamentos aprendidos refletem a história ontogenética, desenvolvem-se em função das interações do indivíduo com o meio e atuam na adaptação do organismo a circunstâncias particulares no transcurso de sua vida. Esses processos de interação do organismo com o meio, que resultam em alterações do comportamento, caracterizam a aprendizagem. Temos, então, que a aprendizagem é uma mudança do comportamento que persiste no tempo, que resulta da experiência individual e que tem como objetivo a adaptação a circunstâncias particulares (Rosenzweig & Leiman, 1982; Toledo, 1989).

Uma das formas de aprendizagem mais simples é a habituação, caracterizada pela diminuição da resposta à estimulação repetida ou contínua (Thompson, 1986). Praticamente todas as espécies animais estudadas, desde uma ameba até o homem, exibem algum tipo de decremento de resposta quando um estímulo é frequentemente repetido ou continuamente aplicado (Harris, 1943. Em: Sharpless & Jasper, 1956). A habituação é considerada aprendizagem, de tipo não associativo, ou seja, acontece pela mera repetição de um estímulo, aparentemente sem associação alguma com outros eventos ambientais (Thompson, 1986). Parece coerente pensar que um dado estímulo que não se relaciona com qualquer tipo de evento, benéfico ou prejudicial, será classificado pelo organismo como não importante (Toledo, 1989). Essa ausência de valor funcional, ou consequência zero, determinaria a diminuição da resposta ao estímulo. A importância do processo de habituação estaria no fato de que seria não-adaptativo continuar respondendo a um estímulo que não tem nenhuma consequência para o animal. Assim, em 1956, Sharpless & Jasper escreveram: "A ampla distribuição deste fenômeno, somado a seu óbvio valor de sobrevivência, sugere que este tipo de plasticidade,

deve ser uma das propriedades mais fundamentais do comportamento animal". Thompson & Spencer (1966) caracterizaram este processo por meio de nove parâmetros ou princípios:

1. Dado que um estímulo particular provoca uma resposta, repetidas aplicações do estímulo resultam num decréscimo da resposta (habituação). O decréscimo é usualmente uma função exponencial negativa do número de estímulos apresentados.
2. Se o estímulo é suprimido, a resposta tende novamente a reaparecer (recuperação espontânea).
3. Se repetidas séries de treinamento de habituação e recuperação espontâneas forem dadas, a habituação tornar-se-á sucessivamente mais rápida.
4. Para estímulos semelhantes, quanto mais rápida a frequência de estimulação, mais rápida e/ou pronunciada é a habituação.
5. Quanto mais fraco for o estímulo, mais rápida e pronunciada é a habituação.
6. Os efeitos de treinamento de habituação podem produzir uma resposta além do nível zero ou um nível de resposta assintótica.
7. A resposta de habituação para um dado estímulo exhibe uma generalização para outro estímulo.
8. A apresentação de um outro estímulo (normalmente forte) resulta num reaparecimento da resposta habituada.
9. Nas aplicações repetidas de um estímulo desabituaente, a quantidade de desabituação produzida habitua (isto pode ser chamado de habituação da desabituação).

Desde o início das pesquisas sobre habituação, um dos mais utilizados padrões de estimulação foi a apresentação de sons (Toledo,

1989) Um dos primeiros estudos mais abrangentes foi realizado por Sharpless & Jasper em 1956. Utilizando estimulação sonora e trabalhando com gatos, eles mediram a reação de alerta registrando ondas cerebrais por meio de eletrodos. Depois deste estudo, houve uma sucessão de trabalhos analisando diferentes tipos de respostas (reação de orientação, sobressalto, potenciais evocados). Tais estudos utilizaram técnicas de lesões em diferentes áreas cerebrais e diferentes padrões de estimulação (duração, intensidade, ordem de apresentação dos estímulos, intervalo entre estímulos) com o objetivo de elucidar as propriedades gerais da habituação e o substrato neural envolvido neste processo (Scourse & Hinde, 1972; Tighe & Leaton, 1976; Hamassaki 1986; Toledo, 1989).

Trabalhos deste tipo em outras espécies, além de mamíferos, são poucos. Um destes é o estudo realizado por Adamo & Bennet (1967), que procuraram estudar o papel de estruturas hiperestriatais do telencéfalo de galinhas na organização e na habituação do reflexo de orientação da cabeça a estímulos sonoros. Após os testes iniciais de habituação, os animais sofreram lesões bilaterais nas regiões hiperestriatais. Sete dias após, os sujeitos foram retestados. Observou-se habituação inter-sessão (longo-prazo) da resposta de orientação somente no teste pré-cirúrgico e não foi notada nenhuma diferença na habituação intra-sessão (curto-prazo) em nenhum dos grupos. Os autores sugeriram que, em galinhas, o hiperestriado exerceria um importante papel funcional na habituação da orientação da cabeça a estímulos sonoros e que o hiperestriado acessório seria importante para a orientação sonora espacial.

Outro estudo foi de Toledo & Ferrari (1991) que, trabalhando com pombos, analisaram o efeito da lesão massiva no telencéfalo sobre a

habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros. Os animais foram submetidos a uma primeira sessão de habituação em que era apresentado o estímulo A (1000-Hz, 83-dB, 1-s) e 24 h depois eram submetidos a uma segunda sessão em que era apresentado o estímulo B (500-Hz, 85-dB, 1-s). Após estes testes os animais sofreram ablação do telencéfalo e foram retestados 10 dias após a cirurgia. Constatou-se uma facilitação da habituação nos testes pós-cirúrgicos. Isto coincide com observações anteriores feitas em ratos e aves, indicando que os sistemas essenciais na organização e controle deste tipo de aprendizagem não estão localizados no telencéfalo.

A análise do processo de habituação, caracterizado pela diminuição na ocorrência de respostas, permite verificar que a velocidade ou rapidez da habituação depende fundamentalmente de uma estreita interação entre as condições estimulatórias e as características fisiológicas do organismo a cada instante (Toledo, 1989).

A influência das características físicas do estímulo e/ou dos padrões de estimulação na velocidade de habituação pode ser analisada considerando os nove parâmetros, já mencionados, que caracterizam o processo de habituação (Thompson e Spencer, 1966). Por outro lado, deve-se considerar a interação entre características funcionais dos estímulos e do estado fisiológico do organismo na determinação do processo de habituação. Essa análise relaciona-se diretamente com a análise de fatores motivacionais.

Segundo Millenson (1967), a motivação do comportamento é geralmente interpretada como o conjunto de determinantes ou causas internas do comportamento. Porém, o conceito de motivação refere-se a

processos inferidos das relações observáveis entre condições ambientais que alteram o valor reforçador de um estímulo e as características (magnitudes, amplitudes, frequências) das respostas do organismo. Fatores genéticos, dependentes da espécie considerada constituem elementos determinantes da significância ou valor biológico dos estímulos que atua nesses processos motivacionais. Habituar a um estímulo de elevado valor biológico, pelo menos em condições naturais, tem muito pouco valor adaptativo.

Isso pode ser evidenciado no relato de Zucchi & Bergman (1975), que estudaram a habituação de um pássaro (Eringilla coelebs L.) a gritos de alarme espécie-específicos. Esta ave responde com uma variedade de padrões comportamentais, um dos quais é a imobilização ou *freezing*. Analisando as alterações na resposta comportamental, ou seja, a duração do *freezing*, conseguiram observar apenas a habituação a longo-prazo. Consideraram que o decréscimo da amplitude da resposta foi consequência de uma ausência de reforçamento, ou seja, de não pareamento com a condição aversiva (a visão do inimigo). Porém, sugerem que em condições naturais, este tipo de habituação teria pouco valor adaptativo dada a contínua variação das circunstâncias do meio ambiente.

Em outro estudo, Douglas & Marler (1989) trabalharam com uma ave canora (Melospiza georgiana), utilizando como estímulo notas do próprio canto da espécie, organizadas numa sequência experimental. Foram registradas as respostas naturais, movimento das asas, ereção da crista e vocalizações que machos territoriais apresentaram em relação ao estímulo. Os animais foram submetidos a duas sessões de habituação, em cada uma das quais apresentava-se um canto formado por quatro sílabas de três notas cada. A única diferença entre os dois

cantos era dada pelas primeiras notas de cada sílaba que diferiam na duração. Na primeira sessão estimulava-se até alcançar 75% de habituação. Na segunda sessão, media-se o grau de recuperação da resposta. Os autores não especificaram o tempo necessário para chegar a esse nível de habituação, porém pode-se supor que não tenham alcançado 100% de diminuição de resposta, pela dificuldade de produzir a habituação a um estímulo de elevado valor biológico como é o caso. Na segunda sessão, o grau de recuperação da resposta habituada na sessão anterior, reflete o grau do contraste perceptual de ambos cantos. A diferença na duração das notas, que formam os cantos experimentais permitiu mostrar como pequenas diferenças nos parâmetros de um som tem um significado dentro do sistema de comunicação destas aves.

Por outro lado, os processos motivacionais também se relacionam diretamente com a história de experiências prévias do animal. Assim, a história passada, com o acúmulo de experiências de relações estímulo-resposta, é uma maneira eficaz de controlar o comportamento de um organismo já que determina o significado funcional dos estímulos e das respostas. Algumas espécies aprendem quais são seus predadores naturais através dos progenitores ou de outros indivíduos adultos. Por exemplo, nos gansos, o *mobbing*, que consiste no acossamento a um predador por numerosos indivíduos da espécie, através de vocalizações intensas e contínuas, é essencialmente instrutivo para os indivíduos mais jovens (Lorenz, 1963).

O fator novidade também é alterado pela experiência. É fácil entender que um estímulo novo que não faz ou não fazia parte do

cotidiano de um animal tenha maior capacidade para desencadear respostas de orientação (Sokolov, 1963; Em Buzsáki, 1982, Toledo, 1989). A diminuição do estado de alerta em guardiães, a diminuição da eficiência do trabalho em tarefas monótonas, a curiosidade (a capacidade de um estímulo novo em atrair nossa atenção e modificar nosso comportamento), a insônia produzida por um meio desconhecido, são fenômenos que demonstram que o sistema nervoso central manifesta uma resposta inicial elevada a um estímulo novo, a qual é diminuída à medida em que o estímulo torna-se repetitivo (Sharpless & Jasper, 1956).

Assim, a manutenção da resposta de um organismo vai depender da interação da sua história ontogenética (novidade e valor funcional do estímulo para o indivíduo) e da sua história filogenética (valor biológico do estímulo para a espécie) determinando o maior ou menor grau de habituação.

Responder a todo estímulo novo seria pouco adaptativo, sendo importante que o estímulo tenha valor biológico ou funcional para o animal (Buzsáki, 1982).

A interação do organismo com o meio ambiente, além de resultar em aprendizagem, pode também atuar modificando a condição fisiológica. Por exemplo, num meio aversivo, ocorrem as mudanças fisiológicas que caracterizam o estado de estresse, que vão determinar respostas comportamentais diferentes daquelas que ocorrem num meio favorável. Pode-se, assim, considerar a definição de motivação estabelecida por Alcock (1942), que se refere a uma hipotética variável fisiológica que reflete o estado interno e altera a tendência em emitir certos comportamentos.

Contudo, além das alterações fisiológicas produzidas pela

interação organismo-meio, as variáveis fisiológicas, independentemente do meio ambiente, apresentam uma flutuação diária regular ao longo das 24 h. Essa variação, filogeneticamente incorporada e geneticamente determinada, teria como finalidade a preparação antecipada do organismo às alterações altamente previsíveis da alternância do dia e da noite (Cipolla-Neto, 1988; Turek & Van Cauter, 1988). Ou seja, é possível dizer que as condições motivacionais, correlacionadas com essas variáveis fisiológicas flutuariam ao longo das 24 h, determinando também, uma flutuação nas características de comportamentos e na capacidade do organismo em reagir frente a estímulos ambientais e endógenos. Pode-se, assim, relacionar o conceito de motivação com o conceito de ritmos biológicos, que se caracterizam pela recorrência a intervalos regulares, de eventos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais (Aschoff, 1981. Em: Cipolla-Neto, 1988). Esses ritmos exibem um amplo espectro de frequências, com períodos que variam desde menos de 1s (EEG), 90 min (estágios de sono), 24 h (ciclo sono-vigília), 28 dias (ciclo menstrual), até 365 dias (hibernação). Mas, os mais estudados e melhor compreendidos até o momento são aqueles com período de aproximadamente 24 h, os chamados ritmos circadianos (Marques, 1991). Em todos os sistemas fisiológicos, e sem exceção, constata-se ritmicidade, principalmente circadiana, como os ritmos hormonais (cortisol, hormônio de crescimento, aldosterona, prolactina, testosterona, renina, insulina), ritmos renais (excreção de potássio, excreção de cálcio, volume urinário), temperatura corporal, variáveis cardiovasculares (frequência cardíaca, resistência capilar, pressão pulsátil), ritmos hematológicos (nível de plaquetas, hematócrito),

ritmos de susceptibilidade a substâncias químicas benéficas ou tóxicas (Cipolla-Neto et al., 1988). Em geral, estas flutuações diárias podem ser associadas a curvas de tipo senóide, representativas de eventos oscilatórios. A partir de tais curvas podem ser definidos alguns parâmetros, que caracterizam e descrevem os ciclos, tais como o período de oscilação, frequência, nível médio, fase e ângulo de oscilação (ver Aschoff, 1979; Cipolla-Neto et al., 1988).

Quando se isola um organismo das oscilações ambientais, ou seja, mantendo as condições de luz, temperatura, som e alimento constantes, a maioria de seus ritmos fisiológicos e comportamentais persiste. Nestes casos, o período encontrado na variação temporal dos eventos biológicos define o que é chamado período em livre curso, cuja duração é normalmente um pouco menor ou um pouco maior do que 24h, segundo a espécie e a variável considerada. Isto significa que o organismo é capaz de gerar sua própria ritmicidade, independentemente do meio externo. O retorno às condições de ritmicidade externa permite observar novamente a coincidência entre o período do ritmo endógeno e o período do ritmo externo, ou seja, o arrastamento ou sincronização do ritmo endógeno pelo ritmo externo. Esta relação existente entre os ritmos endógenos e os ciclos ambientais é importante para que os eventos bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais aconteçam em momentos adequados do dia, contribuindo, assim, para a adaptação e a sobrevivência das espécies em ambientes onde fenômenos tão importantes como a disponibilidade de alimentos e a predação são cíclicos (Paludetti, 1988, Em: Cipolla-Neto et al., 1988; Underwood, 1989).

Os fatores ambientais capazes de arrastar os ritmos endógenos, impondo a eles seu período, são denominados *Zeitgeber*s, palavra alemã

que significa doador de tempo ou sincronizador externo. Para a maioria dos organismos o *Zeitgeber* mais importante é o ciclo claro-escuro (CE), porém existem também outros agentes arrastadores, como ciclos de temperatura, ciclos de disponibilidade de alimentos e fatores sociais (Aschoff, 1954; Em: Cipolla-Neto et al., 1988). Assim, considera-se que os organismos geram seus próprios ritmos circadianos, e são capazes de sincronizá-los às variações cíclicas do meio externo. A evolução da cronobiologia, estudo sistemático da organização temporal dos organismos vivos, foi enfatizada principalmente a partir de observações de variações comportamentais rítmicas. Estas, como por exemplo, a variação rítmica de repouso-atividade, de auto-limpeza, exploração, alimentação, ingestão de água, locomoção, têm sido muito analisadas (Cipolla-Neto et al., 1988).

Uma das características dessa investigação científica tem sido a análise dos correlatos fisiológicos subjacentes a essa ritmicidade. Dessa análise resultou a identificação do sistema neuroendócrino responsável pelas funções de geração e de sincronização dos ritmos biológicos, conhecido como Sistema de Temporização Circadiana ou Sistema Circadiano.

Em mamíferos, o Sistema Circadiano estaria formado por um oscilador ou marcapasso principal, o núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado no hipotálamo, por fotorreceptores localizados nas retinas e que são necessários para o processo de sincronização e ainda, pela glândula pineal, que por meio da secreção de melatonina transmite a informação temporal a todo o organismo (Cassone, 1990; Norgren, 1990)

A atividade metabólica das células do NSQ apresenta uma variação circadiana, possível de ser verificada pela injeção de marcadores metabólicos (Ralph *et al.*, 1990). O isolamento dos NSQ do resto do cérebro, por meio de seções de aferências e eferências, elimina a ritmicidade fora desta área hipotalâmica, porém a ritmicidade dentro desta área persiste claramente (Turek & Van Cauter, 1988). Experimentos realizados mostram que o ritmo circadiano da atividade elétrica celular (Ralph *et al.*, 1990) e da atividade metabólica (Turek & Van Cauter, 1988), continuam expressando-se *in vitro*. A lesão do NSQ em ratos e *hamsters* altera muito os ritmos da atividade locomotora, do sono-vigília, da ingestão de água, da temperatura corporal e da concentração sanguínea de certos hormônios. O transplante de hipotálamo de feto restaura a ritmicidade circadiana nestes animais e, o que é mais interessante, o ritmo restaurado tem um período equivalente ao do animal doador (Ralph *et al.*, 1990). Isto reforça a idéia de que o NSQ estaria no topo da hierarquia de controle da ritmicidade circadiana em mamíferos. Porém, existem dados que sugerem a participação de outros osciladores na determinação de alguns ritmos biológicos, ou que podem eventualmente substituir o NSQ (Linden, 1991).

Em mamíferos, o NSQ recebe projeções retinianas diretas, por meio do trato retinohipotalâmico (TRH) e projeções indiretas provenientes do núcleo geniculado lateral, que faz parte da via visual primária (Moore-Ede, 1982; Norgren, 1990). Estas conexões são importantes porque proveem a informação luminosa necessária ao NSQ para sincronizar seu ritmo intrínseco ao ciclo luz-escuro (LE) do meio ambiente. Em mamíferos, a enucleação bilateral determina que seus ritmos entrem em livre curso, o que demonstra a importância da

retina como mediadora do processo de sincronização em mamíferos

A terceira estrutura do sistema circadiano de mamíferos, a glândula pineal, produz melatonina com um ritmo circadiano, aumentando a secreção durante a noite e diminuindo durante o dia. Contrariamente ao NSQ, a pineal não seria um oscilador independente, dado que a interrupção de suas comunicações neurais com o NSQ anula a ritmicidade de síntese e secreção de melatonina. A produção de melatonina depende da atividade da enzima N-acetiltransferase (NAT), que, por sua vez, é estimulada pela norepinefrina (NE) liberada na pineal por fibras simpáticas originárias do gânglio cervical superior (GCS). O GCS aparentemente é regulado por um circuito multissináptico, com participação das retinas, NSQ e núcleos paraventriculares do hipotálamo (Norgren, 1990). Esta última estrutura, possivelmente seria mais uma estrutura do sistema circadiano, pelo menos em primatas (Cipolla-Neto, comunicação pessoal). Segundo Armstrong (1989), a função da melatonina, em mamíferos, talvez seja a de agir como um *Zeitgeber* interno para toda a estrutura circadiana. Sua ação ocorreria a nível de células, tecidos e órgãos e do organismo como um todo, como também na interação do organismo com as mudanças fotoperiódicas ambientais.

Quando se analisa a organização circadiana em aves, verifica-se uma situação significativamente diferente. O sistema circadiano seria formado por quatro estruturas: retina, glândula pineal, fotorreceptores encefálicos e uma região hipotalâmica homóloga ao NSQ em mamíferos. A interação destas estruturas é complexa e varia entre as diferentes espécies (Figura 1). A importância de cada estrutura na geração e sincronização dos ritmos também difere marcadamente de uma

espécie a outra. Isto tem dificultado muito o estudo do sistema circadiano em aves (Norgren, 1990).

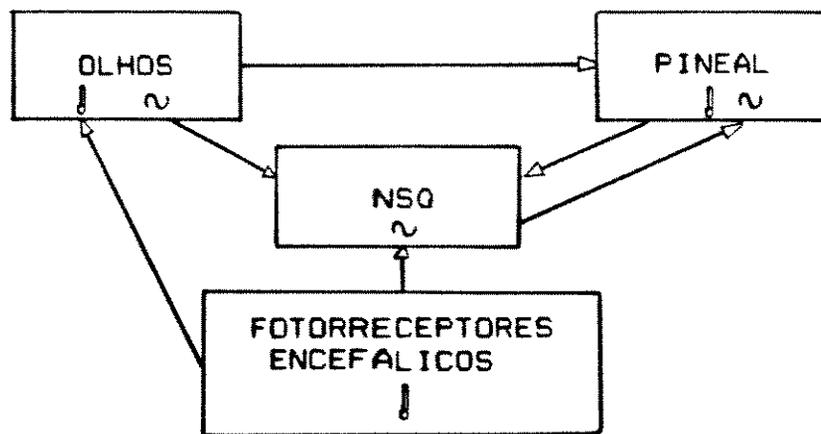


Figura 1. Elementos do sistema circadiano em aves. Setas indicam possíveis influências neurais ou humorais entre os elementos. ~ = oscilador circadiano; ⊕ = fotorreceptores (Extraído de Norgren, 1990).

Dois núcleos, um no hipotálamo medial e outro no hipotálamo lateral, foram sugeridos como homólogos ao NSQ de mamíferos. Embora muitos pesquisadores tenham examinado as projeções retinianas ao hipotálamo em aves, não há certeza sobre a localização e a identificação de núcleos retinorreceptores.

Relatou-se uma projeção retiniana ao hipotálamo lateral, porém não ao hipotálamo medial (Norgren & Silver, 1989). Foram feitas lesões nestes núcleos em diferentes espécies, observando-se os efeitos na atividade locomotora e procurou-se também detectar a ritmicidade da atividade metabólica celular através de marcadores metabólicos. Em ambas as tentativas, os dados obtidos não foram suficientemente esclarecedores (Norgren, 1990). Segundo Rivkees *et al.* (1989), existem evidências que sugerem que a área retinorreceptora do hipotálamo lateral, é homóloga ao NSQ em mamíferos.

A glândula pineal nas aves, como nos mamíferos, sintetiza e secreta melatonina com um ritmo circadiano. Porém, esta oscilação é

intrínseca, já que *in vitro* continua a se manifestar e a sincronizar ao ciclo externo luz-escuro (LE), sugerindo também a presença de fotorreceptores na pineal (Cassone, 1990). A pineal nas aves também recebe inervação simpática do GCS, porém a interrupção desta via não afeta a ritmicidade da pineal. Sugeriu-se que a NE liberada pelos terminais simpáticos seria necessária para manter uma relação temporal entre os diferentes osciladores (Norgren, 1990).

O papel da pineal como geradora de ritmos e como sincronizadora varia muito de uma espécie a outra. No caso de pombos, a pinealectomia não afeta a geração de ritmos de atividade locomotora nem a sincronização desses ritmos aos ciclos externos LE (Ebihara *et al.*, 1983; Norgren, 1990).

Os olhos também produzem melatonina num padrão circadiano, aumentando durante a noite e diminuindo durante o dia. Da mesma forma que a pineal, a importância dos olhos como oscilador e sincronizador difere entre as espécies. Nos pombos a enucleação não interrompe a geração nem a sincronização do ritmo da atividade locomotora (Ebihara *et al.*, 1983; Norgren, 1990). Assim, segundo Ebihara *et al.* (1983), em pombos a pinealectomia e a enucleação realizados separadamente não tem efeito na ritmicidade. Porém, quando são realizadas em forma conjunta, interrompem severamente o ritmo de atividade locomotora. Um trabalho posterior detectou uma leve ritmicidade nestes animais pinealectomizados e enucleados, num esquema escuro-escuro (EE), que desaparece completamente só quando se produzem lesões no hipotálamo medial (Ebihara *et al.*, 1987. Em: Norgren & Silver, 1989). Ou seja, o hipotálamo medial poderia ser um terceiro oscilador, provavelmente de menor importância.

A existência de fotorreceptores encefálicos, provavelmente no hipotálamo, passou a ser considerada porque algumas aves, pinealectomizadas e enucleadas, entre elas os pombos, são ainda capazes de sincronizar seu comportamento a esquemas LE (Ebihara *et al.*, 1983). Os ritmos comportamentais aparentemente estão em estreita relação com a ritmicidade de diversas variáveis fisiológicas, principalmente hormonais. Por exemplo, em pombos, quando o nível de melatonina plasmática está aumentado à noite, a atividade locomotora está diminuída, enquanto que, quando o nível de melatonina está baixo, durante o dia, a atividade locomotora está aumentada. Ebihara *et al.*, em 1983, observaram que a pinealectomia e a enucleação, realizadas conjuntamente, eliminam o ritmo circadiano de atividade locomotora de pombos submetidos a condições constantes de luminosidade tênue. Por outro lado, Foa e Menaker (1988) detectaram que a pinealectomia reduz significativamente a amplitude do ritmo de melatonina plasmática. Este ritmo desaparece totalmente quando os animais pinealectomizados são enucleados bilateralmente. Estes autores demonstraram que 70% do pico noturno de melatonina provem da pineal e 17% da retina, ficando 13% de melatonina cujo comprometimento com a ritmicidade ainda não está claro, de origem não identificada. Por outro lado, a administração diária de melatonina exógena em condições de livre curso sincroniza o padrão de atividade. Isto pode significar que a melatonina impõe ritmicidade aos sistemas cerebrais responsáveis pela geração dos padrões de atividade (Cassone, 1990). Ou seja, a melatonina seria um hormônio circadiano que transmite a informação temporal dos osciladores circadianos até estruturas cerebrais que controlam os comportamentos (Foa & Menaker, 1988).

A utilização de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina permitiu localizar os sítios cerebrais aos quais se liga a melatonina (Cassone, 1990). No cérebro de mamíferos, a ligação é relativamente restrita: retina (Krause & Dubocovich, 1990), NSQ, *pars tuberalis* da adenohipófise e área postrema. Sítios de ligação secundários foram localizados na pineal só em *hamsters* imaturos, núcleo talâmico paraventricular, *subiculum* e no hipocampo só em ovelhas (Cassone, 1990). Esta ligação restrita sugere que a melatonina teria funções centrais específicas claramente definidas. Em muitos casos, os sítios de ligação estão em regiões onde os efeitos fisiológicos e comportamentais da melatonina são bem conhecidos (Krause & Dubocovich, 1990). Receptores no NSQ seguramente mediam a função sincronizadora da melatonina sobre os ritmos biológicos. Já foi demonstrado que a melatonina inibe a atividade elétrica e metabólica destes núcleos (Cassone, 1990). Receptores nos núcleos paraventriculares do tálamo provavelmente regulam ritmos corporais, já que esta região recebe aferentes do NSQ e aparentemente envia eferente a estruturas límbicas (Krause & Dubocovich, 1990). O *pars tuberalis*/eminência média e a pituitária anterior provavelmente mediam efeitos neuroendócrinos, particularmente a conhecida ação da melatonina sobre as gônadas e tireóides. Na retina, os receptores estimulados pela melatonina local desencadeiam uma resposta de adaptação ao escuro (Krause & Dubocovich, 1990).

Em aves, os sítios de ligação de melatonina estão muito mais amplamente distribuídos do que em mamíferos. Estes predominam em estruturas associadas ao processamento visual, nos vários níveis de organização no sistema nervoso: retina, núcleos retinorreceptores

dos sistemas circadianos (homólogos ao NSQ de mamíferos), sistema visual tectofugal e sistema visual talamofugal, núcleos talâmicos e mesencefálicos do sistema visual tectofugal e *ectostriatum*, área integradora do sistema tectofugal, no telencéfalo. Em algumas espécies observou-se ligação de melatonina a células do núcleo oculomotor e a estruturas envolvidas na audição e vocalização (Rivkees *et al.*, 1989; Cassone, 1990) e em estruturas relacionadas ao comportamento emocional e às reações de alerta (Rivkees *et al.*, 1989). Algumas destas estruturas exibem um padrão circadiano de captação de 2-desoxiglicose (2-DG), aumentando durante o dia subjetivo e diminuindo durante a noite subjetiva, (dia e noite subjetivas referem-se à escala de tempo definida pelo sistema circadiano do próprio animal). Não se sabe se esta ritmicidade é endógena ou se é imposta por estruturas do sistema circadiano (pineal, retina, homólogo ao NSQ de mamíferos). Porém, sabe-se que a melatonina influencia esta ritmicidade, inibindo a captação de 2-DG quando administrada por injeção intramuscular de 10 ug/kg, duas horas antes das luzes serem desligadas (Cassone, 1990).

A liberação rítmica de melatonina na circulação durante a noite, a ampla distribuição de receptores de melatonina no cérebro das aves, e o efeito da melatonina na captação cerebral de 2-DG, sugerem, conjuntamente, uma função com variação circadiana das estruturas com sítios de ligação de melatonina (Rivkees *et al.*, 1989; Cassone, 1990). As perguntas de Cassone são: "Será que o contraste visual e a detecção de movimento seriam modulados em função do momento do dia? Será que as habilidades cognitivas das aves para processar informação derivada do sistema visual dependem do momento do dia?" (p 463). Por outro lado, relembando que em algumas espécies

de aves foi verificada ligação de 2-[¹²⁵I]-iodomelatonina em estruturas auditivas, poderíamos fazer as mesmas perguntas com respeito ao processamento auditivo das aves: Será que a detecção da intensidade, frequência e duração do estímulo sonoro é modulado em função do momento do dia? Será que, em aves, o processamento neural das informações derivadas do sistema auditivo, dependeria do momento do dia? Esta questão justifica-se, tendo em vista o dado de Rivkees *et al.* (1991), que mostra que uma variação circadiana no processamento de informação sensorial pode representar um importante mecanismo de adaptação às condições de luz-escuro em aves. Ao mesmo tempo, a existência de ligação de melatonina em estruturas associadas ao comportamento emocional e reações de alerta, permite supor que a melatonina modularia a função destas estruturas, e influenciaria, assim, os processos de aprendizagem ao longo das 24h.

II. Objetivo

Da mesma forma que os ritmos comportamentais são correlacionados com ritmos das diversas variáveis fisiológicas, é lógico pensar que todas ou parte destas variáveis interagem entre si, afetando o desempenho em situações de aprendizagem. Assim, a capacidade de aprendizagem de um animal, poderia variar ritmicamente como consequência da ritmicidade das numerosas variáveis circadianas. Neste sentido, é possível supor uma organização temporal na capacidade de aprendizagem. Com base nessas questões, o presente estudo pretendeu analisar, numa forma sistemática, os seguintes pontos:

1. As características do processo de habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros em pombos, em testes noturnos e matutinos, procurando determinar possíveis diferenças noite-dia.

2. O processo de habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros em pombos submetidos a condições de luz contínua, ou seja, com ausência do ciclo claro-escuro, procurando discutir as possíveis variáveis que atuariam no processo de habituação em diferentes horários.

III Experimentos

III.1 Experimento 1

III.1.1 Objetivo

A rapidez ou velocidade de locomoção dadas pela presença de asas aliadas à possibilidade de ter excelentes pontos de observação (do alto) dada pela capacidade de voar, correlacionam-se com a evolução de um complexo e acurado sistema visual (Toledo, 1989). Essa é uma razão básica para o fato de que estas aves tem sido muito usadas em estudos de sistema visual (Hamassaki, 1986). Deve-se considerar, porém, que uma forma de informação que cobre grandes distâncias são as ondas sonoras. A comunicação acústica é muito bem desenvolvida em aves e tem uma importante função intra e interespecífica. Apesar disto, a investigação da utilização de sons como fonte de informação por aves tomou um novo impulso somente a partir da última década (Becker, 1982; Toledo, 1989).

O pombo é um animal diurno, ou seja, o período de atividade concentra-se na fase clara do ciclo dia-noite. Sendo assim, a modalidade sensorial visual é um sistema que funciona com maior eficácia durante a fase clara. Isto poderia significar que durante a fase escura, como a capacidade visual estaria diminuída, a sensibilidade e eficiência das outras modalidades sensoriais poderia estar aumentada. Em outras palavras, durante a fase clara do dia o valor biológico de um estímulo auditivo, ou seja, a importância que esse estímulo tem para a sobrevivência da espécie, seria diferente do valor biológico desse mesmo estímulo durante a fase escura. Tal consideração coloca perguntas relativas às possíveis interações entre condições de

luminosidade, e significância de um estímulo sonoro, quando testado em situações de habituação

Por outro lado, a análise da literatura cronobiológica e a constatação de uma ampla distribuição de ritmos circadianos, a nível fisiológico e comportamental, gerou perguntas sobre a existência de ritmos circadianos na capacidade de aprendizagem. Assim, numa extensão do trabalho de Toledo (1989), que descreveu habituação a estímulos sonoros em pombos, o objetivo deste experimento foi identificar possíveis diferenças na habituação a estímulos sonoros nos períodos matutinos e vespertinos.

III.1.2. Materiais e métodos

Sujeitos

Foram utilizados 16 pombos adultos, mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso a alimento e a água, submetidos a um esquema de iluminação de 12h de luz e 12h de escuro (LE). Os animais foram distribuídos em dois grupos de oito pombos cada: um grupo denominado HAM-LE (habituação, manhã), com os testes pela manhã, e um segundo grupo denominado HAN-LE (habituação, noite), com os testes realizados à noite.

Equipamento

Foi usada uma caixa de observação (50x50x130cm) isolada acusticamente, iluminada com luz fluorescente (30 w) e com a porta frontal em vidro semi-espelhado. Os estímulos sonoros foram apresentados por meio de um alto-falante Novik 80-watts, localizado num canto superior da caixa. A caixa experimental

estava situada numa sala também isolada acusticamente. Para produzir um ruído de fundo, um circulador de ar permanecia ligado durante as sessões. O estimulador sonoro (Berger AS-109) estava localizado numa sala de controle adjacente, este por sua vez estava acoplado a um programador automático de intervalos que controlava a duração dos pulsos de estímulos e o intervalo entre eles. A medida da intensidade sonora foi feita com um sonômetro digital Bruel & Kjaer 2232.

Um equipamento VHS, para registros áudio-visuais, ligado a um aparelho de TV (Phillips) foi utilizado para a monitoração e gravação das sessões experimentais.

Procedimento

O procedimento geral incluiu a análise do processo de habituação dos comportamentos exploratórios em duas etapas definidas como teste e reteste da habituação.

O horário de testes foi definido pelo acender ou apagar das luzes do biotério: 7:30h, uma hora após o acender das luzes, para as sessões de manhã, e 19:30h, uma hora após o apagar das luzes para as sessões noturnas. Os animais foram colocados no biotério cinco dias, prévios a qualquer tipo de manipulação experimental, a fim de se adaptarem às condições do mesmo. Finalizado este período, ocorreu o processo da adaptação à manipulação e à caixa experimental, durante 15 dias. Este consistiu em colocar, cada animal, durante 20 minutos na caixa experimental, todos os dias em diferentes horários estabelecidos ao acaso. No dia anterior à primeira sessão o animal era colocado em adaptação no mesmo horário da sessão experimental do

dia seguinte

Os testes de habituação consistiram em duas sessões experimentais, com um intervalo entre sessões de 24h. Na primeira sessão, foi apresentado, a cada 30s, um pulso sonoro de 1s de duração, 1000-Hz e 83-dB (estímulo A). Na segunda sessão o estímulo A foi apresentado durante os 10 primeiros estímulos, sendo que a partir da décima-primeira tentativa foi apresentado o estímulo B, com 1s de duração, 500-Hz e 85-dB. Assim, cada sessão consistia numa sequência de estímulos que continuava até que o critério de habituação fosse verificado ou até que um máximo de 100 estímulos fossem apresentados. O critério de habituação estabelecia a ocorrência de 10 estímulos sucessivos sem que fossem observados comportamentos exploratórios e/ou pré-exploratórios. Onze dias após, reiniciava-se o processo de adaptação à manipulação e à caixa experimental durante sete dias. Finalizado este período, os pombos foram submetidos a retestes que consistiram no mesmo esquema anterior, só que os horários das sessões foram invertidos. Isto é para o grupo HAM, os retestes foram realizados à noite, e para o grupo HAN, pela manhã (Figura 2).

As sessões eram gravadas em equipamento de vídeo, ao mesmo tempo que os comportamentos correlacionados com os estímulos sonoros eram observados diretamente e anotados, a cada tentativa, em folhas de registros, por dois observadores independentes. Em caso de dúvidas sobre as anotações se procedia à discussão das observações em relação às gravações feitas e procedia-se à análise de fidedignidade entre as folhas de registros de ambos

observadores. O cálculo foi realizado da seguinte forma: somatória dos acordos dividida pela soma das omissões e desacordos; o valor obtido era multiplicado por cem.

Os comportamentos dos pombos eram observados e registrados segundo categorias de comportamentos previamente definidas (Ferrari, 1982; Toledo, 1989):

1. Exploratória: comportamentos concernentes à inspeção dos eventos ambientais. Inclui orientação a diferentes pontos do ambiente por meio da rotação da cabeça, fixação e/ou reações de alerta.

Rotação da cabeça: rotar a cabeça para um lado, 45 graus ou mais.

Fixação: o pombo mantém a cabeça e o olhar direcionados a um ponto fixo no ambiente, geralmente precedido por extensão restrita do pescoço, com ou sem inclinação da cabeça.

Alerta: extensão total do pescoço, com rotação e/ou inclinação lateral da cabeça de modo alternado e sucessivo.

2. Pré-exploratória: sobressaltos, estremelecimento do corpo e murchar, que precedem as reações exploratórias.

Sobressalto: contração generalizada e brusca da musculatura do tronco, e simultaneamente extensão do corpo inclinándolo no sentido ântero-posterior, combinado com inclinação dorsal da cabeça.

Murchar: contração generalizada e lenta da musculatura peitoral, de modo que, ao contrário do que ocorre no sobressalto, raramente existe a concomitante inclinação do corpo.

Estremelecimento do corpo: movimento rápido do corpo ou do tórax

em várias direções por um breve período

3. Movimentos isolados: como o próprio nome indica, são deslocamentos isolados e independentes de partes do corpo em relação ao próprio corpo sem que o animal se desloque no espaço. Incluem movimentos da cabeça, asa, cauda, no eixo látero-lateral (oscilação) ou vertical (balançar), no sentido pé-cabeça ou ântero-posterior.

4. Manutenção: comportamentos que implicam em cuidados do corpo como limpar, espreguiçar, coçar, bocejar, sacudir.

Bocejar: flexão dorsal do pescoço, abertura do bico com oscilação da cabeça, fechamento dos olhos e por último fechamento do bico.

Sacudir: oscilação e balançar rápido e sucessivo da cabeça ou corpo.

Coçar: aproximação de um pé ao corpo, encostar em algum ponto da sua superfície, seguido de extensão e flexão da perna, alternada e sucessivamente, sobre a região de contato.

Limpar: aproximação do bico ao corpo, encostar em algum ponto da superfície prendendo e soltando sucessivamente com o bico uma ou duas penas ou bicar, rápida e sucessivamente, uma região do corpo.

Espreguiçar: Movimento circular ântero-posterior de uma asa, imediatamente depois a extensão e flexão ventral do pescoço e cabeça, simultaneamente à extensão da perna oposta em direção ântero-posterior e a extensão da asa do mesmo lado do corpo

5. Locomoção: deslocamento do corpo no espaço ou pisoteio

6. Parado: ausência aparente de resposta

Os comportamentos que foram quantificados e analisados no presente estudo foram os agrupados na categoria exploratória e pré-exploratória.

Análise estatística

Foi utilizada a prova U de Mann-Whitney, não paramétrica, para determinar a diferença entre os grupos HAM-LE e HAN-LE, quanto à comparação de (a) experimentos (testes e retestes) realizados à noite e os realizados pela manhã; (b) entre os testes matutinos (HAM-LE) com os retestes matutinos (HAN-LE) e (c) entre os testes noturnos (HAN-LE) com os retestes noturnos (HAM-LE).

Foi também utilizada a prova de Wilcoxon para determinar a diferença entre as primeiras e segundas sessões tanto nos testes como nos retestes.

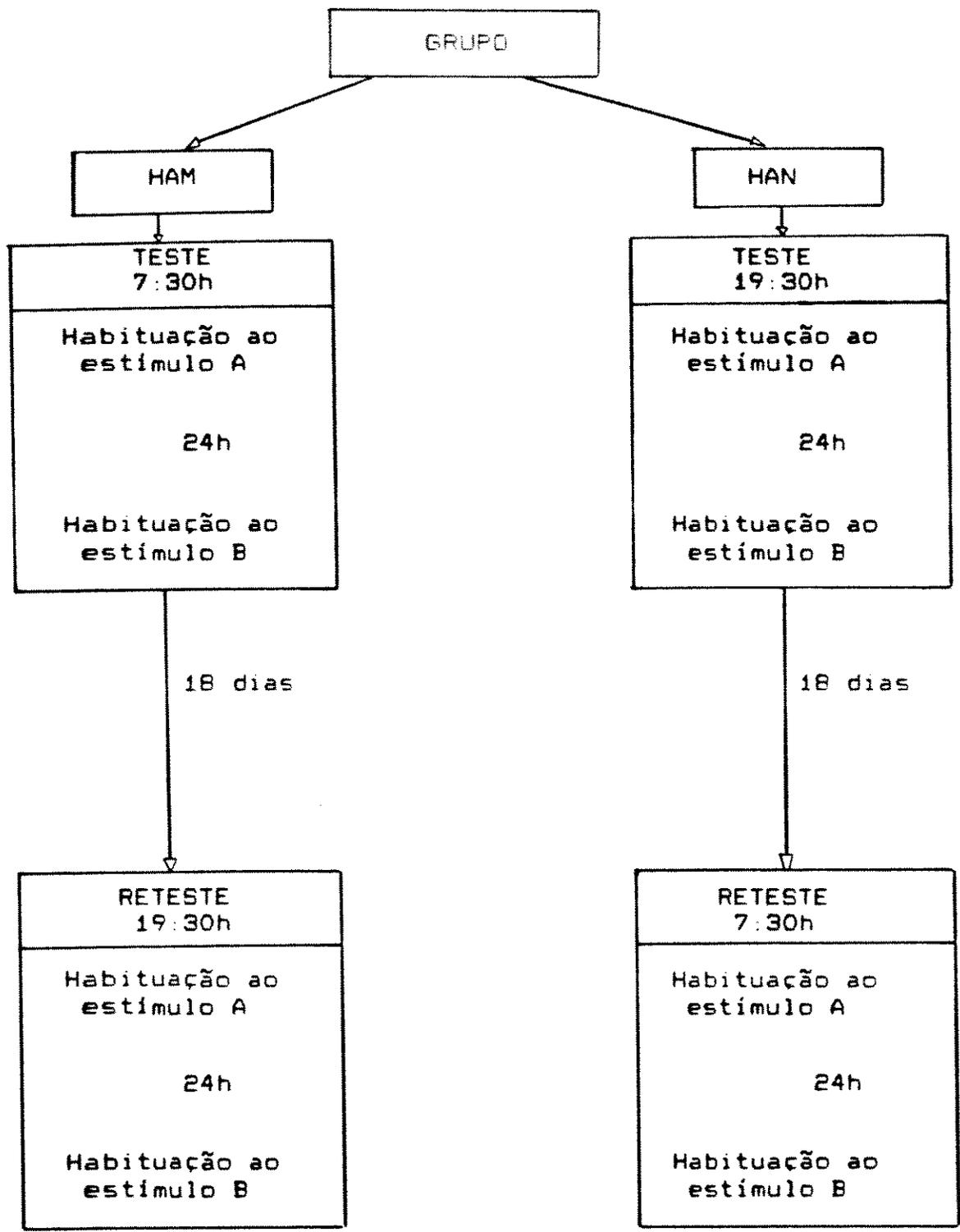


Figura 2. Fluxograma do procedimento experimental básico
 Estímulo A: 1000-Hz, 83-dB e 1-s. Estímulo B: 500-Hz, 85-dB e 1s

III.1.3 Resultados

A análise da habituação da resposta exploratória aos estímulos sonoros foi feita considerando a somatória dos itens exploratórios e pré-exploratórios, a partir a qual foram elaboradas as curvas de habituação, individuais e médias. Para quantificar o nível médio de resposta por estímulo em cada sessão, calculou-se a média da razão entre a somatória das respostas exploratórias e pré-exploratórias e o total de estímulos apresentados na sessão ($\sum \text{EXP+PRE} / \sum \text{ESTIMULOS}$). Foi também considerado o nível inicial de resposta, ou seja, o número de respostas exploratórias e pré-exploratórias registradas nos cinco primeiros estímulos. A avaliação quantitativa do processo de habituação foi feita considerando o tempo (ou o número de ocorrências de estímulos) necessário para que as reações exploratórias atingissem nível zero por um período de cinco minutos, ou seja, dez estímulos sucessivos, segundo o critério experimental de habituação utilizado.

A Figura 3 apresenta as médias dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, mais o erro padrão da média, obtidas por blocos de cinco estímulos sonoros, na situação de teste e reteste dos grupos HAM e HAN submetidos à condição LE. Pombos do grupo HAM, com testes realizados pela manhã, apresentaram uma diminuição gradual de comportamentos em função da repetição dos estímulos, atingindo o critério de habituação. O número médio de estímulos necessários para habituação é de 80, na primeira sessão, e de 70 para a segunda sessão. Os pombos do grupo HAN, com testes realizados à noite, apesar de apresentarem

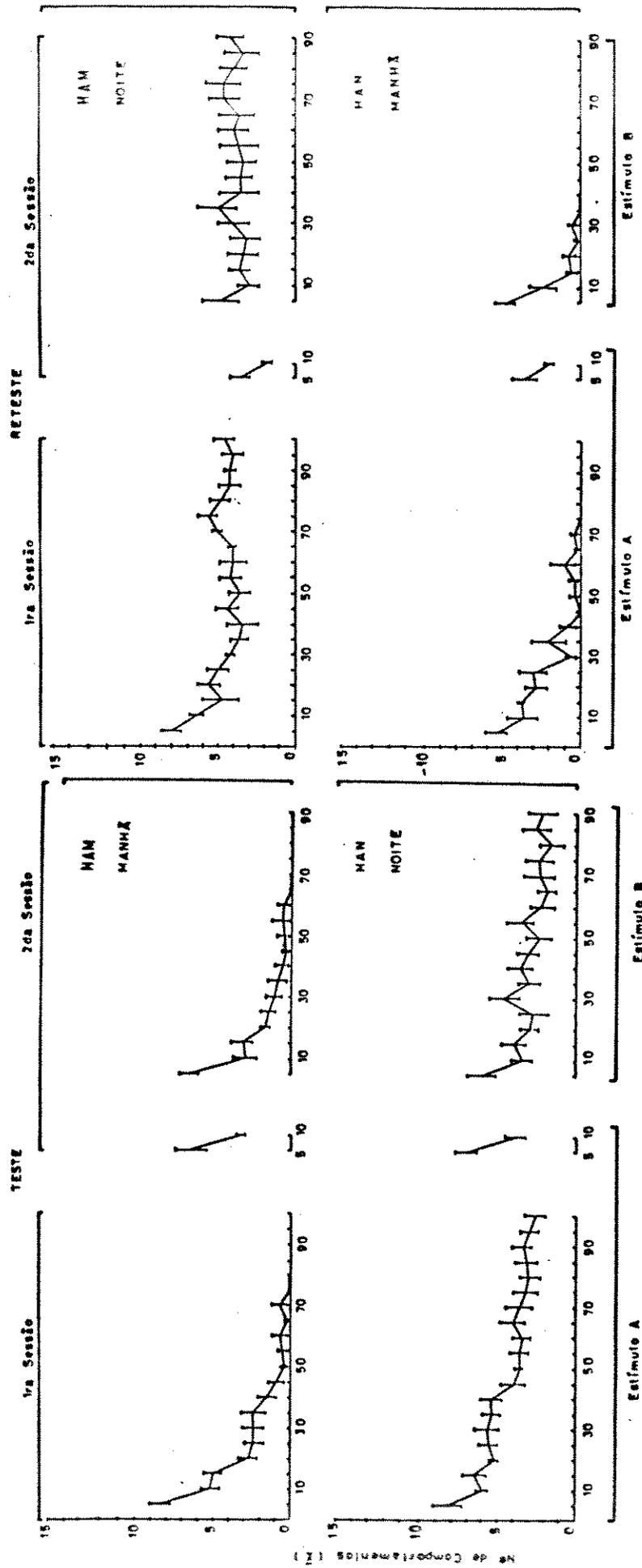


Figura 3. Médias da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por bloco de 5 estímulos, obtidas nos Testes e Retestes dos grupos HAM e MANH da condição LE. Barras verticais representam o erro padrão da média.

uma diferença no número de comportamentos registrados nos primeiros e nos últimos blocos de tentativas, indicando uma diminuição de comportamentos, não atingiram o critério experimental de habituação. Assim, foram expostos a 100 estímulos em cada uma das sessões (Figura 4). O grupo HAM, quando retestado em sessões experimentais noturnas, não mostrou as curvas típicas de habituação, contrariamente ao que foi observado nos testes matutinos. De modo inverso, o grupo HAN, agora exposto a sessões matutinas, mostrou uma curva típica de habituação ao som, com diminuição gradual de comportamentos durante a sessão.

Comparando o nível inicial de resposta (Tabela 1) dos retestes matutinos do grupo HAN, com os resultados dos testes matutinos do grupo HAM, observa-se que em ambas as sessões do reteste os valores são menores, em torno de cinco comportamentos por bloco, enquanto que no teste, os valores são em torno de 8,5 comportamentos por bloco na primeira sessão e 6,5 na segunda sessão ($U=6$; $p=0,023$ e $U=8,5$; $p=0,0555$; Ver Figura 5)

Tabela 1. Nível médio inicial de resposta, mais o erro padrão médio, na condição LE, para os grupos HAM (habituação, manhã) e HAN (habituação, noite).

GRUPO	TESTE		RETESTE	
	Estímulo A	Estímulo B	Estímulo A	Estímulo B
HAM	8,37 ± 0,64	6,75 ± 0,55	8,00 ± 0,63	4,8 ± 1,18
HAN	8,25 ± 0,93	6,12 ± 0,96	5,40 ± 0,72	4,8 ± 0,77

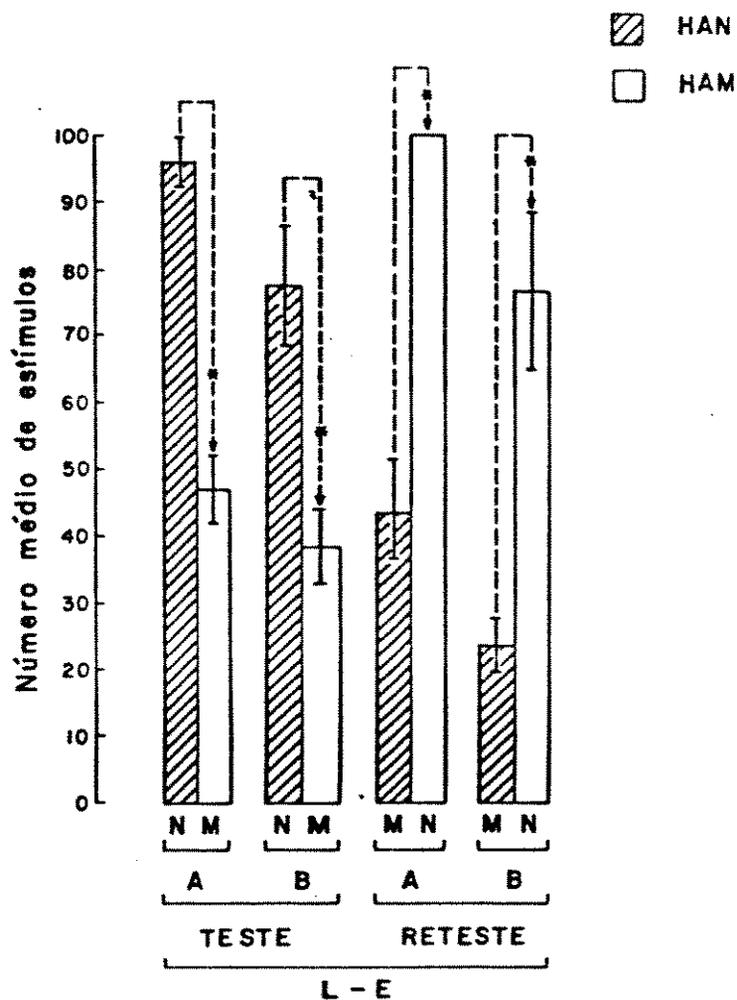


Figura 4. Número médio de estímulos necessários para atingir o critério de habituação, mais o erro padrão da média, obtidos nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, da condição LE. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

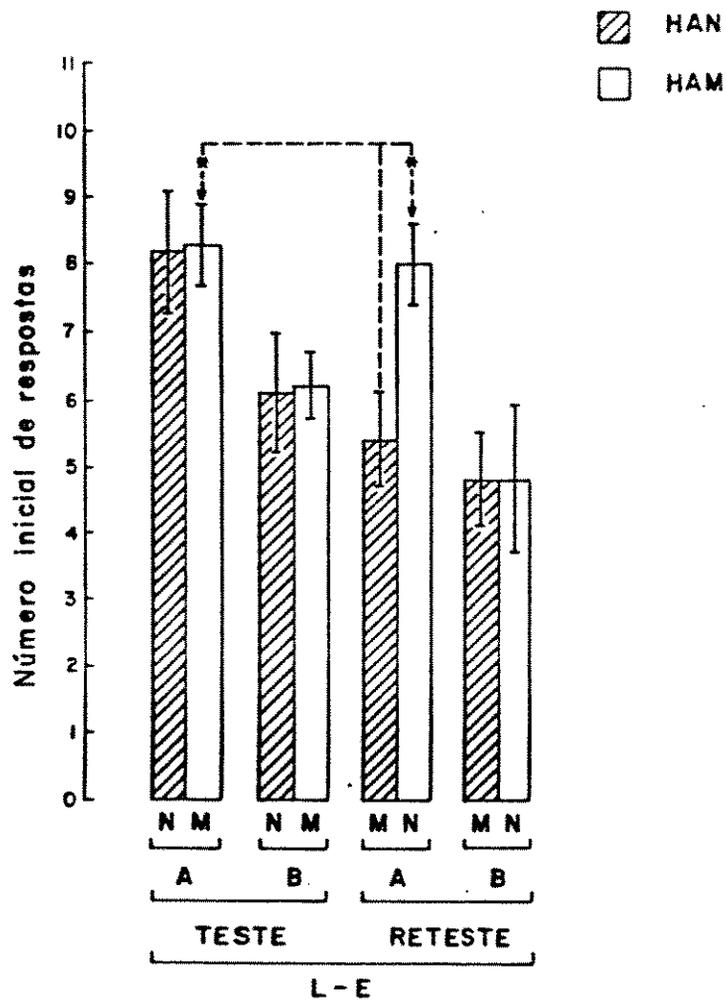


Figura 5. Número médio do nível inicial de resposta, mais o erro padrão da média, nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, da condição LE. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

Com relação ao número de estímulos necessários para a habituação, a mesma comparação mostra que no reteste com o estímulo B, o grupo HAN habitou com um número menor de estímulos (40 tentativas) em relação à segunda sessão do Teste do grupo HAM com 70 tentativas ($U=8,5$; $P=0,0555$; Ver Figura 4). A mesma tendência de diminuição dos valores comportamentais entre os retestes matutinos do grupo HAN e o teste matutino do grupo HAM, é observada com relação ao nível médio de resposta por estímulo, como mostrado na Tabela 2. Nos testes matutinos, o nível geral de respostas foi de 0,65 na primeira sessão e 0,53 na segunda sessão. Nos retestes matutinos, observa-se uma diminuição do nível de resposta, com valores de 0,54 e 0,39 respectivamente, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ($U=14,5$; $p=0,2395$ e $U=12$; $p=0,142$; Ver Figura 6). Entre os retestes e testes noturnos não se observa diferença.

Tabela 2. Nível médio de resposta por estímulo ($\frac{EXP+PRE}{Estímulos}$), mais o erro padrão médio, obtidos na condição LE, para os grupos HAM (habituação, manhã) e HAN (habituação, noite).

GRUPO	TESTE		RETESTE	
	Estímulo A	Estímulo B	Estímulo A	Estímulo A
HAM	$0,65 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,07$	$0,79 \pm 0,17$
HAN	$0,91 \pm 0,07$	$0,66 \pm 0,12$	$0,54 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,05$

A Figura 7 mostra as curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios por blocos de cinco estímulos obtidas nos testes e retestes do grupo HAN da

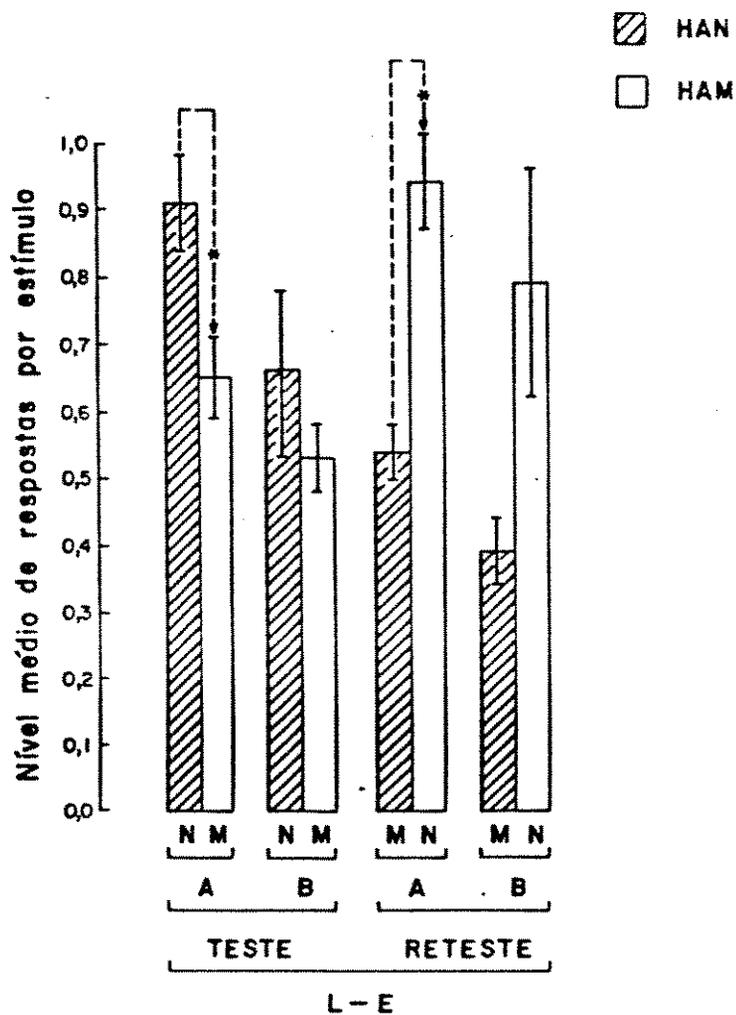


Figura 6. Nível médio de resposta por estímulo ($\frac{\sum \text{EXP} + \text{PRE}}{\sum \text{Estimulos}}$), mais o erro padrão da média, obtidos nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, da condição LE. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

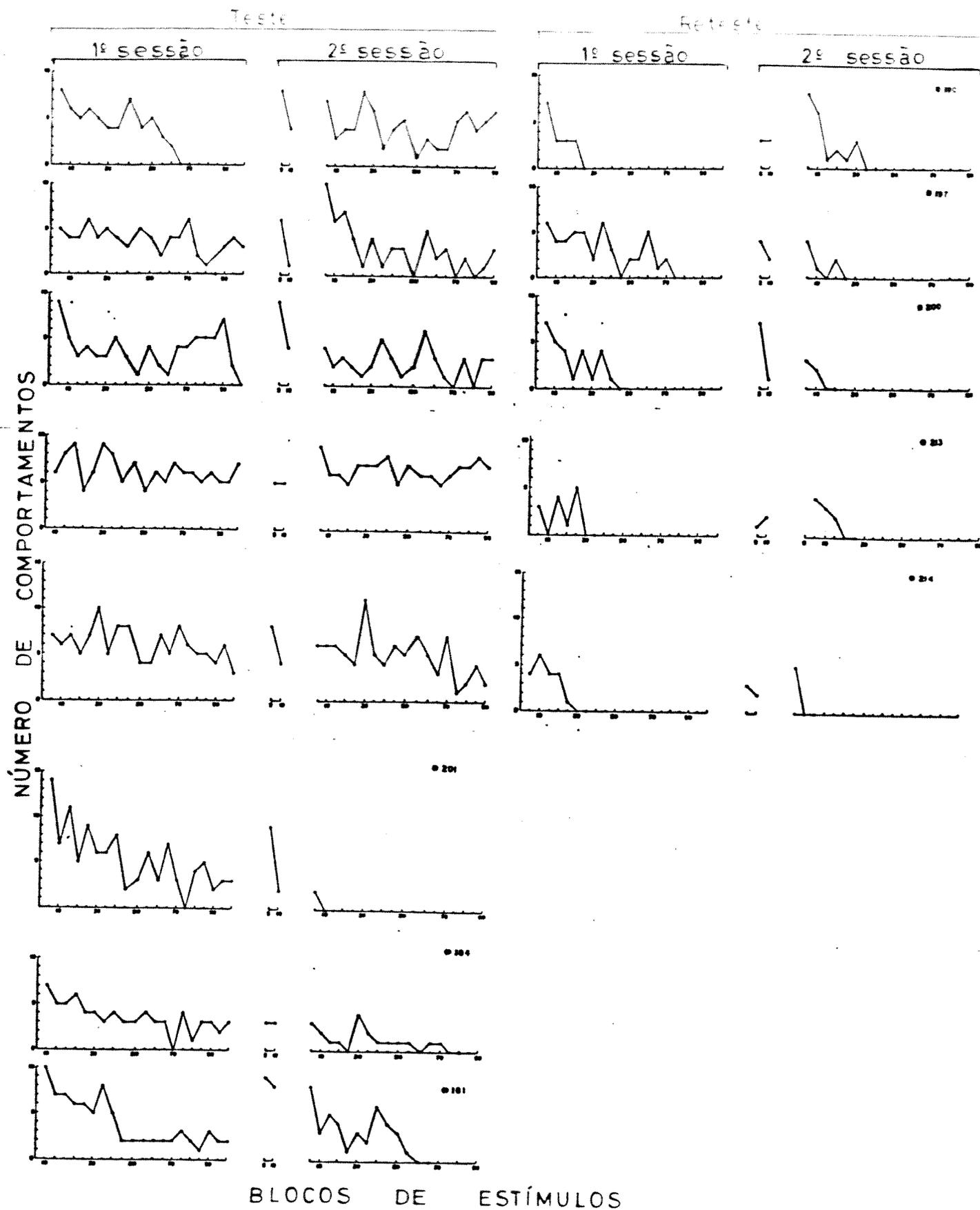


Figura 7. Curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes do grupo HAN da condição LE. O número à direita identifica cada indivíduo.

condição LE Os pombos 201, 184 e 181 não foram retestados devido à perda dos animais por morte ou fuga depois dos testes. Na primeira sessão dos testes observa-se uma diminuição de comportamentos em função da repetição dos estímulos, porém não é atingido o critério de habituação. Somente o pombo 180 habitou, embora com um número elevado de estímulos (70 tentativas). Na segunda sessão do teste, a situação é semelhante à primeira, dado que cinco pombos não atingiram o critério de habituação e dois sujeitos, o pombo 184 e o pombo 181, habituaram com um número elevado de tentativas, respectivamente, 80 e 65 tentativas. Apenas um pombo diferenciou-se marcadamente dos outros, o pombo 201 que atingiu o critério com 15 tentativas. Nas primeiras e segundas sessões dos retestes matutinos houve habituação com um número reduzido de estímulos (entre 15 e 50 estímulos), em todos os casos. Unicamente o pombo 197, demorou mais para habituar na primeira sessão, alcançando 80 estímulos.

A Figura 8 mostra as curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios por blocos de cinco estímulos obtidas nos testes e retestes do grupo HAM da condição luz-escuro. Os pombos 179, 199 e 204 não foram retestados devido à perda dos animais por morte ou fuga. Nas primeiras sessões dos testes matutinos, observa-se habituação com um número de estímulos variando entre 30 e 55, exceto para os pombos 194 e 185 que habituaram com 80 estímulos. As segundas sessões de habituação mostram uma variação entre 15 e 55 estímulos, com exceção do pombo 204 que atingiu o critério com 70 estímulos. Nas duas sessões de retestes à noite, os dados

mostram que houve habituação apenas para o pombo 198, na segunda sessão, com 25 tentativas. Os demais sujeitos não atingiram o critério experimental e continuaram apresentando exploração ao som até o final da sessão.

III.1.4. Discussão

A análise das curvas médias e individuais dos pombos da condição LE, indica claramente que existe uma diferença no tempo necessário para habituar e na ocorrência da habituação a pulsos de estímulos sonoros em pombos, em função do horário das sessões experimentais. Nos testes matutinos do grupo HAM, os animais atingem o critério experimental de habituação, a maioria entre 15 e 50 estímulos, exibindo uma curva típica de aceleração negativa. Esses dados concordam com o primeiro dos nove clássicos parâmetros característicos da habituação: "Dado que um estímulo particular elicia uma resposta, repetidas aplicações do estímulo resultam num decréscimo da resposta. O decréscimo é usualmente uma função exponencial negativa do número de apresentações do estímulo" (Thompson & Spencer, 1966). Contudo, nos testes noturnos do grupo HAN, apesar de os animais apresentarem uma diminuição da resposta exploratória, observa-se que continuam respondendo aos estímulos sonoros até o fim das sessões. Assim, esses dados parecem discordar do primeiro parâmetro da habituação. O que é mais interessante, os pombos do grupo HAM, que mostraram habituação nas sessões de testes, quando retestados à noite, 18 dias depois, não apresentaram habituação, continuando respondendo até o final da sessão experimental. Este comportamento não seria o esperado segundo os parâmetros 1 e 3 de

Thompson & Spencer (1966). Ou seja, nos retestes do grupo HAM, os animais passam pela terceira e quarta sessões de habituação, porém, não se observa o decréscimo da resposta postulado no primeiro parâmetro e observado claramente nos testes matutinos destes animais. Da mesma forma, não se observa a habituação sucessivamente mais rápida postulada no terceiro parâmetro de habituação: "se repetidas séries de treinamento de habituação e recuperação espontâneas forem dadas, a habituação tornar-se-á sucessivamente mais rápida".

O procedimento experimental nos permite também verificar, nas sessões matutinas, o segundo parâmetro: "Se o estímulo é suprimido, a resposta tende novamente a reaparecer", pois atingido o critério de habituação na primeira sessão, esta era interrompida. O mesmo procedimento era repetido 24 h após (segunda sessão), quando foi observada a recuperação da resposta. Nas sessões noturnas, o nível de resposta não chega a zero, porém é possível observar que o número de comportamentos apresentados no início da segunda sessão (primeiro bloco de cinco estímulos) é maior que o último bloco da primeira sessão, observando assim uma pequena recuperação da resposta. O experimento constou ainda, da apresentação de um outro estímulo, semelhante ao primeiro onde a frequência do som era 50% menor que o primeiro (estímulo B). Segundo o oitavo parâmetro: "A apresentação de um outro estímulo (normalmente forte) resulta num reaparecimento da resposta habituada". Se continuamos comparando primeiras e segundas sessões, tanto à noite como de manhã, observa-se que o tempo necessário para os sujeitos atingirem o

critério de habituação com o estímulo B, foi menor quando comparado ao estímulo A, dados que estão em concordância com o terceiro e sétimo parâmetros, respectivamente. "Se repetidas séries de treinamento de habituação e recuperação espontâneas forem dadas, a habituação tornar-se-á sucessivamente mais rápida" e "A resposta de habituação para um dado estímulo exhibe uma generalização para outro estímulo".

Neste sentido, os dados são interessantes não apenas por demonstrarem o processo de habituação em pombos e replicarem dados da literatura (Sharpless & Jasper, 1956; Scourse & Hinde, 1972; Adamo & Bennett, 1967; Hamassaki, 1986; Toledo, 1989), mas também porque tais evidências experimentais sugerem discussões de interesse em relação a uma possível organização temporal da habituação em pombos, que poderia refletir uma ritmicidade circadiana na capacidade de aprendizagem. Assim, poder-se-ia considerar que a interação dos numerosos ritmos circadianos das diversas variáveis fisiológicas, tais como o nível plasmático de determinados hormônios, estariam alterando o estado do organismo. Dessa forma, estes reagiriam diferentemente a um mesmo estímulo quando aplicados em diferentes momentos do dia. Esta mudança na capacidade de responder poderia dever-se a modificações a nível celular, por exemplo, modificação no número de receptores de algum hormônio ou modificação no metabolismo celular, que poderiam levar ao aumento ou diminuição do limiar de resposta.

Nessa linha de raciocínio, pode se lembrar que a secreção e a produção de melatonina exibem um padrão circadiano (Ebihara *et al.*, 1983; Cassone, 1990); e já foram encontrados sítios de ligação de melatonina em estruturas neurais que fazem parte de

sistemas envolvidos na audição, no comportamento emocional e no estado de alerta (Rivkees *et al.*, 1989, Cassone, 1990) Esses três sistemas poderiam ter uma marcada influência na habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros: o sistema auditivo pela sua óbvia intervenção na detecção e processamento de informação auditiva e, os dois últimos, pela sua intervenção na motivação da aprendizagem. A existência de sítios de ligação de um hormônio, que é produzido e secretado com um padrão circadiano, estaria falando a favor de uma função circadiana destas estruturas. Tal consideração baseia-se em ser a melatonina liberada durante a escotofase. O aumento noturno na atenção ao som poderia estar sendo mediado pela melatonina. Dawson *et al.* (1986) estudaram em ratos, o efeito da pinealectomia na atenção a estímulos visuais, auditivos e somatossensoriais. Os resultados sugeriram que a glândula pineal funciona como um sistema neuroendócrino central, cuja ação em processos de atenção resultaria no maior processamento de estímulos visuais e auditivos. Embora a pineal sintetize e secrete numerosos produtos, poderíamos tentar relacionar estes resultados com a secreção de melatonina. À noite a presença de melatonina plasmática poderia estar aumentando a atenção dos animais aos estímulos auditivos dificultando o processo de habituação.

Poderíamos dizer que as estruturas neurais envolvidas no processo de aprendizagem estão sendo continuamente influenciadas pelas numerosas substâncias liberadas no meio interno como neurotransmissores e hormônios. Ao mesmo tempo, estas estruturas

são afetadas pelos mecanismos celulares subjacentes à aprendizagem e memória, mecanismos que determinam que as modificações observadas no comportamento perdurem no tempo. Esses efeitos de longo prazo podem ser observados nas curvas médias e nas individuais, que mostram uma diferença entre os retestes matutinos do grupo HAN com os testes matutinos do grupo HAM. Nos retestes matutinos do grupo HAN, o nível inicial de resposta, o nível médio de resposta por estímulo, bem como o número de estímulos necessários para habituação são menores, em relação às sessões do teste. Isto poderia ser devido ao efeito de uma memória a longo prazo que se manifestaria no reteste. É importante lembrar que o reteste do estímulo B constitui a quarta sessão de habituação a que foram submetidos os pombos. Ou seja, em contatos sucessivos com o estímulo, as reações exploratórias recuperam-se cada vez menos e tendem a apresentar níveis de resposta cada vez menores em instantes correspondentes. O decremento progressivo da atividade exploratória de evolução lenta (da ordem de horas ou dias), identifica a chamada habituação a longo prazo (Ribeiro do Valle, 1982) e corresponde ao terceiro parâmetro de Thompson & Spencer (1966). Este princípio se constata, ao observar os testes e retestes do grupo HAN. Porém, entre o teste à noite do grupo HAN e o reteste à noite do grupo HAM, não se observa a mesma diferença. No reteste do grupo HAM aparentemente não se manifestam os efeitos de uma memória a longo-prazo. A interação com fatores fisiológicos, tais como níveis plasmáticos de hormônios e outros ritmos circadianos, poderiam estar alterando a expressão do aprendizado da habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros.

Os dados também chamam atenção para a importância biológica do som no comportamento diurno e noturno em pombos. A diferença matutina-vespertina na capacidade de habituação a estímulos sonoros poderia estar confirmando o ponto levantado nos objetivos deste experimento. Ou seja, a significância de um estímulo, além de depender da bagagem genética (história filogenética) do animal e da aprendizagem prévia (história ontogenética), varia segundo as características do meio ambiente, neste caso a condição de iluminação. À noite, o significado biológico do som seria maior e isto poderia causar um efeito de mascaramento na expressão do ritmo. Considera-se que há mascaramento quando o sinal externo produz um efeito na manifestação do ritmo, porém sem interferir no oscilador responsável ou quando, além de influenciar diretamente o marcapasso, tem efeitos adicionais na expressão rítmica do mesmo (Aschoff, 1979; Waterhouse & Minors, 1987; Cipolla-Neto et al., 1988). O grau de modificação do ritmo por mascaramento positivo ou negativo, depende do modo e da intensidade do estímulo externo assim como da sensibilidade do organismo ao estímulo (Aschoff, 1988). Neste sentido, pode ser que a diferença noite-dia observada no experimento se deva a uma exacerbação do padrão de atividade dos pombos testados à noite, em função da significância do estímulo auditivo. Isto determinaria uma maior atenção e mais reatividade ao estímulo sonoro durante as sessões noturnas.

A interação entre o valor biológico de eventos e a ritmicidade comportamental é bem ilustrada por Saunders (1982). Respeitando as diferenças, a memória temporal foi muito bem

estudada em abelhas (Apis mellifera) Esta é descrita como um ritmo circadiano endógeno, com propriedades comuns a todos os sistemas circadianos, aparentemente regulada por, pelo menos, dois relógios biológicos. O seu significado adaptativo está em permitir às abelhas retornarem a uma fonte de alimento conhecida na hora em que o néctar e o pólen estão disponíveis e, portanto, maximizar a produtividade. Uma vantagem do relógio ser oscilatório é que as abelhas podem permanecer na colméia um ou dois dias devido a más condições atmosféricas e ainda "lembrar" o horário em que uma determinada espécie de planta secreta néctar. O fato de que o ritmo é extinto quando não há reforçamento positivo, também tem importância biológica, dado que existe variabilidade na disponibilidade de fontes de nectar (Saunders, 1982).

III 2 Experimento 2

III 2 1 Objetivo

Uma das perguntas levantadas no transcurso do Experimento 1 foi que nas sessões realizadas à noite, tira-se o animal de um meio escuro no biotério, no qual está em repouso, colocando-o numa caixa experimental iluminada. Este procedimento implica numa mudança muito brusca, e provavelmente estaria produzindo um estresse. Teríamos, assim, uma variável a mais, o estresse, que poderia estar interferindo no processo de habituação, dificultando sua ocorrência nas sessões noturnas. Assim, um dos objetivos deste experimento foi tentar analisar esta possibilidade. Neste sentido, procurou-se um procedimento que eliminasse a mudança brusca provocada ao trasladar os animais do biotério escuro à caixa experimental iluminada.

Por outro lado, considerando a bibliografia (Ebihara *et al*, 1983; Cassone, 1990; Norgren, 1990; Krause & Dubocovich, 1990) que ressalta o papel importante da melatonina na maioria dos ritmos circadianos, questionou-se qual seria a função deste hormônio na diferença noite-dia na habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros observada no Experimento 1. Sabe-se que a luz inibe a síntese e a secreção de melatonina pela ação direta na retina e na pineal, ou pela ação indireta através de fotorreceptores encefálicos extrapineais (Ebihara *et al*, 1984 e 1987). Desse modo, uma forma clássica de regular o sistema de melatonina é a alteração do fotoperíodo modificando o momento e/ou duração do estímulo luminoso (Krause & Dubocovich, 1990). Assim, considerou-se que o nível de melatonina plasmática dos animais poderia ser reduzido se estes fossem colocados em luz

contínua. Neste sentido, a manutenção dos sujeitos em luz contínua teria um duplo efeito: eliminação da mudança brusca do escuro para o claro e redução dos níveis de melatonina.

Com base em tais considerações, o objetivo deste experimento foi verificar se os pombos submetidos à luz contínua, continuariam a apresentar diferenças na ocorrência e na velocidade de habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros, em função dos horários das sessões experimentais.

III.2.2. Materiais e métodos

Sujeitos

Foram utilizados 12 pombos adultos, mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso a alimento e água, em esquema de luz contínua. Os pombos foram distribuídos em dois grupos: um com sessões de habituação pela manhã (HAM), e luz contínua (LL), grupo HAM-LL, e outro com sessões de habituação à noite (HAN), e luz contínua, grupo HAN-LL.

Equipamento

Foram utilizados os mesmos equipamentos e as mesmas condições experimentais descritas para o Experimento 1.

Procedimento

Os animais foram alojados numa outra sala independente do biotério, que permanecia as 24h do dia com luz artificial. Esta sala possuía duas janelas com vidros transparentes (1,65x0,85m), que permaneceram abertas o tempo todo. Os animais foram colocados

nesta sala por cinco dias prévios a qualquer tipo de manipulação experimental, a fim de se adaptarem às condições da mesma. O procedimento geral foi o mesmo que o utilizado para o Experimento 1 (ver Figura 2).

Análise estatística

Foi utilizada a prova U de Mann-Whitney, não paramétrica, para analisar a significância da diferença entre os grupos HAM-LL e HAN-LL, quanto à comparação de (a) experimentos realizados pela manhã e os realizados à noite; (b) entre os testes matutinos (HAM-LL) com os retestes matutinos (HAN-LL); (c) entre os testes noturnos (HAN-LL) com os retestes noturnos (HAM-LL) e (d) entre os experimentos da condição LE com os experimentos da condição LL. Foi também utilizada a prova de Wilcoxon para verificar a diferença entre as primeiras e segundas sessões, tanto nos testes como nos retestes.

III.2.3. Resultados

Como no Experimento 1, os dados foram organizados considerando a somatória dos itens exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, a partir do qual foram elaboradas as curvas de habituação, individuais e médias. Para quantificar o nível médio de resposta por estímulo em cada sessão, calculou-se a média da razão entre a somatória das respostas exploratórias e pré-exploratórias e o total de estímulos apresentados na sessão ($\sum \text{EXP+PRE} / \sum \text{ESTIMULOS}$). Foi também considerado o nível inicial de resposta, ou seja, o número de respostas exploratórias e pré-exploratórias registradas

nos cinco primeiros estímulos. A avaliação quantitativa do processo de habituação foi feita considerando o tempo (ou o número de ocorrências de estímulos) necessário para que não fossem observadas reações exploratórias por um período de cinco minutos ou seja dez estímulos sucessivos, segundo o critério experimental de habituação.

A Figura 9 apresenta as médias dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios mais o erro padrão médio, por bloco de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes dos grupos HAM-LL e HAN-LL. Pombos do grupo HAM-LL, com testes realizados pela manhã, apresentaram habituação ao som, com uma diminuição de comportamentos em função da repetição dos estímulos. O número médio de estímulos necessários até a habituação foi de 50 estímulos na primeira sessão e 35 estímulos na segunda. Assim, o número de tentativas da condição HAM-LL foi menor em relação ao número médio de estímulos da condição HAM-LE ($U=5$; $p=0,036$ e $U=7$; $0,033$; Ver Figura 10). O valor médio do nível inicial de resposta no grupo HAM-LL foi menor em relação ao grupo HAM-LE: 7,5 na primeira sessão e 3,5 na segunda sessão (Ver Tabela 3 e Figura 11) e o número médio de respostas foi de 0,5 e 0,28 repostas por estímulo respectivamente para as duas sessões (ver Tabela 4 e Figura 12). As comparações entre os grupos HAM-LL e HAN-LE, quanto aos níveis iniciais e gerais de resposta, indicaram diferenças estatísticas significativas, somente nas segundas sessões ($U=1$; $p=0,04$ e $U=2,5$; $p=0,0115$ respectivamente).

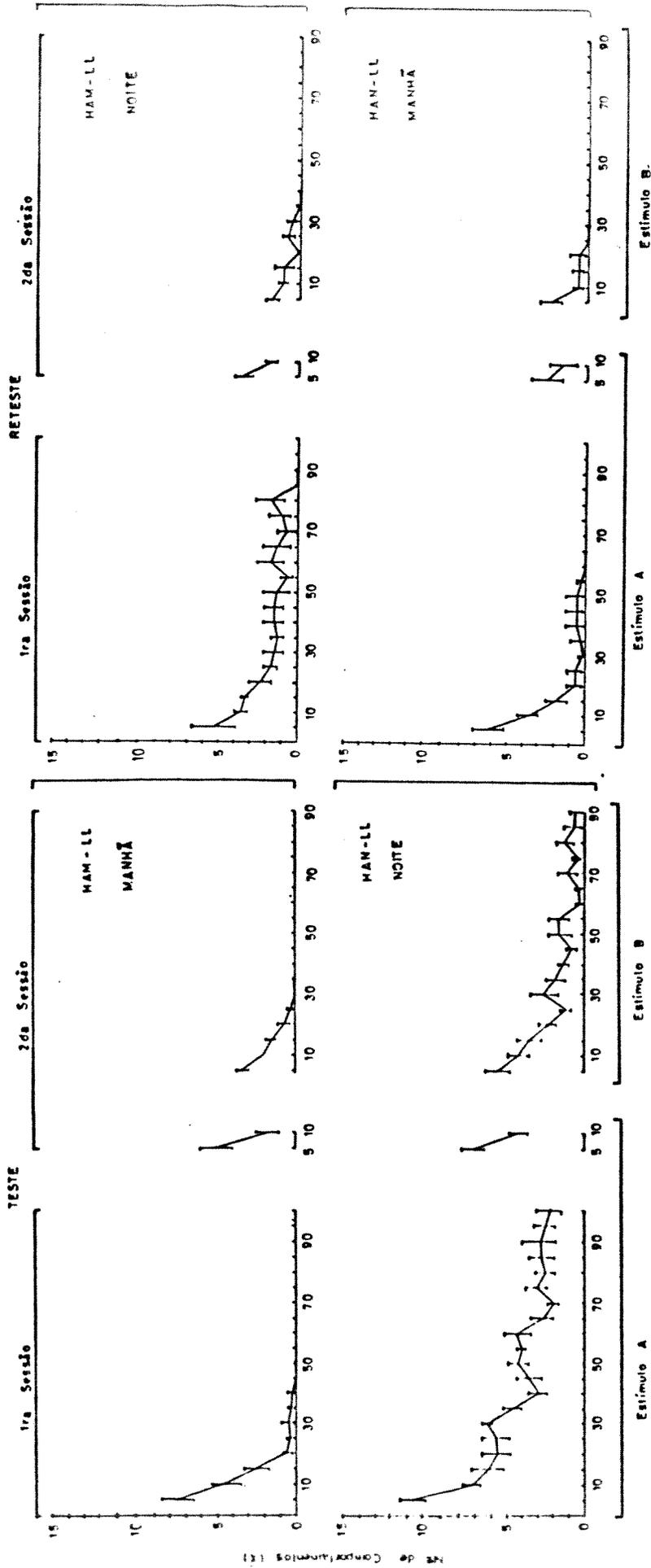


Figura 9. Médias da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidas nos Testes e Retestes dos grupo HAM e HAN da condição LL. Barras verticais representam o erro padrão da média.

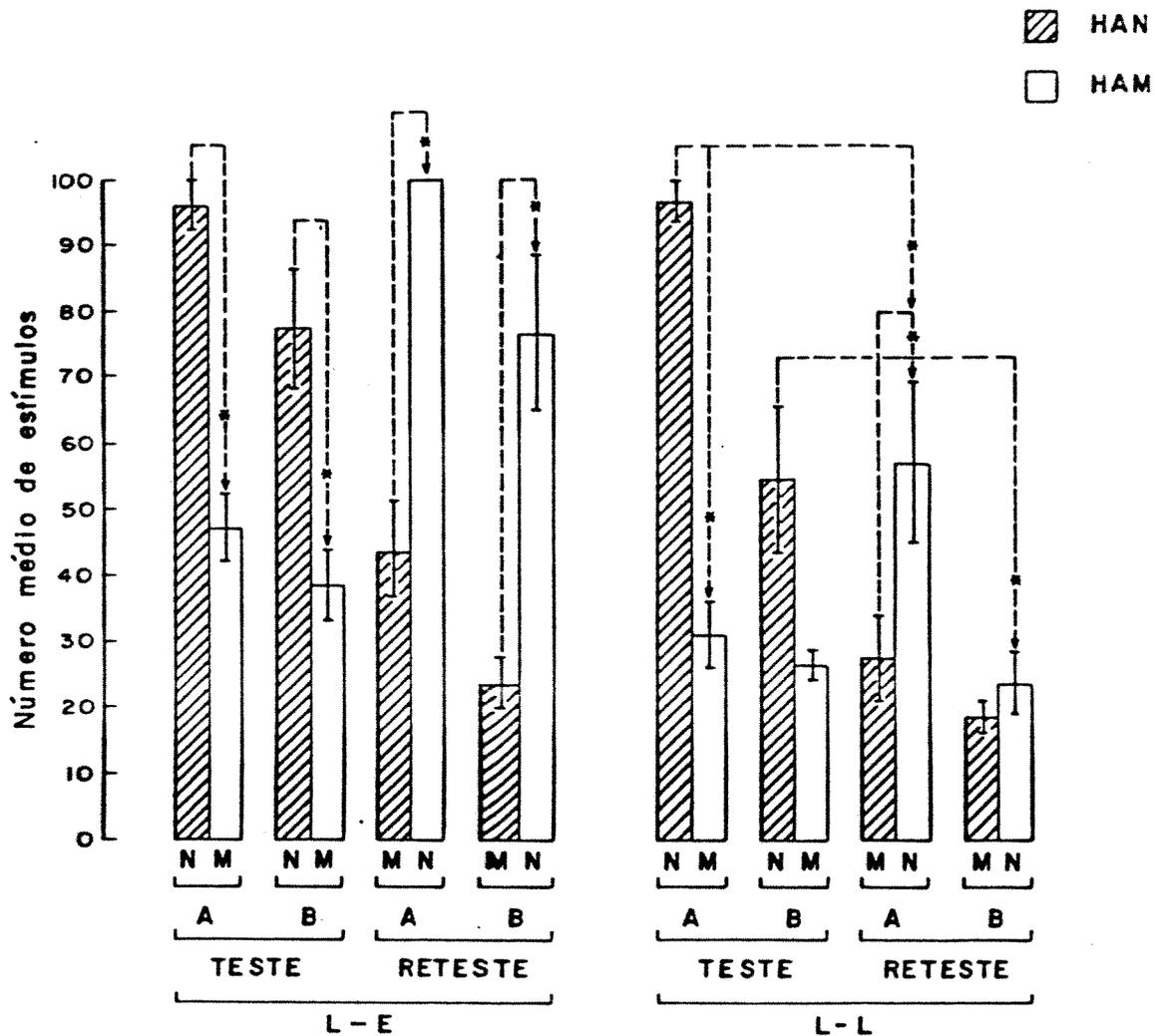


Figura 10. Número médio de estímulos necessários para atingir o critério de habituação, mais o erro padrão da média, nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, das condições LE e LL. Ambas condições são ilustradas juntas a fim de facilitar a comparação. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

Tabela 3. Nível inicial de resposta, mais o erro padrão médio, obtidos na condição LL, para os grupos HAM (habituação, manhã) e HAN (habituação, noite)

GRUPO	TESTE		RETESTE	
	Estímulo A	Estímulo B	Estímulo A	Estímulo B
HAM	7,50 ± 1,03	3,25 ± 0,41	5,25 ± 1,24	2,00 ± 0,50
HAN	10,67 ± 0,84	5,50 ± 0,87	7,16 ± 0,68	2,33 ± 0,73

Tabela 4. Nível médio de resposta por estímulo ($\sum \text{EXP} + \text{PRE} / \sum \text{Estimulos}$), mais o erro padrão médio, obtidos na condição LL, para os grupos HAM (habituação, manhã) e HAN (habituação, noite).

GRUPO	TESTE		RETESTE	
	Estímulo A	Estímulo B	Estímulo A	Estímulo B
HAM	0,50 ± 0,05	0,28 ± 0,02	0,44 ± 0,05	0,18 ± 0,03
HAN	0,87 ± 0,09	0,50 ± 0,09	0,63 ± 0,05	0,22 ± 0,05

Os pombos do grupo HAN-LL, com testes realizados à noite, apesar de apresentarem uma diferença no número de comportamentos registrados nos primeiros e nos últimos blocos de estímulos, indicando uma diminuição de comportamentos, não atingiram o critério experimental de habituação (Figura 9 e 10). O nível médio de resposta por estímulo do grupo HAN-LL, apresentou um valor médio de 0,87 e 0,5 respostas por estímulo, nas duas sessões respectivamente. As amplitudes das respostas são menores a aquelas obtidas no grupo HAN-LE embora não seja

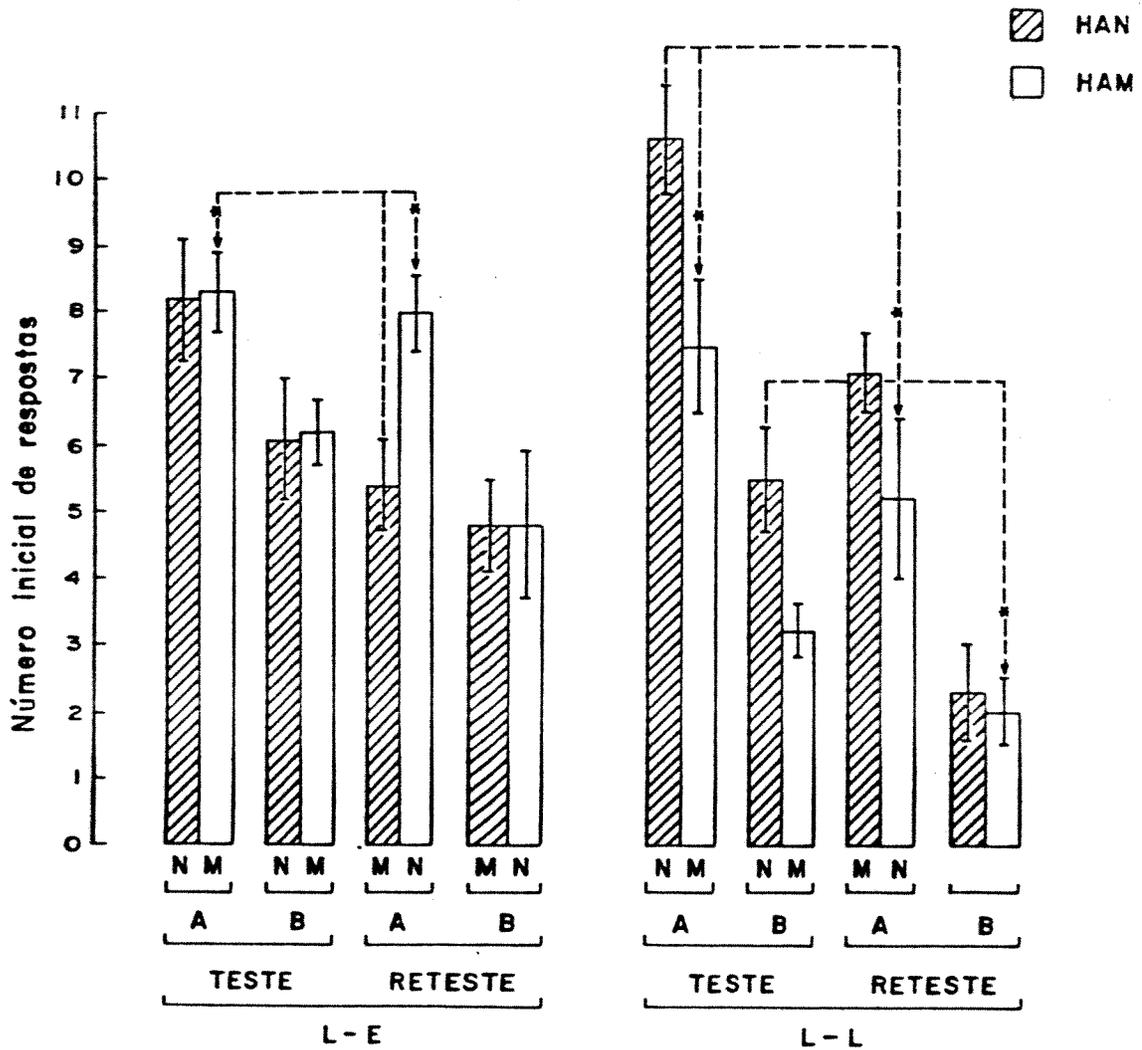


Figura 11. Número médio do nível inicial de resposta, mais o erro padrão da média, nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, das condições LE e LL. Ambas condições são ilustradas juntas a fim de facilitar a comparação N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$

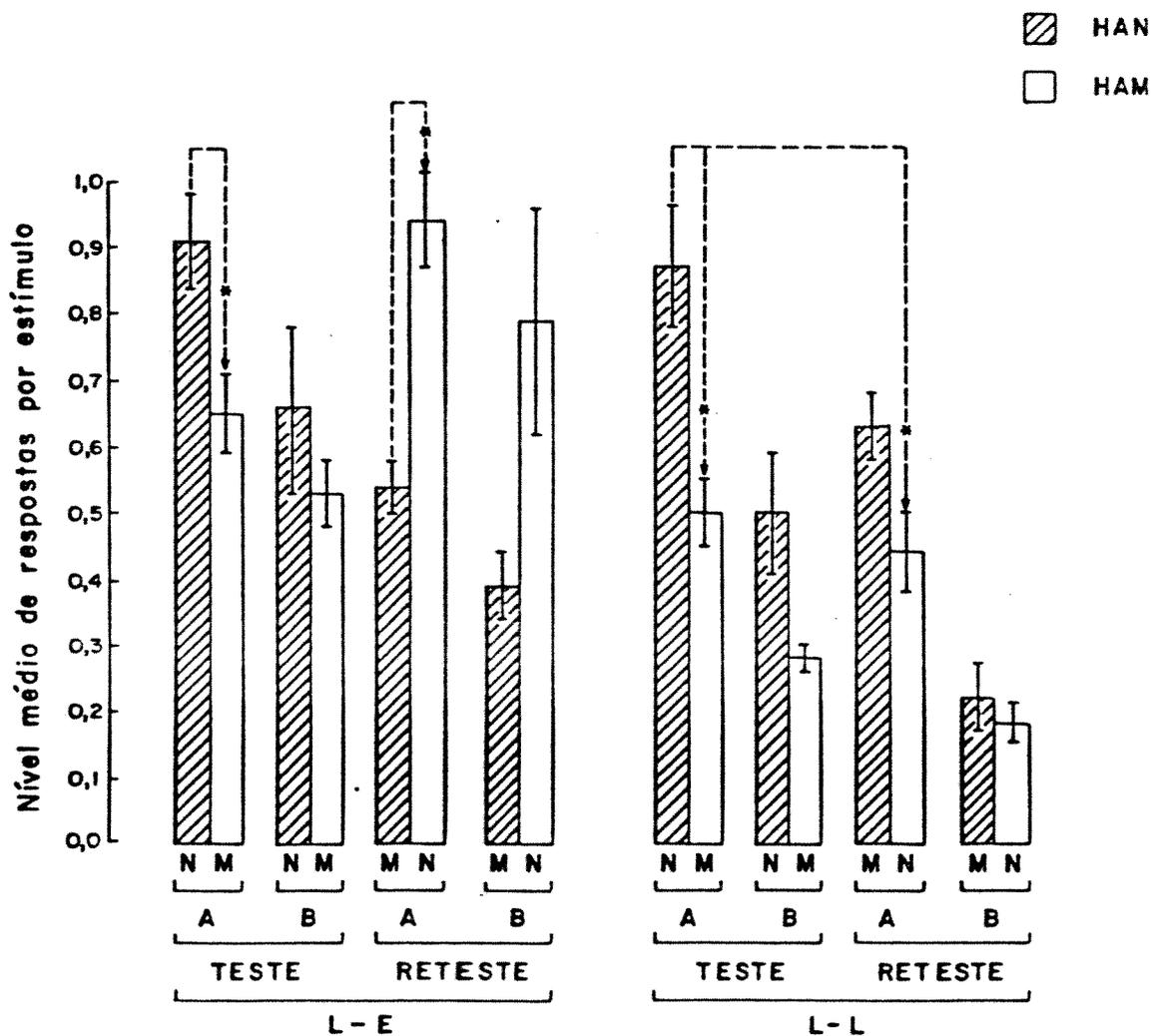


Figura 12. Nível médio de respostas por estímulo ($\frac{\sum \text{EXP} + \text{PRE}}{\sum \text{Estímulos}}$), mais o erro padrão da média, obtidos nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, das condições LE e LL. Ambas condições são ilustradas juntas a fim de facilitar a comparação. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

estatisticamente significativa (Figura 12). O nível inicial de resposta, no grupo HAN-LL foi de 10,5 e 5,5 respostas por estímulo (Figura 11). Nos retestes o grupo HAM-LL, submetido a sessões experimentais noturnas, mostrou habituação ao som, contrariamente ao observado nos retestes noturnos do grupo HAM-LE. A habituação na primeira sessão ocorreu com 90 estímulos, enquanto que na segunda sessão ocorreu com 40 estímulos (Figura 9 e 10). O nível inicial de atividade foi de cinco comportamentos por bloco de estímulos na primeira sessão e de 1,5 comportamentos na segunda sessão. Estas amplitudes são menores em relação ao grupo HAM-LE, com valores de oito comportamentos por bloco na primeira sessão e cinco comportamentos na segunda sessão ($U=4$; $p=0,095$ e $U=4$; $p=0,095$; Ver Figura 11). O nível médio de resposta por estímulo também foi marcadamente menor, 0,44 e 0,18 em relação a 0,94 e 0,79 do reteste HAM-LE ($U=0$; $p=0,08$ e $U=3$; $p=0,052$; Ver Figura 12). A falta de uma diferença significativa na segunda sessão, apesar dos valores médios extremos (0,18 no grupo LL e 0,79 no grupo LE) deve-se provavelmente ao fato de o número de animais deste grupo ser muito pequeno ($n=4$), já que dois pombos deste grupo fugiram. Isto se agrava pelo fato de um destes pombos ter um valor muito baixo

O grupo HAN-LL, submetido a retestes pela manhã, mostrou habituação ao som, com curvas semelhantes àquelas obtidas no retestes do grupo HAN-LE, porém o número de estímulos necessários para habituar foi menor, 65 na primeira sessão e 30 na segunda sessão, em relação a 75 e 40, respetivamente do reteste do grupo HAN-LE. Esta diferença não é estatisticamente significativa

($U=23,5$; $p=0,5$ e $U=15$, $p=0,141$, Ver Figura 9 e 10) O nível inicial de atividade foi 5,5 respostas por bloco na primeira e segunda sessão em relação a 5,5 e 4,5 do reteste HAN-LE ($U=11$, $p=0,054$ e $U=20,5$; $p=0,354$, Ver Figura 11). O nível médio de resposta por estímulo é de 0,53 e 0,22 respostas por estímulo em relação a 0,54 e 0,39 do grupo HAN-LE ($U=5,5$; $p=0,052$ e $U=5$; $p=0,041$; Ver Figura 12).

Ao comparar o reteste matutino do grupo HAN da condição LL com o teste matutino do grupo HAM da mesma condição observa-se que o nível inicial de atividade foi menor para o reteste, 5,5 comportamentos por bloco de estímulos na primeira sessão e 2,0 na segunda sessão, em relação a 7,5 comportamentos por bloco de estímulos na primeira sessão e 3,0 na segunda sessão do teste, embora a diferença não seja estatisticamente significativa ($U=4,5$; $p=0,0715$ e $U=7,5$, $p=0,207$, Ver Figura 9 e 11) O número de estímulos necessários para habituar foi de 65 e 35 estímulos para o reteste matutino e de 50 e 35 para o teste matutino (Ver Figura 9 e 10). O nível médio de resposta por estímulo foi de 0,63 e de 0,22 respostas por estímulo nos retestes matutinos e 0,50 0,28 no teste matutino ($U=4,5$, $p=0,0715$ e $U=7,5$; $p=0,207$, Ver Figura 9 e 12).

A Figura 13 mostra as curvas individuais dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios por bloco de cinco estímulos obtidas nos testes e retestes do grupo HAN da condição LL. Nas primeiras sessões dos testes noturnos do grupo HAN-LL observa-se uma diminuição no número de respostas entre o primeiro bloco de estímulos e o último. Porém, os animais não atingiram o critério, com exceção do pombo 211 que habitou com 85 estímulos. Nas

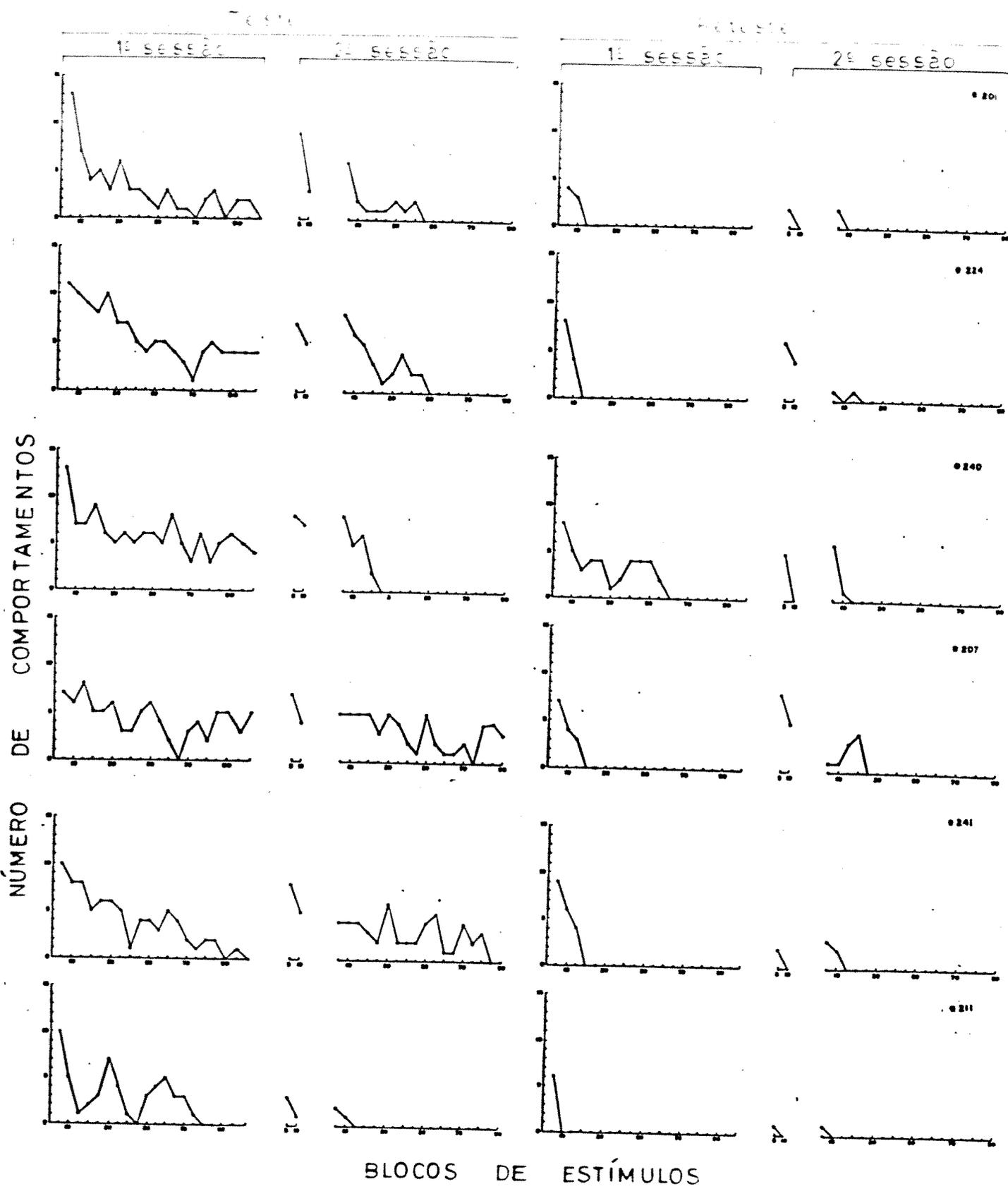


Figura 13 Curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes do grupo HAN da condição LL. O número à direita identifica cada indivíduo

segundas sessões, todos os animais atingiram o critério, com exceção do pombo 207 que continuou respondendo até o final da sessão. Nos retestes matutinos observa-se habituação em todos os casos. A habituação é atingida entre 25 e 30 tentativas. Só o pombo 240 demorou mais para atingir o critério na primeira sessão, com 65 tentativas.

A Figura 14 mostra as curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios por blocos de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes do grupo HAM da condição LL. Nas primeiras e segundas sessões dos testes matutinos do grupo HAM o critério é atingido entre 25 e 50 estímulos. Nas primeiras sessões dos retestes noturnos o critério de habituação é atingido, por todos os animais, porém, o número de estímulos necessários é maior em relação aos testes (entre 35 e 90 estímulos). Na segunda sessão, a habituação é atingida entre 15 e 40 estímulos.

III.2.4. Discussão

As curvas médias e individuais de respostas exploratórias ao som, para os pombos LL, indicam uma diferença significativa entre os testes matutinos e vespertinos na aprendizagem da habituação apenas nas primeiras sessões dos testes e retestes. Esses dados são interessantes porque: (a) replicam dados do experimento 1; (b) evidenciam efeitos de aprendizagem a longo prazo que se correlacionam com a possível redução dos níveis plasmático de melatonina e (c) eliminam a possibilidade de que a diferença matutina-vespertina fosse devido ao estresse da mudança brusca do escuro para o claro nas sessões noturnas.

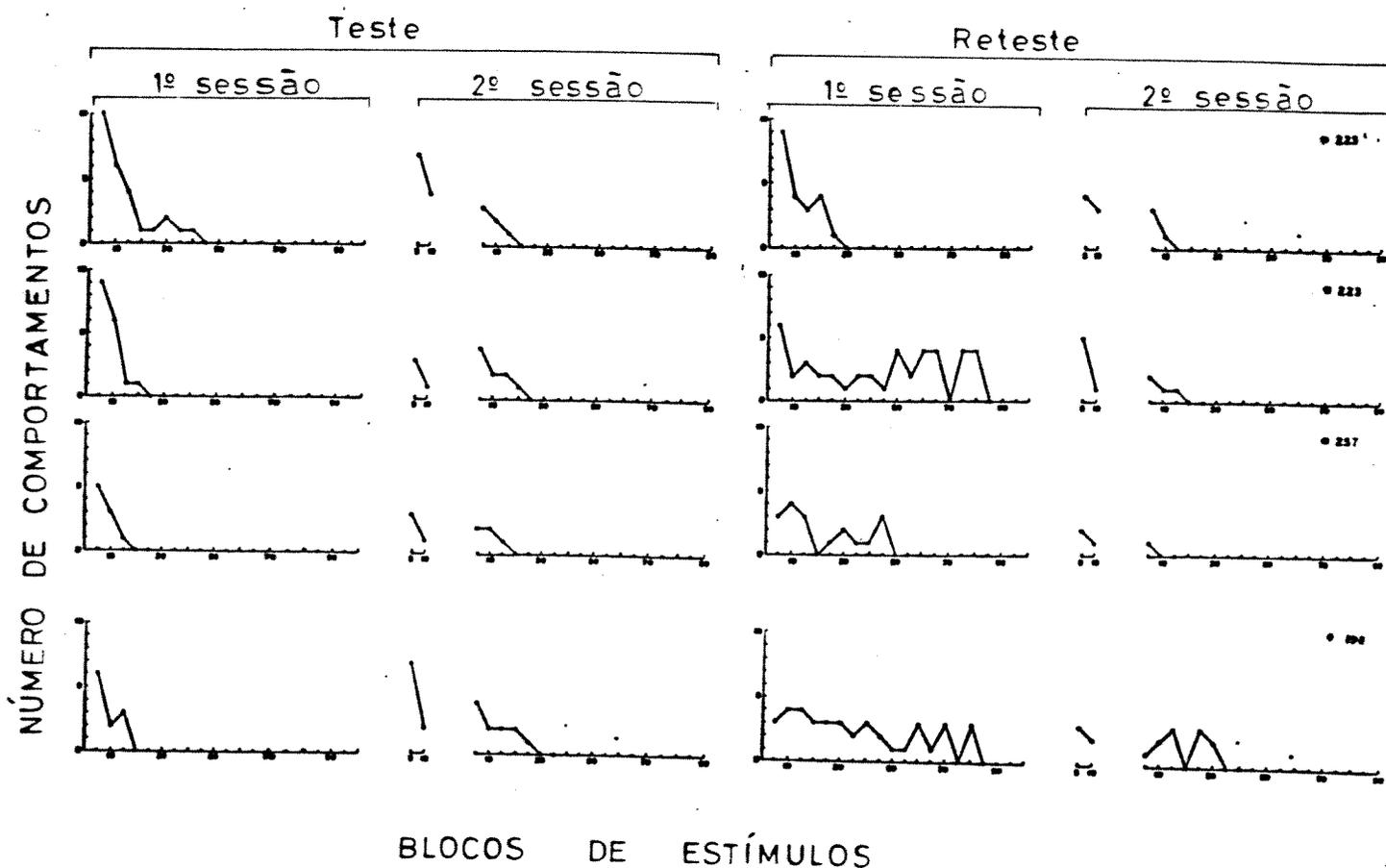


Figura 14. Curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes do grupo HAM da condição LL. O número à direita identifica cada indivíduo.

Nas primeiras sessões dos testes, os pombos submetidos a sessões experimentais pela manhã (HAM) atingem o critério experimental de habituação. Observa-se nitidamente as curvas de função exponencial negativa, em concordância com o primeiro dos nove parâmetros de habituação (Thompson & Spencer, 1966). Porém, nas sessões à noite (HAN), os pombos continuam respondendo aos sucessivos estímulos sonoros, apesar de haver uma diminuição na ocorrência da resposta ao longo da sessão. A diferença noite-dia também é verificada nas primeiras sessões dos retestes, porém menos evidente em relação aos testes. Nas primeiras sessões dos retestes matutinos do grupo HAN observam-se as típicas curvas exponenciais, enquanto que nas primeiras sessões dos retestes noturnos do grupo HAM, o processo de habituação demorou mais.

Esta menor diferença nas primeiras sessões dos retestes provavelmente se deva à memória a longo prazo, dado que no reteste matutino do grupo HAN, a habituação acontece mais rapidamente em relação ao teste matutino do grupo HAM. Segundo o que foi considerado no Experimento 1, isto poderia dever-se a efeitos de aprendizagem a longo prazo, que estaria se manifestando na terceira e na quarta sessões do grupo HAN. A mesma observação pode ser feita no grupo HAM, pois nos retestes noturnos deste grupo, a habituação acontece com um menor número de estímulos, em relação aos testes noturnos do grupo HAN. Apesar disto, comparando os testes matutinos com os retestes noturnos do grupo HAM, o processo de habituação nos retestes é dificultado, apesar dos animais terem habituado com maior facilidade nas primeiras e nas segundas sessões. Esta observação sugere a

atuação de outras variáveis, provavelmente de origem endógena, na diferença matutina-vespertina da habituação, manifestando-se independentemente da experiência previa do animal.

Comparando as primeiras e segundas sessões dos testes e retestes, tanto matutinos como vespertinos, podemos verificar o segundo parâmetro pela recuperação da resposta na segunda sessão. Também se verificou o oitavo parâmetro, dado que na apresentação de outro estímulo observou-se o reaparecimento da resposta. O fato de que a habituação na segunda sessão é sempre mais rápida do que na primeira sessão, evidencia o processo de generalização e a verificação do terceiro e sétimo parâmetros. Os animais deste grupo, expostos à luz contínua, continuam manifestando uma diferença matutina-vespertina da habituação, replicando a tendência observada nos animais da condição LE. Porém, ao comparar estas curvas com as curvas da condição LE, vemos que a diferença matutina-vespertina é menos marcada nos animais submetidos a luz contínua. De modo geral, podemos dizer que os animais da condição LL, tanto à noite como pela manhã, habitam com menor número de estímulos, menor nível inicial e geral de resposta, que resulta numa maior inclinação das curvas em relação aos animais da condição LE (Ver Figuras 10, 11 e 12).

Em condições de luz contínua, com ausência de pistas temporais, cada animal começa a expressar seus ritmos biológicos com seu período natural, desviando-se ligeiramente de 24 h. Neste caso, diz-se que o ritmo está em livre-curso (Cipolla-Neto et al., 1988). Contudo, deve considerar-se que a sala onde foram alojados os animais deste estudo não estava isolada, apesar das condições de luminosidade serem constantes. Assim, o ambiente

experimental estaria fornecendo outras pistas ambientais, como a alternância noite-dia no ambiente fora da sala que poderia ter sido percebida pelos pombos através das janelas abertas, a alternância térmica, a alternância acústica e/ou a atividade do prédio onde estava localizada a sala. Estas pistas poderiam estar atuando como *Zeitgebers*.

A potência ou força arrastadora de um *Zeitgeber* depende da combinação de duas características de um oscilador externo: (a) das propriedades desse *Zeitgeber*, como a amplitude e (b) a sensibilidade do organismo à pista temporal (Aschoff, 1979). Ou seja, a força arrastadora de um *Zeitgeber* é também intrínseca à espécie considerada, embora na maioria das espécies o sincronizador externo mais potente dos ritmos circadianos seja o ciclo claro-escuro. Poderíamos, assim, considerar que as pistas ambientais presentes na sala onde estavam alojados os animais poderiam estar atuando como sincronizadores fracos, quando comparados com a condição LE do Experimento 1, em que teríamos um sincronizador muito forte dado pelo ciclo LE do biotério. Provavelmente, a diferença observada entre a condição LL e LE se deva simplesmente a uma diferença na potência arrastadora dos *Zeitgebers* presentes em cada caso. Ou seja, os animais desta condição poderiam estar sincronizados parcialmente.

É importante considerar os possíveis efeitos de mascaramento do ciclo LE na amplitude de um ritmo e na forma de onda. Por exemplo, Aschoff (1987), medindo a temperatura cerebral em galinhas submetidas a um ciclo LE de 12:12 h, detectou um ritmo com abruptos aumentos e diminuições de temperatura no momento de

ligar e desligar as luzes, resultando numa onda quadrada. Em contraste, em condições de livre-curso a onda adquire um padrão senoidal, com uma amplitude de oscilação muito menor. Segundo os dados de Aschoff 33% da oscilação em condições de LE é devida ao efeito de mascaramento. Resultados similares foram também achados no ritmo de temperatura corporal em várias espécies de aves (Aschoff, 1987). Ou seja, esta poderia ser uma possível explicação pela qual nos animais da condição LL, o ritmo de aprendizagem se manifestaria com uma amplitude menor em relação aos animais da condição LE. Deve ser lembrado que no Experimento 1 discutiu-se o possível efeito de mascaramento do som, quando apresentado à noite, condição em que teria o seu valor biológico aumentado. A exposição contínua à luz poderia agir no sentido de diminuir a importância biológica do som e, conseqüentemente, reduzir seus efeitos de mascaramento. Tais fatos se correlacionam com a facilitação do processo de habituação dos animais da condição LL. A manutenção da diferença matutina-vespertina na condição LL sugere que provavelmente a alteração do valor biológico do estímulo não seja o único determinante das diferenças sob condições de LE. Contudo, uma forma de analisar tais possibilidades seria modificando o canal sensorial utilizado no processo de habituação.

Por outro lado, lembremos que a luz ambiental inibe a síntese e a secreção de melatonina (Ebihara, 1983; Krause, 1990). Isto leva a considerar que no grupo LL, teoricamente temos uma importante modificação fisiológica que seria uma ausência crônica de melatonina. Em numerosas espécies de vertebrados é bem conhecido o papel central da melatonina no controle de ritmos

circadianos (Cassone, 1990). Em pombos está muito bem documentada a relação da melatonina plasmática com os ritmos circadianos de atividade locomotora, temperatura corporal e alimentação (Ebihara *et al.*, 1983; Yamada *et al.*, 1988; Oshima *et al.*, 1989; Chabot & Menaker, 1992). Poderíamos, aqui, considerar novamente os dados de Dawson *et al.* (1986) que indicam que a pinealectomia diminui a atenção a estímulos auditivos e fazer uma relação deste efeito com a secreção rítmica de melatonina. Nos experimentos da condição LE, a facilitação da habituação acontece pela manhã, ou seja, num horário em que o nível de melatonina plasmática está baixo, enquanto que à noite, momento em que o nível de melatonina está elevado, o processo de habituação é dificultado. Ou seja, a possível ausência contínua de melatonina plasmática nos animais da condição LL estaria facilitando o processo de habituação, tanto à noite como pela manhã, devido à diminuição da atenção aos estímulos. Esta consideração poderia estar explicando porque a habituação intra-sessão, ou seja habituação a curto-prazo (min/horas), acontece mais rapidamente na condição LL. Somado a isto, nas segundas sessões sempre se observa habituação, tanto de manhã como à noite, ou seja, habituação a longo-prazo.

Estes argumentos parecem ter fundamento porque, considerando o nível inicial de resposta e o nível médio de resposta por estímulo, existem diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as primeiras e segundas sessões dos testes e retestes, tanto do grupo HAN como do grupo HAM (Figura 12). Assim, a ausência de melatonina poderia estar facilitando a memória a longo-prazo, tanto à noite como de manhã. Quanto ao número de estímulos

necessários para habituar, existem diferenças estatísticas nas sessões noturnas, ou seja, nos retestes do grupo HAM e nos testes do grupo HAN. Provavelmente à noite existiria uma maior tendência a responder aos estímulos devido a fatores endógenos, tendência esta que diminui na segunda sessão. Por outro lado, a diferença noite-dia, que só se observa nas primeiras sessões é menos evidente nos retestes, o que estaria apoiando a idéia de que a ausência de melatonina facilita o processo de habituação.

Deve ser ressaltado que, embora o nível de melatonina plasmática na condição LL seja possivelmente baixo durante as 24 horas do dia (Yamada *et al.*, 1988; Krause & Dubocovich, 1990), ainda se observa uma diferença noite-dia na aprendizagem da habituação. É importante lembrar que os organismos são considerados estruturas multioscilarórias, regulados por um ou mais osciladores principais. Existem algumas evidências de que cada oscilador principal regula um conjunto de ritmos circadianos (Aschoff, 1979; Cipolla-Neto *et al.*, 1988; Turek & Van Cauter, 1988; Norgren, 1990). Podemos considerar como as estruturas centrais do sistema circadiano dos pombos a glândula pineal, os olhos e uma estrutura hipotalâmica (Yamada *et al.*, 1998; Norgren, 1990). A diferença matutina-vespertina da habituação que continua se manifestando neste experimento, replicando dados da condição LE, levaria a considerá-la como sendo controlada pelo terceiro oscilador das aves, localizado no hipotálamo. Este controle seria através de mecanismos independentes da melatonina, porém, esta poderia estar regulando a expressão do ritmo. Assim, ao eliminar a melatonina, a expressão rítmica seria alterada

Uma outra explicação poderia ser que as interações humorais

e neurais entre as três estruturas circadianas do pombo, determinariam a expressão e a manutenção dos ritmos circadianos (Yamada *et al.*, 1988). Com a exposição à luz contínua, estaríamos eliminando a interação humoral, o que levaria à alteração da expressão rítmica (Ebihara *et al.*, 1983; Ebihara *et al.*, 1987 Em: Norgren, 1989).

III.3. Experimento 3

III.3.1. Objetivo

Assim como no Experimento 2, pretendeu-se aqui analisar o efeito da luz contínua na habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros (Ebihara *et al.*, 1983; Cassone, 1990; Norgren, 1990; Krause & Dubocovich, 1990). Porém, neste experimento reduzimos a exposição à luz contínua para um período de apenas dois dias. Este curto período foi escolhido para evitar que a sincronização ao ciclo externo LE fosse afetada. Considerou-se que, durante a exposição à luz contínua por dois dias os ritmos circadianos continuariam intactos (Yamada *et al.*, 1988; Cipolla-Neto, comunicação pessoal). Desse modo, esta situação não alteraria a possível variação endógena na capacidade de aprendizagem que estamos postulando. No Experimento 2, os animais foram submetidos a um período mínimo de 20 dias de luz contínua. Pode-se considerar que, por ocasião das sessões de testes nesse experimento, o *Zeitgeber* mais potente, o ciclo LE, já não estaria afetando a ritmicidade dos animais. Apesar disso, foi observada uma sincronização ao meio, provavelmente pelo efeito de sincronizadores de menor força arrastadora.

Com dois dias de luz contínua, deveria ocorrer ainda a manifestação de efeitos posteriores (*after-effects*) do arrastamento prévio desse *Zeitgeber* forte (ciclo LE) permitindo, assim, isolar o efeito direto da ausência de melatonina na aprendizagem. Ao mesmo tempo, seria possível também controlar a variável introduzida pela mudança de iluminação durante as sessões experimentais dos pombos dos grupos da noite.

III.3.2. Materiais e métodos

Sujeitos

Foram utilizados 12 pombos adultos, mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso ao alimento e à água. Os pombos permaneceram num esquema de iluminação de 12 h de luz e 12 h de escuro, exceto por dois dias antes das sessões. Dois grupos experimentais foram constituídos: um com sessões de habituação pela manhã (HAM) e outro, com sessões de habituação à noite (HAN).

Equipamento

Idem àqueles utilizados nos Experimentos 1 e 2.

Procedimento

O procedimento e a sequência das sessões de habituação foram idênticos aos utilizados nos Experimentos 1 e 2 (ver Figura 2). A única diferença foi que nos dois dias que antecederiam os testes e retestes, cada pombo era colocado numa sala adjacente ao biotério que permanecia com luz contínua durante as 24 horas do dia (2L). Parte da parede frontal possuía esquadrias de ferro e vidro transparente (3,00 x 4,80 m). Essa parede de vidro foi recoberta por uma cortina espessa, com uma camada de plástico preto, exceto, numa pequena faixa inferior de 0,30 m de altura. A separação do Biotério era feita por uma cortina preta, de brim grosso, que vedava a luz para os outros animais que estavam submetidos a um ciclo LE de 12:12h.

Análise estatística

Foi utilizada a prova U de Mann-Whitney, para comparações entre os grupos HAN-2L e HAM-2L, considerando: (a) os experimentos realizados pela manhã e os experimentos realizados à noite; (b) entre os testes matutinos (HAM-2L) com os retestes matutinos (HAN-2L); (c) os testes noturnos (HAN-2L) com os retestes noturnos (HAM-2L) e (d) os experimentos da condição 2L com os experimentos das condições LL e LE.

Foi também utilizada a prova de Wilcoxon para determinar a diferença entre as primeiras e segundas sessões, tanto nos testes como nos retestes.

III.3.3. Resultados

Os dados foram organizados da mesma forma exposta nos Experimentos 1 e 2, ou seja, considerando a somatória dos itens exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, a partir dos quais foram elaboradas as curvas de habituação, individuais e médias. Para quantificar o nível médio de resposta por estímulo em cada sessão, calculou-se a média da razão entre a somatória das respostas exploratórias e pré-exploratórias e o total de estímulos apresentados na sessão ($\frac{\sum \text{EXP+PRE}}{\sum \text{ESTIMULOS}}$; Ver Tabela 5).

Tabela 5. Nível médio de resposta por estímulo (EXP+PRE/ Estímulos), mais o erro padrão médio, obtidos na condição 2L, para os grupos HAM (habituação, manhã) e HAN (habituação, noite).

GRUPO	TESTE		RETESTE	
	Estímulo A	Estímulo B	Estímulo A	Estímulo B
HAM	0,60 ± 0,04	0,37 ± 0,08	0,44 ± 0,07	0,34 ± 0,09
HAN	0,68 ± 0,06	0,43 ± 0,06	0,54 ± 0,08	0,39 ± 0,04

Foi também considerado o nível inicial de resposta, ou seja o número de respostas exploratórias e pré-exploratórias registradas nos primeiros cinco estímulos (Ver Tabela 6). A avaliação quantitativa do processo de habituação foi feita considerando o tempo (ou número de ocorrências de estímulos) necessário para que as reações exploratórias diminuíssem até um nível de ocorrência zero, por um período de cinco minutos, ou seja, dez estímulos sucessivos, segundo o critério de habituação.

Tabela 6. Nível inicial de resposta, mais o erro padrão médio, obtidos na condição 2L, para os grupos HAM (habituação, manhã) e HAN (habituação, noite).

GRUPO	TESTE		RETESTE	
	Estímulo A	Estímulo B	Estímulo A	Estímulo B
HAM	6,83 ± 0,86	3,5 ± 0,51	5,33 ± 0,51	3,33 ± 0,60
HAN	7,33 ± 0,65	4,00 ± 0,23	5,33 ± 0,93	3,00 ± 0,62

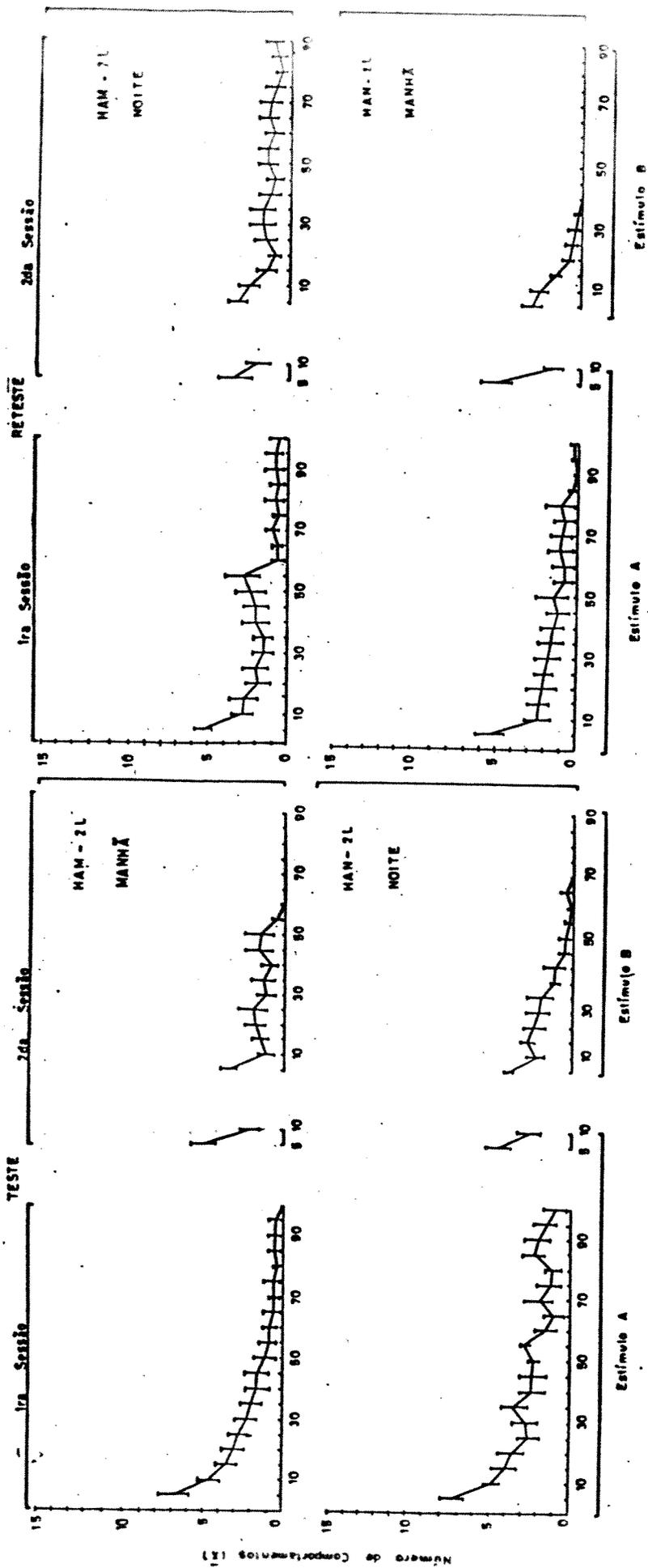


Figura 15. Médias da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidos nos Testes e Retestes dos grupos HAM e HAN da condição 2L. Barras verticais representam o erro padrão da média.

A Figura 15 mostra as médias dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, mais o erro padrão da média, por blocos de cinco estímulos, obtidas nas situações de teste e reteste, respectivamente. Os dados médios indicam uma diminuição na ocorrência da resposta em função da repetição dos estímulos, indicando que ocorreu habituação ao som em todas as sessões de testes e de retestes matutinos e vespertinos. A ausência de diferenças entre as curvas de habituação, nas diferentes situações, foi confirmada estatisticamente para comparações entre os grupos HAM-2L e HAN-2L, quanto ao número de estímulos necessários para habituação, nível inicial de resposta exploratória e nível geral de resposta exploratória ($p > 0,05$). Nas Figuras 16, 17 e 18 é possível ver, que a diferença matutina-vespertina desaparece neste grupo, em relação aos grupos LE e LL quando consideramos os valores médios de número de estímulos necessários para habituar (Figura 16), nível inicial de resposta (Figura 17) e nível de resposta por estímulo (Figura 18). Nestas figuras também é possível verificar que acontece habituação a longo-prazo, entre as primeiras e segundas sessões e entre testes e retestes.

A Figura 19 mostra as curvas individuais dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios por blocos de cinco estímulos obtidas nos testes e nos retestes do grupo HAN-2L. Na primeira sessão do teste observa-se que três pombos, no total de seis, atingiram o critério de habituação. Os outros três continuaram respondendo até os 100 estímulos, um dos quais, o pombo 316 atingiu o critério após 104 tentativas. Contudo, na segunda

▨ HAN
 □ HAM

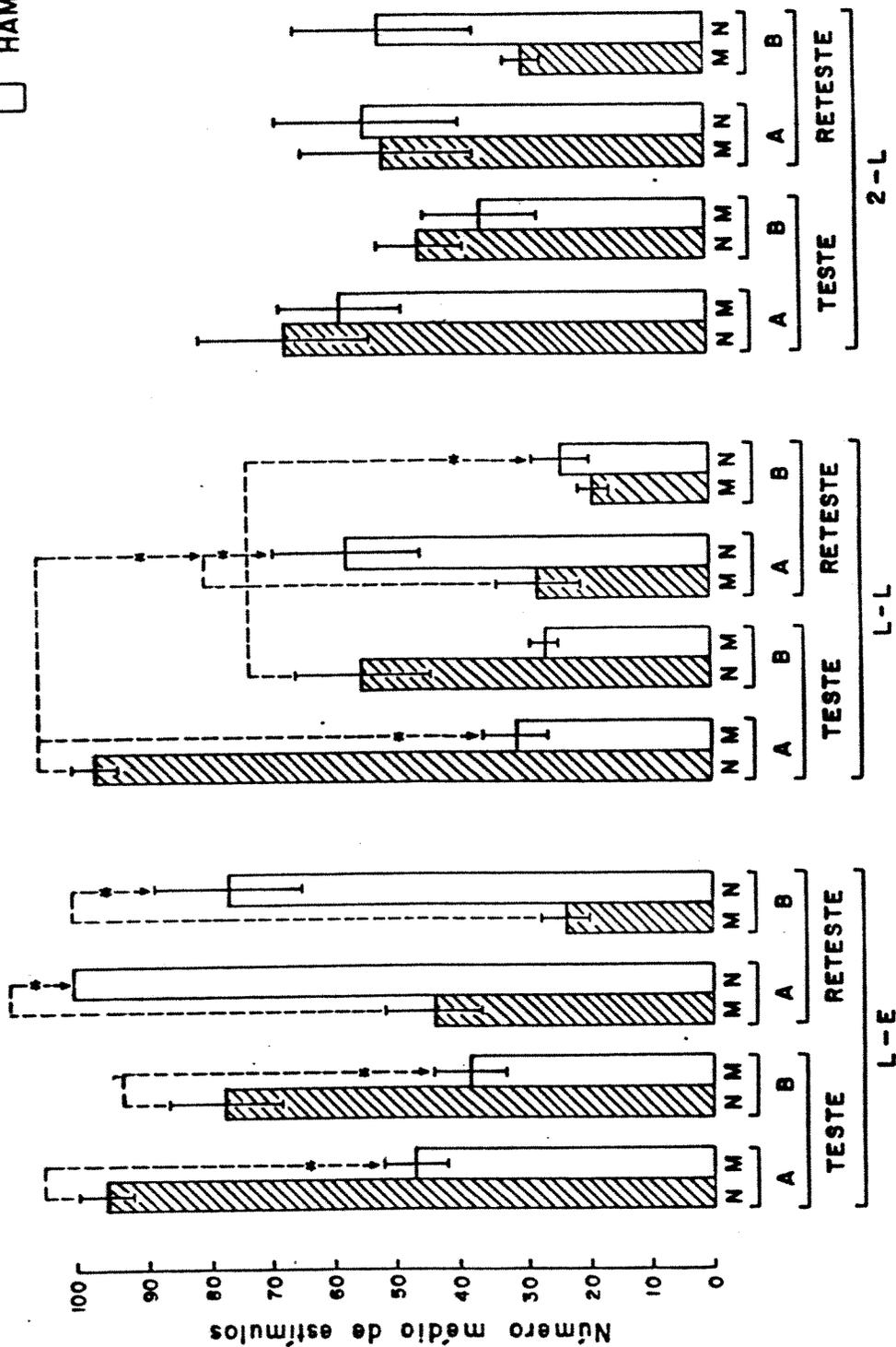


Figura 16. Número médio de estímulos necessários para atingir o critério de habituação, mais o erro padrão da média, nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, das condições LE, LL e 2L. As três condições são representadas juntas a fim de facilitar as comparações. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

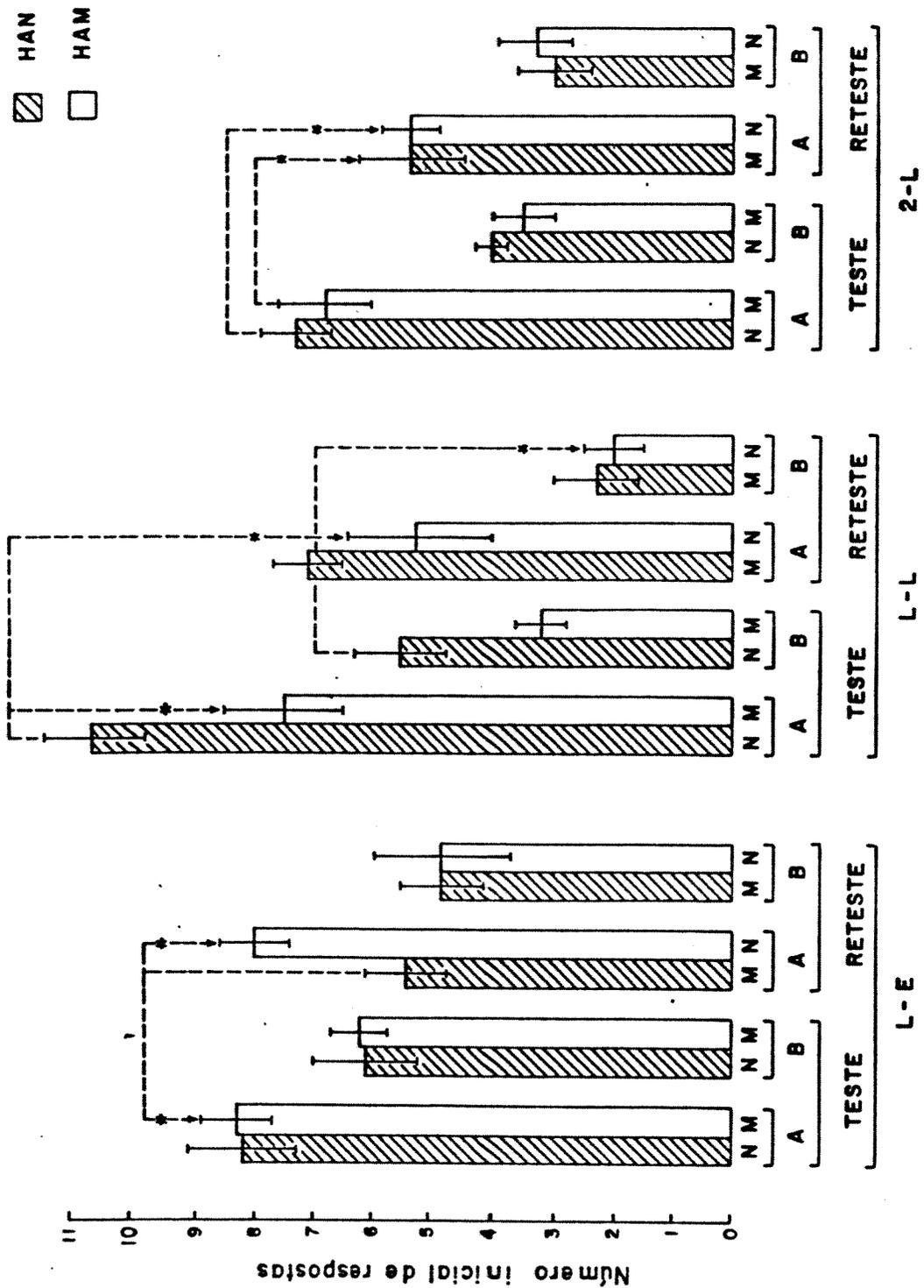


Figura 17. Número médio do nível inicial de resposta, mais o erro padrão médio, obtidos nos testes e retestes, dos grupo HAN e HAM, das condições LE, LL e 2L. As três condições são representadas juntas a fim de facilitar as comparações. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

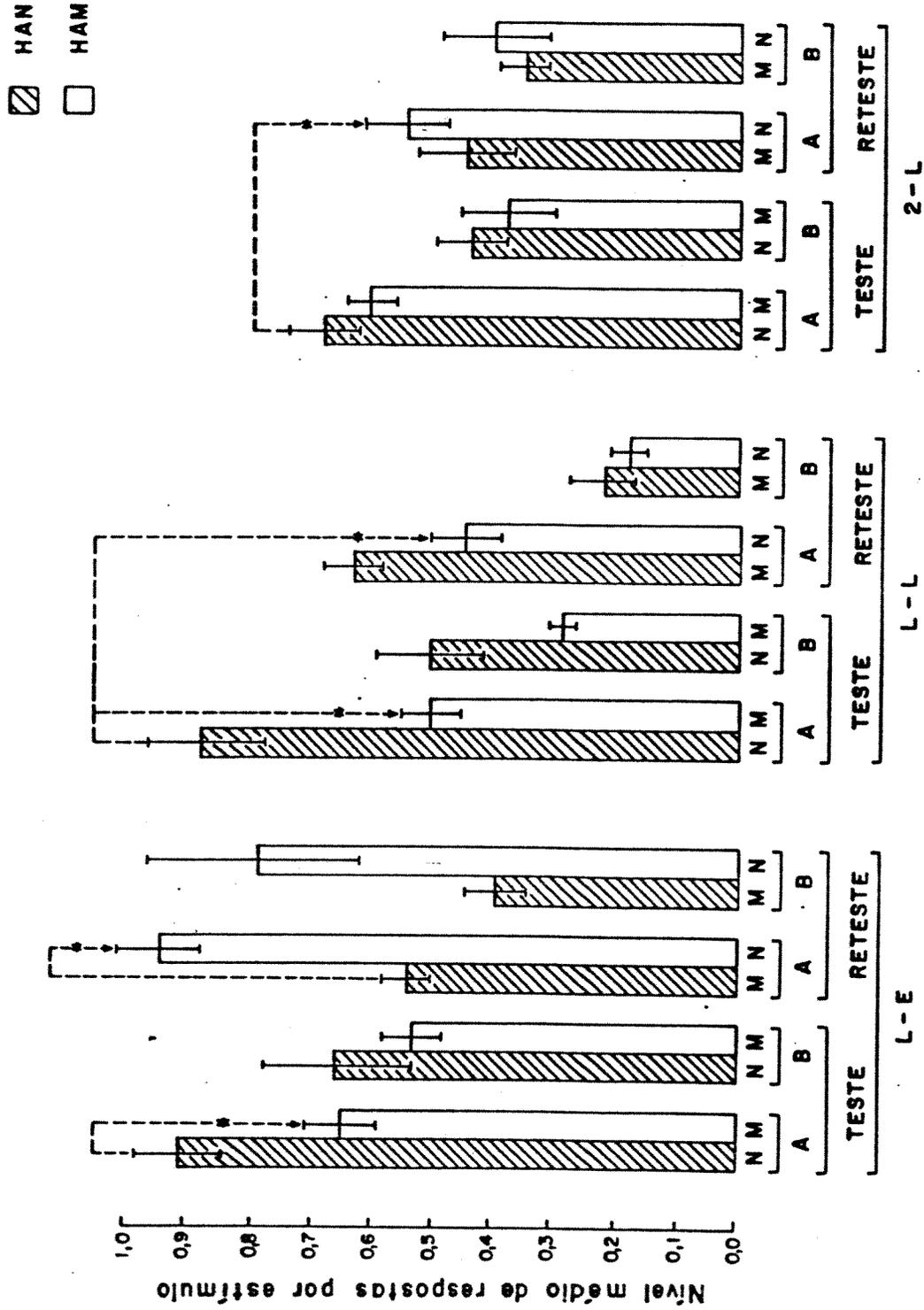


Figura 18. Nível médio de resposta por estímulo ($\Sigma \text{EXP+PRE} / \Sigma \text{Estímulo}$), mais o erro padrão médio, nos testes e retestes, dos grupos HAN e HAM, das condições LE, LL e 2L. As três condições são representadas juntas a fim de facilitar as comparações. N: sessões noturnas; M: sessões matutinas; A: primeira sessão com estímulo A; B: segunda sessão com estímulo B; * : $p < 0,05$.

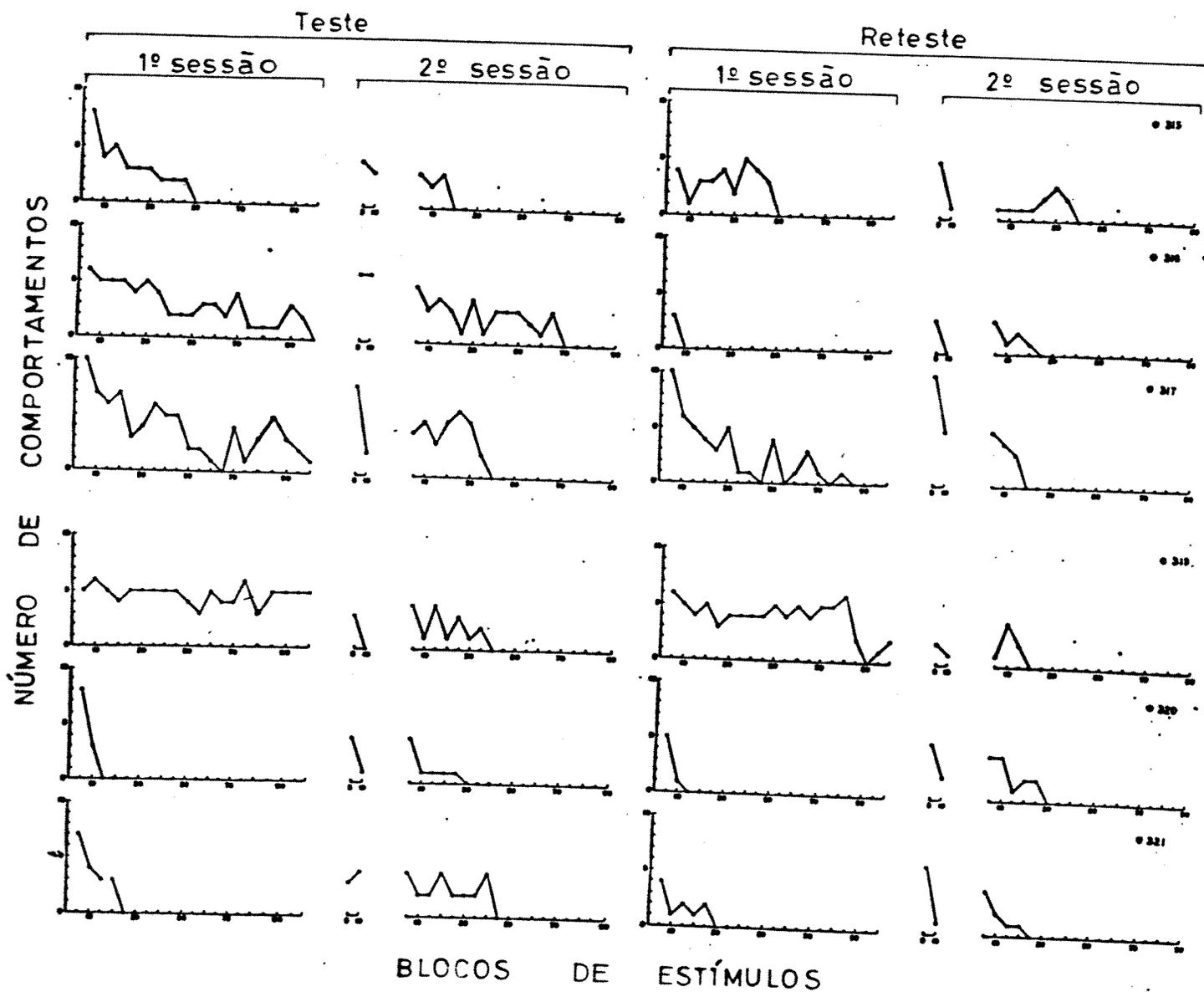


Figura 19. Curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por bloco de cinco estímulos, obtidos nos testes e retestes do grupo HAN da condição 2L. O número à direita identifica cada indivíduo.

sessão de teste todos os animais atingiram o critério experimental de habituação. Na primeira sessão de retestes matutinos, só um pombo, o 319, não atingiu o critério de aprendizagem. Os cinco pombos restantes atingiram o critério com um número de estímulos entre 15 e 55 estímulos, com exceção do animal 317 que habituou com 86 estímulos. Na segunda sessão de reteste, todos os animais atingiram o critério com um número de estímulos entre 25 e 45 tentativas.

A Figura 20 mostra as curvas individuais dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios por blocos de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes do grupo HAM da condição de dois dias de luz. Na primeira sessão do teste matutino observa-se que todos os animais atingem o critério de habituação com um número de estímulos entre 20 e 70, com exceção do pombo 313 que habituou com 103 estímulos. Na segunda sessão, todos os animais atingem o critério: dois pombos com 63 estímulos, e os cinco restantes com um número de estímulos entre 15 e 45 estímulos.

Na primeira sessão de retestes noturnos, dois animais atingiram o critério com, respectivamente, 80 e 85 estímulos, três animais habituaram com um menor número de estímulos, entre 15 e 25 tentativas, e apenas um animal não atingiu o critério. Na segunda sessão, apenas dois pombos não atingiram o critério. Dentre os quatro que habituaram o pombo 313 recebeu 76 estímulos, enquanto que os três restantes habituaram entre 10 e 20 estímulos.

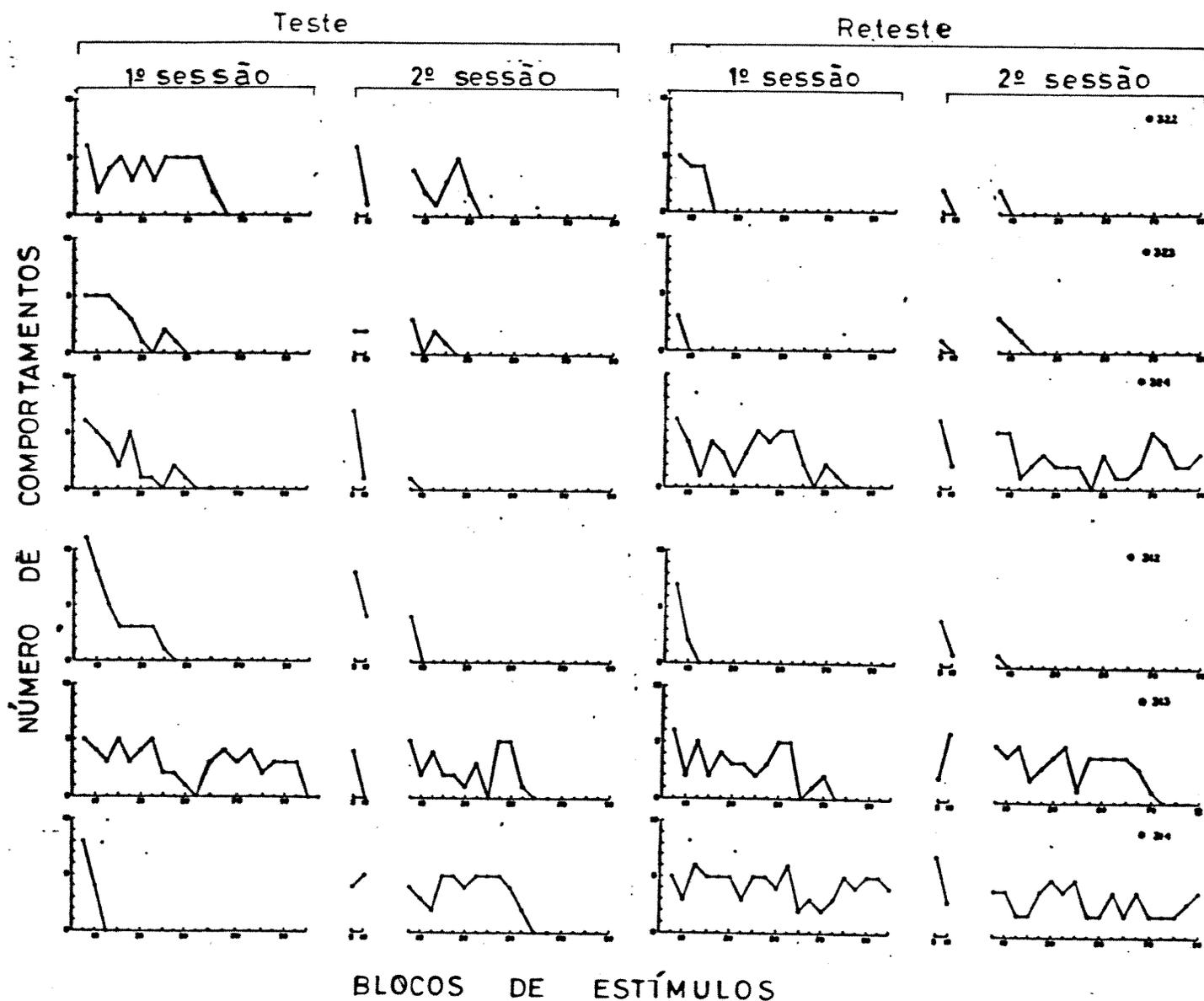


Figura 20. Curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidas nos testes e retestes do grupo HAM da condição 2L. O número à direita identifica cada indivíduo.

III.3.4. Discussão

Os resultados deste terceiro experimento mostram curvas médias e individuais de ocorrência de respostas exploratórias em função da repetição do estímulo sonoro, que replicam dados da literatura sobre habituação. Cinco parâmetros (1, 2, 3, 7 e 8) dos nove princípios de Thompson & Spencer (1966), são confirmados por esses dados (Sharpless & Jasper, 1956; Adamo & Bennett, 1967; Scourse & Hinde, 1972; Tighe & Leaton, 1976; Hamassaki, 1986; Toledo, 1989). Nas curvas médias e nos histogramas, não é possível detectar uma diferença matutina-vespertina. Porém, pela análise das curvas individuais a situação se modifica.

Na primeira sessão noturna dos testes do grupo HAN-2L, de um total de seis pombos, três atingiram o critério de habituação, enquanto que os outros três continuam respondendo até o final da sessão. Na primeira sessão matutina do teste do grupo HAM-2L, todos os animais atingem o critério de habituação, com exceção de um. Isto está mostrando que na condição 2L continua manifestando-se uma diferença matutina-vespertina, embora menos evidente que nas condições LL e LE, pelo menos nas primeiras sessões dos testes. Observou-se que nas primeiras sessões noturnas dos testes do grupo HAN-2L três pombos continuam respondendo até o final da sessão e que em três casos dos retestes noturnos do grupo HAM-2L não é atingido o critério. Isso parece reafirmar a conclusão do Experimento 2, de que o fator estresse nas sessões noturnas da condição LE, provocado pelo traslado do biotério escuro até a caixa experimental iluminada, não seria determinante da dificuldade de habituação em

horário noturno.

No presente experimento a exposição a dois dias de luz contínua determinaria que o nível de melatonina plasmática estaria próximo a zero, como estaria acontecendo com os animais da condição LL. Como discutido no Experimento 2, a ausência de melatonina poderia estar facilitando o processo de habituação. É possível supor que as evidências de diferença noite-dia que ainda são observadas sejam devidas à função do NSQ. Tal função em condições normais estaria sendo regulada ou potencializada pelo efeito da melatonina. Portanto, a diminuição dos níveis desse hormônio determinaria uma diminuição na diferença comportamental noite-dia. A outra possível explicação sugerida no Experimento 2 foi de que a interação neural e humoral dos três osciladores determinaria a manifestação desta diferença noite-dia. Desse modo, quando eliminamos a interação humoral, restando só a interação neural, a expressão do ritmo ficaria alterada.

Retomando o ponto sobre o valor biológico, uma possibilidade seria que em condições de luz constante a significância do som estaria diminuída em relação à condição de escuro. Este seria mais um fator determinante da facilitação da habituação a estímulos sonoros observada neste experimento. Ou seja, este experimento replica em certa medida os dados do Experimento 2. Porém, no grupo 2L a diferença matutina-vespertina é menos evidente em relação ao grupo LL. Deve ser considerado, contudo, que os animais da condição 2L são trasladados a outra sala e a outra gaiola, submetidos a dois dias de luz contínua e testados antes de se adaptarem à nova sala e à nova condição de

luminosidade.

Segundo Griffin (1989) mudanças ambientais que produzem estímulos sonoros, olfativos e visuais estranhos ou novos podem provocar mudanças crônicas ou agudas na fisiologia do animal, as quais caracterizariam, um maior ou menor grau de estresse. Conforme definido por Fraser *et. al.* (1975; Em: Griffin, 1989) o estresse seria um ajuste normal ou extremo da fisiologia de um animal para enfrentar situações adversas do meio. As mudanças fisiológicas que ocorrem pela influência da ativação do sistema nervoso central durante o estresse produzem marcadas modificações no animal. Inicialmente ocorre um aumento no metabolismo e na atividade cardiovascular, via controle do sistema simpático-adrenomedular o que normalmente determina a chamada resposta de fuga-luta. Isto é devido à liberação de catecolaminas por duas vias, (a) diretamente, pela liberação de norepinefrina das terminações nervosas simpáticas e (b) indiretamente, pela liberação de epinefrina e pequenas quantidades de norepinefrina da medula adrenal. Se a situação estressante continua, é desencadeado um segundo mecanismo, via sistema hipotálamo-hipofisário-adrenocortical. O hipotálamo libera o hormônio liberador da adrenocorticotrofina (CRH), que estimula a pituitária anterior a liberar adrenocorticotrofina (ACTH) que, por sua vez atua no córtex da adrenal, aumentando a produção e a secreção de glicocorticóides. Os glicocorticóides afetam a maioria dos sistemas do organismo. O ciclo é completado por uma resposta de aprendizagem-adaptação condicionada pela produção de uma variedade de fatores neuroendócrinos. Também, na medida em que o estresse é afetado principalmente pela percepção individual

de estímulos externos, é importante considerar a liberação e função de peptídeos cerebrais e transmissores que poderiam influenciar a resposta adaptativa ao estresse. A produção de neuropeptídeos causa ativação de respostas fisiológicas e comportamentais. Hormônios como CRH, ACTH, MSH, encefalinas, beta-endorfinas, oxitocina e vasopressina foram associados com a aprendizagem e a memória. Muitos dos neuropeptídeos tem um importante papel em muitas das mudanças comportamentais e fisiológicas encontradas em animais estressados (Griffin, 1989).

Sabe-se que, além da interação dos osciladores principais de um organismo, vários osciladores subordinados, como as glândulas endócrinas, podem retroagir, modulando a função dos marcapassos e, portanto, modulando a expressão rítmica (Cipolla-Neto et al., 1988; Norgren, 1990). Dessa forma, pode-se considerar que o estresse produzido na situação experimental do Experimento 3, poderia estar determinando a diferença entre os resultados da condição 2L e os da condição LL. Isso poderia explicar a expressão indefinida da diferença noite-dia na habituação dos animais da condição 2L.

A melatonina influencia a atividade funcional de numerosos órgãos, inclusive das glândulas adrenais. Segundo Khan et al. (1990a; 1990b) e Mahata & De, (1990), modulando a corticoesteroidogênese. Essa ação, tanto em condições normais como em condições estressantes, provavelmente ocorre a nível hipofisiário, diminuindo a liberação de ACTH. Khan considerou que a pineal tem um efeito antiestresse. Ele e seus colaboradores observaram que a pinealectomia em ratos exacerbava a ulceração

gástrica induzida por situações estressantes. Eles também observaram que esta ulceração era significativamente menor em ratos normais, quando estressados durante a fase escura, em comparação àqueles estressados durante a fase clara e que a administração exógena de melatonina diminuía a ulceração. Ou seja, poderíamos pensar que o estresse provocado no grupo 2L, estaria sendo exacerbado pelo menor nível de melatonina.

Nos animais da condição LL pode-se considerar que depois de 20 dias de luz contínua, sem nenhuma mudança de sala ou gaiola, tenha ocorrido uma adaptação à situação, eliminando ou pelo menos diminuindo, a variável estresse. Segundo o comentado anteriormente, pode-se pensar que este grupo estaria na terceira etapa do ciclo das mudanças fisiológicas que normalmente acontecem numa situação de estresse. Ou seja, na resposta de aprendizagem-adaptação condicionada pela produção de uma variedade de fatores neuroendócrinos. Os animais da condição LL estariam, então, num ponto intermediário entre os animais da condição LE e da condição 2L, em relação à expressão da diferença noite-dia da capacidade de habituação. Esta localização intermediária é claramente observável nos histogramas das Figuras 16, 17 e 18, referidas aos valores médios do número de estímulos necessários para habituar, nível inicial de resposta e nível de resposta por estímulo, respectivamente.

Por outro lado podemos retomar a discussão sobre o efeito de *Zeitgebers* de diferente potência arrastadora. Neste grupo de animais dois dias de luz contínua não é tempo suficiente para observar uma dessincronização dos ritmos endógenos ao ciclo externo LE, embora o processo de dessincronização já tenha

começado. Ou seja, a dessincronização populacional demora em acontecer, dado que as diferenças nos períodos endógenos entre os animais é muito pequena. Assim, podemos considerar que os *Zeitgebers* da condição 2L são os mesmos que na condição LE.

Porém, a diferença matutina-vespertina é ainda menor que na condição LL do Experimento 2, onde o efeito do ciclo externo LE foi eliminado totalmente. Isto estaria descartando a explicação relacionada à potência das pistas ambientais como causa da diferença entre os animais da condição LE e LL.

IV Discussão Geral

O conjunto de dados dos Experimentos 1, 2 e 3 são importantes na medida em que: (a) demonstram o processo de habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros em pombos, replicando dados da literatura (Sharpless & Jasper, 1956; Adamo & Bennett, 1967; Scourse & Hinde, 1972; Tighe & Leaton, 1976; Hamassaki, 1986; Toledo, 1989); (b) permitiram a análise de curvas típicas de habituação (Thompson & Spencer, 1966), evidenciando como as características do estímulo e/ou dos padrões de estimulação afetam a velocidade de habituação e (c) mostraram uma variação noite-dia da habituação da resposta exploratória a estímulos sonoros em pombos, dada como uma facilitação da habituação nos testes matutinos e uma dificuldade da habituação nos testes noturnos.

A variação noite-dia indicada pelos dados poderia sugerir uma organização temporal da aprendizagem de habituação. Neste sentido, tais dados tem fundamental importância pela sua originalidade, considerando a literatura específica.

Além da diferença noite-dia observada em relação aos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios foi possível constatar uma diferença matutina-vespertina quanto a outros comportamentos. Assim, nos testes noturnos observou-se um aumento dos comportamentos de manutenção locomoção. Os animais testados à noite se deslocavam continuamente, pisoteavam, inclusive tentavam fugir da caixa experimental, bocejavam, sacudiam o corpo, coçavam, limpavam e espreguiçavam. Estes comportamentos desapareciam totalmente quando terminava a sessão.

Pelo contrário, os animais testados de manhã exibiam um número reduzido destes comportamentos de locomoção e manutenção, alguns animais com ausência quase total deles. Estas observações estariam afirmando a existência de uma diferença no estado do animal, o que o leva a responder diferentemente a um mesmo estímulo quando testado em diferentes horários.

Os resultados evidenciam que o processo de habituação não é só influenciado pelas características estimulatórias, mas pela interação destas com as condições fisiológicas do organismo. Ou seja, o estado interno de um animal é determinado pelas interações entre história ontogenética, história filogenética e as interações entre as condições ambientais e as variações fisiológicas (circadianas, ultradianas e infradianas), próprias de qualquer organismo.

No Experimento 1, observou-se uma marcada diferença noturna na habituação, que poderia estar sugerindo a existência de uma variação da capacidade de aprendizagem. A possibilidade dessa variação existir, leva necessariamente a considerar a existência de uma ritmicidade endógena determinando tal variação. Nos Experimentos 2 e 3 continuou-se a observar a diferença matutina-vespertina na capacidade de aprendizagem, porém menos evidente em relação ao Experimento 1. Em ambos os experimentos se observa uma facilitação da habituação, tanto à noite como pela manhã.

Tentou-se explicar os dados pela análise dos efeitos dos últimos dois fatores, a condição fisiológica determinada pelo próprio ritmo circadiano das diversas variáveis fisiológicas e/ou determinadas pelo efeito das condições ambientais. A interação

destas condições fisiológicas com a experiência prévia (aprendizagem-memória) foi analisada pela comparação das quatro sessões de habituação a que foram submetidos os animais. Uma outra argumentação utilizada abordou explicações quanto à modificação do valor biológico ou funcional do som. Um determinado som, caracterizado por seus parâmetros físicos (intensidade, frequência e duração) vai ter maior ou menor valor, segundo a história filogenética (valor biológico) e segundo a história ontogenética (valor funcional). Em algumas situações, sob o ponto de vista biológico, o estímulo utilizado pode não ter valor para o animal. A partir de relações aprendidas, considerando a história de reforçamento das relações estímulo-estímulo ou estímulo-resposta, esse estímulo pode adquirir significado funcional. No caso da habituação, não ocorrem relações explícitas entre o som e outros estímulos, mas já no transcurso ou depois da primeira sessão, o valor funcional poderia diminuir desde que o som não tem nenhuma consequência programada para o animal. Isto de fato parece acontecer, pois em praticamente todas as sessões há uma diminuição da resposta ao estímulo (habituação).

Porém, também deve ser considerado o efeito do meio externo, mais especificamente das condições de luminosidade, no valor do estímulo. Nesse caso, o valor do estímulo seria consequência de uma modificação fisiológica. Durante a fase escura, o valor funcional do som seria potencializado devido ao fato da capacidade visual do animal estar diminuída em condições de baixa luminosidade. Essa alteração atuaria no sentido de

dificultar a habituação. Isto se deve também ao fator filogenético, dado o fato do pombo ser um animal diurno

Com relação ao sistema circadiano das aves deve-se lembrar que: (a) está formado basicamente por três relógios biológicos pineal, retina e um núcleo no hipotálamo lateral, cada um dos quais com um papel diferente segundo a espécie e a variável considerada e (b) os organismos são estruturas multioscilaatórias coordenados ou modulados por marcapassos mestres. É, então pertinente hipotetizar, que a variação temporal na aprendizagem seria gerada por um dos relógios biológicos das aves, pela interação de dois ou dos três relógios ou pela interação das numerosas variáveis fisiológicas que flutuam num período de 24 h. Ou seja, a maioria das variáveis fisiológicas de um organismo tem uma flutuação circadiana, com a finalidade de promover a adaptação do indivíduo à alternância do dia e da noite. Esta variação fisiológica ao longo do dia provavelmente implicaria também na modificação do desempenho em situações de aprendizagem, evidenciando alterações na capacidade de aprendizagem.

Os animais dos Experimentos 2 e 3 tiveram em comum a permanência em luz contínua, o que determinaria uma virtual ausência de melatonina. Assim, a menor diferença noite-dia observada poderia também dever-se a níveis baixos de melatonina. Os numerosos sítios de ligação de melatonina em estruturas encefálicas de aves, indicam que estas estruturas seguramente respondem ao padrão circadiano de melatonina.

O argumento de que foi possível eliminar a melatonina plasmática pela exposição dos animais à luz contínua implica em que essas estruturas cerebrais deixariam de ser afetadas pela presença

rítmica de melatonina. Assim, na sua ausência haveria a perda do padrão circadiano, resultando numa manifestação menos evidente dos ritmos circadianos ou numa desincronização entre eles.

O sistema circadiano das aves consta de três osciladores principais. Ao eliminar a melatonina poderíamos supor que estaríamos eliminando a intervenção da pineal e da retina, na manifestação dos ritmos, isto é, dos osciladores produtores de melatonina. Restaria, então, o NSQ como possível responsável pela diferença ainda observável. Outra possibilidade seria de que a manifestação desta diferença, tão claramente observada no Experimento 1, poderia dever-se às interações neurais e humorais dos três osciladores. Assim, ao modificar a interação humoral estaríamos diminuindo a diferença observada. Podemos aqui enfatizar que a ausência de melatonina pode estar facilitando o processo de habituação.

Aparentemente, a ausência de melatonina correlaciona-se com uma diminuição da resposta dos animais aos estímulos sonoros e com o favorecimento da memória a curto e longo prazo. Neste sentido, os dados apontam na mesma direção que os resultados de Dawson *et al.* (1986). Apesar desta facilitação nos Experimentos 2 e 3, a diferença noite-dia ainda permanece.

A comparação entre os Experimentos 2 e 3 mostra alteração dos resultados em função da manipulação do período de luz. A diferença noite-dia no Experimento 3 é menos evidente. Esse dado pode ser relacionada com a variável estresse visto que os animais foram submetidos a uma mudança ambiental por dois dias,

tempo provavelmente muito curto para permitir a adaptação à nova situação. Poder-se-ia considerar, segundo o comentado no Experimento 3, que estes animais estariam na segunda etapa do ciclo das mudanças fisiológicas que normalmente acontecem numa situação de estresse, caracterizada pela ativação do eixo hipotálamo-hipofisiário-adrenocortical, com a consequente liberação de glicocorticóides. Os glicocorticóides por sua vez afetam a maioria dos sistemas do organismo, determinando uma desestabilização de todo o sistema fisiológico. Estas alterações seguramente vão retroagir sobre as estruturas cerebrais envolvidas na organização da aprendizagem. Somado a isso, a ausência de um hormônio antiestresse como a melatonina, provavelmente estaria agravando a situação.

No Experimento 2, os animais permaneceram, no transcurso de todo o estudo, na mesma sala com iluminação contínua, possibilitando a adaptação à situação. Isto leva a pensar que esses animais estariam na terceira etapa do ciclo das mudanças fisiológicas que normalmente acontecem numa situação de estresse. Ou seja, na situação de aprendizagem-adaptação, modulada pela produção de fatores neuroendócrino.

Nesse contexto, é oportuno colocar outra variável que poderia ter um efeito importante nesta diferença noite-dia da habituação, que seria o nível de glicocorticóides. Veldhuis *et al.* (1985), trabalhando com ratos, observaram que a aprendizagem e a retenção da imobilidade em situações de natação forçada eram facilitadas por aumento nos níveis de glicocorticóides na circulação. A adrenalectomia diminuiu a retenção, enquanto que a administração exógena de glicocorticóides facilitou a mesma. A

importância destes hormônios na aprendizagem se vê reforçada pela presença de receptores de corticosterona no sistema límbico, principalmente no hipocampo (Velduis *et al.*, 1985). Tais considerações são importantes na medida em que a corticosterona plasmática de pombos mostra uma variação circadiana (Joseph & Meier, 1973; Cipolla-Neto *et al.*, 1988). As interações entre os níveis de corticosterona e os níveis de melatonina provavelmente tem um papel relevante nas características do processo de habituação observadas nos experimentos.

Podemos tentar analisar a diferença entre o Experimento 2 e 3 sob um outro ponto, que de alguma forma está implícito na hipótese anterior. No grupo 2L, a ausência aguda de melatonina seguramente desorganizou o sistema circadiano. Nos animais da condição LL, depois de 20 dias de luz contínua o efeito da melatonina na manifestação dos ritmos circadianos poderia ser substituído por outros mecanismos. Assim, depois de um determinado tempo o controle seria assumido por outras estruturas oscilatórias. Esta plasticidade teria um importante valor adaptativo, já que em caso de lesão de um oscilador, alguma outra estrutura tomaria comando, de tal forma que o animal possa continuar ajustando-se à alternância ambiental.

De um modo geral, o conjunto de dados desses experimentos, sugere a existência de uma variação na capacidade de aprendizagem. Contudo, a caracterização precisa dessa variação temporal inclui um passo de fundamental importância, que é a determinação de como varia a habituação ao longo das 24h. Nesse sentido, foi feita uma observação piloto, trabalhando com animais

submetidos a um ciclo eterno LE de 12:12h. Foram testados seis pombos numa sessão com o estímulo A a cada 4 h, durante um período de 24 h. Os dados obtidos, se for considerado o número de estímulos necessários para habituação, aparentemente indicam uma ritmicidade circadiana na capacidade de aprendizagem descrita por uma onda quadrada. Ou seja, durante a fase clara houve uma facilitação da habituação, enquanto que durante a fase escura houve uma inibição (Ver Figura 21). Essas observações precisariam ser replicadas de forma sistemática a fim de serem confirmadas. Além da caracterização precisa, restaria ainda averiguar se esta ritmicidade seria endógena ou se seria meramente uma resposta do organismo às condições cíclicas do meio ambiente. Para isso seria necessário repetir o experimento em condições ambientais totalmente constantes. Se a ritmicidade na habituação continuar manifestando-se, com um período em livre-curso poderíamos assegurar que é um ritmo endógeno. Outro procedimento interessante, que levaria a uma confirmação definitiva ou não desta diferença matutina-vespertina, seria alternar novamente os horários de testes, usando os mesmos animais. Ou seja, cada pombo passaria por um total de oito sessões de habituação. Se a diferença continuasse a se manifestar nas quatro últimas sessões, estaríamos reafirmando a atuação de fatores matutinos-vespertinos na expressão da memória a longo-prazo que caracteriza todo processo de aprendizagem.

A característica dos dados, apontando uma possível organização temporal dos processos de aprendizagem, aparenta ser coerente considerando que o meio ambiente em que o animal vive é recorrente em praticamente todas suas características

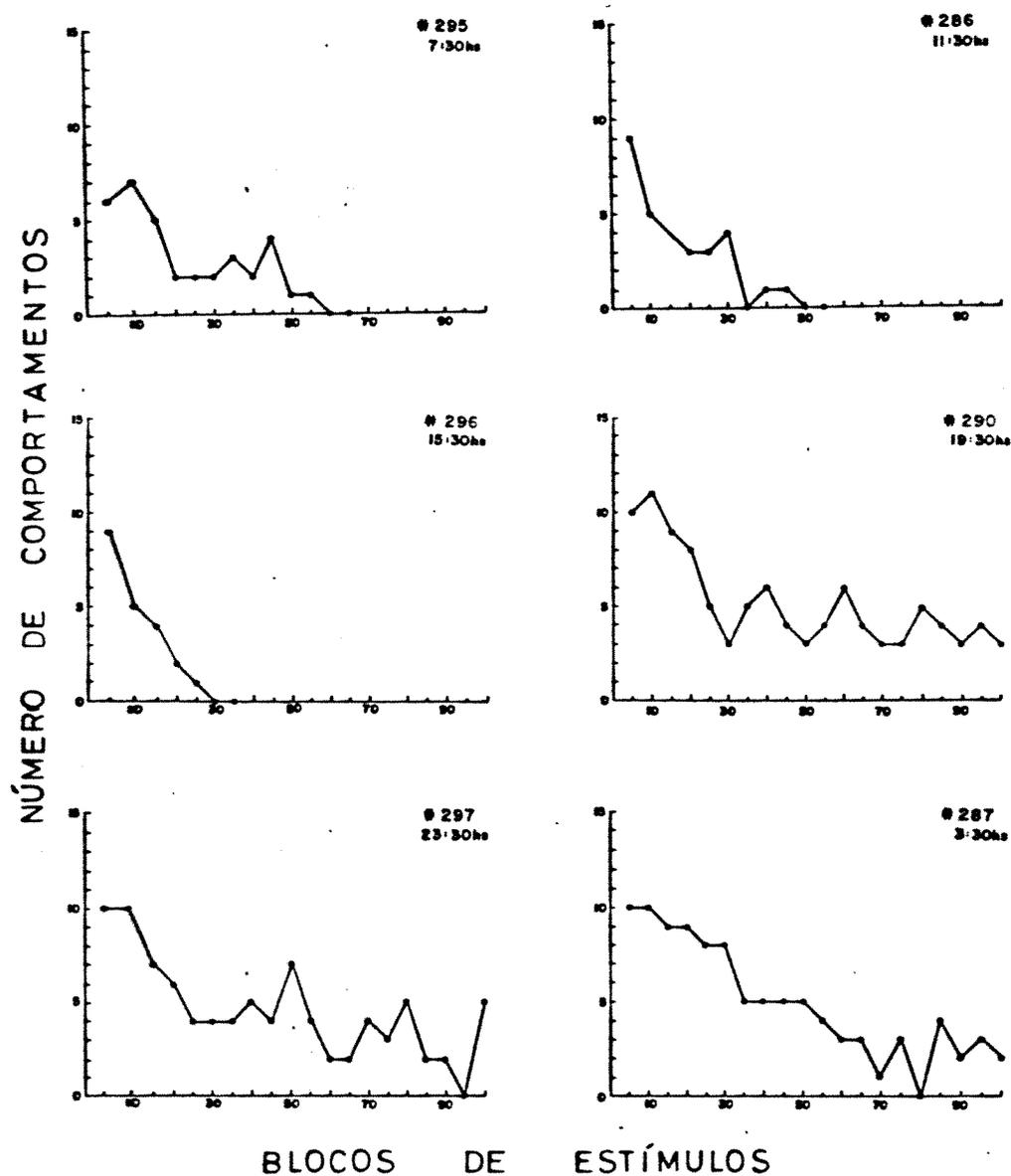


Figura 21. Curvas individuais da somatória dos comportamentos exploratórios e pré-exploratórios, por blocos de cinco estímulos, obtidos em sessões realizadas em diferentes horários. Na margem direita-superior da cada curva está indicado o número do pombo e o horário da sessão.

(iluminação, disponibilidade de alimentos, predação, temperatura, etc). Resulta, portanto, que para a adaptação e sobrevivência da espécie num meio essencialmente rítmico é muito importante a recorrência de suas variáveis bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. Assim, parece lógico pensar que um processo como a aprendizagem, fundamental para a sobrevivência de um indivíduo, e conseqüentemente da espécie, também demonstre um ajuste com a alternância ambiental para garantir a eficiência do mesmo. Esta ritmicidade da aprendizagem poderia ser endógena, poderia ser conseqüência direta do ritmo de atividade-reposo, poderia ser conseqüência de uma ou mais variáveis fisiológicas ou ser uma simples resposta à alternância do meio externo e conseqüente valor funcional dos estímulos. Uma perspectiva interessante para tentar elucidar estas suposições é a análise da correlação dos dados comportamentais com medidas de variáveis fisiológicas, tais como temperatura corporal, nível de corticosterona e melatonina plasmática, ciclo de atividade-reposo. Tais análises permitiriam estabelecer a relação entre estes ritmos circadianos e a variação na aprendizagem

V. Abstract

The present work investigated habituation learning to acoustic stimulation in the context of temporal organization of behavior. The process of habituation of the exploratory responses to sound was analysed in three experiments. The main purpose of these experiments was the analysis of these responses as function of the time of habituation sessions, i.e., morning or night tests. The experiments differed in relation to the light cycles to which adult pigeons were exposed : 12:12h light-dark cycle in Experiment 1; continuous illumination in Experiment 2 and two-days of continuous illumination interposed to a 12:12 light-dark cycle, in Experiment 3. Time for testing was matched for the three experiments with morning tests at 7:30 a.m., one hour after light onset, and night tests at 7:30 p.m., one hour after turn out of light. Pigeons were exposed to 1000-Hz, 83-dB, 1s sound (stimulus A) at 30 seconds intervals until habituation of the exploratory and startle response or until a maximum of 100 stimulus when the learning criterion was not observed. The learning criterion was 10 trials without the occurrence of these responses. Twenty-four hours after habituation to stimulus A the birds were tested with a 500-Hz, 85-dB, 1s sound (stimulus B). Retesting, with the same sequence of procedures but reversal of the time of test was carried out 18 days after stimulus B habituation. Results from Experiment 1 showed an increased number of habituation trials in nocturnal ($p < 0.05$) as compared to the morning tests for both stimulus A and B. The number of trials until habituation in the Experiment 2 showed differences between morning-night test only for stimulus A session. Pigeons exposed to two-days of continuous illumination in Experiment 3 also showed a morning-night difference, although it was not significant. Taken together the data from these experiments suggest one temporal organization of the habituation learning processes and raises issues concerning the biological meaning of sound stimulation in light and dark environmental conditions. The differences observed between the three experiments also suggest a role for the melatonin hormone in these processes. Pigeons maintained under continuous light or exposed to two-days of continuous illumination prior to tests, which were probably characterized by decreased levels of melatonin, showed facilitation of habituation when compared to pigeons maintained under light-dark cycle. The lower levels of melatonin may act toward a facilitation of habituation. It was also argued a possible stress variable due to exposition to two-days of continuous light. In this condition the animals probably did not have enough time for adaptation to the new situation of constant light. Further studies are necessary for a precise characterization of those morning-night differences in habituation to sound as expression of a circadian rhythmicity.

VI. Resumo

Este trabalho analisou a habituação a sons no contexto da organização temporal do comportamento. O processo de habituação da resposta exploratória ao som foi analisado em três experimentos. O objetivo principal desses experimentos foi a análise dessa resposta em função do horário das sessões de habituação, i.e., matutinas ou vespertinas. Os experimentos diferiram quanto aos ciclos de iluminação aos quais pombos adultos foram expostos: ciclo claro-escuro de 12:12h, no Experimento 1; claro contínuo, no Experimento 2; e dois dias de claro contínuo, interposto a um ciclo claro-escuro de 12:12h, no Experimento 3. Os três experimentos foram iguados quanto aos horários de teste. Os testes matutinos foram realizados às 7:30h, uma hora após o acender da luz, e às 19:30h, uma hora após o desligar da luz. Os pombos foram submetidos a apresentações de um som de 1000-Hz, 83-dB, 1s (estímulo A), a cada 30 s, até habituação das respostas exploratórias ou até um máximo de 100 estímulos, quando o critério de aprendizagem não era observado. O critério de aprendizagem estabelecia a ocorrência de 10 estímulos sem o registro de respostas exploratórias. Uma segunda sessão de habituação, com a apresentação de um som de 500-Hz, 85-dB, 1s (estímulo B), foi realizada 24h depois. O reteste, com a mesma sequência de procedimentos e inversão do horário de teste, foi realizado 18 dias após a segunda sessão. Os resultados do Experimento 1 mostraram que nos testes noturnos, em comparação com os matutinos, houve um maior número de estimulações até habituação ($p < 0,05$), tanto para o estímulo A quanto para o estímulo B. No Experimento 2 foram observadas diferenças na velocidade da habituação nos testes matutinos e noturnos, apenas nas sessões com o estímulo A ($p < 0,05$). Os pombos expostos a dois dias de iluminação contínua antes dos testes do Experimento 3 também mostraram uma diferença noite-dia embora não significativa. O conjunto de dados desses experimentos sugerem uma organização temporal dos processos de habituação e colocam questões relativas ao significado biológico da estimulação sonora em condições de claro e de escuro. As diferenças observadas entre os três experimentos também sugerem uma função para a melatonina na regulação desses processos. Os pombos mantidos sob iluminação constante e aqueles que foram expostos a dois dias de luz contínua antes do teste, provavelmente caracterizados por baixos níveis de melatonina plasmática, mostraram menor velocidade de habituação em comparação com os pombos mantidos em ciclo claro-escuro. Os baixos níveis de melatonina poderiam atuar no sentido de uma facilitação da habituação. Também foi argumentado um possível efeito de estresse devido à exposição a dois dias de luz contínua. Nesta condição provavelmente não haveria tempo suficiente para adaptações à nova situação de iluminação. A caracterização precisa dessas diferenças noite-dia na habituação ao som como expressão de um ritmo circadiano necessita ainda de outros estudos.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adamo, N. I. & Bennett, T. L., The effect of hyperstriatal lesions on head orientation to a sound stimulus in chickens. Experimental Neurology, 19:166-175, 1967.
- Armstrong, S.M. Melatonin and circadian control in mammals. Experientia 45:932-938, 1989.
- Aschoff, J. Masking of circadian rhythms by *Zeitgebers* as opposed to entrainment. In: Hekkens, W. TH. J. M.; Kerkhof, G. H. & Rietveld, W. J. (ed), Trends in Chronobiology, Pergamon Press, pp. 149-161, 1987.
- Aschoff, J. Zeitgeber der Tierischen Tagesperiodik. Naturwissenschaften, 41:49-56, 1954. Em Introdução ao Estudo da Cronobiologia. Editado por J. Cipolla-neto, M. Marques, e L.S. Menna-Barreto, Icone editora, SP, 1988.
- Aschoff, J. Circadian Rhythms: General Features and Endocrinology Aspects. In: Krieger (ed) Endocrine Rhythms, Raven Press, pp. 1-32, 1979.
- Aschoff, J. (Ed) Handbook of Behavioral Neurobiology. Biological Rhythms. New York, Plenum Press, 1981. Em Introdução ao Estudo da Cronobiologia editado por J. Cipolla-Neto, N. Marques e L.S. Menna-Barreto, Icone editora, 1988.

-Becker, P. H., The coding of species-specific characteristics in birds sounds. In: Acoustic Communication in Birds (vol I). Edited by D.E. Kroodsma, E.H. Miller & H. Dwellet. Academic Press, New York, 1982.

-Buzsáki, G. The "Where is it? reflex": Autoshaping the Orienting Response. Journal of the Experimental Analysis of Behavior 37:461-484, No 3, may 1982.

-Cassone, V.M. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. Trends in Neuroscience, 13, (11):457-464, 1990.

-Chabot, C.C. & Menaker, M., Effects of physiological cycles of infused melatonin on circadian rhythms in pigeons. Journal of Comparative Physiology A, 170:615-622, 1992.

-Cipolla-Neto, J.; Marques, N. e Menna Barreto, L. S. (Orgs). Introdução ao Estudo da Cronobiologia. Edusp., São Paulo, 1 ed. 1988.

-Dawson, K.A.; Crawne, D.P. & Richardson, C.M., Pineal lesion produces bilateral visual and auditory inattention in the rat. Behavioural Brain Research, 19:187-190, 1986.

-Douglas, A.N. & Marler, P., Categorical perception of a natural stimulus continuum: birdsong. Science, 244:976-978, 1989.

-Ebihara, S.; Uchiyama, K. & Oshima, I., Circadian organization in the pigeon, C.L.: the role of the pineal organ and the eye. Journal of Comparative Physiology A 154:59-69, 1983.

- Ebihara, S.; Oshima, I.; Yamada, H.; Goto, M. & Sato, K., Circadian organization in the pigeon. In: Hiroshige, Homma, Comparative Aspects of Circadian Clocks, pp.84-94, Hokkaido University Press, Sapporo, 1987.
- Ferrari, E.A.M. Catálogo de comportamentos de pombos (Columbia livia). Trabalho apresentado na Reunião Anual da SBPC, Campinas, SP, Julho de 1982.
- Foa, A. & Menaker, M., Contribution of pineal and retinae to the circadian rhythms of circulating melatonina in pigeons. Journal of Comparative Physiology A 164:25-35, 1988.
- Griffin, J.F.T., Stress and Immunity: a Unifying Concept. Veterinary Immunology and Immunopathology, 20:263-312, 1989.
- Halberg, F.; Vischer, M.B. & Bittner, J.J., Relation of visual factors to eosinophil rhythm in mice. American Journal of Physiology, 179: 229-235, 1954.
- Harris, J.D., Psichiat. Bull., 40,385 (1943). In: Sharpless, S. & Jasper, H., Habituation of the arousal reaction. Brain, 79: 655-680, 1956.
- Hamassaki, D.E., Transferência Inter-Hemisférica da Habituação a Estímulos Luminosos em Pombos Tese de Mestrado em Fisiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1986.
- Joseph, M. M. & Meier, A. W., Daily rhythms of plasma corticosterone in the common pigeon, C.l. General and Comparative Endocrinology 20: 320-330, 1973.

-Khan, R.; Burton, S.; Morley, S.; Daya, S. & Potgieter, B. The effect of melatonin on the formation of Gastric stress lesions in rats. Experientia, 46:88-89, 1990a.

-Khan, R.; Daya, S. & Potgieter, B., Evidence for a modulation of the stress response by the pineal gland. Experientia, 46:860-862, 1990b.

-Krause, D.N. & Dubocovich, M.L., Regulatory sites in the melatonin system of mammals. Trends of Neuroscience, 13, (11): 464-467, 1990.

-Linden, R., Transplante de relógio biológico. Ciência Hoje, 12, (71):7, 1991.

-Lorenz K. Sobre la Agresión: El Pretendido Mal. Siglo Veintiuno Editores. 13 ed., 1963.

-Mahata, S. K. & De, K. Effect of melatonin on norepinephrine, epinephrine and corticosterone contents in de adrenal gland of three avian species. Journal of Comparative Physiology B, 161: 81-84, 1991.

-Marques, M.D., Ritmos biológicos e adaptação ao meio ambiente. Apostilas do Quarto Curso de Verão de Cronobiologia 1991.

-Millenson, J.R., Princípios de Análise do Comportamento Coordenada. Editora de Brasília, 1967.

-Moore-Ede, M.D.; Sulzman, F.M. & Fulher, C.A., The Clock That Time Us, Physiology of the Circadian Timing System. Cambridge, Harvard University Press, 1982.

-Norgren, R.B., Jr. & Silver, R., Retinohypothalamic projections and the suprachiasmatic nucleus in birds. Brain, Behavior and Evolution 34:73-83, 1989.

-Norgren, R.B. Jr., Neural basis of circadian rhythms. Bird Behavior. 8: 57-66, 1990.

-Oshima, I.; Yamada, H.; Goto, M.; Sato, K. & Ebihara, S., Pineal and retinal melatonin is involved in the control of circadian locomotor activity and body temperature rhythms in the pigeon. Journal of Comparative Physiology A, 166:217-226, 1989

-Paludetti, L.A., A origem dos ritmos biológicos e seu papel na evolução e adaptação dos seres vivos. Em: Cipolla-Neto, J.; Marques, M. e Menna-Barreto, L. S. (Eds), Introdução ao Estudo da Cronobiologia, Icone editora, SP, 1988.

-Pitman, D.L.; Ottenweller, J.E.; Natelson, B.H., Methodological Problems in the Study of Classical Aversive Conditioning of Adrenocortical Responses. Physiology & Behavior 38:677-685, 1986.

-Ralph, M.R.; Foster, R.G.; Davis, F.C. & Menaker, M., Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. Science, 247:975-978, 1990.

- Ribeiro do Valle, L.E., Bases Neurais do Comportamento Exploratório. Dissertação de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (SP), 1982.
- Rivkees, S.A.; Cassona, V.M.; Weavaer, D.R. & Reppert, S.M., Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. Endocrinology 125:363-368, 1989.
- Rosenzweig, M.R. & Leiman, A.L., Physiological Psychology D.C. Heath and Company. Massachusetts, 1982.
- Sharpless, S. & Jasper H., Habituation of the arousal reaction. Brain 79:655-680, 1956.
- Saunders, D. S. Insect Clocks, Pergamon Press, Second Edition, 1982.
- Scourse, N.J.S. & Hinde, R.A., Habituation to auditory stimuli in mice. Behaviour, XLII :1-13, 1972.
- Sokolov, E. N., Perception and the conditioned reflex. New York, Pergamon Press, 1963. In: Buzsáki, G., The "where is it reflex?": autoshaping the orienting response. Journal of the Experimental Analysis of Behavior. 3, (37): 461-485, 1982.
- Thompson, R.F., The Neurobiology of learning and memory. Science, 233: 941-947, 1986.
- Thompson, R.F. & Spencer, W.A., Habituation: a dual process theory Psychological Review 77:419-450, 1966

-Tighe, T.J. & Leaton, R.N. (Editors) Habituation. Perspectives from Child Development, Animal Behavior and Neurophysiology Lawrence Erlbaum Associates Publishers, Hillsdale, 1976.

-Toledo, C.A.B., Facilitação da Habituação da Resposta Exploratória a Estímulos Sonoros em Pombos Destelencefalados. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, 1989.

-Toledo, C.A.B. & Ferrari, E.A.M. Habituation to sound stimulation in detelencephalated pigeons (*Columba livia*). Brazilian Journal of Medical Biological Research 24:187-190, 1991.

-Turek, F.W. & Van Cauter, E., Rhythms in Reproduction. Em: Knobil, E. and Neil, J. (Eds), The Physiology of Reproduction, Raven Press, Ltd., New York, 1988.

-Underwood, H., The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates Experientia 45:914-922, 1989.

-Veldhuis, H. D.; De Korte, C. C. M. M. & De Kloet, E. R. Glucocorticoides facilitate the retention of acquired immobility during forced swimming. European Journal of Pharmacology, 115: 211-217, 1985.

-Waterhouse, J. & Monors, D. Masking and entrainment. In: Hekkens, W. Th. J. M.; Kerkhof, G. A. & Rietveld, W. J. Trends in Chronobiology, Pergamon Press, pp. 163-171, 1987.

-Wever, R. A., The Circadian System of Man, Springer-Verlag, New York, 1979

-Yamada, H.; Oshima, I.; Sato, K. & Ebihara, S., Loss of the circadian rhythms of locomotor activity, food intake and plasma melatonin concentration induced by constant bright light in the pigeon (Columba livia), Journal of Comparative Physiology A, 163:459-463, 1988.

-Zucchi, H. & Bergman, H., Long term habituation to species-specific alarm calls in a songbird (Fringilla coelebs L.). Experientia, 31:817-818, 1975.

VIII. Apêndice

Tabela I. Número total de estímulos a que foi submetido cada indivíduo da condição LE. Σ : somatória por sessão, X: média; EPM: erro padrão médio.

HAN-LE				HAM-LE				
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE		
A	B	A	B	A	B	A	B	
100	90	78	26	47	53	100	90	
100	90	35	22	36	30	100	90	
100	90	31	14	78	35	100	90	
68	90	29	40	55	31	100	24	
100	83	46	17	78	30	100	90	
100	76			37	70			
100	90			28	14			
100	11			46	45			
Σ	768	620	219	119	377	308	500	384
X	96,0	77,5	43,8	23,8	47,1	38,5	100	76,8
EPM	3,74	9,04	8,07	4,06	5,02	5,67	0,00	11,78

Tabela II. Número total de estímulos a que foi submetido cada indivíduo da condição LL. Σ : somatório por sessão; \bar{X} : média; EPM: erro padrão médio.

HAN-LL				HAM-LL				
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE		
A	B	A	B	A	B	A	B	
81	19	15	11	48	21	33	17	
100	27	62	16	25	33	90	40	
100	49	20	12	24	23	55	14	
100	90	24	20	27	29	90	24	
100	90	25	29					
100	53	19	23					
Σ	581	328	165	111	124	106	268	95
\bar{X}	96,83	54,67	27,50	18,50	31,00	26,50	67,00	23,75
EPM	2,89	11,26	6,44	2,57	4,94	2,38	12,14	5,03

Tabela III. Número total de estímulos a que foi submetido cada indivíduo da condição 2L. Σ : somatória por sessão; X: média; EPM: erro padrão médio.

HAN-2L				HAM-2L				
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE		
A	B	A	B	A	B	A	B	
52	25	54	42	49	14	18	11	
100	75	13	28	100	63	80	76	
100	43	100	23	19	63	100	90	
100	43	86	22	68	37	25	16	
19	32	19	33	52	26	12	22	
28	50	32	26	57	11	83	90	
Σ	399	268	304	174	345	214	318	305
X	66,50	44,66	50,60	29,00	57,5,	35,66	53,00	50,80
EPM	14,25	6,46	13,40	2,79	9,86	8,60	14,46	14,27

Tabela IV. Número inicial de respostas obtidas em cada indivíduo da condição LE. Σ : somatória por sessão; X: média; EPM: erro padrão médio.

HAN-LE				HAM-LE			
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE	
A	B	A	B	A	B	A	B
7	6	4	5	7	7	8	7
5	10	6	4	6	6	6	4
9	4	7	3	11	8	10	6
6	9	3	4	8	9	9	7
8	7	7	8	10	8	7	0
7	3			9	7		
10	8			6	5		
14	2			10	4		
Σ 69	49	27	24	67	54	40	24
X 8,25	6,12	5,40	4,80	8,37	6,75	8,00	4,80
EPM 0,93	0,96	0,72	0,77	0,64	0,55	0,63	1,18

Tabela V. Número inicial de respostas obtidas em cada indivíduo da condição LL. Σ : somatória por sessão; X: média; EPM: erro padrão médio.

HAN-LL				HAM-LL				
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE		
A	B	A	B	A	B	A	B	
10	4	9	3	6	4	3	1	
13	6	4	2	9	4	6	1	
13	8	8	6	10	3	9	3	
10	2	6	1	5	2	3	1	
11	8	8	1					
7	5	8	1					
Σ	64	33	43	14	30	13	21	8
X	10,67	5,50	7,16	2,33	7,50	3,25	5,25	2,00
EPM	0,84	0,87	0,68	0,73	1,03	0,41	1,24	0,55

Tabela VI. Número inicial de respostas obtidos em cada indivíduo da condição LL. Σ : somatória por sessão; \bar{X} : média; EPM: erro padrão médio.

HAN-2L				HAM-2L				
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE		
A	B	A	B	A	B	A	B	
7	4	4	4	5	3	3	3	
6	5	3	3	6	1	6	5	
8	3	4	1	11	4	7	1	
8	4	5	4	8	4	5	4	
5	4	6	1	5	5	6	5	
10	4	10	5	6	4	5	2	
Σ	44	24	32	18	41	21	32	20
\bar{X}	7,33	4,00	5,33	3,00	6,83	3,50	5,33	3,33
EPM	0,65	0,23	0,93	0,62	0,86	0,51	0,51	0,60

Tabela VII. Número médio de resposta por estímulo ($\sum \text{EXP+PRE} / \sum \text{Estímulos}$) obtido em cada indivíduo da condição LE. \sum : somatória por sessão; X: média; EPM: erro padrão médio.

HAN-LE				HAM-LE			
TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE	
A	B	A	B	A	B	A	B
1,17	0,99	0,61	0,36	0,52	0,48	0,96	0,93
0,75	0,61	0,60	0,26	0,34	0,53	0,91	0,71
0,75	0,48	0,59	0,29	0,79	0,76	1,24	1,26
1,24	1,32	0,37	0,54	0,58	0,70	0,82	0,92
0,87	0,85	0,55	0,52	0,94	0,48	0,75	0,12
0,70	0,25			0,74	0,46		
0,79	0,65			0,59	0,53		
1,07	0,18			0,71	0,28		
\sum	7,34	5,33	2,72	1,97	5,21	4,22	3,94
X	0,91	0,66	0,54	0,39	0,65	0,53	0,79
EPM	0,07	0,12	0,04	0,05	0,06	0,05	0,17

Tabela VIII. Número médio de resposta por estímulo (\sum EXP+PRE/Estímulos) obtido em cada indivíduo da condição LL. \sum : somatória por sessão; X: média; EPM: erro padrão médio.

	HAN-LL				HAM-LL			
	TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	0,88	0,63	0,60	0,31	0,37	0,22	0,27	0,07
	1,14	0,64	0,63	0,09	0,56	0,28	0,64	0,23
	0,64	0,03	0,40	0,09	0,63	0,31	0,47	0,16
	1,20	0,78	0,66	0,41	0,44	0,33	0,40	0,27
	0,61	0,35	0,70	0,17				
	0,77	0,54	0,79	0,25				
\sum	5,24	2,97	3,78	1,32	2,00	1,14	1,78	0,73
X	0,87	0,55	0,63	0,22	0,50	0,28	0,44	0,18
EPM	0,09	0,09	0,05	0,05	0,05	0,02	0,06	0,03

Tabela IX. Número médio de respostas por estímulo ($\sum \text{EXP+PRE} / \sum \text{Estimulos}$), obtido em cada indivíduo da condição 2L. \sum : somatória por sessão; X: média; EPM: erro padrão médio

	HAN-2L				HAM-2L			
	TESTE		RETESTE		TESTE		RETESTE	
	A	B	A	B	A	B	A	B
	0,78	0,70	0,52	0,54	0,73	0,46	0,52	0,19
	0,94	0,37	0,78	0,30	0,56	0,48	0,54	0,64
	0,58	0,25	0,26	0,39	0,63	0,70	0,85	0,63
	0,61	0,32	0,54	0,26	0,75	0,28	0,55	0,09
	0,55	0,48	0,23	0,25	0,47	0,09	0,56	0,50
	0,60	0,44	0,31	0,30	0,50	0,23	0,25	0,27
\sum	4,06	2,56	2,64	2,04	3,64	2,24	3,22	2,32
X	0,68	0,43	0,44	0,34	0,60	0,37	0,54	0,39
EPM	0,06	0,06	0,08	0,04	0,04	0,08	0,07	0,09

Tabela X. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAN-LL por cada bloco de cinco tentativas para os estímulos A e B do teste.

Blocos de	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	8,2	0,19	7,1	0,7	6,1	0,9
02	6,0	0,4	3,9	0,7	3,5	0,7
03	6,5	0,8			3,9	0,8
04	5,2	0,3			3,1	0,6
05	5,6	0,6			2,7	1,0
06	5,7	0,8			4,6	1,0
07	5,4	0,6			3,0	0,8
08	5,4	0,7			3,6	0,8
09	4,0	0,8			3,1	0,7
10	3,6	0,3			2,4	0,8
11	3,6	0,6			3,6	0,9
12	3,4	0,6			2,2	0,8
13	4,0	0,8			1,9	0,6
14	3,6	0,9			2,4	1,0
15	3,2	0,8			2,4	0,9
16	2,9	0,7			1,6	0,8
17	3,1	0,8			2,6	0,9
18	3,4	0,7			2,2	0,9
19	3,0	0,6				
20	2,6	0,7				

Tabela XI. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAN-LE por bloco de cinco estímulos, para os estímulos A e B do reteste.

Blocos	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	5,4	0,7	3,6	0,8	4,8	0,7
02	3,6	0,9	2,0	0,3	2,4	0,9
03	3,8	0,2			0,6	0,3
04	2,8	0,7			0,8	0,4
05	3,0	0,9			0,2	0,2
06	0,6	0,3			1,2	0,6
07	2,0	1,1				
08	0,8	0,5				
09	0,0	0,0				
10	0,4	0,3				
11	0,4	0,3				
12	1,0	0,1				
13	0,2	0,2				
14	0,4	0,3				

Tabela XII. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAM-LE, por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do teste.

Blocos	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	8,4	0,6	6,4	1,0	6,6	0,6
02	5,2	0,6	3,2	0,3	3,0	0,8
03	5,0	0,6			3,2	0,7
04	2,7	0,6			1,7	0,3
05	2,4	0,6			1,5	0,5
06	2,4	0,7			1,1	0,5
07	2,4	0,8			0,9	0,6
08	1,5	0,6			0,6	0,4
09	0,9	0,5			0,4	0,2
10	0,4	0,2			0,5	0,4
11	0,5	0,3			0,6	0,6
12	0,7	0,5			0,5	0,4
13	0,2	0,1				
14	0,7	0,5				

Tabela XII. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAM-LE, por cada bloco de cinco estímulos, para os estímulos A e B do reteste.

Blocos de	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	8,0	0,6	3,6	0,6	4,8	1,2
02	6,4	0,5	1,8	0,3	3,0	0,7
03	4,8	1,2			3,6	0,7
04	5,6	0,7			3,4	1,0
05	5,0	0,7			3,2	1,0
06	4,2	0,3			4,0	1,0
07	3,6	0,6			5,0	1,3
08	3,4	1,0			3,6	1,3
09	4,4	0,7			3,6	0,9
10	3,6	0,7			3,4	1,0
11	4,2	0,7			3,6	1,3
12	4,0	0,9			4,0	1,0
13	4,0	0,3			3,6	1,3
14	5,0	0,3			4,6	1,0
15	5,6	0,7			4,6	1,2
16	4,8	0,7			4,0	0,9
17	4,2	0,7			3,4	1,2
18	4,2	0,4				
19	4,0	0,7				
20	4,6	0,7				

Tabela XIV. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAN-LL por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do teste.

Blocos de	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	10,6	0,8	7,0	0,7	5,5	0,8
02	7,2	0,6	4,2	0,7	4,2	0,7
03	6,2	1,1			3,5	0,9
04	5,7	0,9			2,3	0,6
05	5,7	0,9			1,2	0,4
06	6,2	0,3			2,5	0,9
07	4,7	0,6			1,8	0,7
08	3,0	0,6			1,3	0,4
09	3,5	0,8			0,8	0,3
10	4,2	0,7			1,5	0,8
11	4,0	0,3			1,7	0,7
12	4,2	0,9			0,3	0,2
13	2,7	0,7			0,3	0,2
14	2,0	0,4			1,0	0,6
15	3,0	0,7			0,3	0,3
16	2,5	0,6			1,2	0,7
17	2,7	0,8			0,7	0,6
18	2,8	0,9			0,5	0,4
19	2,5	0,7				
20	2,2	0,9				

Tabela XV. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAN-LL, por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do retestes.

Blocos de	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	7,0	0,7	4,0	1,0	2,3	0,7
02	3,7	0,8	1,5	0,8	0,7	0,3
03	1,8	0,7			0,7	0,4
04	0,7	0,6			0,7	0,6
05	0,7	0,6				
06	0,2	0,1				
07	0,3	0,7				
08	0,7	0,6				
09	0,7	0,6				
10	0,7	0,6				
11	0,3	0,3				

Tabela XVI. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAM-LL por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do teste.

Blocos	1 sessão		2 sessão			
	de		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	7,5	1,0	5,0	1,0	3,2	0,4
02	4,2	0,9	1,7	0,7	2,0	0,0
03	2,5	0,8			1,5	0,2
04	0,5	0,2			0,7	0,4
05	0,2	0,2			0,2	0,2
06	0,5	0,4				
07	0,2	0,2				
08	0,2	0,2				

Tabela XVII. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAM-LL por cadao bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do reteste.

Blocos	1 sessão		2 sessão			
	de		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	5,2	1,2	3,5	0,6	1,7	0,4
02	3,5	0,4	1,7	0,4	1,0	0,3
03	3,2	0,2			1,0	0,6
04	2,2	0,7			0,0	0,0
05	1,7	0,4			0,7	0,6
06	1,5	0,6			0,5	0,4
07	1,2	0,4				
08	1,5	0,6				
09	1,5	0,6				
10	1,2	0,8				
11	0,7	0,4				
12	1,7	0,9				
13	1,2	0,8				
14	0,7	0,6				
15	1,0	0,9				
16	1,7	0,9				

Tabela XVIII. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAN-2L por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do teste.

Blocos de	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	7,3	0,6	4,7	0,7	4,0	0,2
02	4,8	0,5	2,7	0,8	2,3	0,6
03	4,0	0,8			2,8	0,4
04	3,7	0,9			2,3	0,7
05	2,5	0,8			2,2	0,8
06	2,8	0,9			2,0	0,8
07	3,5	0,6			1,2	0,4
08	2,3	0,8			1,2	0,7
09	2,3	0,8			0,5	0,4
10	2,3	0,3			0,5	0,4
11	2,8	0,1			0,3	0,3
12	1,5	0,8			0,2	0,1
13	1,0	0,2			0,5	0,4
14	2,0	0,8				
15	1,3	0,9				
16	1,2	0,5				
17	2,3	0,8				
18	2,0	0,8				
19	1,5	0,7				
20	1,0	0,7				

Tabela XIX. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAN 2L, por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do reteste.

Blocos	1 sessão		2 sessão			
			A		B	
de						
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	5,3	0,9	5,2	1,0	3,0	0,6
02	2,3	0,9	1,7	0,6	2,7	0,6
03	2,3	0,8			1,7	0,3
04	2,2	0,8			0,8	0,3
05	2,0	0,6			0,7	0,4
06	1,8	0,8			0,5	0,5
07	1,7	0,8			0,3	0,3
08	1,5	0,7				
09	1,2	0,7				
10	1,5	0,9				
11	0,7	0,6				
12	0,9	0,7				
13	1,2	0,7				
14	1,0	0,7				
15	0,8	0,8				
16	1,2	0,9				
17	0,3	0,3				
18	0,0	0,0				
19	0,2	0,1				
20	0,3	0,3				

Tabela XX. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para todos os sujeitos do grupo HAM-2L, por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do teste.

Blocos de	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	6,8	0,9	5,2	0,8	3,5	0,5
02	4,7	0,7	2,2	0,7	1,2	0,5
03	3,5	0,7			1,5	0,6
04	3,2	0,7			1,8	0,7
05	2,8	0,6			2,0	0,9
06	2,3	0,7			1,2	0,6
07	2,0	0,7			1,3	0,8
08	1,7	0,7			0,8	0,8
09	1,7	0,7			0,7	1,0
10	1,2	0,7			1,5	0,9
11	0,8	0,8			0,5	0,3
12	0,8	0,5				
13	0,7	0,6				
14	0,5	0,5				
15	0,7	0,6				
16	0,3	0,3				
17	0,5	0,5				
18	0,5	0,5				
19	0,5	0,5				

Tabela XXI. Número médio de respostas comportamentais (X) e o erro padrão médio (EPM), para os sujeitos do grupo HAM-2L, por cada bloco de cinco tentativas, para os estímulos A e B do reteste.

Blocos	1 sessão		2 sessão			
	A		A		B	
de						
Tent.	X	EPM	X	EPM	X	EPM
01	5,3	0,5	3,7	0,9	3,3	0,6
02	2,8	0,8	2,0	0,8	2,7	0,7
03	2,7	1,0			1,5	0,7
04	1,8	0,8			1,0	0,4
05	2,0	0,8			1,7	0,7
06	1,5	0,8			1,8	0,8
07	1,5	0,6			1,8	0,8
08	2,0	0,9			1,3	0,7
09	2,0	0,8			1,0	0,6
10	2,3	1,0			1,5	0,7
11	2,8	1,2			1,5	0,6
12	1,7	0,4			1,2	0,6
13	0,7	0,4			1,5	0,6
14	1,0	0,4			1,3	0,7
15	0,7	0,5			1,0	0,6
16	0,8	0,8			0,7	0,4
17	0,7	0,6			0,8	0,5
18	0,8	0,8			1,2	0,7
19	0,8	0,8				
20	0,7	0,6				