

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CELENA MARIA ZANI DE SOUZA

ORGANIZAÇÃO TEMPORAL DE PROCESSOS DE
APRENDIZAGEM: VARIAÇÃO DE CONCENTRAÇÕES
PLASMÁTICAS DE MELATONINA E CORTICOSTERONA,
ATIVIDADE GERAL E HABITUAÇÃO A SOM, EM POMBOS SOB
CONDIÇÕES DE CLARO-ESCURO E DE CLARO CONSTANTE.

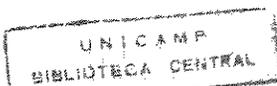
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Celena Maria Zani de Souza
e aprovada pela Comissão Julgadora.
17/12/99

Elenice A. de Moraes Ferrari

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular na área de Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice A. de Moraes Ferrari

Campinas - 1999



UNICAMP
CHAMADA: UNICAMP
De 890
Ex.
IMBO BC/40413
COC. 278/00
C D
RECO R\$ 11,00
DATA 17-02-00
I.º CPD

CM-00138012-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Souza, Celena Maria Zani de

So890 Organização temporal e processos de aprendizagem: variação de concentrações plasmáticas de melatonina e corticosterona, atividade geral e habituação a som, em pombos sob condições de claro-escuro e de claro constante /Celena Maria Zani de Souza. -- Campinas, SP: [s.n.] 1999.

224 f. ilus.

Orientadora: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1.Melatonina. 2.Ritmos biológicos. 3.Aprendizagem.
4. Corticosterona. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes.
II.Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 17/12/1999

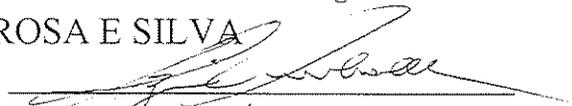
Banca Examinadora:

TITULARES

Profa. Dra. ELENICE APARECIDA DE MORAES FERRARI



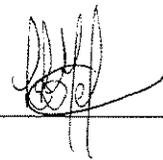
Profa. Dra. ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA



Prof. Dr. EDSON DELATTRE



Profa. Dra. LIANA LINS MELO

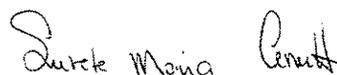


Prof. Dr. FRANCESCO LANGONE

SUPLENTES:

Profa. Dra. REGINA CÉLIA SPADARI BRATFISCH

Profa. Dra. SUZETE MARIA CERUTTI



Ao meu marido Ubirajara
e a meus filhos Cauê, Araê e Tainá
Dedico

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dr.^a Alzira Amélia Martins Rosa e Silva e Clara Soares Caldas pela acolhida e por possibilitarem a utilização das técnicas por elas desenvolvidas para a realização do radioimunoensaio no Laboratório de Fisiologia da Reprodução do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina-USP de Ribeirão Preto.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP, por proporcionar-me a oportunidade da realização deste trabalho.

À Professora Dr.^a Regina Célia Spadari Bratfisch por permitir a utilização dos equipamentos do Laboratório de Adrenoceptores.

A todos do Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento, pela amizade.

Ao Washington, pela colaboração técnica e pela dedicação.

À Verônica, pelas sugestões e pela disponibilidade.

De maneira especial, à minha orientadora e ao meu marido:

~~ELENICE~~ obrigada pela orientação constante, pelo exemplo de vida, pela dedicação e, principalmente, pela amizade que você me ofereceu ao longo destes 20 anos de convivência. Graças a você, hoje, eu sou uma pessoa melhor.

BIRA, sem você este trabalho não teria se realizado. Obrigada pelo apoio, pela ajuda, pela paciência inesgotável, pelo companheirismo. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida e peço a Ele que nos mantenha sempre unidos.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	10
I. O estudo descritivo como etapa preliminar à análise funcional	10
II. Comportamento, Aprendizagem e memória	13
III. Sistemas fisiológicos e ritmicidade circadiana	18
IV. Considerações sobre o sistema circadiano de vertebrados	23
V. Relações entre ritmos comportamentais e concentrações plasmáticas de Melatonina e Corticosterona em Aves	26
VI. Evidências de organização temporal nos processos de aprendizagem e memória	29
VII. Evidências da participação da Melatonina em processos de aprendizagem	40
OBJETIVOS GERAIS	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
EXPERIMENTO I	47
Materiais e Métodos	47
♦ Sujeitos	47
♦ Equipamentos	49
♦ Procedimentos	50
♦ Análise Estatística	56
Resultados	57
Discussão	68

EXPERIMENTO II	74
Materiais e Métodos	74
♦ Sujeitos	74
♦ Equipamentos	75
♦ Procedimentos	76
♦ Análise estatística	83
Resultados	84
Discussão	91
EXPERIMENTO III	107
Materiais e Métodos	107
♦ Sujeitos	107
♦ Equipamentos	108
♦ Procedimentos	109
♦ Análise estatística	113
Resultados	114
Discussão	127
DISCUSSÃO GERAL	144
BIBLIOGRAFIA	153
ANEXO 1	193

RESUMO

O objetivo foi analisar substratos hormonais da variação de atividade geral e de processos de habituação do comportamento exploratório a estimulação acústica ao longo de 24h, relacionando variações diurna-noturna no comportamento e nas concentrações de melatonina (MEL) e corticosterona (B) plasmáticos. A descrição do comportamento utilizou um catálogo de comportamento de pombos em cativeiro, cuja elaboração é descrita no Experimento I. No Experimento II, esse catálogo foi usado para analisar as relações entre a variação da atividade geral nas 24h e as concentrações plasmáticas de MEL e B. Foram usados 40 pombos machos atribuídos ao grupo de ciclo claro-escuro de 12h:12h (CE), com luz acendendo às 6h (n= 20) ou de claro contínuo (CC) (n= 20). O registro comportamental ocorreu em duas sessões de 5 min, às 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24h, em dois dias sucessivos, com gravação em vídeo para a posterior categorização e quantificação da atividade geral. Amostras de sangue foram coletadas para subgrupos (n=5) de pombos nos mesmos horários de observação comportamental. Análises radioimunológicas foram usadas para avaliar as concentrações hormonais plasmáticas de MEL (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24h) e de B (6, 12, 18 e 24h). O Experimento III analisou a habituação do comportamento exploratório a estímulos acústicos. Foram usados dois grupos de pombos, CE (n=64) e CC (n=64), divididos em subgrupos (n=8) segundo a hora dos testes: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 ou 24h. Os pombos receberam sons (1000Hz, 83dB, 1s) a intervalos de 30s, em duas sessões, com intervalo de 24h. Os resultados indicaram variação de atividade geral com um pico às 6h e 18h e outro intermediário às 12h ($p < 0,05$). Houve um robusto ritmo de MEL plasmática em CE, com diferenças significativas dia-noite ($p < 0,001$). Na situação CC, a atividade geral é mantida em níveis mais elevados, exceto às 24h e 3h ($p < 0,05$). Em CC, a curva de concentrações medianas de B plasmática mostrou um padrão similar ao de CE, porém com valores superiores ($p = 0,002$). Os dados do Experimento III mostraram diferenças noite-dia na habituação em CE, com habituação ocorrendo apenas durante a fase clara. Na situação CC houve habituação em todos os horários excetuando-se a primeira sessão das 21h e 24h. O aumento das concentrações plasmáticas de B em todos os horários da situação CC foi interpretado como indicativo de que a luz constante é estressante. As relações entre os aumentos nas concentrações de B e a diminuição das concentrações de MEL, com desaparecimento do seu ritmo característico, observadas na situação CC, refletiriam uma interação entre as variações cíclicas desses hormônios de modo a garantir a eficiência dos sistemas de ritmicidade endógena do organismo. As interações desse substrato hormonal e os sistemas neurais de ritmicidade biológica resultariam na modulação do comportamento e da aprendizagem de habituação ao longo das 24h.

ABSTRACT

This work analyzed the diurnal variation of different behaviors, habituation learning and plasmatic levels of melatonin and corticosterone in pigeons. Experiment I describes the procedures for the elaboration of a behavioral catalogue of pigeons maintained in home cages, in the animal's room under laboratory conditions. Two other experiments were done, each one with had two groups of animals: one submitted to a 12:12h light-dark cycle (LD), with lights on at 6:00 a.m and the other to constant light (LL) for a maximum of three days. In Experiment II both LD and LL groups, were observed in 5 min sessions at times 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24h during two successive days. Behavior was video taped in the home cages for posterior categorization and quantification. Radioimmune essays were used to evaluate plasmatic hormonal levels of melatonin and corticosterone. Blood samples were obtained at the same times of behavioral observation. In Experiment III, animals were tested for habituation of the exploratory behavior to a 1000Hz, 83dB, repetitive sound (30s), in two sessions, with a 24h between-session interval. Both LD and LL birds were subdivided in 8 groups, each one tested at a different time (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 or 24h). Results indicated diurnal variation of general activity with peaks at 6h and 18h and an intermediary one at 12h ($p < 0,05$) and a robust diurnal rhythm of plasmatic melatonin ($p < 0,001$) under LD. Both of these rhythms disappeared under LL conditions. The curve of median cummulative corticosterone plasmatic concentrations was displaced to higher values under LL but showed a similar pattern as in LD ($p = 0.002$). Habituation data for the LD condition indicated night-day differences with habituation learning only during the day times. Under LL conditions birds habituated to the sound at every time, except during the 21:00 and 24:00h sessions. Constant light is a stressful stimulus for pigeons as indicated by the increase in the corticosterone levels. This change in corticosterone added to the blunting of the melatonin rhythm in LL conditions may interact in a modulatory way in order to guarantee an effective system of endogenous temporal organization. This modulatory hormonal substrate may interact with the neural system of biological timing and contribute to the changes observed in the diurnal variation of general activity and habituation learning.

INTRODUÇÃO

I. O estudo descritivo como etapa preliminar à análise funcional.

Desde Darwin (1872) pode-se constatar o uso de técnicas de observação sistemática no estudo do comportamento animal e humano. Contudo, foi com o reconhecimento da etologia, como uma área de domínio científico, que o comportamento passou a ser estudado de modo objetivo, quantitativo e descritivo.

As questões colocadas pela etologia, inicialmente consideradas como o estudo biológico do comportamento animal, referem-se ao entendimento dos determinantes biológicos da ocorrência de um evento comportamental, de sua origem ontogenética, de seu significado funcional e do porquê filogenético. O conhecimento pormenorizado dos comportamentos típicos da espécie a ser estudada caracterizam uma etapa descritiva do comportamento. A listagem desses comportamentos e suas descrições resultará na elaboração do etograma ou de catálogos de comportamentos.

Conforme é definido na literatura (Jones, 1972) um catálogo de comportamento consiste numa ordenação de reações de um animal ou de um grupo de animais. A listagem e ordenação dos elementos componentes do catálogo é feita a partir de uma descrição objetiva da topografia e função de cada reação dos animais em situações naturais ou de laboratório. Um catálogo de comportamento definindo precisamente as unidades comportamentais que serão

observadas, registradas e analisadas é de fundamental importância para a análise do comportamento.

Um dos marcos da etologia é o trabalho mais antigo e, talvez, mais exaustivo sobre o comportamento de pombos realizado por Charles Whitman (1919). O extenso trabalho de Whitman é muito ilustrativo e informativo, caracterizado, porém, por um sistema de observação assistemática, anedótico, e por uma linguagem bastante apreciativa o que coloca certas restrições em termos de objetividade do dado observacional.

Goodwin (1970) relata uma descrição do comportamento natural do pombo *Columba livia* abordando aspectos comportamentais e contextuais que caracterizam a sociabilidade, comportamento de auto-manutenção (comer, beber, banho, banho de sol, limpeza, relaxamento e repouso), comportamento de agressão, território e fuga, reconhecimento da espécie e estampagem, comportamentos sexuais e comportamentos reprodutivos (formação de pares, seleção do lugar do ninho, nidação, postura e incubação, cuidados com o filhote).

A partir da década de 60, a análise dos repertórios comportamentais naturais dos organismos e as relações que esses padrões naturais podem apresentar com os padrões mostrados em laboratório passaram a receber grande ênfase (Bolles, 1970; Seligman, 1970, Seligman & Hager, 1972). Implícito em tal ênfase está o interesse pela utilização da observação direta para a análise descritiva do comportamento em situações naturais, semi-naturais ou de laboratório. Esse procedimento permite, não só a obtenção de dados

complementares, como também uma maior integração das investigações etológicas e experimentais do comportamento.

As ciências que estudam o comportamento preocupam-se primordialmente em analisar as interações de um organismo biológico com os eventos ambientais (Skinner, 1953, 1981; Catania, 1999). A partir dessa análise os estudiosos do comportamento obtêm os dados fundamentais para explicar questões básicas, tais como: Como o comportamento ocorre? Por que o comportamento ocorre? Como o comportamento ou a probabilidade de ocorrência de um comportamento é modificada? Que fatores internos ou externos podem influenciar a ocorrência de um comportamento? A resposta à primeira questão é fornecida através de estudos descritivos do comportamento. Nestes, utilizando técnicas de observação direta o estudioso identifica as formas (topografia) características da ocorrência de uma resposta e também as funções dessa resposta no seu ambiente. As demais questões são respondidas por meio de estudos experimentais em que o controle e a manipulação de variáveis podem permitir uma análise funcional do comportamento.

Atualmente, o estudo do comportamento do ponto de vista biológico, realizado pela etologia e pela neuroetologia, tem como objetivo realizar uma análise exaustiva do comportamento desde os níveis mais elevados de integração até suas bases mais elementares, ao nível do neurônio, efetores e moléculas (Tinbergen, 1951; Sabbatini, 1977). Por outro lado, a análise experimental do comportamento que tem se caracterizado pelo estudo exaustivo das relações funcionais entre eventos ambientais e comportamentais também tem uma

abordagem biocomportamental. Nestes estudos, os pombos têm sido usados muito freqüentemente como sujeitos, e inúmeros comportamentos vêm sendo analisados e modificados pelo aprendizado. Tais estudos deram origem a um número crescente de discussões teóricas e experimentais sobre as interações entre variáveis filogenéticas e ontogenéticas no condicionamento (Bolles, 1970; Ferarri *et al.*, 1973; Seligman & Hager, 1972).

II. Comportamento, Aprendizagem e memória

O comportamento é resultado de uma interação entre fatores biológicos e ambientais. Os fatores biológicos inatos, pré-programados geneticamente resultam de processos de seleção natural relacionados com a adaptação da espécie ao meio. A experiência individual dos organismos com os fatores ambientais resulta em aprendizagem e envolve processos de aquisição de conhecimento acerca do mundo.

Se os conhecimentos adquiridos são armazenados e recuperados falamos em memória. Memória é então entendida como o processo que permite manter reter ou arquivar o que foi aprendido no organismo, ficando assim disponível para a utilização posterior (Rosenzweig, 1996). A observação e a medida das mudanças comportamentais decorrentes do aprendizado, constituem a principal evidência dos processos de memória. Estes dois processos caracterizam-se como o meio mais importante pelo qual o ambiente altera o comportamento e disponibiliza-o para utilização posterior, tendo como função a adaptação dos

organismos à circunstâncias particulares (Kupfermann, 1991; Rosenzweig & Leimann, 1982; Toledo 1989; Valentinuzzi, 1993; Valentinuzzi, 1999).

O aprendizado pode ser classificado em associativo e não associativo, quando se consideram critérios de procedimentos ou como ocorrem. A aprendizagem associativa é descrita como aquela em que se estabelecem relações entre estímulos diferentes ou entre comportamentos e estímulos. Estas relações estímulo-estímulo podem ser investigadas por meio do condicionamento clássico. As relações respostas-estímulos são avaliadas por meio do condicionamento operante.

A aprendizagem não associativa é definida como modificação do comportamento sem o estabelecimento de relações evidentes entre estímulos ou entre estímulos e comportamentos, tal como ocorre na sensitização e na habituação.

Sensitização é o incremento de uma resposta frente à apresentação de um novo estímulo ou à alteração súbita na intensidade ou frequência de um estímulo já conhecido do organismo (Kupfermann, 1991).

Habituação é uma das mais elementares formas de aprendizagem que se caracteriza por um decréscimo de respostas quando um estímulo é continuamente apresentado ou repetido com alta frequência. (Groves & Thompson, 1970; Thompson & Spencer, 1966). A redução de respostas frente a um estímulo, sem significado funcional, tem valor adaptativo para o organismo, uma vez que continuar respondendo a ele implicaria dispêndio energético desnecessário.

Um dos mais abrangentes estudos sobre habituação foi realizado por Sharpless & Jasper (1956), que mediram a reação de alerta de gatos, frente a estímulos sonoros, através do registro das ondas cerebrais por meio de eletrodos. Depois deste trabalho ocorreu uma sucessão de outros experimentos e foram analisadas, por exemplo, respostas de orientação, sobressalto e potenciais evocados, tanto em organismo intactos como em animais com diferentes áreas cerebrais lesada (Adamo & Bennett, 1967; Buzsaki, 1982; Davis & Gendelman, 1977; File, 1973; Fox, 1979; Glickman & Sroges, 1966; Groves & Thompson, 1970; Hamassaki & Britto, 1987; Kandel *et al.*, 1991; Köhler, 1976; Patterson & Petinovich, 1979; Sokolov, 1960; Toledo, 1989; Toledo E Ferrari, 1991; Valentinuzzi, 1993; Leaton, *et al.*, 1985; Plappert *et al.*, 1993; Xavier *et al.*, 1991).

Se consideramos o volume de estudos de habituação em aves, pode-se afirmar que é comparativamente inferior àqueles focalizados em mamíferos. Contudo, tal como em mamíferos os estudos com aves têm contribuído para o conhecimento da organização neural desse processo de aprendizagem. Neste sentido, respostas de orientação a estímulos acústicos ou luminosos vem sendo bastante utilizados (Adamo & Benett, 1967; Hamassaki & Britto, 1987; Toledo & Ferrari, 1991, Fornel, 1994). A resposta de orientação faz parte do comportamento exploratório que tem uma relação direta com a apresentação de estímulos novos. A exploração garante a inspeção, a localização, a identificação e a avaliação precisa de eventos ambientais (Berlyne, 1960; Buzsaki, 1982; Sokolov, 1960). O comportamento exploratório tem componentes vegetativos, reflexos e operantes e relacionam-se de maneira direta com a novidade e a intensidade do estímulo. A

exploração também tem sido relacionada com a curiosidade animal (Glickman & Sroges, 1966). Os comportamentos reflexos, relacionados com apresentação de estímulos, que precedem as reações exploratórias caracterizando-se portanto como comportamentos pré-exploratórios, vêm sendo também estudados. Num contexto mais amplo, estudos de habituação em aves revestem-se também de importância numa perspectiva comparativa/evolutiva em diferentes organismos.

Toledo & Ferrari (1991) investigaram o papel de estruturas telencefálicas no processo de habituação a sons em pombos. Tanto sujeitos experimentais (EXPE) como controles recebiam estímulos sonoros de 1000Hz, 110dB, 1s (estímulo A) em intervalos de 30 segundos, até que se verificasse 10 apresentações do som sem ocorrência de comportamento exploratório (critério de habituação). Decorridas 24h, eram apresentados 10 estímulos A e em seguida introduzia-se o estímulo sonoro B (500Hz, 110dB, 1s) mantido até que o critério de habituação fosse atingido. Novamente após 24h, os pombos EXPE sofriam a cirurgia de destelencefalação e seguidos 10 dias de recuperação eram retestados. Os resultados indicaram que, embora após a ablação telencefálica um mesmo padrão de curvas de habituação fosse obtido verificava-se uma aceleração da habituação, tanto para o estímulo A, como para o B. Os dados foram interpretados como indicativos de uma interação de efeitos facilitatórios da habituação, devido à lesão, e efeitos de longo prazo da aprendizagem anterior a lesão. Considerando a extensão da lesão telencefálica, a aprendizagem ocorrida antes da lesão estaria atuando por meio de estruturas subtelencefálicas que participam do processo de armazenamento da informação. A lesão interferiu na modulação do

comportamento exploratório mas não impediu a recuperação da informação relativa ao estímulo apresentado antes da cirurgia.

O estudo de Toledo & Ferrari levantou questões que foram estudadas por Fornel (1994). Foram realizados dois experimentos, utilizando os mesmos estímulos e o mesmo critério de habituação. Grupos experimentais e controles foram primeiramente submetidos à destelencefalação ou simulação da cirurgia, respectivamente, e após o período de recuperação foram expostos a estímulos A (1000 Hz, 110 dB, 1s) na primeira sessão e B (500 Hz, 110dB, 1s) na segunda, ou vice versa. Todos os grupos mostraram aprendizagem de habituação, independente da seqüência de exposição aos estímulos e da integridade do telencéfalo. A ordem de apresentação de estímulos também não interferiu na velocidade de habituação. Os dados replicaram as observações de Toledo & Ferrari (1991) e forneceram indicações dos possíveis efeitos de habituação a longo prazo ou efeitos de aprendizagem entre as sessões.

Valentinuzzi & Ferrari (1997) analisaram a variação diurna e noturna da aprendizagem de habituação em pombos utilizando os mesmos procedimentos. Demonstraram que animais treinados à noite não mostraram habituação intra-sessão e nem habituação mais rápida em função de repetição das sessões. Somente animais testados ou retestados pela manhã atingiram os critérios experimentais de habituação durante a primeira sessão ou mais rapidamente na segunda sessão. Os dados sugeriram uma possível organização temporal no processo de habituação da resposta de exploração a sons em pombos, situando a discussão no contexto da análise de fatores temporais na aprendizagem. Em um

segundo experimento em que pombos foram expostos a dois dias de claro constante a diferença noite-dia na habituação observada em condições de CE desapareceram. Estes dados sugeriram uma influência direta do ciclo claro-escuro na habituação a sons em pombos. Ao mesmo tempo foram levantadas questões sobre os possíveis efeitos da Melatonina (MEL) e da corticosterona (B) neste tipo de aprendizagem. Ou seja, os pombos expostos a claro constante poderiam estar sofrendo alterações nas variações rítmicas hormonais, principalmente destes dois hormônios, que poderiam estar influenciando o resultado encontrado. Ao mesmo tempo, nos testes noturnos as concentrações mais elevadas de MEL, em comparação com a manhã, poderiam ter alguma função modulatória sobre os processos observados.

III. Sistemas fisiológicos e ritmicidade circadiana

A habilidade que todas as espécies possuem de mudar seu comportamento ao longo das 24 horas é um dos mais óbvios fenômenos adaptativos (Turek, 1994). O conceito de adaptação refere-se a processos pelos quais uma população muda e ajusta-se adequadamente ao ambiente, garantindo a sobrevivência da espécie (Futuyma, 1991). A adaptação é considerada como uma consequência evolucionária da ação da seleção natural na diversidade individual genética (Avers, 1989). É lógico assumir que durante a seleção natural os organismos tiveram que se adaptar às oscilações ambientais cíclicas. Estas oscilações estão correlacionadas com as mudanças ocorridas no meio ambiente devido à rotação

da terra em seu eixo (Moore-Ede *et al.*, 1982). Muitas destas flutuações, no entanto, não são aparentes, pois envolvem aspectos do meio interno dos organismos.

Inúmeros estudos têm demonstrado que basicamente todas as variáveis bioquímicas e fisiológicas possuem ritmicidade (Cipolla-Neto, 1988). Assim, muitos hormônios, por exemplo, possuem flutuações circadianas, isto é, são liberados demonstrando um ritmo que dura aproximadamente 24 horas (Van Cauter & Aschoff, 1989; Van Cauter *et al.*, 1992). Outras variáveis circadianas, no entanto, são mais facilmente percebidas sendo que a alternância entre atividade e repouso constitui uma das mais evidentes flutuações deste tipo.

Uma característica notável destes ritmos circadianos é que são observados na maioria dos seres vivos estudados e não representam uma simples resposta do organismo às mudanças físicas do ambiente, imposta pela alternância entre o claro e o escuro, embora sejam por ele sincronizadas. Os ritmos surgem de um sistema temporizador interno, os chamados relógios biológicos (Pittendrigh, 1965, 1981). A existência de temporizadores pôde ser comprovada por estudos nos quais diferentes sujeitos experimentais foram colocados em condições experimentais constantes, sem que nenhuma pista temporal do ambiente pudesse influenciar estes relógios. Foram realizados experimentos inclusive na cavernas e nos pólos, visando eliminar ou atenuar pistas temporais tais como flutuações diárias da pressão atmosférica ou mudanças no campo geomagnético (Marques, *et al.*, 1997). Os resultados obtidos indicaram que mesmo em condições experimentais constantes os sujeitos estudados mantinham ritmicidade

circadiana, por dias, meses ou anos, dependendo da espécie e das condições experimentais. Estes ritmos, chamados ritmos de livre-curso são a expressão de relógios biológicos endógenos (Cassone, 1990). Esta característica endógena dos ritmos permitem ao organismo prever e preparar-se tanto fisiológica quanto comportamentalmente para enfrentar as mudanças físicas do ambiente associadas com a alternância dia/noite (Turek *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 1997).

As mudanças diárias do meio ambiente sincronizam os ritmos endógenos dos organismos, ajustando-os. Esta relação existente entre os ritmos endógenos e os ciclos ambientais é extremamente importante para a sobrevivência da espécie assegurando que o organismo esteja preparado bioquímica, fisiológica e comportamentalmente nos diferentes momentos do dia. Assim podemos facilmente perceber que algumas espécies são ativas durante a fase clara do ciclo claro-escuro e permanecem inativa na fase escura (animais diurnos), enquanto outras, estão ativas na fase escura e inativas na fase clara deste ciclo (animais noturnos). Diversas alterações do ambiente são capazes de arrastar os ritmos endógenos, impondo a eles seu período. Estes fatores foram denominados *zeitgebers*, neologismo alemão que significa doador de tempo (Aschoff, 1951). São exemplos de *zeitgebers*, as flutuações características do meio físico, entre elas o ciclo claro-escuro e a variação de temperatura, e/ou flutuações do meio biológico-social, tais como a alternância entre presença e ausência de alimento, de parceiro sexual e da mãe (Aschoff, 1954; Gimenes *et al.*, 1993; Marimuthu *et al.*, 1981; Eskes, 1982; Viswanathan, 1989).

Além de atuarem como *zeitgebers* promovendo ajustes nos relógios biológicos por meio de mecanismos biológicos específicos, os fatores ambientais podem ter, também, uma ação direta sobre o ritmo expresso, modificando-o sem que ocorra o envolvimento de relógios biológicos. Este fenômeno foi denominado de mascaramento por Aschoff (1960). O fato dos relógios biológicos serem geneticamente determinados e ajustados por *zeitgebers* específicos confere ao organismo uma adaptação temporal rigidamente controlada, ou seja, os componentes do sistema circadiano, o período em livre curso e as relações de fase com o ambiente são marcadamente constantes em indivíduos da mesma espécie. Assim, o mascaramento adiciona flexibilidade ao sistema circadiano.

Page (1989) sugeriu que o mascaramento permite o ajuste temporal fino das espécies ao ambiente, sendo, portanto, ecologicamente relevante. Uma interessante revisão sobre os principais estudos do mascaramento e seus efeitos em ritmos biológicos é apresentada por Marques *et al.* (1997). Estes autores consideram que o mascaramento pode ocultar o verdadeiro ritmo biológico ou o verdadeiro *zeitgeber*, tratando-se, portanto, de um grande problema nos estudos cronobiológicos. Ressaltaram, no entanto, o importante papel do mascaramento na adaptação temporal, pois confere plasticidade aos sistemas rítmicos, uma vez que permite aos organismos responderem a um evento ambiental, sem que este evento seja cíclico e altere os relógios biológicos. O mascaramento ocorreria através de um sinal ambiental ao qual o organismo é sensível. Ao contrário do que ocorre com os ritmos arrastados por *zeitgebers*, a resposta a um agente mascarador não teria caráter antecipatório, ou seja, o organismo responde ao

estímulo ambiental instantaneamente mas não antes dele. O valor adaptativo do mascaramento, deve ser considerado na medida em que, enquanto o arrastamento é um mecanismo de sincronização geral do indivíduo ao ambiente, o mascaramento pode ser importante para o ajuste fino dos ritmos biológicos, como sugeriu Page (1989). Marques & Waterhouse (1994) propõe que tendo em vista que organismos da mesma espécie respondem de maneira característica e constante a um mesmo agente mascarador, o mascaramento pode atuar junto com o *zeitgeber*, melhorando a capacidade que o organismo tem de se ajustar ao ambiente.

Os ritmos biológicos de um mesmo organismo costumam apresentar uma relação de fase¹ característica entre si, ou seja, uma ordem temporal interna (Marques *et al.*, 1997). Segundo Turek (1994) os relógios biológicos funcionariam como condutores de uma orquestra sinfônica, pois promoveriam a organização temporal interna assegurando que as mudanças internas aconteçam de maneira coordenada uma com as outras, e sincronizadas com o ambiente externo. Durante muitos anos, principalmente a partir da década de 60, inúmeros fisiologistas demonstraram interesse em entender como o ciclo claro-escuro regulava a ritmicidade circadiana, e qual ou quais seriam as estruturas responsáveis pelo ritmo endógeno exibido pelos organismos.

¹ "distância (diferença) temporal entre dois eventos (fases) de um ou dois ritmos" em Marques & Menna-barreto, 1997, pp 275.

IV. Considerações sobre o sistema circadiano de vertebrados

Sabemos, atualmente, que em mamíferos o relógio mestre, que controla e coordena quase todos os ritmos circadianos endógenos, está localizado em dois núcleos bilaterais no hipotálamo anterior, os núcleos supra-quiasmático (NSQ). Os estudos do papel do hipotálamo na regulação da ritmicidade circadiana iniciaram-se com Richter (1965, 1967), que demonstrou que lesões no hipotálamo anterior afetavam processos rítmicos. O trato retino hipotalâmico que se inicia na retina e termina no NSQ, descrito por Moore & Lenn (1972), é uma das mais óbvias vias aferentes do sistema circadiano. O NSQ recebe ainda projeções indiretas provenientes do núcleo geniculado lateral, que faz parte da via visual primária (Moore-Ede *et al.*, 1982; Takahashi & Menaker, 1992; Norgren, 1990). A conexão neural entre a retina e os NSQ é uma forte evidência da supremacia do ciclo claro-escuro como o agente sincronizador.

Depois dos trabalhos pioneiros de Moore & Eischler (1972) e Stephan & Zucker (1972) que demonstraram que lesões no NSQ aboliam ritmos de atividade-repouso, de secreção de corticosterona e de ingestão de líquidos, muitos outros trabalhos foram realizados. Assim, lesões no NSQ em ratos e *hamsters* alteram os ritmo de secreção de inúmeros hormônios, ritmos de atividade locomotora, ritmos de sono e vigília, ritmos de temperatura corporal, dentre outros (Moore, 1983; Rosenwasser & Adler, 1986; Rusak & Zucker, 1979; Turek, 1985). O NSQ apresenta também ritmicidade *in vitro*, tanto para parâmetros bioelétricos (Ralph *et al.*, 1990) como neuroquímicos (Turek & Van Cauter, 1988). Transplantes fetais de

NSQ em animais com estes núcleos lesionados restauram a ritmicidade perdida (Ralph *et al.*, 1990). Apesar do NSQ ser o único oscilador identificado em mamíferos existem dados que sugerem a participação de outros osciladores na determinação de alguns ritmos biológicos (Linden, 1991; Krieger *et al.*, 1977; Fuller *et al.*, 1981). Existem sugestões de que estruturas hipotalâmicas, como os núcleos ventro-medial e lateral atuem como osciladores circadianos (Aguilar-Roblero & Drucker-Colin, 1987). Embora não esteja bem estabelecido como o NSQ, de mamíferos, transmite a informação temporal endógena, quando em condições de livre curso, ou sincronizada a todo o organismo, acredita-se que comunicação envolva sinais hormonais ou neuro-hormonais (Turek, 1994).

Outra estrutura importante do sistema temporizador de mamíferos é a glândula pineal. Esta glândula secreta um hormônio chamado melatonina (N-acetil-5-metoxotriptamina), durante o escuro. Este hormônio, também secretado pela retina, influencia a regulação circadiana e sazonal de uma variedade de processos fisiológicos e comportamentais (Reiter, 1991; Cassone, 1990; Krause & Dubocovich, 1990). Contudo, essa glândula que se caracteriza essencialmente como fotorreceptora em peixes, anfíbios, répteis e aves, é um órgão exclusivamente endócrino nos mamíferos (Underwood & Gross, 1982). Assim, as condições determinantes para a ocorrência da produção rítmica de MEL pela pineal é dada pelas relações neurais existentes entre o NSQ e a referida glândula (Binkley, 1988).

Em aves, por outro lado o sistema circadiano é bastante complexo envolvendo sistemas oscilatórios inter-relacionados e fotorreceptores que recebem

informações acerca da luminosidade do ambiente e arrastam estes osciladores (Gwinner, 1989). Pelo menos quatro estruturas fazem parte do sistema circadiano de aves: olhos, pineal, núcleos do hipotálamo tuberal e fotorreceptores encefálicos (Turek, 1994; Takahashi & Menaker, 1984; Takahashi *et al.*, 1980, 1992; Cassone & Menaker, 1984). A lesão combinada de tais estruturas nem sempre resulta em arritmia total, indicando que existem outros osciladores (Rusak, 1981). Inúmeras pesquisas anatômicas e fisiológicas indicaram que os núcleos do hipotálamo lateral são homólogos ao NSQ de mamíferos (Cassone & Moore, 1987; Cassone, 1988; Cassone *et al.*, 1990; Cassone & Brooks, 1991). Assim, Cassone *et al.* (1995), denominaram estes núcleo de núcleos supraquiasmático visual (vNSQ).

A glândula pineal das aves sintetiza e secreta MEL com um ritmo circadiano intrínseco. Este ritmo continua se manifestando *in vitro*, sem perder a sincronização com o ciclo claro-escuro (Binkley, *et al.* 1978; Kasal *et al.* 1979; Deguchi 1979; Ebihara & Kawamura, 1981). Como o grau de importância e a hierarquia das estruturas do sistema temporizador de aves variam dependendo da espécie estudada (Norgren, 1990) o estudo deste sistema torna-se difícil.

Cassone & Menaker (1984) propuseram um modelo para explicar como ocorre a interação das estruturas circadianas em aves. Segundo este modelo, chamado de sistema de regulação neuroendócrina, durante o dia subjetivo o vNSQ inibiria a pineal e os osciladores oculares, por meio de uma via neural multissináptica que incluiria o gânglio cervical superior. Durante a noite, a atividade do vNSQ seria inibido pela liberação de MEL na circulação sangüínea

pela pineal. Este sistema neuroendócrino sincronizaria os múltiplos osciladores garantindo a estabilidade e a precisão do sistema circadiano.

V. Relações entre ritmos comportamentais e concentrações plasmáticas de Melatonina e Corticosterona em Aves

Ritmos circadianos de atividade locomotora (Ebihara & Kawamura, 1981), comportamento alimentar e comportamento de subir no poleiro (Beldhuis *et al.*, 1988; Chabot & Menaker, 1987) já foram descritos em diferentes espécies de aves. Além disso, um conjunto de dados de interesse para a organização temporal do comportamento em aves tem origem em trabalhos relacionando ritmos comportamentais e concentrações de MEL plasmáticas.

A administração constante de MEL promove a supressão do ritmo circadiano e a redução de atividade locomotora em pombos (Ebihara *et al.*, 1984). Em pardal, a pineal é um marcapasso circadiano envolvido com a atividade locomotora, a temperatura corporal e o comportamento alimentar. A pinealectomia (PX) abole estes ritmos em condições de escuro constante (Binkley, *et al.*, 1971; Chabot & Menaker, 1987; Ebihara & Kawamura, 1981; Funchs, 1983; Gaston & Menaker, 1968; Gwinner, 1989; Mcmillan, 1972). Em estorninhos, embora o ritmo de secreção de MEL seja abolido (Janik *et al.*, 1992) após a PX, os ritmos circadianos do comportamento alimentar, locomotor e de subir no poleiro permanecem intactos, em condições de escuro constante (Gwinner *et al.* 1987; Gwinner & Benziger, 1978;). Isso indica que o ritmo destas variáveis

comportamentais são independentes do ritmo de MEL plasmáticos. A PX também não é eficiente para abolir ritmos circadianos de atividade locomotora, em condições de escuro constante, em galinhas (Macbride, 1973), cordoniz japonesa (Simpson & Follet, 1981) e pombos (Ebihara *et al.* 1984).

Em pombos foi demonstrado que a retina também secreta MEL de maneira rítmica (Ebihara *et al.*, 1984 e 1987; Foa & Menaker, 1988; Hamm & Menaker, 1980; Oshima *et al.*, 1987 e 1989; Underwood *et al.*, 1984; Underwood & Siopes, 1984 e 1985;). Assim, o ritmo de secreção de MEL não é perdido após a PX. Somente quando realizadas a PX e a enucleação (EX) conjuntas é que o ritmo de MEL plasmático é eliminado e a atividade locomotora de pombos, colocados em condições constantes, torna-se arrítmica. Porém, como o ciclo claro-escuro é eficiente para restabelecer a ritmicidade deste comportamento, sugere-se a existência de fotorreceptores localizados em estruturas diferentes da retina e da pineal (Ebihara, *et al.*, 1987; Foa & Menaker, 1988).

Do mesmo modo que a PX e EX, a exposição de pombos à luz intensa (2000 lux) constante também elimina o ritmo de MEL plasmático resultando em perda de ritmicidade circadiana de atividade locomotora e comportamento alimentar (Yamada *et al.*, 1988). Luz constante (1000 lux) também é eficiente para interromper o ritmo de subir no poleiro e o ritmo do comportamento alimentar em estorninhos (Gänshirt *et al.*, 1984).

Variações cíclicas na produção dos glicocorticóides, que atingem valores máximos ao amanhecer, assim como, uma inter-relação entre a pineal e a adrenal tem sido descrita para mamíferos (Champney *et al.*, 1985 a, b; Khan *et al.*, 1990;

Rijnberk & Mol, 1989; Van Cauter, 1989). Ritmicidade na secreção de corticosterona, semelhante à verificada em mamíferos, tem sido demonstrada em algumas espécies de aves (Chan & Phillips, 1973; Joseph & Meier, 1973; Meier *et al.*, 1978). Da mesma forma, uma inter-relação entre a pineal e a adrenal, também tem sido postulada.

Foi demonstrado que a administração exógena de MEL durante o dia interfere na produção de catecolaminas pelo medula da adrenal em aves (Mahata *et al.*, 1988). A análise da glândula adrenal de pombos, por espectrofluorimetria, realizadas 50 min e 24h após serem administradas doses intraperitoneais de MEL (200ug/100g peso corporal) indicaram aumento de 69% e 60% na B produzida, respectivamente (Mahata & De, 1991). Além disso, em aves a B, assim como a MEL, também tem sido associada à redução de atividade (John & George, 1990; Michell *et al.*, 1986). Buttener *et al.* (1991) demonstraram que a administração de B aumentava a quietude e tranqüilidade de pombos, que reagem menos à presença de humanos e à manipulação experimental.

De um modo geral, esse conjunto de dados indicam a existência de uma relação inversa entre as fases de inúmeros ritmos comportamentais (locomotor, alimentar e subir no poleiro) e as concentrações plasmáticas de MEL. Ao mesmo tempo, a B, um outro hormônio secretado em maiores quantidades durante o período de escuro do ciclo claro-escuro, também, estaria vinculado à redução de atividade metabólica e aumento de quietude em aves que são animais diurnos. Estas evidências colocam questões referentes aos tipos de interações modulatórias entre a MEL e B. Neste sentido, um trabalho que busque relacionar

as concentrações plasmáticas de MEL e B, e a variação diurna/noturna dos comportamentos de pombos pode indicar questões relevantes quanto a essas interações.

VI. Evidências de organização temporal nos processos de aprendizagem e memória.

Como discutido acima, a ritmicidade das variáveis fisiológicas tem a finalidade de preparar antecipadamente o organismo às alterações do dia e da noite. Assim, o estado geral bioquímico/fisiológico varia de uma hora para outra determinando uma diferença na capacidade do organismo de perceber o meio, processar informações e emitir respostas adequadas frente a estímulos do meio ambiente externo e interno (Ferrari *et al.*, 1997). Em diferentes momentos das 24 horas do dia, os seres vivos respondem diferentemente a um mesmo estímulo (Chabot & Taylor, 1992). Se há correlação entre a variação do comportamento e processos fisiológicos, é possível considerar que, numa situação de aprendizagem, a qualidade das relações funcionais entre estímulos e respostas poderá ser afetada pela ritmicidade dessas classes de variáveis. Apesar desta relação parecer óbvia existem poucos trabalhos analisando-a.

Pesquisas que procuram a relação entre ritmos biológicos e processos cognitivos vêm sendo realizadas em humanos, desde o final do século passado. Assim, variáveis psicofisiológicas como a fadiga, sonolência e a atenção,

mostram clara ritmicidade circadiana (Folkard, 1990; Folkard & Monk, 1979; Gates, 1916; Güérin *et al.*, 1993; Güérrin *et al.*, 1991; Lombard, 1887).

Os maiores acidentes industriais envolvendo erros humanos ocorreram à noite. O acidente da usina nuclear de Three Mile Island, localizada nos Estados Unidos da América, ocorreu às 4h; o de Chernobyl, na antiga União Soviética, às 1h23min; o de vazamento do "pó da China" da indústria Union Carbide em Bhopal, na Índia, logo após a meia noite. Acidentes automobilísticos também ocorrem mais entre 21h e 9h do que entre 9h e 21h, apesar do trânsito no período noturno ser bem menos intenso do que no período diurno. Existem dados que demonstram a existência de um pico de acidentes às 3h e outro às 6h (Folkard, 1990). Apesar destes fatos poderem ser apenas fruto de coincidência, existem estudos realizados ao longo das 24h do dia que sugerem uma redução de desempenho no período da noite (Folkard & Monk, 1979).

Horários críticos para a ocorrência de aprendizado e retenção de informações vêm sendo verificados em inúmeros estudos. Folkard *et al.* (1977) trabalhando com crianças verificaram variações na retenção de informações em função do momento do treino, estudando memorização de textos escolares. Os resultados indicaram que a memória de curto prazo era melhor quando a aquisição acontecia pela manhã, enquanto que a memória de longo prazo era melhor quando a aquisição ocorria à tarde, independente da hora em que o teste de retenção acontecia. Lecont (1989) também relatou melhor memória de curto prazo pela manhã quando comparada com a tarde, estudando a habilidade para memorizar uma lista de sílabas sem significado.

Güérin *et al.* (1991) estudaram em meninas com idade de 8, 9 e 10 anos níveis de fadiga, sonolência e atenção, usando escalas de analogia visual e auto avaliação e teste de cancelamento de letras. As medidas foram realizadas durante duas semanas às 9h, 11h, 14h e 16h. Foram observadas maior sonolência e fadiga e menor atenção no grupo de 8 anos em comparação com os de 9 e 10 anos. O melhor desempenho no teste de cancelamento de letras foi dos grupos de 9 e 10 anos às 14h. O subgrupo de baixo rendimento escolar apresentou maior nível de fadiga e menor atenção quando comparado aos de ótimo e médio rendimento. Dois anos mais tarde, o experimento foi replicado e os resultados sugeriram aumento da amplitude do ritmo de desempenho à medida que as crianças amadureciam. Flutuações rítmicas no desempenho de adolescentes do sexo feminino em tarefas que envolviam o processamento imediato de informações foram estudados por Andrade (1997) e correlacionados com as flutuações no nível de sonolência. Os resultados indicaram efeito significativo da hora do dia nos testes de desempenho, sendo que o melhor desempenho foi obtido às 16h e o pior às 10h. Foi observado ainda que adolescentes mais sonolentas obtiveram resultados piores nos testes.

Interessante é verificar que as propriedades destes ritmos de desempenho estudadas são similares à de qualquer outro ritmo circadiano, ou seja, persistem em condições ambientais constantes e são invertidas se o ciclo claro/escuro é também invertido, alterando o período de atividade/repouso (Folkard, 1990; Güérin *et al.*, 1991).

Inúmeros autores têm sugerido que a consolidação da memória acontece durante a fase de sono (Karni *et al.*, 1994; Koulack, 1997; Wilson & McNaughton, 1994) Recentemente, Nesca & Koulack (1994) verificaram que a memorização de uma lista de palavras melhorava significativamente quando a aquisição era seguida por um período de sono. Visando minimizar ou eliminar fatores que poderiam estar atuando como mascaradores da ritmicidade de variáveis cognitivas, um protocolo experimental denominado protocolo de rotina constante foi utilizado por Johnson *et al.* (1992) e Dijk *et al.* (1992). Os indivíduos são colocados em condições comportamentais e ambientais constantes sendo também impedidos de dormir por um período de 36 a 60 horas. Foram estudados a memória de curto prazo (lembrar um texto), o desempenho cognitivo (realização de cálculos) e o estado de alerta auto avaliado. Os resultados obtidos demonstraram que embora o ciclo de sono tivesse um efeito significativo, o componente circadiano das variáveis estudadas era claro e definido.

A existência de uma variação temporal na capacidade dos organismos estabelecerem novas relações com o ambiente vem sendo bastante estudada também nos animais. Um trabalho realizado com polvos (Bradley & Young, 1975) submetidos a treinamento de discriminação visual e tátil no período matutino e vespertino indicou um melhor desempenho dos mesmo durante o período da tarde. Porém esta diferença foi verificada apenas nas duas primeiras sessões, sugerindo que a hora do dia afeta o desempenho do aprendizado destas respostas apenas durante a fase de consolidação da memória.

Diferenças de desempenho matutinas e vespertinas foram também verificadas no condicionamento alimentar do peixe marinho *Serranus scriba* Cuv (Kovacevic *et al.*, 1991 a). Estes animais mantidos em um tanque unido a outro por um corredor, deveriam: (a) atravessar o corredor iluminado e sinalizado com um triângulo preto para receber o alimento no outro tanque (experimento I); (b) identificar a sinalização do recebimento de um choque quando um círculo era introduzido no lugar do triângulo (experimento II). Os resultados indicaram que apenas os peixes treinados às 18h atingiram o critério experimental (90% de respostas corretas durante 3 dias consecutivos). Protocolo semelhante foi utilizado para se estudar o condicionamento de esquiva (Kovacevic *et al.*, 1991b) e os resultados foram parecidos. Convém ressaltar que é no período vespertino que se encontra a fase de maior atividade e onde se concentra o período de alimentação dessa espécie.

Uma maior sensibilidade a estímulos acústicos durante o período de maior atividade, em ratos albinos jovens, foi sugerido por Horlington (1970). Seus estudos indicaram que a frequência e a magnitude da resposta de sobressalto frente a estimulação sonora tendia a ser gradativamente maior no período noturno, quando comparada ao período diurno, após a idade de 55 dias. A diferença noturna chegou a atingir 90% em animais com 72 dias de idade.

Infurna *et al.* (1979) estudaram a preferência por sacarose e aversão induzida por cloreto de lítio (LiCl) como função da dose da droga e da fase do ciclo de iluminação em ratos albinos. Os ratos foram mantidos em dois viveiros, com alteração de fase de 12h entre um viveiro e outro (viveiro com luz entre 6h e 22h,

e viveiro com luz entre 18h e 10h). Verificaram que a preferência por sacarose e a aversão condicionada pelo LiCl, dependiam da fase do ciclo de iluminação. A susceptibilidade ao condicionamento foi aumentada durante a fase clara do ciclo claro-escuro. No mesmo contexto de análise Infurna (1981), demonstrou que um maior número de ratos lactantes retornavam ao ninho durante a fase escura em comparação com o ratos observados na fase clara. Filhotes que receberam injeção de anfetaminas durante a fase escura apresentavam, em geral, melhor desempenho do que aqueles injetados durante a fase clara. A aversão olfativa (odor de alho) também se mostrou dependente do horário do dia. Filhotes condicionados no meio da fase clara mostraram maior aversão por odor de alho. Ainda, o desempenho no teste de retenção foi melhor quando realizado no mesmo horário do condicionamento original. Os dados indicaram que a influência do ritmo circadiano sobre o aprendizado e a retenção de respostas condicionadas independem da idade do animal, e enfatizaram a importância de se considerar o horário do dia quando se trabalha com esquemas de condicionamento.

Davies *et al.* (1973) investigaram a esQUIVA passiva em ratos machos ao longo das 24h do dia, com ciclo claro-escuro de 12h:12h. O tempo de permanência em cada compartimento da câmara experimental era medido. Após 3 min., os ratos eram colocados no lado escuro de uma câmara, onde recebiam choques nas patas. Decorridas 48h eram recolocados na câmara iluminada e a latência de entrada na câmara escura era novamente medida. Durante a fase clara, observou-se melhor desempenho dos animais ao meio dia se comparados com a meia noite. Resultados opostos foram verificados quando se investigou

esquiva ativa (Hoffmann & Balschum, 1992). Convém ressaltar, no entanto, que esquiva passiva requer que o animal responda permanecendo imóvel, e esta é a tendência natural destes animais na fase clara do ciclo. Condicionamento de esquiva ativa implica em uma ação, ação esta facilitada durante a fase escura do ciclo. Assim, o tipo de resposta que é reforçada num determinado problema de aprendizagem pode ser influenciada diretamente pelo ritmo de atividade/repouso. Este ritmo pode estar mascarando a ritmicidade do processo de aprendizagem propriamente dito.

Holloway & Wansley, (1973a, b) verificaram que ratos não conseguiam recuperar a memória de experiências prévias, tanto para esquiva passiva como ativa, se o experimento ocorresse em determinado intervalo de tempo após o treino. Isto foi chamado de deficiência múltipla de retenção. Quando os testes ocorriam com intervalos de 15min, 12h ou múltiplos de 12h após o treino o desempenho dos animais era bom. Animais testados 6, 18 e 30 horas, após o treino mostravam baixos desempenhos. Resultados semelhantes foram obtidos em outro experimento realizado por estes pesquisadores (1976) e um maior número de horários foi testado. Deficiência múltipla de retenção em aprendizagem apetitiva de ratos também foi demonstrada (Hunsicker & Mellgren, 1977). Animais privados de alimento e treinados a obter leite açucarado após passarem do compartimento iluminado para o escuro, mostraram melhor desempenho quando testados 12h e 24h após o treino. Lesões bilaterais do NSQ eliminavam o déficit existente nos intervalos entre o treino e o testes, que não eram múltiplos de 12h, ou seja, o desempenho dos animais era o mesmo em todos os horários testados

(Stephan & Kovacevik, 1978). Estes dados corroboram a interação existente entre o sistema circadiano e os processos de aprendizagem.

Como mencionado acima, o claro-escuro não é o único sincronizador do relógio biológico. O alimento, por exemplo, também pode funcionar como tal. Sincronização de ritmos circadianos por disponibilidade de alimento e aprendizagem do tipo temporal/espacial são fortes indicadores da interação existente entre ritmicidade circadiana e aprendizado. Um rato alimentado uma vez por dia, durante a fase inativa, apresenta um aumento de atividade típico da fase escura duas a três horas antes da apresentação do alimento. Este ritmo diário de atividade é aprendido (Mistlberger, 1990). A aprendizagem do tipo temporal/espacial observada primeiro em abelhas, já no século XIX (ver Moore-Ede *et al.*, 1982), coloca-se como pioneira no estudo do efeito do sistema circadiano em processos de aprendizagem. Esta aprendizagem, descrita também por Saunders (1982), foi verificada também em aves (Saksida & Wilkie, 1994; Wilkie *et al.*, 1994; Wilkie 1995).

Abelhas e pombos aprendem, com uma precisão surpreendente, em que hora do dia comedouros distribuídos em diferentes locais terão comida disponível. Este desempenho é mantido em condições constantes de luminosidade ou após um deslocamento de fase do ciclo claro-escuro, demonstrando que o ciclo externo não está sendo utilizado como referência temporal (Ferrari *et al.*, 1997). A aprendizagem temporal/espacial é um fenômeno de elevado valor adaptativo, uma vez que, confere aos animais aumento de alimento com menor gasto energético de mobilização. Processar, codificar e armazenar informações referentes à hora e

ao lugar em que o alimento estará disponível, possibilita que um animal, com fome, recupere em sua memória as informações sobre lugares e horários que no passado tenham tido uma alta probabilidade de consequência positiva (Wilkie *et al.*, 1994). Estes dados revelam a capacidade que os animais têm de formar memória temporal. É muito provável que estruturas neurais envolvidas com processos de aprendizagem interajam com estruturas do sistema temporizador que sinaliza o tempo transcorrido.

A capacidade do sistema nervoso em se modificar em função do aprendizado é descrita como plasticidade neural (Kandel & Hazkins, 1992; Kandel *et al.*, 1991). Existem estudos que sinalizam modificações no sistema circadiano por processos de aprendizagem. Golombek *et al.* (1994) verificaram que se a apresentação de água (estímulo não específico) fosse coincidente com o início da fase escura, a glândula pineal passava a liberar MEL apenas a partir da apresentação do estímulo não específico. Da mesma forma, Amir & Stewart (1996), demonstraram que ratos que tiveram uma corrente de ar pareada com um pulso de luz, reagiam apenas à corrente de ar alterando ritmos de temperatura, atividade locomotora e transcrição do fator Fos nos NSQ. Valentinuzzi (1999), interpretou esses resultados como demonstrativos de que estruturas circadianas podem ser arrastadas por estímulos não fóticos, após aprendizagem associativa de modo que estes estímulos passam a imitar os efeitos da luz.

Antoniadis *et al.* (1999), estudaram em *hamster* a preferência condicionada por lugar em horários de atividade espontânea elevada (noite subjetiva) ou baixa (dia subjetivo). Durante o teste foram usados dois contextos com forma, cor e

cheiro diferentes, sendo que em um dos contextos havia uma roda de atividades. Os resultados mostraram que houve aquisição da preferência condicionada por lugar, em ambos horários circadianos, enquanto que a expressão da preferência condicionada ocorreu somente quando os animais foram testados apenas no mesmo horário de treino. Assim, o ajuste temporal entre o treino e o teste foi importante para a expressão do condicionamento. Esses resultados foram interpretados como indicativos da importância da variável horário sobre o valor reforçador da recompensa.

McDonald & Ralph (1999), treinaram ratos no labirinto aquático de Morris. A situação de aprendizagem consistia na localização espacial de uma plataforma submersa. O treinamento ocorreu no início da fase de atividade, sendo que a cada dia o treinamento foi antecipado em uma hora. O grupo controle foi treinado no início da fase de escuro. Todos os testes também ocorreram no início da fase de escuro, dois e dez dias após o treinamento. A mesma velocidade de aquisição foi observada em todos os animais, porém os animais que sofreram avanço de fase durante o treino mostraram menor memória espacial durante os testes (2 e 10 dias), em comparação com os controles. Os dados indicaram que a ruptura do ritmo circadiano prejudicou a consolidação do comportamento aprendido.

Valentinuzzi (1999), analisou o processo de condicionamento aversivo a um contexto e o condicionamento som choque em camundongos C57BL/6J. Os animais foram expostos a um foroperíodo esqueleto (luz verde de 0,5-1,0 lux, contínua e dois pulsos de luz branca de 400 lux às 6h e 18h) visando minimizar os efeitos do ciclo claro-escuro. Os resultados indicaram que o condicionamento

aversivo a um contexto variou segundo a fase do ciclo de atividade-reposo em que os treinos e testes aconteceram. A aquisição e a extinção da resposta condicionada, foram maiores durante a fase ativa do animal em relação a fase inativa. Contrariamente, o processo de condicionamento som-choque não foi afetado pela hora do dia em que os testes foram realizados. A evidência de uma variação temporal no condicionamento aversivo a um contexto, porém não do condicionamento aversivo a um som, processos baseados em diferentes vias neurais, levantou questões relacionadas com as interações entre o sistema circadiano e os substratos neurais desses processos. Assim, foi sugerido que o relógio biológico teria um efeito sobre o hipocampo, estrutura essencial no condicionamento a um contexto.

A maioria das pesquisas que evidenciam a ritmicidade circadiana na capacidade de aprendizagem envolvem trabalhos com aprendizagem associativa e em menor número, processos de aprendizagem do tipo não associativo. Assim, foi descrito habituação de caranguejos a estímulos potencialmente perigosos apenas na fase escura mas não na fase clara (Pereyra *et al.*,1996). Conforme descrito anteriormente, Valentinuzzi & Ferrari (1997), também demonstraram modulação temporal em habituação a estímulos auditivos em pombos.

VII. Evidência da participação da Melatonina em processos de aprendizagem.

A MEL é um hormônio que tem um importante papel na organização circadiana em geral (Cassone, 1990). Segundo Reiter (1991), a MEL informa o cérebro a respeito das condições do ambiente (hora do dia). Se a variação circadiana afeta a capacidade de aprendizagem do animal, é lógico pensar, que a MEL teria um papel importante nesse processo.

A influência sazonal na habilidade de peixes dourados, machos e fêmeas, aprenderem a discriminar cor, foi estudada durante dois anos consecutivos (Farr *et al.*, 1979). Embora não houvesse diferenças de desempenhos entre machos e fêmeas, havia uma variação sazonal. O índice de acerto diminuía 50% de fevereiro para 0% em junho/julho. Estes dados eram opostos ao pico de maturidade gonadal observada para esta espécie. A relação entre desenvolvimento gonadal e desempenho não foi, no entanto, estabelecida. Algum outro fator que não apenas a secreção de gonadotrofinas estaria afetando o aprendizado. Mangtani *et al.* (1979), postularam que a pineal seria o possível elo de ligação entre a capacidade de aprendizado e a atividade gonadal. Num outro experimento verificaram que a administração de MEL aumentava o número de acertos diários e a pinealectomia estava associada à inabilidade de todos os peixes aprenderem a tarefa. Nenhuma correlação entre as concentrações de MEL, desempenho e atividade gonadal foi demonstrada.

Doollins *et al.* (1993), estudaram o efeito de doses farmacológicas de MEL no desempenho intelectual de homens. Os sujeitos tiveram redução de desempenho em tarefas que visavam avaliar cognição, memória, capacidade auditiva e visual. Mostraram também maior sonolência, menor vigor físico e temperatura corporal reduzida. Resultados semelhantes foram obtidos em outro experimento que usou doses fisiológicas de MEL (Dollings *et al.*, 1994).

Inúmeras substâncias suprimem ou medeiam os padrões de sono, e conforme discutido anteriormente, acredita-se que o sono seja importante para a consolidação da memória, pelo menos para alguns tipos de memórias (Karni *et al.*, 1994; Wilson & Mcnaughton, 1994). A MEL pode ser uma destas substâncias (Cassone & Menaker, 1983; Klein, 1985). Reforçando esta sugestão está o fato de a exposição a claro constante ser capaz de abolir o ritmo plasmático de MEL, bem como interromper o sono de ondas lentas em ratos (Eastman & Rechtschaffen, 1983) e aves (Berger & Phillips, 1989; Yano *et al.*, 1974).

As proposições sobre as relações entre a MEL, comportamento e aprendizagem, obtiveram outras fundamentações baseadas em técnicas que utilizam melatonina marcada com iodo (2[¹²⁵I]) para a localização dos sítios cerebrais aos quais a MEL se liga (Cassone, 1990). Em mamíferos, os sítios de ligação são relativamente restritos, estando presentes nos NSQ, pars-tuberalis da hipófise, adeno-hipófise, retina, e núcleos paraventriculares do tálamo. Outros sítios foram localizados em outras áreas, como por exemplo área postrema e plexos coróides de ratos, estria terminal e núcleos antero medial do tálamo de camundongos, núcleos hipotalâmicos dorsomedial e núcleos das estria medular

de *hamsters* (Krause & Dubocovich, 1990) e núcleos talâmicos anterodorsal e anteroventral de ratos (Lindroos *et al.*, 1992). Essas ligações restritas sugerem que a MEL tem funções cerebrais específicas e claramente definidas. Em alguns desses sítios, os efeitos fisiológicos e comportamentais da MEL não são bem conhecidos, enquanto que em outros, o papel desse hormônio já foi identificado. Existem experimentos que sugerem, por exemplo, que os núcleos talâmicos anterodorsal (AD) de ratos participam de processos de aprendizado em esquemas de condicionamento de esquiava (Gabriel *et al.* 1981). Estes núcleos têm inúmeras conexões com o sistema límbico, modulando as funções de memória em animais e também no homem. Os núcleos AD receberam informações do fotoperíodo não somente via glândula pineal, mas também diretamente da retina (Conrad & Stumpf, 1975), podendo participar da regulação de muitos comportamentos como o alerta e a atenção, por exemplo.

A utilização de $2[1-125]$ como marcador de sítios de ação da MEL demonstrou que no cérebro de aves esses sítios estão amplamente distribuídos, predominando em estruturas associadas com vias fotorreceptoras e visuais. Existem quatro grandes vias visuais em aves:

1. via hipotalâmica que compreende: vNSQ (Cassone, *et al.* 1995), a área supraquiasmática (ASQ) e a decussação supraóptica ventral (DSV) que possuem conexão (Hodges & Cassone, 1989). Em pombos sítios de ligações de $2[1-125]$ são encontradas no vNSQ, ASQ e DSV;
2. via tectofugal - homóloga a via visual extrageniculocortical que controla movimentos bruscos e outros processos visuais inconscientes em mamíferos.

É constituída pelo tecto óptico (TeO) que possui eferências que se projetam no núcleo rotundus (Rt) e núcleos triangulares (T) no tálamo (Engelage & Bischof 1993). Rt tem projeções para o Ectoestriado (E) (Karten, 1969). Acredita-se que esta via visual central regula padrões de discriminação (Hodos & Karten, 1970). Pombos possuem sítios de ligação de 2 [I-125] no teO, Rt, T e E. Alguns outros núcleos que recebem aferências do tecto óptico mas que não são considerados como pertencentes às vias tectofugais, também tem receptores para MEL em pombos. São eles os núcleos: istmo óptico (IO), subpretectal (SP), pretectal (PT), mesencefálico lentiforme (LM), istmo parte parvocelular (Ipc), istmo parte magnocelular (Imc) e semilunar (SLu);

3. via talamofugal - homóloga à via geniculocortical de mamíferos (Shimizu & Karten, 1993), inicia-se no principal núcleo óptico retinoreceptor (PON), uma compilação de núcleos localizados no tálamo dorsal: anterior lateral (LA), dorsomedial anterior parte magnocelular (DLAmc) e parte lenticular (DLAtr); e o núcleo dorsal talâmico parte lateral ventral (DLLv) e a parte dorsal (DLLd) (Güntürkün et al., 1993). A parte lateral do núcleo geniculado (GLv) também é retinoceptora e recebe extensa inervação tectal. Neurônios do PON terminam no chamado Wulst visual, que é formado por quatro regiões, o hiperestriado dorsal (HD), o hiperestriado intercalar superior (HIS), hiperestriado acessório (HA) e o hiperestriado intercalado hiperestriatal acessório (IHA) (Shimizu & Karten, 1993). Lesões no Wulst afetam o desempenho de aves em aprendizagem de discriminação visual (Zeigler & Karten, 1973a e b), na reversão de padrões de discriminação (Benowitz & Lee-Teng, 1973) e em

padrões locomotores causando redução temporária deste comportamento (Zeigler 1963). Pombos tem marcação para 2 [I-125] no LA, GLv, DC e HA;

4. via óptica acessória - compreende: o núcleo ectomamilar retinorreceptor (EM) que envia aferências para núcleos oculomotor e cerebelo (Henke 1983), via que inicia reflexos oculomotores na presença de estímulos periféricos (Karten 1969); e os núcleos Edinger-Westphal (EW) estrutura oculomotora autônoma, que recebe aferências neurais do vNSQ, estruturas reticulares e pré tectais (Gamlin & Reiner, 1991). As marcações com 2 [I-125] ocorrem em EM e EW.

O lótopararolfatório (LPO), o N, vias do sistema auditivo e estruturas envolvidas com a vocalização e comportamento emocional, como o alerta e a excitação sexual (Cassone *et al.* 1995; Cassone, 1990; Rivkees *et al.* , 1989), também possuem sítios que são marcados pela 2[I-125] em pombos. Nenhuma marcação foi encontrada no hipotálamo lateral, eminência média, adeno-hipófise, neuro-hipófise e pineal, (Cassone *et al.* 1995), como verificado em mamíferos (Morgan & Williams ,1989). Esta grande quantidade de sítios de ligações de MEL no sistema nervoso sugerem variação circadiana, sensorial e comportamental.

OBJETIVOS GERAIS

É lógico pensar que numa situação de aprendizagem a qualidade das relações funcionais entre estímulos e respostas poderá ser afetada pela ritmicidade dessas classes de variáveis. Considerando que:

1. os comportamentos resultam de uma interação entre os fatores biológicos e ambientais;
2. os fatores ambientais são cíclicos;
3. as variáveis bioquímicas e fisiológicas de um organismo possuem ritmicidade endógena, ritmicidade esta que é sincronizada pelas mudanças diárias do meio ambiente;
4. a ritmicidade das variáveis fisiológicas tem a finalidade de preparar antecipadamente o organismo às alterações do dia e da noite;
5. em diferentes momentos das 24h do dia, os seres vivos respondem diferentemente a um mesmo estímulo;
6. há correlação entre a variação do comportamento e processos fisiológicos;

Foi objetivo deste trabalho analisar a variação diária da atividade geral apresentada por pombos (*Columba livia*) mantidos em cativeiro, em duas diferentes situações de luminosidade (ciclo claro-escuro e 24h de claro constante) e relacionar os resultados com as variações nas concentrações plasmáticas de MEL e B. Após a análise dessas relações, pretendeu-se caracterizar nas mesmas situações a existência de variação diurna-noturna em processos de aprendizagem

não associativa buscando discutir funções da MEL e B plasmáticas como possíveis substratos hormonais desse processo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar, ao longo das 24 horas do dia, os comportamentos apresentados por pombos mantidos em cativeiros, sob duas situações experimentais: um ciclo claro-escuro de 12h:12h e 24h de claro constante. Os padrões comportamentais ao longo das 24 horas forneceram uma linha de base adequada para as análises propostas para objetivos que se seguem;
2. Estudar a variação plasmática das concentrações de MEL e B em pombos *Columba livia* durante o período de 24 horas, nas mesmas situações experimentais descritas acima.
3. Analisar, ao longo das 24h do dia, variações nos processos de habituação da respostas pertencentes às categorias exploratória e pré exploratória a sons em pombos mantidos em cativeiro, sob um ciclo claro-escuro de 12h:12h ou situação de claro constante.

EXPERIMENTO I

Análise da distribuição de categorias comportamentais de pombos *Columba livia* em cativeiro ao longo de 24h

Este trabalho teve por objetivo realizar um estudo sistemático do repertório de comportamentos de pombos *Columba livia* ao longo do período de 24h. Esta análise foi possível a partir da utilização de um catálogo de comportamentos de pombos em cativeiro desenvolvido previamente em nosso laboratório (Ferrari, 1982; Toledo, 1989).

Assim, neste experimento primeiramente descreveremos: (a) a metodologia de elaboração do catálogo; (b) a seqüência de organização dos itens constantes do catálogo e (c) a análise do comportamento de pombos em cativeiro ao longo de 24h, sob condições de claro-escuro 12h:12h e de claro constante.

Materiais e Métodos

Sujeitos

Foram usados pombos machos e fêmeas, adultos (*Columba livia*), derivação não controlada, pesando entre 350 e 450 gramas. As aves foram, mantidas em gaiolas-viveiros individuais de aço galvanizado (0,50m x 0,35m x 0,38m) ou ainda em gaiolas-viveiros coletivas de aço galvanizado (1,10m x 0,40m

x 0,50m) que abrigavam grupos de pombos de apenas um sexo, ambos os sexos, ou ainda de casais isolados. As gaiolas ficavam alojadas no biotério de aves do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP. As aves alojadas individualmente podiam manter contato visual, auditivo, olfativo e corporal através das grades das gaiolas.

Água e alimento eram fornecidos à vontade e trocados em dias alternados entre 13 e 14 horas. O alimento fornecido consistia de uma mistura de ração, quirera de milho, semente de girassol, casca de ovo, complementação vitamínica e areia. A temperatura do biotério era mantida ao redor de 24°C. Visando a adaptação dos pombos às condições de alojamento, as manipulações experimentais iniciaram-se após 20 dias no biotério. Os pombos foram mantidos em um período claro-escuro 12h:12h, com a luz acendendo às 6h e apagando às 18h.

Para a análise da distribuição de comportamentos ao longo do período de 24h foram usados 12 pombos machos, obtidos de um mesmo fornecedor alojados individualmente. Após os 20 dias de adaptação às condições de alojamento, os pombos foram atribuídos aleatoriamente a 2 grupos, definidos segundo a situação experimental a que estavam expostos: ciclo claro-escuro 12h:12h (situação CE), em que foram mantidas as condições acima descritas (n = 6); ou 24h de claro constante (situação CC), introduzida antes da observação comportamental, que durou um máximo de 32h (n = 6).

Equipamentos

Para a observação direta e registros comportamentais com o objetivo de organização do catálogo de comportamentos foram utilizados:

1. Gaiolas-viveiros individuais (0,50m x 0,35m x 0,38m), ou coletivas (1,10m x 0,40m x 0,50m) constituídas de aço galvanizado. As gaiolas ficavam alojadas no biotério de aves do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP. As aves alojadas individualmente podiam manter contato visual, auditivo, olfativo e corporal através das grades das gaiolas;
2. Câmara de observação, construída em cimento (100 x 50 x 50 cm), com vidro laminado reflexivo na parte frontal. A iluminação era dada por uma luz fluorescente de 40 watts;
3. Câmara de condicionamento operante para pombos (Ferster & Skinner, 1958).
4. Câmara de habituação, confeccionada de madeira, forrada internamente por revestimento melamínico (fórmica) e externamente por material isolante termo-acústico (lã de vidro recoberto por placas de isopor). A parte frontal era composta por dois vidros, de 8mm de espessura cada, espaçados por 10mm, sendo o vidro interno temperado transparente e o externo laminado reflexivo. A iluminação era dada por duas lâmpadas fluorescentes Super Compacta de 9 watts. No canto superior esquerdo de uma das paredes, existia um alto falante Novik 80-watts.

As câmaras experimentais ficavam numa sala do laboratório com isolamento acústico. Na frente da sala experimental, existia uma sala de controle.

Entre estas duas salas havia uma janela com vidro laminado unidirecional através da qual era possível observar diretamente os comportamento e gravar as sessões experimentais. Quando os registros foram realizados no próprio biotério as gaiolas-viveiro foram alojadas em uma sala que também possuía uma janela com vidro laminado unidirecional. Na frente desta janela existia uma ante-sala que permitia a monitoração e gravação das sessões experimentais. Para realizar a monitoração e gravação das sessões de observação comportamental foi utilizado um equipamento VHS, para registros audiovisuais (câmara filmadora Panasonic), conectado a um aparelho de TV (Panasonic). Os observadores usavam também folhas de registro especialmente elaboradas para o registro contínuo do comportamento ou amostragem em intervalos de tempo.

Procedimentos:

1. Elaboração do catálogo de comportamentos:

O procedimento geral para a elaboração do catálogo de comportamentos de pombos mantidos em cativeiro incluiu a observação, o registro, a identificação e a descrição, em termos de topografia e função, dos comportamentos apresentados pelos sujeitos experimentais em diferentes situações de observação. Estabeleceu-se como critério o registro das reações observáveis dos pombos, fossem movimentos, posturas ou deslocamentos.

A observação dos comportamentos foi feita obedecendo-se as seguintes etapas:

- 1.1- registro de comportamentos: o observador registrava continuamente os comportamentos dos pombos durante o período de observação, com o objetivo de fazer um levantamento das ações que o pombo apresentava nas diferentes situações;
- 1.2- identificação dos comportamentos: essas ações eram registradas em folhas de registro e em áudio como formas verbais, os registros realizados por vídeo eram também transcritos primeiramente em formas verbais. A partir da análise dos registros de formas verbais eram listadas as ações e/ou padrões comportamentais;
- 1.3- descrição de comportamento: o pesquisador observava repetidamente a ocorrência de cada ação (item comportamental), revendo os registro audiovisuais ou realizando novas observações diretas, com objetivo de descrever a topografia específica (forma de ocorrência), os seus efeitos e a situação em que cada um ocorria;
- 1.4- definição e categorização do comportamento: nas diferentes situações os registros de comportamento foram feitos simultaneamente e independentemente, ou isoladamente por pelo menos dois observadores. A descrição de cada comportamento foi discutida em conjunto pelos observadores participantes do estudo. Também foram realizadas observações em que pares de observadores identificavam verbalmente, a partir das descrições elaboradas, os comportamento dos pombos, à medida

em que iam ocorrendo. As identificações e as descrições eram discutidas e revistas até a concordância total entre observadores.

As situações de observação e registro do comportamento incluíram: (a) gaiolas-viveiro individuais localizadas no biotério; (b) câmara de observação, localizadas no laboratório, onde os pombos eram mantidos por um período restrito de tempo; (c) gaiolas-viveiros coletivas, localizadas no biotério, ocupadas por casais de pombos ou ainda por grupos de cinco pombos (machos e fêmeas), utilizadas para descrever as situações de interação social; (d) câmara de condicionamento operante, onde ocorriam a aplicação de estímulos aversivos ou a câmara de habituação, onde as aves recebiam estímulos auditivos.

As observações diretas e sistemáticas dos comportamentos de pombos em situação de cativeiro alojados individualmente ou em interação social com casais ou mais pombos da espécie, bem como, as observações feitas a partir de observações de diferentes apresentações de estímulos permitiu : (a) identificação de diferentes comportamentos ou itens comportamentais; (b) descrição das características topográficas da cada comportamento; (c) o agrupamento desses itens comportamentais num catálogo de comportamento do pombo em cativeiro, de acordo com critérios de função ou de conseqüências comuns a diferentes itens comportamentais. Cada agrupamento pode ser identificado como uma classe ou categoria. O catálogo resultante foi utilizado para a análise descritiva e funcional do comportamento de pombos em cativeiro ao longo das 24h, como descreveremos a seguir.

2. Análise da distribuição de comportamentos em gaiolas-viveiro ao longo de 24h.

Os comportamentos apresentados por 12 pombos foram registrados em duas sessões, de 5 minutos com intervalo de 24h, nos seguintes horários: 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. As gaiolas, dos pombos filmados, foram posicionadas em duas fileiras sobrepostas (3 gaiolas cada) encostadas em uma das paredes da sala, com localização oposta à porta de entrada na sala. Durante o período de escuro da situação CE (horários compreendidos entre 18h e 6h), o biotério ficou iluminado apenas por uma lâmpada Philips de 60 Watt, protegida por um canhão que continha um filtro vermelho Kodak 1A Safelight Filter CAT 1521517-7H. Esta luz foi introduzida no biotério com uma semana de antecedência (iluminação inferior a 1 lux, na localização central, a 92cm de distância do teto, na altura da fileira superior das gaiolas).

Neste experimento, a câmara filmadora foi posicionada na sala do biotério, 1m na frente das gaiolas-viveiro, 24hs antes do início das gravações. Nesta situação o aparelho de TV, conectado ao equipamento de filmagem, ficava em uma ante-sala permitindo a monitoração da gravação das sessões de observação comportamental.

A observação e registro dos comportamentos utilizou o catálogo de comportamentos de pombos em cativeiro. O catálogo foi organizado em oito categorias comportamentais distintas, com um total de 101 itens comportamentais. A descrição dessas categorias comportamentais que expressam funções ou

conseqüências comuns estão apresentadas abaixo. Os catálogo completo incluindo os comportamentos, pertencentes a cada categoria com as respectivas definições encontram-se descritos no anexo 1. Sempre que possível foram respeitados os seguintes itens na descrição dos comportamentos: Condição para que o comportamento ocorra (C) - que corresponde à postura inicialmente exigida para que o comportamento apresentado pelo sujeito possa ser classificado; Resposta (R) que corresponde ao comportamento apresentado; Conseqüência (P) que corresponde ao produto, efeito ou mudança atingida como conseqüência da emissão do comportamento.

As categorias comportamentais descritas foram:

- Categoria I - Movimentos discretos de partes do corpo ou de todo o corpo - incluem-se nesta categoria deslocamentos discretos e independentes de partes do corpo em relação ao próprio corpo, ou de todo o corpo, sem que o animal se desloque no espaço;
- Categoria II - Pré-exploratória - comportamentos reflexos, eliciados por apresentação de estímulos novos e ou intensos e que precedem imediatamente as reações exploratórias;
- Categoria III - Exploratória - nesta categoria estão descritas as reações relacionadas à orientação e à investigação de parte ou do ambiente como um todo;
- Categoria IV - Manutenção - comportamentos relacionados com os cuidados com o corpo e reações vegetativas tais como bocejar e vomitar;

- Categoria V - Locomoção - comportamentos relacionados com o deslocamento do corpo no espaço;
- Categoria VI - Interação - comportamentos relacionados com a interação de um animal com outro do mesmo sexo ou do sexo oposto;
- Categoria VII - Posturas - posturas apresentadas pelos animais;
- Categoria VIII - Parado - registra-se a ausência de respostas observáveis.

A análise dos comportamentos foi realizada após a transcrição das fitas, por dois observadores independentes. Os comportamentos observados foram registrados a cada 1s e atribuídos às categorias comportamentais descritas acima. Neste estudo, os comportamentos pertencentes à categoria pré-exploratória, embora tenham sido registrados em separado, foram analisados juntamente com os comportamentos pertencentes à categoria exploratória, dada a baixa frequência de ocorrência.

A análise comportamental utilizou a somatória dos comportamentos pertencentes a cada categoria apresentados na primeira e na segunda sessão considerando-se o total de 10 minutos de observação².

3. Controle de Fidedignidade dos dados e validação do catálogo

Os comportamentos, apresentados pelos pombos eram observados diretamente e anotados, em folhas de registro pelo experimentador ao mesmo tempo em que ocorria a gravação das sessões em fitas de vídeo. As fitas eram

² As primeiras sessões não diferiram das segundas e portanto foram somadas (Wilcoxon, $p > 0,05$)

posteriormente transcritas pelo experimentador, em folhas de registros. As dúvidas foram discutidas por dois observadores pela reanálise das fitas e das transcrições realizadas. A análise da fidedignidade entre ambos os observadores foi realizada pela somatória dos acordos (A) dividido pela soma das omissões (O), acordos e desacordos (D), e o valor obtido foi multiplicado por cem ($A/A+O+D \times 100$).

Análise estatística

Utilizamos a prova não-paramétrica de Friedman, um tipo de análise de variância por postos para um mesmo grupo de sujeitos expostos a diversas condições (horários), para determinar se a frequência de comportamentos apresentadas em cada uma das categorias comportamentais, variavam ao longo das 24h do dia, na situação CE e CC. O teste de Friedman foi seguido por processo de comparações múltiplas pareadas com o método de Student-Newman-Keuls.

Utilizamos ainda o teste não paramétrico, para amostras dependentes Wilcoxon Matched Pairs Test. para compararmos as diferentes posturas apresentadas em cada horário.

Resultados

Situação CE

A Figura 1 mostra a distribuição de comportamentos Exploratórios (EXP) apresentados ao longo das 24h do dia. Dois picos de EXP são verificados às 6h (mediana=380,5comp/10min) e 18h (mediana=344,5comp/10min) e um outro intermediário às 12h (mediana=191,5comp/10min). O menor nível de EXP ocorreu às 3h (mediana=1,5comp/10min). Esses resultados foram confirmados estatisticamente pela prova de Friedman que evidenciou efeito significativo de horário ($\chi^2=37,970$; $df=7$; $p<0,001$). As múltiplas comparações *post-hoc*, método de Student-Newman-Keuls, determinaram diferenças significativas para os horários de 6h, 12h e de 18h em relação aos demais horários ($p<0,05$). Na fase de escuro, o horário das 3h diferiu de todos os demais ($p<0,05$).

Para a categoria interação (INT) verificou-se um efeito significativo de horário ($\chi^2=25,377$; $df=7$; $p<0,001$). Esse efeito deve ser devido à diferença significativa ($p<0,05$) verificada às 18h (mediana=159,5comp/10min) em relação aos demais horários, conforme indicado pelas comparações *post-hoc* (Figura 2).

As freqüências medianas dos comportamentos pertencentes à categoria de locomoção (LOC) podem ser observados na Figura 3. Também foram verificados picos às 18h (mediana=87,5comp/10min) e 6h (mediana=80,5comp/10min), com confirmação estatística de efeito significativo de horário ($\chi^2=31,464$; $df=7$; $p<0,001$). As múltiplas comparações *post-hoc* indicaram diferenças significativas

Exploração - Situação CE

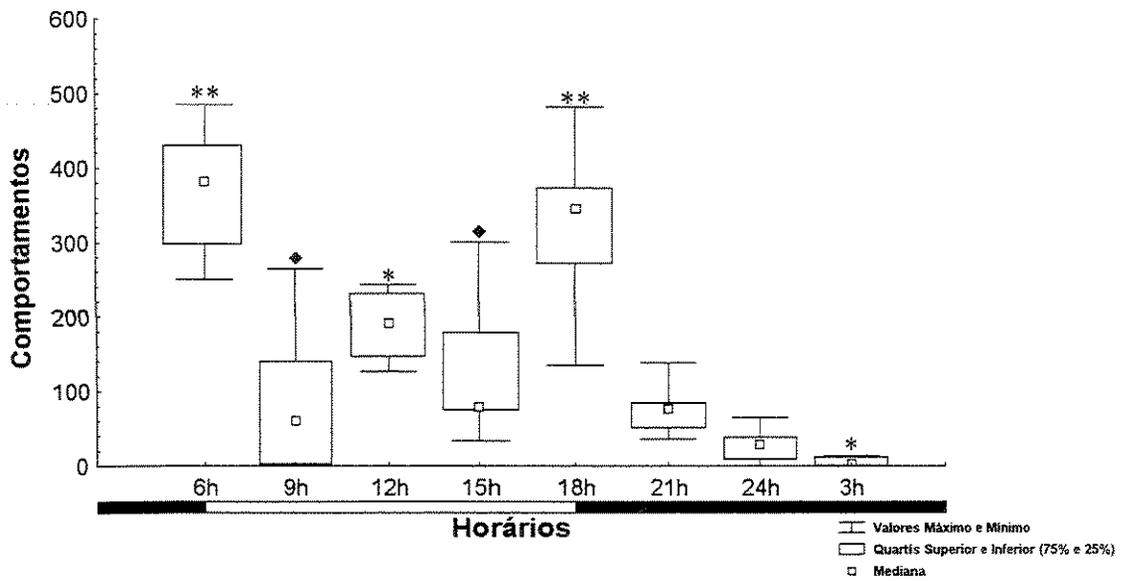


Figura 1 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Exploratória, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min.). Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 37,90$; $df = 7$; $p < 0,001$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

- * $p < 0,05$, em relação aos demais horários
- ** $p < 0,05$, em relação à 9h, 12h, 15h, 21h, 24h e 3h
- ◆ $p < 0,05$, em relação 24h

Interação - Situação CE

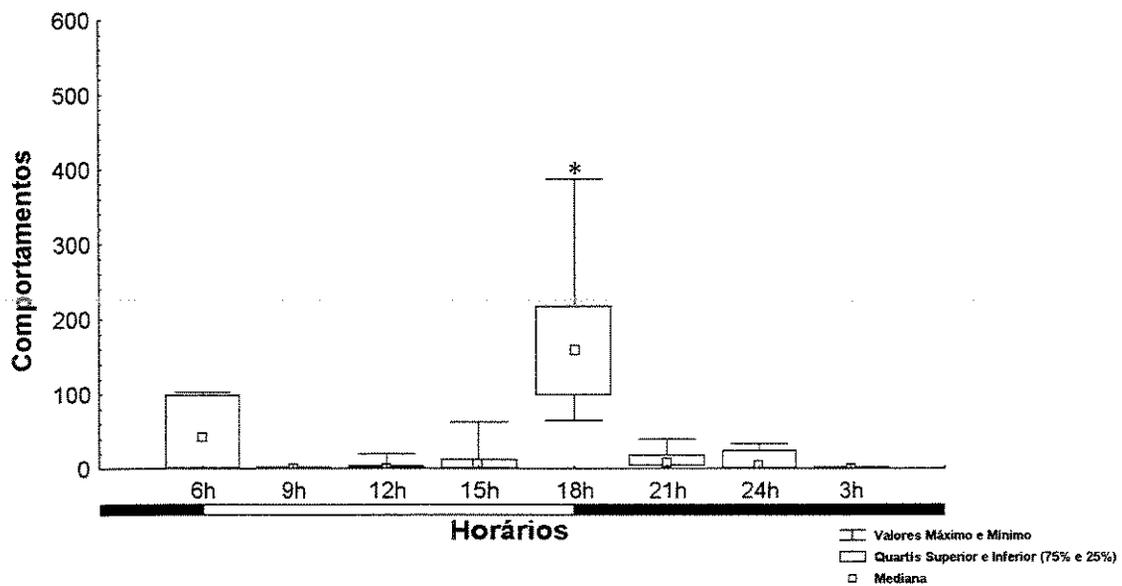


Figura 2 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Interação, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min.).

Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 25,37$; $df = 7$; $p < 0,001$)

- Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:
- * $p < 0,05$, em relação aos demais horários

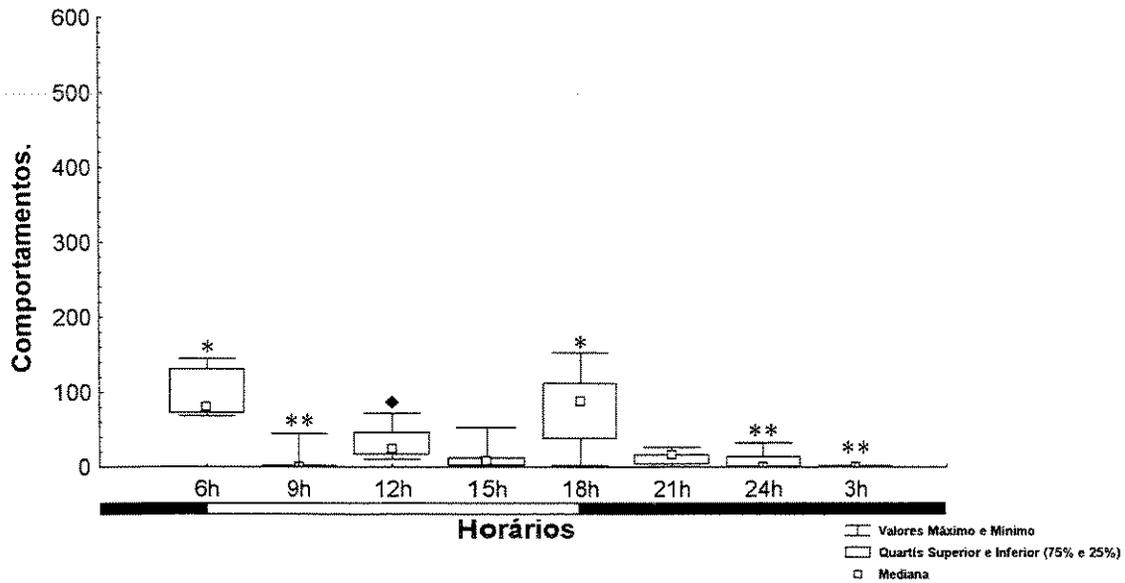
para os horários das 6h e 18h em relação aos demais horários ($p < 0,05$). As menores frequências medianas de LOC ocorreram às 9h, 3h, e 24h, ($p < 0,05$).

A Figura 4 apresenta a frequência mediana dos movimentos discretos de partes do corpo ou de todo o corpo (MOV). Mais uma vez um pico de atividade foi verificado às 6h (mediana=55,0comp/10min) e confirmado pela análise estatística que indicou efeito de horário ($\chi^2=31,106$; $df=7$; $p < 0,001$), e diferença significativa entre este horário e todos os demais ($p < 0,05$). As menores frequências foram verificadas às 24h (mediana=0,5comp/10min) e 3h (mediana=0comp/10min) que diferiram de todos os demais horários ($p < 0,05$).

A Figura 5 mostra a distribuição de comportamentos pertencentes à categoria de manutenção (MAN). Estes comportamentos apresentaram uma distribuição homogênea ao longo das 24h do dia, fato confirmado pela análise estatística que não indicou efeito de horário ($\chi^2=10,090$; $df=7$; $p=0,07$)

A análise da ocorrência de parado (Figura 6), ou seja, as ausências aparentes de respostas, (categoria PAR) mostrou um efeito de horário ($\chi^2=37,008$; $df=7$; $p < 0,001$). A análise *post-hoc* indicou que a maior frequência mediana de PAR foi verificada às 3h (mediana=589,5comp/10min), com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a todos os demais horários. Também os horários das 9h (mediana=456comp/10min), 21h (mediana=418comp/10min), 24h (mediana=322,5comp/10min) e 15h (mediana=327,5comp/10min), diferiram significativamente ($p < 0,05$) das 6h, 12h e 18h.

Locomoção - Situação CE

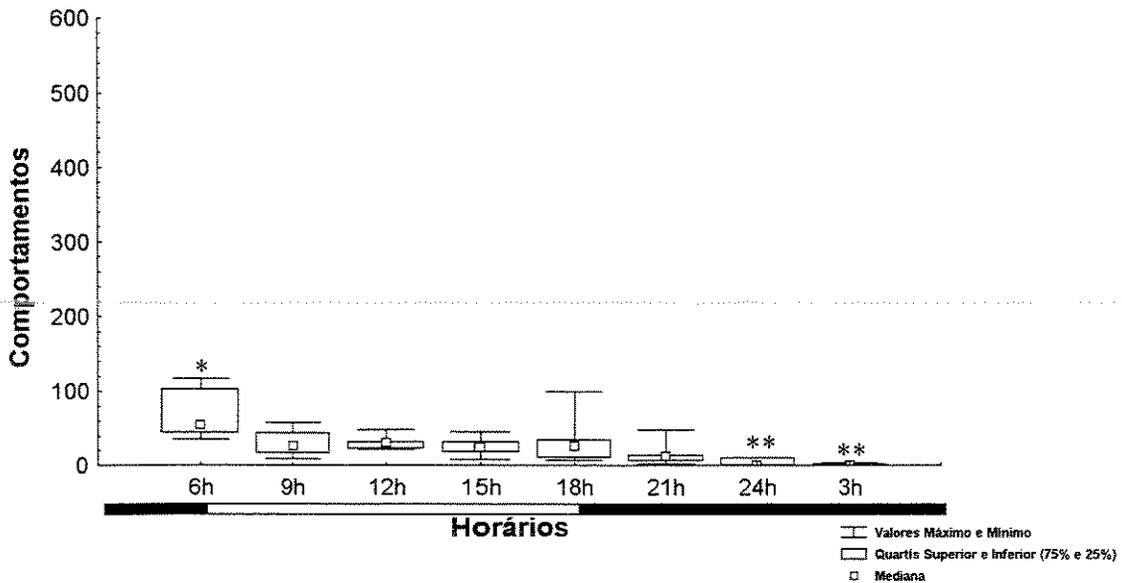


jura 3 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Locomoção, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).
 edman: Efeito de horário ($\chi^2 = 31,46$; $df = 7$; $p < 0,001$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

- * $p < 0,05$, em relação aos demais horários
- ** $p < 0,05$, em relação à 6h, 12h, 15h, 18h e 21h
- ♦ $p < 0,05$, em relação à 15h e 21h

Movimentos Isolados - Situação CE



jura 4 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Movimentos Isolados, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).

edman: Efeito de horário ($\chi^2 = 31,11$; $df = 7$; $p < 0,001$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

- * $p < 0,05$, em relação aos demais horários
- ** $p < 0,05$, em relação à 6h, 9h, 12h, 15h, 18 e 21h

Manutenção - Situação CE

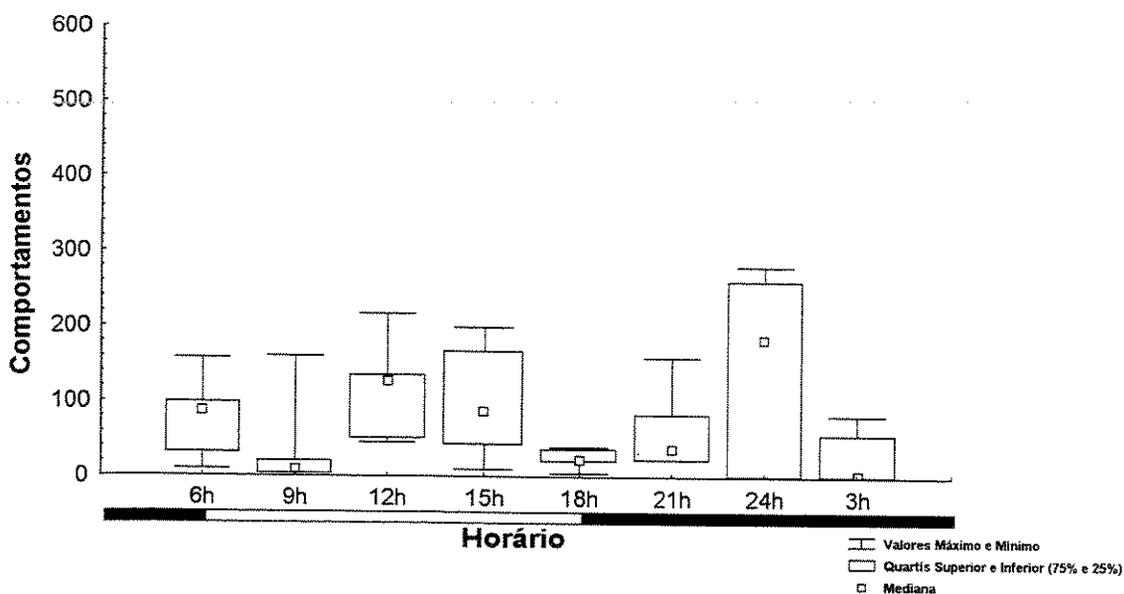


Figura 5 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Manutenção, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min). Friedman: Não foi encontrado efeito de horário ($\chi^2 = 10,09$; $df = 7$; $p = 0,07$)

Parado - Situação CE

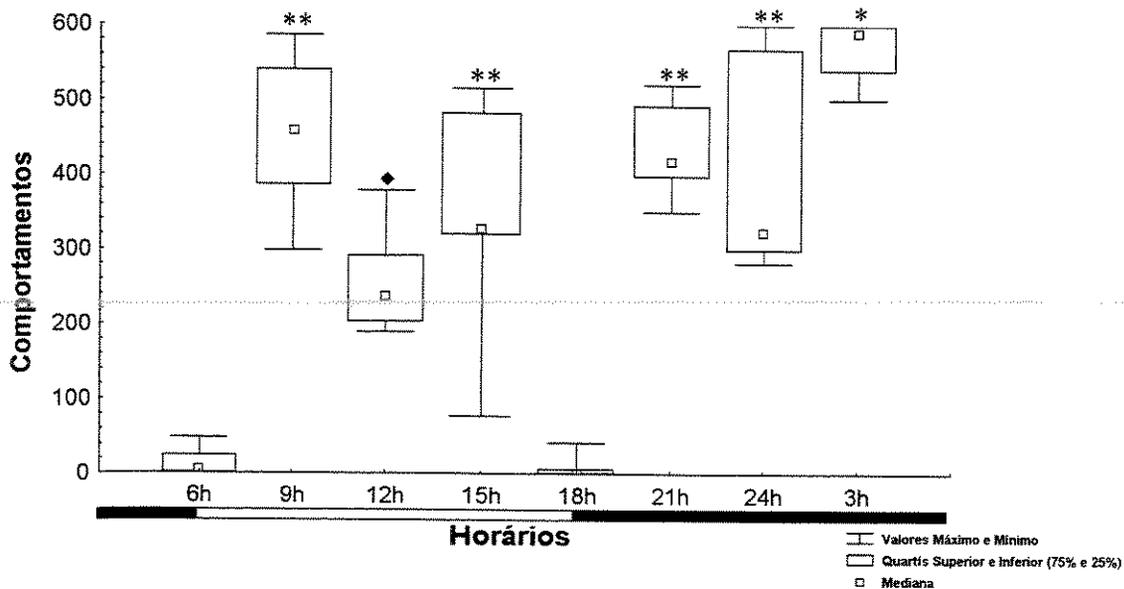


Figura 6 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Parado, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).

Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 37,00$; $df = 7$; $p < 0,001$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

* $p < 0,05$, em relação aos demais horários

** $p < 0,05$, em relação à 6h, 12h e 18h

◆ $p < 0,05$, em relação à 6h e 18h

Foi registrado o aparecimento de apenas duas posturas: o Em Pé (EMP) e Agachado (AGO) . A análise estatística indicou não haver efeito de horário para nenhuma delas ($\chi^2=6,335$; $df=7$; $p=0,5$, para ambas). A Figura 7 apresenta as comparações realizadas entre a postura EMP e AGO nos diferentes horários. O teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras dependentes indicou que as posturas EMP prevalecem na fase clara do ciclo claro-escuro e também às 18h e 3h se comparadas nos mesmos horários com a postura AGO ($p<0,05$).

Situação CC

A Figura 8 mostra a distribuição de EXP ao longo das 24h do dia. A análise estatística indicou um significativo efeito de horário ($\chi^2=20,556$; $df=7$; $p<0,004$) evidenciado pela diferença significativa encontrada com as múltiplas comparações *post-hoc*, método de Student-Newman-Keuls, para os horários do dia subjetivo e o horário das 18h, que diferiram dos horários das 21h, 24h e 3h ($p<0,05$)

Para INT (Figura 9) não foram verificados efeitos significativos de horário ($\chi^2=14,204$; $df=7$; $p<0,07$).

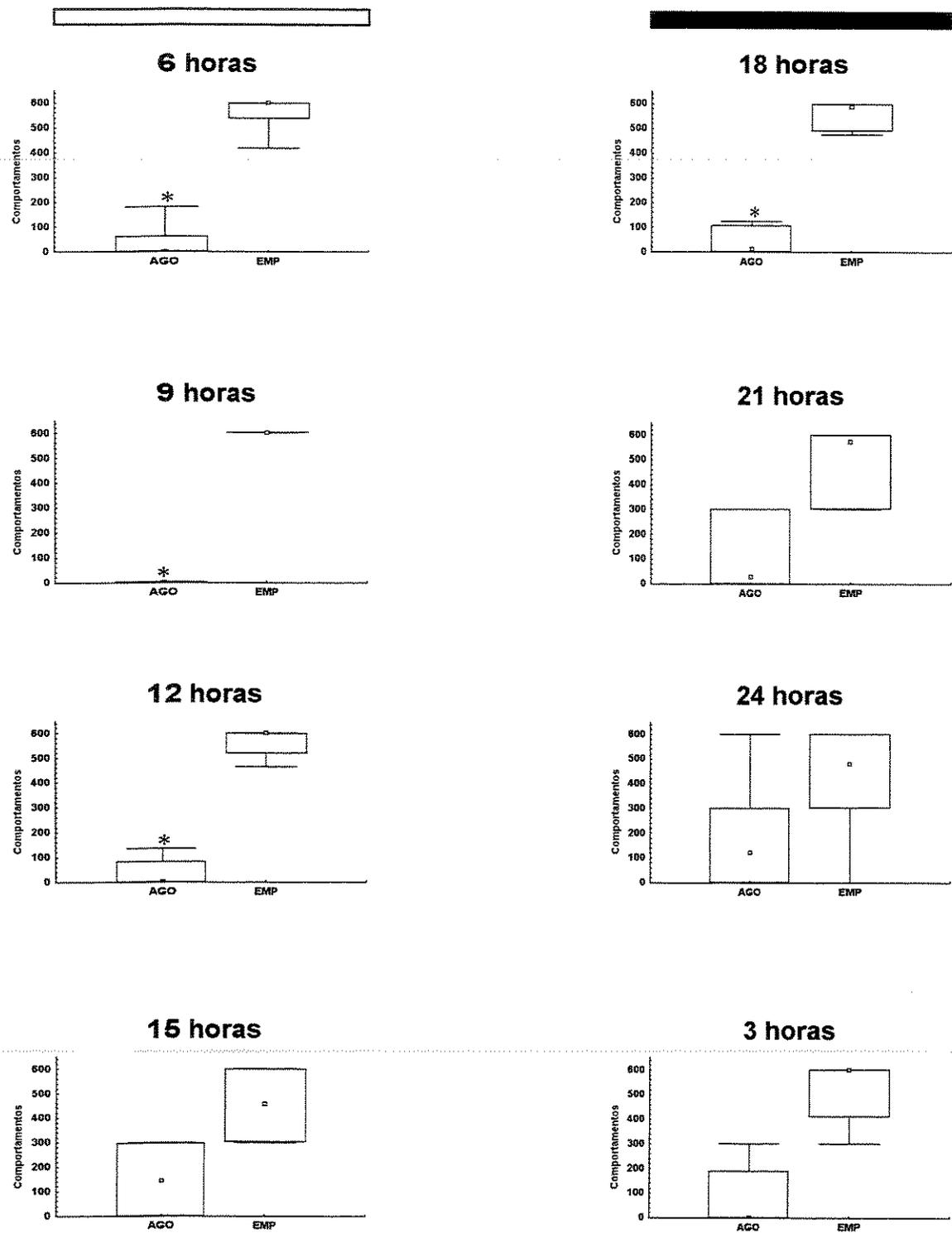


Figura 7 - Valor Mediano das Posturas Agachado (AGO) e Em Pé (EMP), observados durante 10 minutos em pombos expostos ao ciclo claro-escuro 12h:12h, luz acesa às 6h (CE), nos horários das 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. Comparou-se AGO e EMP em cada horário. * - indica $p < 0,05$, Wilcoxon Matched Pairs Test.

Exploração - Situação CC

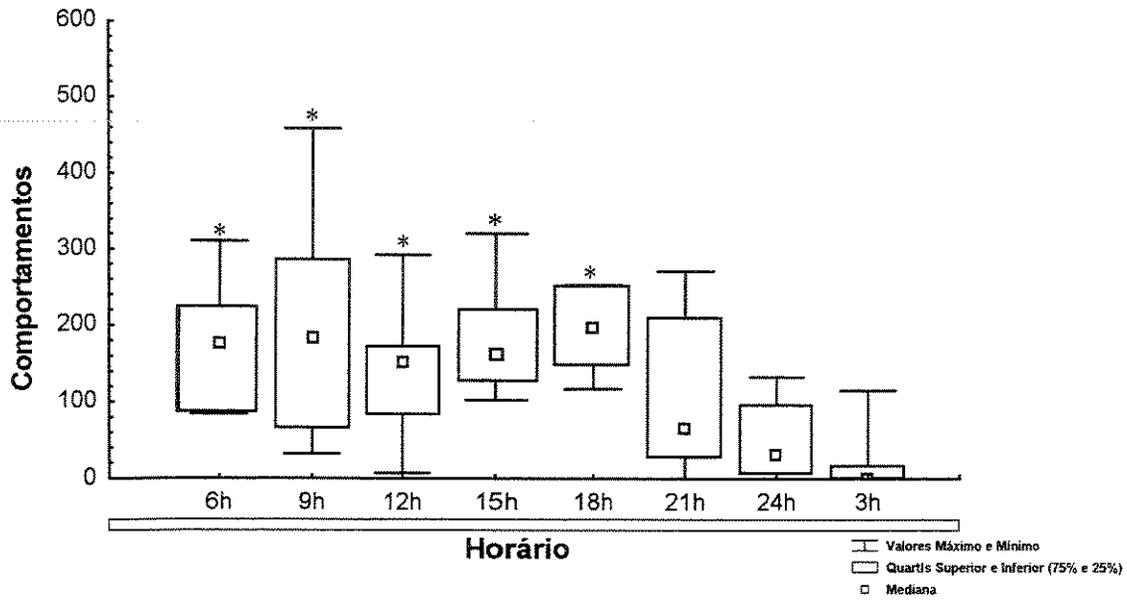


Figura 8 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Exploratória, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min.).
 Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 20,556$; $df = 7$; $p=0,004$)
 Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:
 * $p < 0,05$, em relação à 21h, 24h e 3h.

Interação - Situação CC

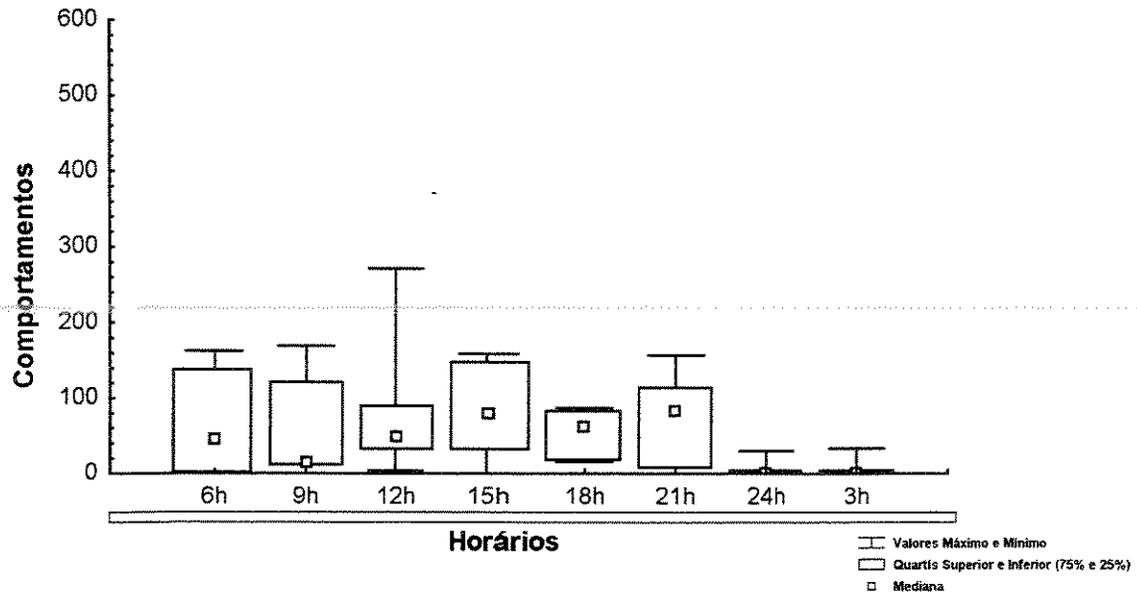


Figura 9 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Interação, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min.).
 Friedman: Não foi encontrado efeito de horário ($\chi^2 = 14,204$; $df = 7$; $p=0,07$)

As frequências medianas dos comportamentos pertencentes à categoria LOC podem ser observados na Figura 10. Foram verificados os menores valores às 3h e 24h (mediana=0,0comp/10min), e os maiores às 15h (mediana=48,5comp/10min) com confirmação estatística de efeito significativo de horário ($\chi^2=24,187$; $df=7$; $p<0,001$). As múltiplas comparações realizadas *post-hoc* confirmaram estes resultados ($p<0,05$).

A Figura 11 apresenta a frequência mediana de MOV. Mais uma vez uma menor atividade foi verificada às 3h (mediana=1,50comp/10min). Valores medianos baixos de atividade foram encontrados ainda às 24h (mediana=4,50comp/10min) e 12h (mediana=6,50comp/10min). Estes dados foram confirmados pela análise estatística que indicou efeito de horário ($\chi^2=19,824$; $df=7$; $p<0,006$), com diferença significativa entre o horário das 3h e todos os demais e entre 24h e 12h se comparados com os horários das 6h, 9h, 15h, 18h e 21h ($p<0,05$).

A Figura 12 mostra a distribuição de MAN. Estes comportamentos apresentaram uma distribuição homogênea ao longo das 24h do dia, e a análise estatística não indicou efeito de horário ($\chi^2=11,765$; $df=7$; $p=0,10$)

A análise da ocorrência de categoria PAR (Figura 13) mostrou um efeito de horário ($\chi^2=23,783$; $df=7$; $p<0,001$). A análise *post-hoc* indicou que a maior frequência mediana de PAR foi verificada às 3h (mediana=528,5comp/10min) e 24h (mediana=469,50comp/10min), com diferenças significativas ($p<0,05$), de todos os demais horários. O horários das 9h (mediana=94,50comp/10min) também diferiu significativamente ($p<0,05$) de 15h, 18h e 21h.

Locomoção - Situação CC

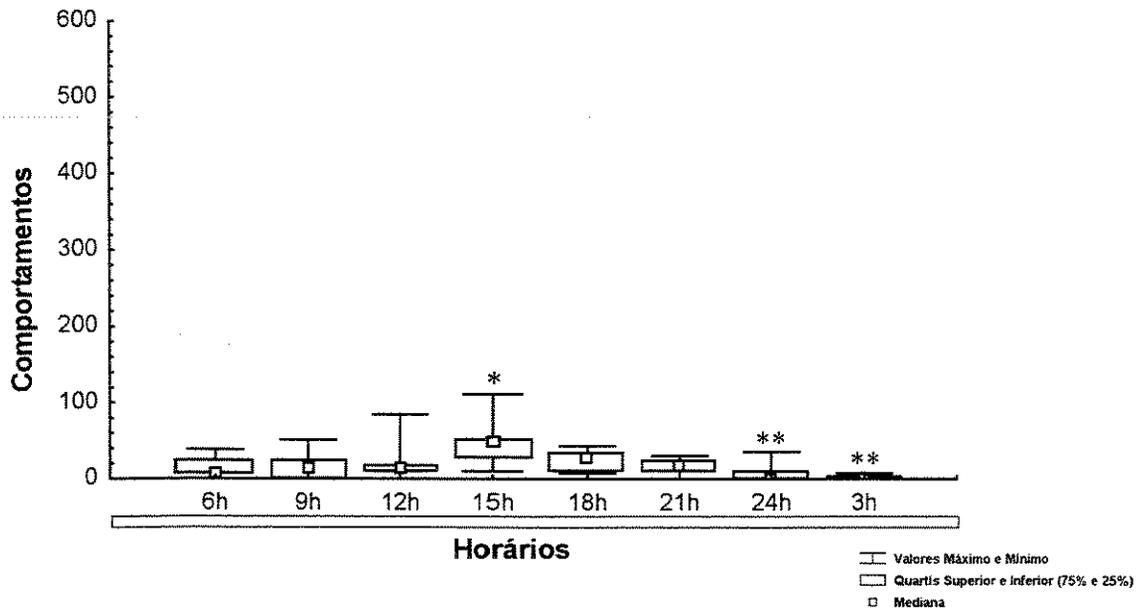


Figura 10 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Locomoção, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).

Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 24,187$; $df = 7$; $p < 0,001$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

* $p < 0,05$, em relação aos demais horários

** $p < 0,05$, em relação à 6h, 9h, 12h, 15h, 18h e 21h

Movimentos Isolados - Situação CC

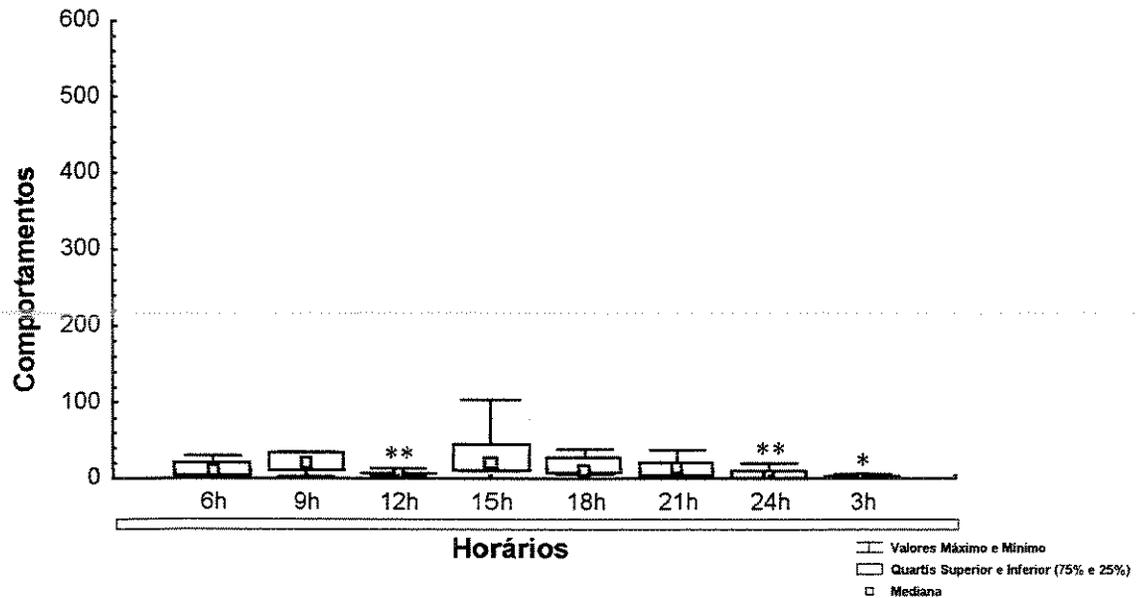


Figura 11- Valor mediano dos comportamentos da categoria Movimentos Isolados, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).

Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 19,824$; $df = 7$; $p = 0,006$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

* $p < 0,05$, em relação aos demais horários

** $p < 0,05$, em relação à 6h, 9h, 15h, 18 e 21h

Manutenção - Situação CC

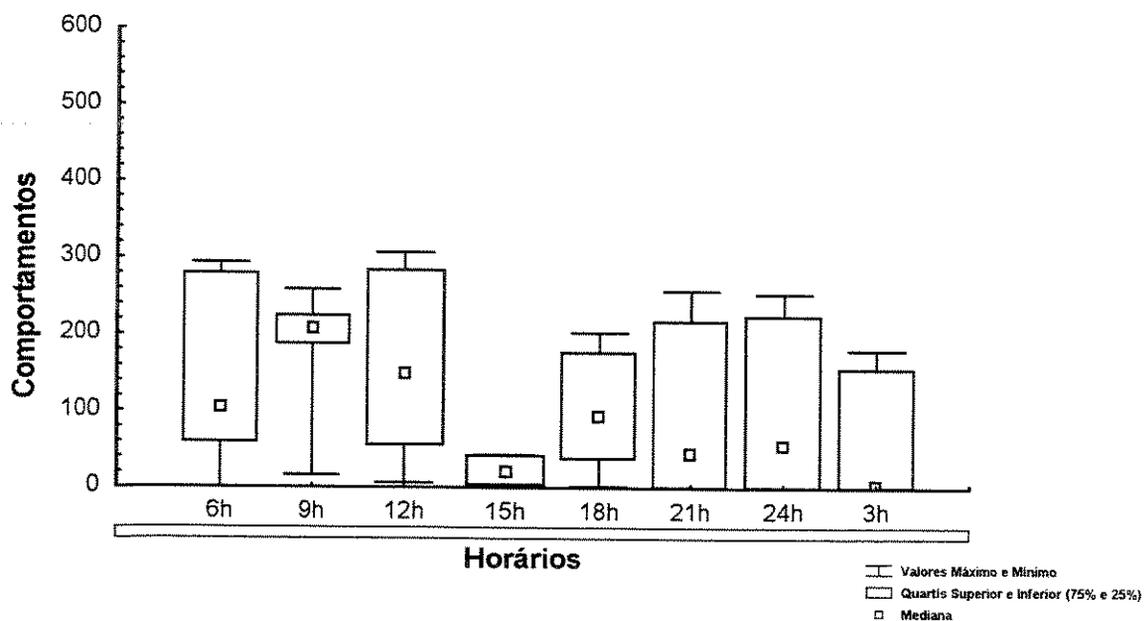


Figura 12 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Manutenção, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).
Friedman: Não foi encontrado efeito de horário ($\chi^2 = 11,765$; $df = 7$; $p = 0,109$)

Parado - Situação CC

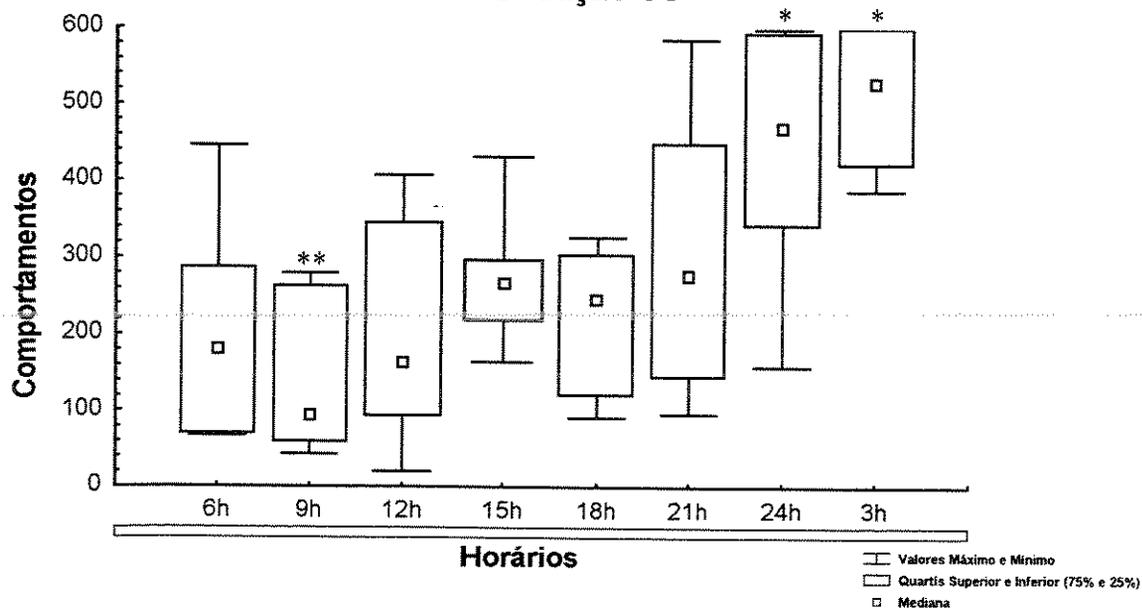


Figura 13 - Valor mediano dos comportamentos da categoria Parado, observados durante 10 minutos (duas sessões experimentais de 5 min).
Friedman: Efeito de horário ($\chi^2 = 23,783$; $df = 7$; $p < 0,001$)

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Student-Newman-Keuls indicaram:

* $p < 0,05$, em relação aos demais horários

** $p < 0,05$, em relação à 15h, 18h e 21h

Foi registrado o aparecimento de apenas duas posturas: o Em Pé (EMP) e Agachado (AGO) . A análise estatística indicou não haver efeito de horário para nenhuma delas ($\chi^2=8,778$; $df=7$; $p=0,2$, para ambas). A Figura 14 apresenta as comparações realizadas entre a postura EMP e AGO nos diferentes horários. O teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras dependentes indicou que as posturas EMP prevalece no horário de 9h se comparadas nos mesmos horários com a postura AGO ($p<0,05$). Nos demais horários não foram encontradas diferenças significativas.

Discussão

Os resultados do Experimento I indicaram variação de comportamento na situação CE. Os comportamentos de EXP e LOC apresentaram as maiores freqüências às 6h e 18h, diferindo de todos os demais horários. O horário das 6h apresentou ainda, alta freqüência de MOV, enquanto que o horário das 18h apresentou alta freqüência de INT. A categoria PAR aparece com maiores freqüências nos horários de escuro às 3h, diferindo de todos os demais e também às 21h e 24h que diferiram dos horários das 6h e 12h da fase clara. Outros comportamentos mostraram uma distribuição mais homogênea ao longo do dia. Assim, observou-se uma fase de maior freqüência de comportamentos durante a fase clara, e outra de menor freqüência durante o escuro.

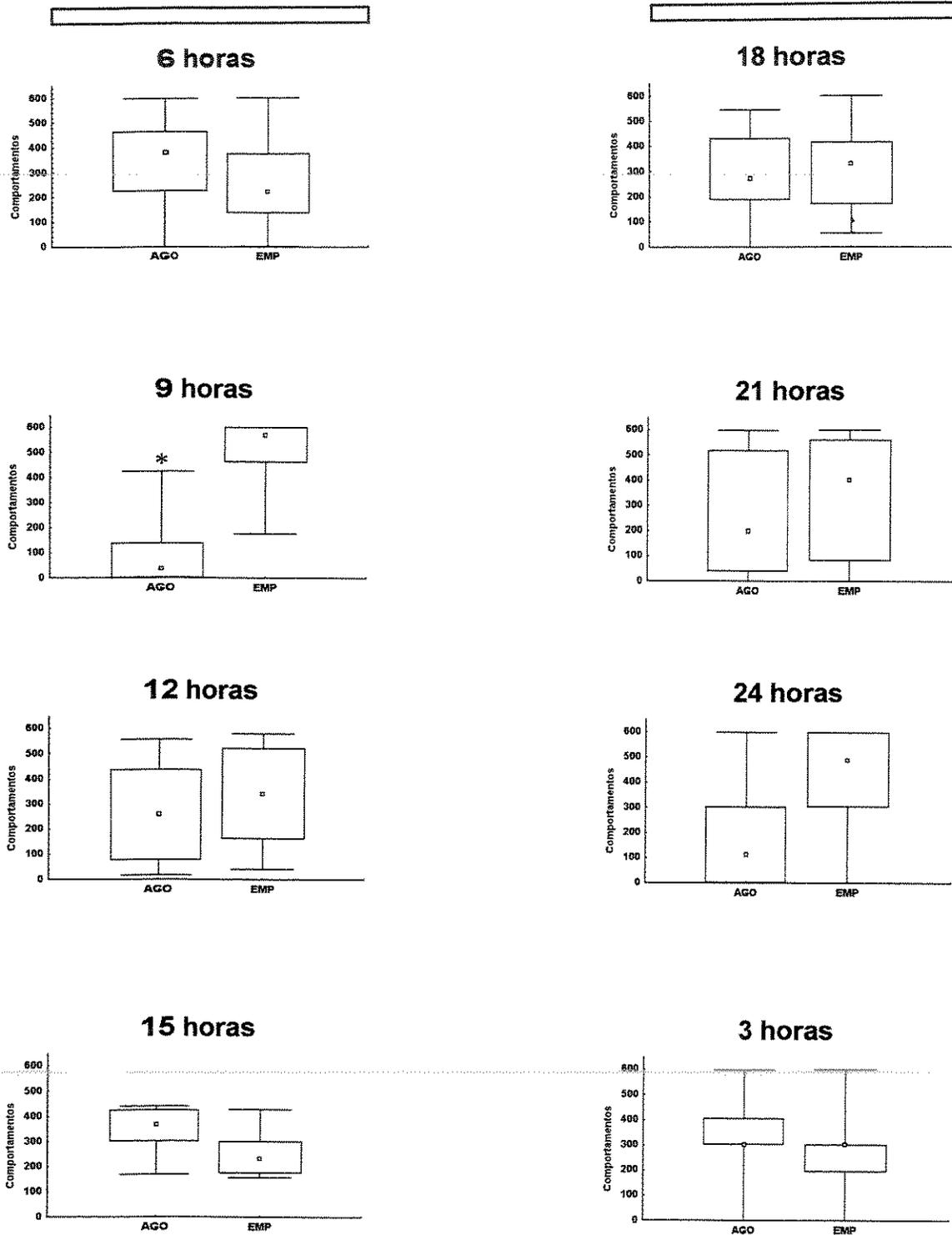


Figura 14 - Valor Mediano das Posturas Agachado (AGO) e Em Pé (EMP), observados durante 10 minutos em pombos expostos a claro constante (CC), nos horários das 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. Comparou-se AGO e EMP em cada horário.
 * - indica $p < 0,05$, Wilcoxon Matched Pairs Test.

Na situação CC não foram verificados picos de atividades ao longo das 24h, no entanto continua-se verificando uma menor frequência de comportamentos pertencentes às categorias EXP, MOV, LOC, nos horários da noite subjetiva (principalmente às 24h e 3h), bem como uma maior frequência de PAR nestes horários.

A menor atividade comportamental, evidenciada pela alta frequência de PAR, nas diferentes categorias estudadas nos horários de escuro do ciclo claro-escuro (21h, 24 e 3h), na situação CE e durante a noite subjetiva (24h e 3h) da situação CC parece ser lógica, pois pombos são animais diurnos. Apesar de ser lógico considerar que em animais diurnos a fase de atividade tenha seu início coincidente com o início do período de luz, é importante lembrar que em nosso estudo, na situação CE, o acender das luzes ocorre abruptamente e neste horário ocorre um pico de comportamentos. Outro pico de atividade é também verificado às 18h, logo após o apagar das luzes. Essa variação abrupta da luminosidade poderia introduzir um efeito de mascaramento sobre os ritmos comportamentais característicos desses sujeitos. Experimentos que sejam realizados nestes horários podem ter resultados modificados por esta alteração comportamental. Assim, o efeito da mudança abrupta da luminosidade sobre os comportamentos de pombos deve ser considerado como um possível evento mascarador da ritmicidade.

A observação é parte importante no estudo do comportamento. Um animal, em um procedimento experimental já possui um repertório de comportamentos bem estabelecido e o conhecimento desse repertório pode ser essencial para

compreender os resultados de um experimento. Ou seja, antes de tentar modificar comportamentos, precisamos conhecer que comportamento será modificado. Os animais têm um ritmo de atividade espontâneo que pode determinar um aumento ou diminuição periódicos do comportamento estudado. Esse ritmo de atividade espontâneo pode interagir com ritmos de comportamentos em situações experimentais e levar a interpretações errôneas sobre os efeitos dessas condições. Por outro lado, as condições experimentais podem interagir com a ritmicidade do comportamento do animal e estabelecer controles diferenciais de respostas ou classes de respostas.

As descrições comportamentais podem ser realizadas utilizando-se vários tipos de registros diferentes. Assim, por exemplo, pode-se selecionar alguns comportamentos de interesse e registrar o tempo em que o animal passa realizando-os. Pode-se ainda, descrever a seqüência de eventos motores que caracterizam um tipo de comportamento, bem como, o tempo que o animal necessita para realizá-lo e a freqüência com que o mesmo aparece no período de tempo observado. Com este estudo, apesar de se ter realizado um registro contínuo, com marcação de comportamentos a cada segundo, não se analisou a duração dos diferentes comportamentos e nem se verificou a organização seqüencial de itens comportamentais. Inúmeras observações de comportamento animal, tanto em campo com em situações experimentais revelam freqüentemente a existência de seqüências de itens comportamentais (Nelson 1964; Delius, 1969; Sabbatini, 1977), sugerindo que existem ligações causais entre sucessivas atividades. A verificação desses padrões seqüenciais de itens comportamentais e

a sua alteração ao longo de diferentes horários do período de 24h poderiam fornecer informações interessantes quanto à organização temporal do comportamento.

A distribuição diferencial de freqüências de categorias comportamentais durante as fases do ciclo claro-escuro e a alteração dessas distribuições em situação de claro constante fornecem evidências a favor do papel do fotoperíodo como um *zeitgeber* para os ritmos comportamentais de pombos em cativeiro. O fato de que na situação CC o comportamento tem uma distribuição mais homogênea ao longo das 24h, exceto para os horários de 24h e 3h, também é indicativa de uma distribuição diferencial durante o dia e a noite subjetiva.

A variação de comportamentos ao longo das 24h na situação CE estaria sincronizada à alternância da fase de claro e de escuro no ciclo claro-escuro. Pode-se dizer que a variação comportamental sincronizada a esse ciclo estaria correlacionada com a sincronização de outros ritmos fisiológicos e bioquímicos. Essas correlações garantiriam e definiriam a ordem temporal interna dos animais (Cipolla-Neto, 1988).

Na situação CC, a ausência do sincronizador externo altera a distribuição comportamental e, provavelmente, também a variação cíclica de variáveis fisiológicas, tais como os níveis hormonais. Isso levaria a uma ruptura da ordem temporal interna do organismo e, como consequência, a um ajuste do sistema temporizador. Nessa condição de CC pelo menos dois hormônios sofreriam alterações mais drásticas: a MEL e a B. Contudo, a validade dessas proposições depende de análises que possam relacionar essa ritmicidade

comportamental à variação de medidas de concentrações plasmáticas desse hormônio. Tais questões são abordadas no Experimento II.

EXPERIMENTO II

Relações entre a variação diurna/noturna nas concentrações de Melatonina e Corticosterona plasmática e a atividade geral de pombos (*Columba livia*) em cativeiro

Este Experimento pretendeu analisar as relações entre variações na atividade geral de pombos *Columba livia* e as concentrações plasmáticas de MEL e B ao longo de 24h. Para a análise das condições de luminosidade sobre o comportamento de pombos em cativeiro e concentrações de secreção hormonal foram usadas duas situações: ciclo claro-escuro de 12h:12h (CE) e 24 horas de claro constante (CC).

Materiais e Métodos

Sujeitos

Foram usados 40 pombos machos, adultos (*Columba livia*), obtidos de um único fornecedor, pesando entre 350 e 450 gramas, mantidos em gaiolas-viveiros individuais de aço galvanizado (0,50m x 0,35m x 0,38m), alojados no biotério de aves do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP. As aves podiam manter contato visual e corporal através das grades das gaiolas. Água e alimento eram fornecidos à vontade e trocados em dias

alternados entre 13 e 14 horas. O alimento fornecido consistia de uma mistura de ração, quirera de milho, semente de girassol, casca de ovo, complementação vitamínica e areia. A temperatura do biotério era mantida ao redor de 24°C. Visando a adaptação dos pombos às condições de alojamento, as manipulações experimentais iniciaram-se após 20 dias no biotério. Durante este período, os pombos foram mantidos em um período claro-escuro 12h:12h, com a luz acendendo às 6h e apagando às 18h. Os animais foram atribuídos aleatoriamente a 2 grupos, definidos segundo a condição experimental a que estavam expostos: ciclo claro-escuro 12h:12h (situação CE), em que foram mantidas as condições acima descritas (n = 20); ou 24h de claro constante (situação CC), introduzida antes da observação comportamental, que durou um máximo de 32h (n = 20).

Equipamentos

O registro comportamental foi realizado na sala do biotério com os animais alojados em suas gaiolas-viveiro.

Para a filmagem dos comportamento foi utilizando um equipamento VHS, para registros audiovisuais (câmara filmadora Panasonic) A câmara filmadora foi posicionada na sala do biotério, 1m na frente das gaiolas-viveiro, 24hs antes do início das gravações. Um aparelho de TV (Panasonic), conectado ao equipamento de filmagem, ficava em uma ante-sala e permitia a monitoração da gravação das sessões de observação comportamental.

Para a coleta de sangue foram utilizados scalp n.º 21, seringa descartável de 10ml, algodão e álcool. Durante o período de escuro do ciclo claro-escuro a coleta foi realizada com o auxílio de uma lanterna com lâmpada GE-PR-25, coberta com um filtro vermelho.

Procedimentos

1. Observação direta e registro comportamental

Os comportamentos foram registrados em duas sessões, de 5 minutos com intervalo de 24h, nos seguintes horários: 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. No horário das 6h a filmagem foi iniciada 5min. após o acender das luzes. Nestes horários, apenas 6 animais escolhidos aleatoriamente, em cada situação experimental, foram filmados. As gaiolas, dos pombos filmados, foram posicionadas em duas fileiras sobrepostas (3 gaiolas cada) encostadas em uma das paredes da sala, com localização oposta à porta de entrada na sala.

Durante o período de escuro da situação CE o biotério ficou iluminado apenas por uma lâmpada Philips de 60 Watt, protegida por um canhão que continha um filtro vermelho Kodak 1A Safelight Filter CAT 1521517-7H. Esta luz foi introduzida no biotério com uma semana de antecedência³ (iluminação inferior a 1 lux na localização central, a 92cm de distância do teto, na altura da fileira superior das gaiolas). Na situação CC uma luz fluorescente (iluminação de 300 lux, medida

³ Testes preliminares indicaram que esta intensidade de luz não afeta os níveis de MEL e B plasmáticos.

tomada na mesma posição acima descrita) foi acesa 24h antes do início da gravação e assim permaneceu durante os 2 dias de observação.

A análise dos comportamentos foi realizada após a transcrição das fitas, por dois observadores independentes. Os comportamentos observados foram registrados a cada 1s e atribuídos a 6 categorias comportamentais distintas, componentes do catálogo de comportamentos de pombos em cativeiro (Experimento I). Foram elas: Movimentos discretos de partes do corpo de partes do corpo ou de todo o corpo (MOV); Exploração (EXP), que englobou comportamentos exploratórios e pré-exploratório devido a baixa frequência de ocorrência do segundo; Locomoção (LOC); Interação (INT); Manutenção (MAN) e parado (PAR).

A análise comportamental utilizou a somatória dos comportamentos MOV, EXP, MAN, LOC e INT apresentados na primeira e na segunda sessão considerando-se o total de 10 minutos de observação⁴. Essa somatória foi denominada atividade geral (AG) de cada pombo. Utilizou ainda, a somatória dos registros de ausência de atividade observável (PAR) na primeira e na segunda sessão da mesma forma.

Os comportamentos, apresentados pelos pombos eram observados diretamente e anotados, em folhas de registro pelo experimentador ao mesmo tempo em que ocorria a gravação das sessões em fitas de vídeo. As fitas eram posteriormente transcritas pelo experimentador, em folhas de registros. As dúvidas foram discutidas por dois observadores pela reanálise das fitas e das transcrições

⁴ A primeira sessão não diferiu da segunda, em nenhum horário, e portanto foram somadas (Wilcoxon $p > 0,05$)

realizadas. A análise da fidedignidade entre ambos os observadores foi dada pela somatória dos acordos dividido pela soma das omissões, acordos e desacordos, o valor obtido foi multiplicado por cem. $(A/A+O+D \times 100)$.

2. Análise das concentrações plasmáticas de MEL e B

A coleta de sangue foi realizada nos seguintes horários: 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h, sendo que no horário das 6h o procedimento foi iniciado 5 min após o acender da luz. Cada pombo, da situação CE e CC, passou pelo procedimento de coleta de sangue em dois horários diferentes, com intervalo de 12h. No primeiro dia foram coletados 5ml de sangue, uma única vez de cada animal, nos horários: 6h, 12h, 18h e 24h e, no dia seguinte, coletou-se 1ml de sangue, uma única vez, às 9h, 15h, 21h e 3h. Na situação CC, 24h antes do início da coleta de sangue, os pombos foram expostos a luz constante (300lux), assim permanecendo durante todo o período de coleta.

A adaptação aos procedimentos foi realizada durante os 5 dias que antecederam a coleta, seguindo-se sempre o mesmo protocolo experimental. Assim, os pombos eram retirados da gaiola viveiro, sempre pela mesma pessoa, colocados dentro de um saco de tecido (brim) preto e transferidos para o Laboratório, onde eram colocados em decúbito dorsal, a asa era retirada do saco através de uma abertura lateral e estendida para expor a veia branquial. Algumas penas da região eram então retiradas e realizava-se assepsia com álcool no local da punção. Este procedimento ocorreu nos mesmos horários experimentais.

Durante o período escuro do ciclo claro-escuro, os pombos permaneciam no escuro total no biotério e no laboratório. Para auxiliar a coleta uma lanterna era focalizada apenas sobre a asa que seria puncionada. Entre a retirada do pombo do biotério e a coleta de sangue o tempo máximo decorrido era de 60 segundos.

A coleta de sangue foi realizada um mês após os registros comportamentais. Na condição CC durante estes 30 dias, os animais foram mantidos no mesmo ciclo claro-escuro da situação CE.

Após a coleta, cada amostra foi colocada em tubo heparinizado, identificada e centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos, a uma temperatura de 4°C. O plasma foi separado e congelado a -70°C, para análise posterior.

3. Radioimunoensaio

Tanto a dosagem de MEL como a de B foram realizadas por radioimunoensaio (RIE). O RIE de MEL foi estabelecido e validado por Caldas (Caldas, M.C.S., dados não publicados) no Laboratório de Fisiologia da Reprodução da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP utilizando o método de adsorção da fração livre em carvão-dextrano descrito pela firma Stockgrand LTD (1984) que forneceu o anticorpo anti-Mel. O RIE de B foi padronizado e validado biologicamente por Jisménes (1989), modificado no mesmo laboratório descrito acima utilizando o método de adsorção em carvão-dextrano, método este baseado no original de Vecsei *et al.* (1972).

As concentrações plasmáticas de MEL foram dosadas para todos os horários. A dosagem de B plasmática foi feita usando-se apenas a coleta do primeiro dia.

Para o RIE de MEL foram empregados os seguintes reagentes e soluções: (a) anticorpo para melatonina (Stockgrand Ltd.), (b) melatonina marcada ([O-methyl-3H] Melatonin, TRK 798, Amershan Life Science), (c) melatonina (N-Acetyl-5-methoxytryptamine) utilizado como padrão (Sigma M 520), (d) Solução tampão (TRIE) preparada com 18 g de tricina (Sigma, T 9784), 9g de cloreto de sódio cristalizado (Merk, Art/ 6404) e 1 g de gelatina (Merk, 4070) diluídos em 1 litro de água bidestilada, (e) carvão-dextrano preparado com 625 mg de carvão ativado (Merk, Art. 2186) e 62,5 mg de dextran (Sigma, D-1390) diluídos em 100 ml de TRIE, (f) líquido de cintilação preparado com 5g de 2,5 diphenyl-oxazole (PPO, Sigma D 4630), 980 ml de tolueno (Merk, Art. 8325) e 20 ml de metanol absoluto (Merk, Art. 6009) e (g) Soro de cabra normal.

Para o RIE de B foram utilizados: (a) anticorpo para a corticosterona (obtido no laboratório do prof. Dr. Alaina Belanger, C. H. U. L., Quebec Canadá), (b) corticosterona marcada (3H - Corticosterone, TRK 406 (proveniente de New England), (c) corticosterona utilizada como padrão (Sigma c - 2502); (d) solução tampão fosfato gel (STF) preparado com 16,3g de cloreto de sódio cristalizado (Merk, Art/ 6404), 0,4g de azida sódica; 6,5ml de fosfato-monosódio, 43,5ml de fosfato de sódio e 2g de gelatina a 1% (Merk, 4070) diluídos em água destilada, (e) carvão-dextrano preparado da forma descrita acima e diluídos em 100ml de

SFG e (f) líquido de cintilação (mesma preparação que a utilizada para RIE de MEL).

Em cada ensaio foi determinada uma curva padrão com concentrações crescentes de MEL ou B ensaiadas em duplicata: 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 pg/ml

Tanto para o RIE de MEL, como para o de B foram determinados em dois tubos o ponto zero (Padrão 0, B₀ - ligação máxima da anti-MEL com a MEL 3H e da anti-B com a B 3H, na ausência do padrão ou desconhecido). A quantidade de ligação inespecífica foi avaliada pela substituição da anti-MEL (2 tubos) ou a anti-B (2 tubos) por solução tampão.

Volumes crescentes de plasma com concentrações desconhecidas foram testados no ensaio (50, 100, 250 e 500 µl), sendo estes completados com os tampões dos RIE para 500 µl.

A seqüência de realização do ensaio de MEL foi a seguinte: (a) adicionaram-se nos tubos: solução tampão, padrões ou desconhecidos, anticorpo e MEL 3H, (b) as amostras foram homogeneizadas (agitador vórtex) e incubadas por 24h à 4°C; (c) após este período adicionou-se às amostras, 50 µl de soro de cabra normal diluído a 1/500 e as mesmas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos; (d) 250 µl de carvão-dextrano foram adicionados, as amostras foram homogeneizadas novamente e centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos a 4^a C., (e) os sobrenadantes foram vertidos em tubos de cintilação (exceto tubos totais); (f) foram adicionados 5 ml de líquido de cintilação; (g) os tubos foram agitados e procedeu-se à leitura em um cintilador líquido da Beckman.

Foram usados um volume de 500 μ l de plasma. A dose mínima detectável foi de 5 pg/tubo, o coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi de 3,8% e 7,5% respectivamente.

Foi observado paralelismo da curva padrão (MEL-Sigma) com as baixas concentrações de MEL diurnas e altas concentrações noturnas. Este fato validou biologicamente o ensaio para análise do hormônio no plasma de pombos.

Durante a realização do ensaio de B, foi seguida uma seqüência bastante parecida com aquela utilizada para o ensaio de MEL, assim: (a) adicionaram-se nos tubos: solução tampão, padrões ou desconhecidos, anticorpo e B 3H, (b) as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 24h à 4°C, (c) após este período, as amostras foram adicionadas de 250 μ l de carvão-dextrano (2º anticorpo) e centrifugadas a 2.500 rpm por 20 minutos a 4°C, (d) os sobrenadantes foram vertidos em tubos de cintilação (exceto tubos totais), (e) foram adicionados 4 ml de líquido de cintilação e (f) os tubos foram agitados e procedeu-se a leitura em um cintilador líquido da Beckman.

Foi utilizado um volume de 500 μ l de plasma. A dose mínima detectável foi de $36,5 \pm 12,7$ pg/tubo, o coeficiente de variação intra e inter-ensaio foi de 3,9% e 6,0% respectivamente.

Em testes realizados quando se estava realizando a padronização da técnica do RIE verificou-se que as concentrações plasmáticas de MEL nas coletas realizadas logo após a luz do biotério se acender estavam em torno de 160pg/ml. Os valores caíam para 36pg/ml, se a coleta ocorria às 6h05min, mantendo-se

estáveis até as 6h30min. Por este motivo, a coleta de sangue se iniciou às 6h05min.

Análise estatística

Análises comparativas entre a frequência geral (total) de comportamentos (AG) e repouso (PAR) para as situações CC e CE foram realizadas utilizando-se ANOVA, de duas vias, com horário (H: 6h-15h; 18h 3h) como fator e situação (S: CE e CC) como medida repetida, seguida por comparações múltiplas com o teste de Newman-Keuls.

Usamos a prova não-paramétrica de Friedmam, um tipo de análise de variância por postos para um mesmo grupo de sujeitos expostos a diversas condições (horários), para determinar se a frequência de AG, de PAR, e ainda as concentrações de MEL plasmáticas, dependiam da hora do dia considerada, nas situações CE e CC. O teste de Friedmam foi seguido por processo de múltiplas comparações pareadas com o método de Student-Newman-Keuls. O efeito de horário nas concentrações de B plasmática, na situação CE e CC foi investigada utilizando-se Kruskal-Wallis análise de variância de um fator (horário) seguidas por comparações múltiplas com o teste de Newman-Keuls.

Para analisar as concentrações cumulativas medianas plasmáticas de MEL e B na situação CE X CC e a MEL na situação CE 6h-15h X CC 6h-15H foi utilizado o teste não paramétrico, para amostras independentes Mann-Whitney Rank Sum Test.

Resultados

A Figura 15 mostra que os valores médios de AG apresentados durante a fase clara do ciclo claro-escuro (CE 6h-15h) ou durante o dia subjetivo (CC 6h-15h) foram maiores em comparação ao período de escuro (CE 18h-3h) ou à noite subjetiva (CC 18H-3H). Comparações entre CE 6h-15h X CC 6h-15h e CE 18h-3h X CC 18h-3h, não mostraram diferenças significativas. A análise estatística validou essas observações indicando um efeito significativo para horário $\{H[F(1,10)=17,39;p<0,002]\}$, mas não para os resultados referentes ao efeito de situação $\{S[F(1,1)=0,33;p=0,6]\}$. A média de AG dos animais expostos à situação CC durante o dia subjetivo foi, no entanto, maior que aquela verificada em CE 6h-15h. Com relação aos valores médios de PAR relações inversas foram observadas, ou seja, as maiores freqüências ocorreram durante o período de escuro do ciclo claro-escuro ou durante a noite subjetiva de CC, com efeito de horário $\{H [F (1,10)=17,08;p<0,003]\}$, mas não de situação $\{S[F (1,1)=0,45;p=0,6]\}$.

Pela análise da Figura 16 é possível comparar a variação de AG e de concentrações plasmáticas de MEL e B ao longo do período de 24h na situação CE. Observamos que tanto o comportamento, quanto os hormônios MEL e B apresentaram flutuações durante as 24h. Ocorreram dois picos de AG às 6h (mediana=637,5comp/10min) e 18h (mediana=615,5comp/10min) e um outro intermediário às 12h (mediana=397,0comp/10min). O menor nível de AG ocorreu

Situação CE

Situação CC

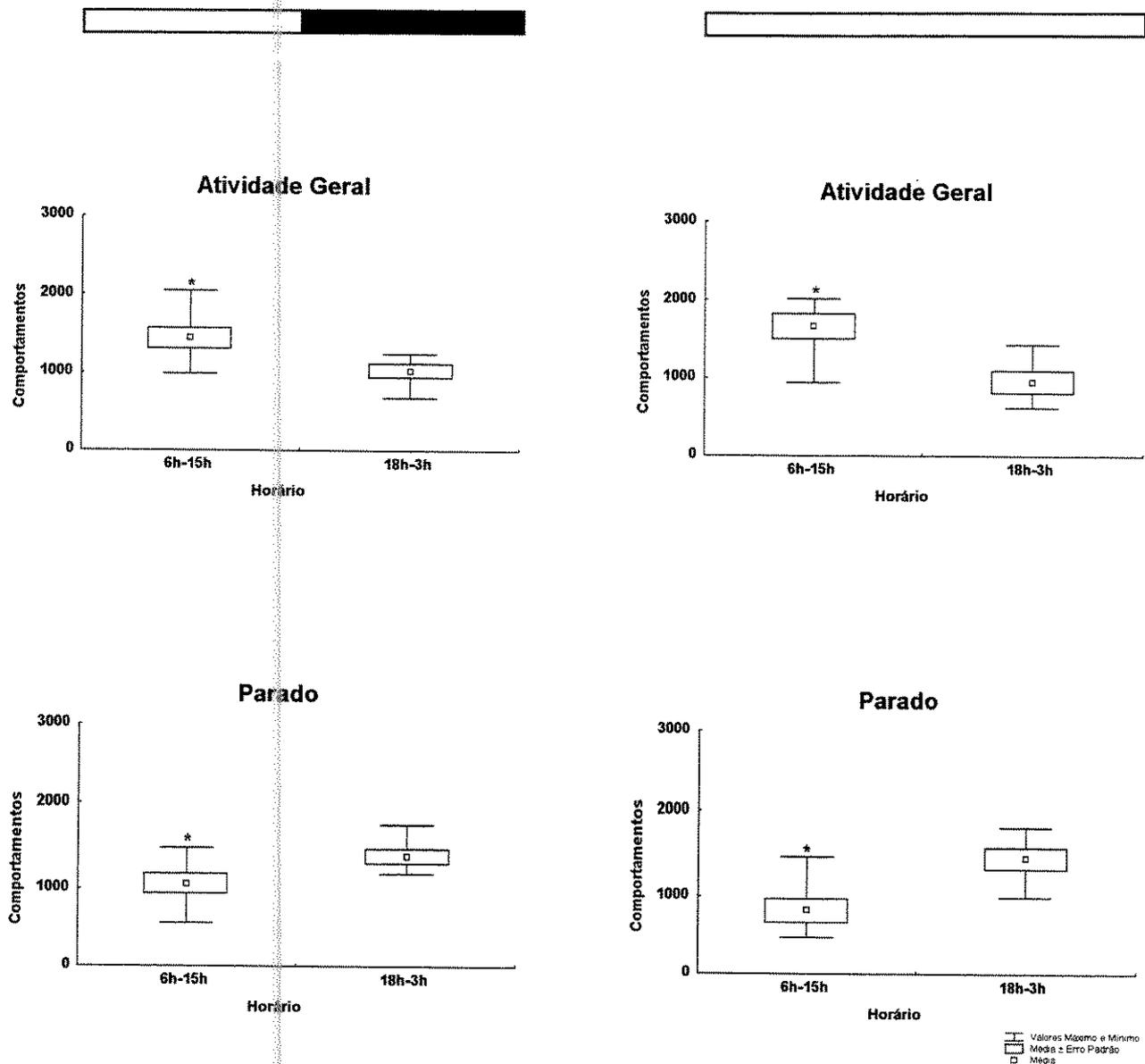


Figura 15 - Valor médio de: Atividade Geral (AG) de pombos expostos ao período de claro (6h-15h) e escuro (18h-3h) do ciclo claro-escuro 12h:12h, luz acesa às 6h (Situação CE); e a 24 h de claro constante (Situação CC) durante o dia subjetivo (6h-15h) e a noite subjetiva (18h-3h); Comportamentos da Categoria Parado (PAR) em pombos expostos ao período de claro-escuro da Situação CE; PAR em pombos expostos ao dia e noite subjetivos da Situação CC.

Anova - AG - Efeito de horário ($H[F(1,10)=17,39; p<0,002]$)*
 PAR - Efeito de horário ($H[F(1,10)=17,08; p<0,003]$)*
 Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o método Student-Newman-Kleus
 * $p<0,05$

às 3h (mediana=10,5comp/10min). Esses resultados foram confirmados estatisticamente pela prova de Friedman que evidenciou efeito significativo de horário ($\chi^2=35,891$;df=7;p<0,001). As múltiplas comparações realizadas *post-hoc*, método de Student-Newman-Keuls, determinaram diferenças significativas para os horários de 6h, 12h e de 18h em relação aos demais horários (p<0,05). Não houve diferença significativa entre 6h e 18h (p>0,05). As concentrações plasmáticas de MEL, mostraram um claro ritmo com concentrações mais elevadas durante o período de escuro. As diferenças entre os horários diurnos e noturnos foram confirmados pelos teste de Friedman ($\chi^2=27,431$;df=7;p<0,001). Os horários noturnos de 21h, 24h e 3h diferiram significativamente dos demais (p<0,05) conforme indicado pelas múltiplas comparações *post-hoc*. Embora a variação da concentração mediana plasmática de B não tenha sido tão clara quanto a de MEL, foram detectadas diferenças estatísticas entre os horários {H [F(3,16)=3,50;p< 0,04]}. A concentração de B às 12h (0,81ng/ml) foi significativamente menor (p<0,05) em comparação com 6h (1,52ng/ml) e 24h (1,26ng/ml).

O mesmo tipo de análise para a situação CC (Figura 17), indicou mudanças na distribuição dos valores medianos de AG e nas concentrações medianas de MEL e B plasmáticas, ao longo das 24 horas. A manutenção de ritmicidade foi indicada por um efeito estatisticamente significativo de horário ($\chi^2=22,222$;df=7;p<0,002) que deve se relacionar com os menores valores medianos de AG ocorridos às 24h (145 comp./min.) e 3h (71,5 comp./min.), que diferiram estatisticamente dos demais horários (p<0,05). Além disso, na fase

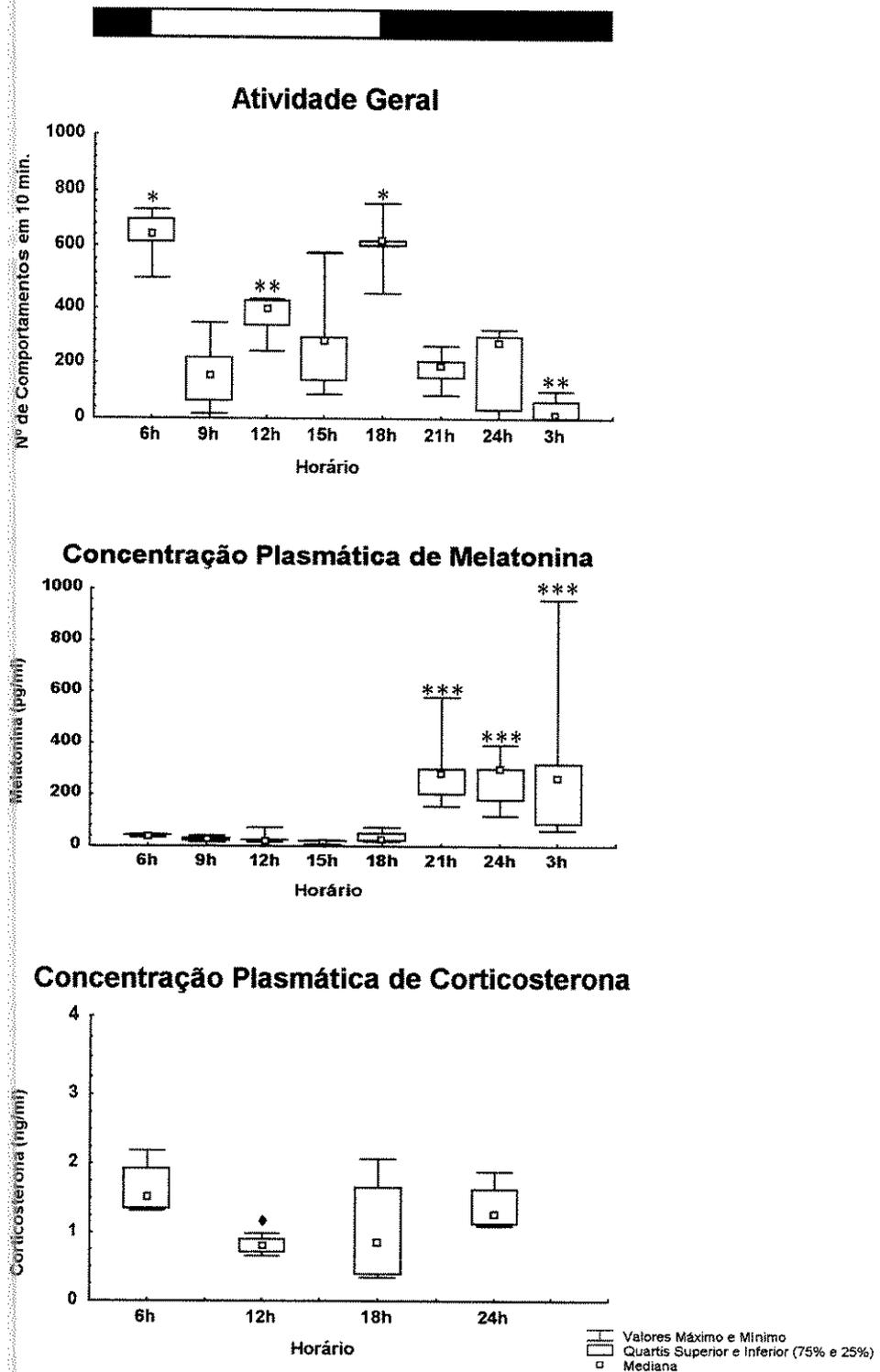


Figura 16 - Valor Mediano da Atividade Geral (AG), concentração mediana de Melatonina (MEL) Plasmática e Corticosterona (B) Plasmática, em pombos expostos ao ciclo claro-escuro 12h:12h, luz acesa às 6h (CE)

Friedman:

AG - Efeito de Horário ($\chi^2 = 35,891$; $df = 7$; $p < 0,001$).

MEL - Efeito de Horário ($\chi^2 = 27,431$; $df = 7$; $p < 0,001$).

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o método Student-Newman-Kleus indicaram:

* $p < 0,05$, em relação às 9h, 12h, 15h, 21h, 24h e 3h

** $p < 0,05$ em relação aos demais horários

*** $p < 0,05$ em relação às 6h, 9h, 12h, 15h e 18h

Kruskal-Wallis:

B - Efeito de Horário [$f(3,16) = 3,50$; $p < 0,04$]

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o método Newman-Kleus indicaram:

♦ $p < 0,05$ em relação às 6h e 24h

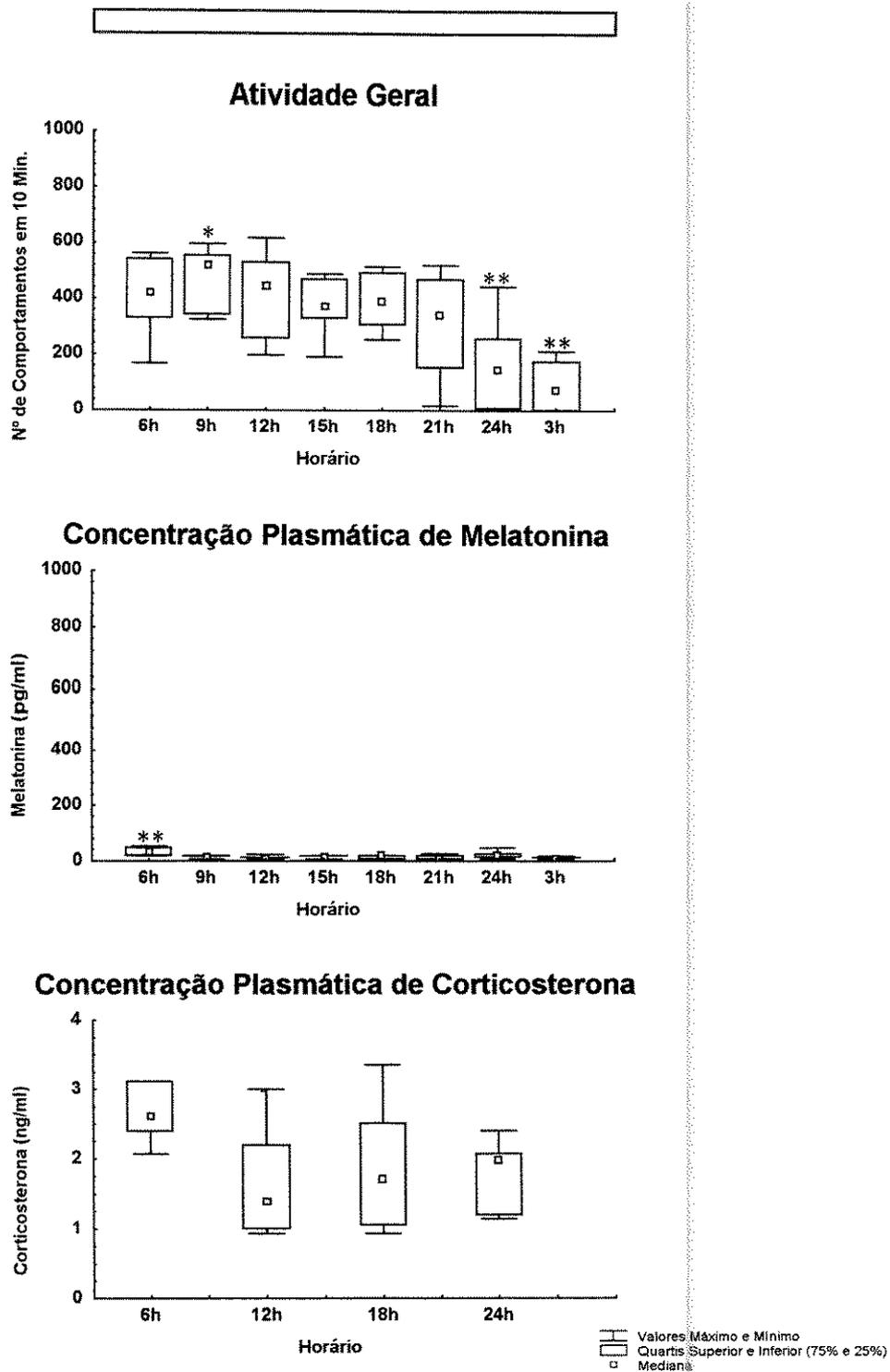


Figura 17 - Valor Mediano da Atividade Geral, concentração mediana de Melatonina Plasmática e Corticosterona Plasmática, em pombos expostos a 24h de claro constante (CC)

Friedman: AG - Efeito de Horário ($\chi^2 = 22,222$; $df = 7$; $p < 0,002$).

MEL - Efeito de Horário ($\chi^2 = 16,27$; $df = 7$; $p < 0,03$).

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o método Student-Newman-Kleus indicaram:

* $p < 0,05$, em relação às 21h, 24h e 3h

** $p < 0,05$ em relação aos demais horários

Kruskal-Wallis: B - Não foi verificado efeito de Horário [$f(3,16) = 1,69$; $p = 0,3$]

correspondente ao dia subjetivo foi verificado que a AG no horário das 9h (mediana = 520 comp./min.) diferiu significativamente dos horários da noite subjetiva ($p < 0,05$). Embora o ritmo de secreção de MEL verificado durante a situação CE tenha sido abolido na situação CC, continuamos encontrando um efeito de horário ($\chi^2 = 16,271; df = 7; p < 0,03$) que deveu-se provavelmente a maior concentração mediana de MEL verificada às 6h (28,60pg/ml), que diferiu significativamente de todos os demais horários ($p < 0,05$). Não foi encontrado efeito de horário durante a situação CC quando se considerou as concentrações plasmáticas medianas de B { $H[F(3,16) = 1,69; p = 0,3]$ }. No entanto, como verificado para a situação CE, as maiores concentrações plasmáticas de B ocorreram às 6h (2,61ng/ml) e 24h (1,98ng/ml; $p < 0,05$).

A Figura 18 sumariza os dados de AG e das concentrações plasmáticas de MEL e B, para as situações CE e CC. Embora a frequência média total de AG para o período entre 6h-24h não tenha mostrado diferenças significativas entre as duas situações ($p > 0,05$) as diferenças entre as concentrações de MEL ($T = 2185,50; p < 0,001$) e B ($T = 295,500; p = 0,002$) nas duas situações foram claras. Além disso, é interessante notar que as concentrações plasmáticas cumulativas medianas de MEL durante o dia subjetivo de CC foram significativamente menores em comparação com a fase clara de CE ($T = 497,50; p = 0,019$).

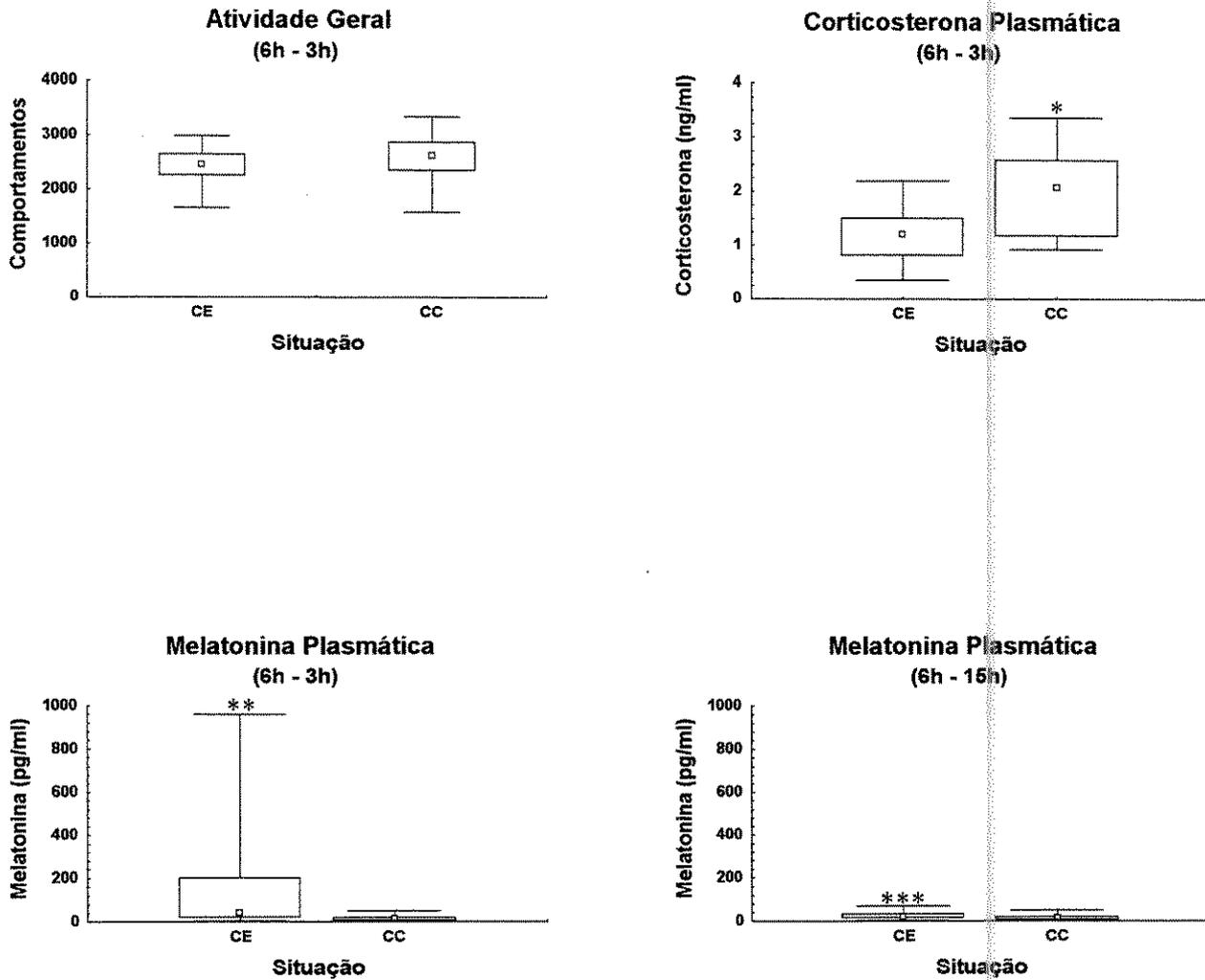


Figura 18 - Valor Cumulativo Médio de Atividade Geral em pombos expostos ao ciclo claro-escuro 12h:12h, luz acesa às 6h (CE) e às 24h de claro constante (CC). Os comportamentos foram registrados às 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. Concentração cumulativa mediana de Melatonina Plasmática (MEL) em pombos expostos a CE e CC. As amostras foram coletadas às 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. Concentração cumulativa mediana de MEL em pombos expostos à fase clara da situação CE (6h-15h) e ao dia subjetivo da situação CC (6h-15h). Concentração cumulativa mediana de Corticosterona Plasmática em pombos expostos a CE e CC. As amostras foram coletadas às 6h, 12h, 18h e 24h. No painel superior esquerdo, as barras verticais indicam os valores máximo e mínimo, a caixa representa a média \pm erro padrão e \square a média. Nos demais painéis, as barras verticais indicam valores máximo e mínimo, a caixa representa os valores contidos entre o quartil inferior (25%) e o quartil superior (75%) e o \square a mediana.

Mann-Whitney Rank Sum Test

- * $p < 0,05$, em relação a CE
- ** $p < 0,0001$, em relação a CC
- *** $p < 0,05$ em relação a CC 6h-15h

Discussão

Os resultados do presente estudo confirmam observações prévias que indicam uma relação inversa entre a ocorrência de comportamentos e as concentrações plasmáticas de MEL, em pombos expostos a situação CE (Ebihara *et al.*, 1984; Oshima *et al.*, 1989). Em seu conjunto esses resultados reforçam a importância do ciclo claro-escuro como agente sincronizador. Por outro lado, replicam dados da literatura indicando uma distribuição mais homogênea de AG ao longo das 24h na situação CC. Ainda, nossos dados indicam que luz constante de 300 lux por apenas 24h é eficiente para causar interrupção da secreção rítmica de MEL, e reduzir a secreção de MEL a concentrações inferiores às basais durante o dia subjetivo da condição CC. A condição CC resulta em concentrações plasmáticas de B elevadas sem, contudo, mudar o perfil de secreção. Levanta, ainda questões a respeito das relações existentes entre AG, MEL e B.

Os níveis comportamentais mais elevados na fase clara da situação CE (6h-15h) quando comparada à fase escura (18h-3h) caracterizam claramente a sincronização ao ciclo claro-escuro. Por outro lado, verificamos também uma distribuição mais homogênea de AG nos vários horários, na situação CC, sugerindo uma alteração do ritmo característico da condição CE. Estas aves, contudo, continuaram apresentando uma maior quantidade de atividades durante o dia subjetivo, se comparadas com a noite subjetiva. Essa variação pode ser considerada como indicativa da manutenção de ritmo comportamental.

A análise comportamental ao longo das 24h na situação CE mostrou um pico de AG, às 6h e 18h, como já havia sido demonstrado no experimento I quando as categorias comportamentais foram analisadas em separado. Devemos, no entanto, lembrar que estes horários coincidem com o acender e o apagar das luzes do biotério. Assim, a influência que a mudança abrupta de luminosidade causa nos comportamentos de pombos deve ser levada em consideração como um possível evento mascarador da ritmicidade. Essa suposição parece ser confirmada pelo fato de que os pombos expostos à situação CC não demonstraram este pico de atividade nesses horários. Dessa forma pode-se considerar que na situação CC esses dados não teriam efeitos de mascaramento. Possivelmente, o uso de um potenciômetro que permitisse que a luz do biotério fosse aumentando de intensidade gradativamente ao amanhecer, e reduzindo da mesma maneira ao anoitecer, mimetizando o que ocorre no meio ambiente poderia controlar esse efeito mascarador do ambiente sobre o ritmo comportamental.

Embora considerando a possibilidade de mascaramento do ritmo de AG na condição CE é importante lembrar que um segundo pico de atividade comportamental foi verificado às 12h. Além disso, a baixa frequência de emissão de comportamentos às 21h, 24h e 3h na situação CE apontam claramente a ritmicidade comportamental nesta condição estudada. Ao mesmo tempo, nesta situação, às 3h a categoria PAR apresentou a maior frequência, diferindo de todos os demais horários analisados ao longo das 24h do dia. Os dados obtidos são similares àqueles encontrados em estudos que analisaram registros automáticos

de comportamentos de aves. Nestes trabalhos, os comportamentos são registrados de maneira ininterrupta ao longo das 24 horas do dia, por muitos dias consecutivos, garantindo a verificação de um claro ritmo de atividade diurna (Chabot & Menaker, 1992; Ebihara et al., 1984; Hans, et al., 1988).

No presente trabalho foram registrados apenas 10 minutos de atividade em cada um dos horários analisados e ainda assim evidenciamos uma preponderância de atividades na fase clara do ciclo CE. No entanto, de maneira bastante interessante evidenciamos horários de maior ou menor atividades durante o período de claro e durante o período de escuro do mesmo ciclo. Estes dados sugerem a existência de uma possível ritmicidade ultradiana. Ritmos ultradianos são aqueles com período menor que 20h. Segundo Halberg (1980), é possível demonstrar a coexistência de ritmos circadianos e ultradianos em diversos sistemas biológicos. A coexistência destes ritmos em comportamento de ingestão de líquidos em ratos albinos, expostos a um ciclo claro escuro 12h:12h e em condições de escuro, já foram descritos (Araújo 1995; Araújo *et al.*, 1996). A origem dos ritmos ultradianos e o seu significado biológico não são claros. Segundo Turek (1994) as oscilações ultradianas são adaptativas, pois permitem sincronização de eventos intermitentes promovendo uma utilização mais econômica de energia. As inter-relações entre ritmos ultradianos e os circadianos poderiam resultar em modulação dos ritmos ultradianos por sinais circadianos e também, na subordinação dos processos biológicos a estes dois ritmos. Araújo *et al.* (1996) propõem que a ritmicidade ultradiana serviria para coordenar a ocorrência de processos metabólicos e comportamentais de uma série de eventos

simultâneos com eficiência máxima. Em aves, a ritmicidade ultradiana em eventos comportamentais não tem sido descrita. Para verificarmos a existência de ritmicidade ultradiana, sugerida em nosso experimento, seria necessária a realização de experimentos com um maior número de sujeitos observados por uma quantidade superior de dias e com monitoração comportamental contínua. Além disso, seria interessante também dentro deste contexto analisar as categorias comportamentais em separado.

Conforme já demonstrado na literatura, um claro e robusto ritmo diário de secreção de MEL foi verificado em CE, com baixas concentrações de MEL plasmática durante a fase clara do ciclo e altas concentrações durante a fase escura. Assim, os horários diurnos do ciclo CE são caracterizados pelos maiores níveis de AG e pelas menores concentrações de MEL. Nos horários noturnos, a maior concentração de MEL plasmática foi observada às 3h, horário também caracterizado pela menor atividade geral e a maior frequência de PAR.

Pode-se considerar que os resultados do presente estudo estão diretamente relacionados com questões sobre a inter-relação entre sistemas biológicos oscilatórios e o sistema temporizador de atividade circadiana. A atividade comportamental rítmica no período de 24h característica de diferentes organismos, é indicada pelos dados de AG nas condições CE e CC. O ritmo comportamental descrito em CE tem uma relação inversa com a oscilação rítmica identificada nas concentrações de MEL. Essa relação inversa entre nível de atividade e concentrações de MEL bem descrita na literatura (Chabot & Menaker 1992; Foa & Menaker, 1988; Oshima *et al.* 1989; Oshima e. al., 1987) tem sido

relacionada a diferentes possíveis funções da MEL. Oshima *et al.* (1989) verificaram que a administração contínua de MEL em pombos PX e EX não era eficiente para causar restauração de ritmicidade de atividade locomotora e temperatura corporal, enquanto que administração rítmica deste hormônio era eficiente para restaurar a ritmicidade perdida. Esses autores sugeriram que esse hormônio, liberado de maneira cíclica teria um efeito modulatório nos ritmos de inúmeros comportamentos. A MEL poderia ainda atuar em sistema(s) alvo(s) que funcionaria(m) como oscilador(es) (Chabot & Menaker, 1992). Embora esse(s) oscilador(es) não esteja(m) identificado(s) Ebihara *et al.*, (1984), também propuseram a presença do(s) mesmo(s), uma vez que demonstraram que o ciclo claro-escuro é capaz de sincronizar pombos PX e EX. O NSQ em muitas espécies de aves podem depender da entrada rítmica de MEL ou da luz para manter comportamentos rítmicos (Cassone & Menaker, 1984). Assim, apesar de não serem conhecidas todas as funções da MEL, produzida de maneira cíclica pela pineal e pela retina, pode se afirmar que esse hormônio realiza a interface entre o ciclo claro-escuro ambiental e os sistemas nervoso central e endócrino, sendo o principal mediador da resposta fisiológica nos ritmos circanuais e um poderoso modulador dos ritmos circadianos (Rivkees *et al.*, 1989, Golombek, *et al.*, 1997).

Na situação CC de nosso experimento, o ritmo de secreção de MEL plasmático, foi completamente abolido. O efeito da luz em inibir a produção de MEL pela pineal em pombos e reduzir a níveis basais as concentrações plasmáticas desse hormônio é documentado na literatura (Yamada *et al.*, 1988). No entanto, a intensidade luminosa utilizada é superior (2000 lux) àquela

empregada em nosso experimento (300 lux). Observamos, ainda, que a luz constante foi capaz de reduzir também as concentrações basais desse hormônio durante o dia subjetivo, dado esse, que reforça a eficiência desse estímulo para inibir a produção de MEL. Na condição CE altas frequências de AG ocorreram em horários de baixas concentrações de MEL plasmáticas. Porém na situação CC, quando as concentrações de MEL permaneceram baixas o tempo todo, observou-se redução de comportamento às 24h e 3h.

Quando tomados em conjunto os dados de AG de nosso experimento na situação CE e CC, verificamos que os pombos expostos à situação CE apresentaram uma frequência média de AG inferior àquela verificada na situação CC, embora não significativo do ponto de vista estatístico. Deve ser lembrado que a elevada emissão de comportamento ocorrida às 6h e 18h, horário do acender e apagar das luzes, estão englobadas nessa medida. Esse fato poderia estar relacionado à pequena variação da frequência comportamental verificada quando se compara CE e CC. Convém ressaltar ainda, que o pico intermediário de atividades verificado em CE não ocorreu durante a situação CC. Talvez a exposição à luz contínua, mesmo por pouco tempo, interfira em ritmos ultradianos que, como discutido acima, precisam ser investigados.

Dados preliminares, obtidos durante a validação da técnica de radioimunoensaio, demonstraram que exposição a apenas 5 minutos de luz (300 lux) são suficientes para reduzir as concentrações plasmáticas de MEL a valores 75% inferiores. Esse fato também é demonstrado em roedores, onde pulsos de 5 minutos de luz são suficientes para suprimir o mecanismo de produção de MEL

pela pineal e também reduzir a concentrações basais a MEL plasmática (Yellon & Hilliker, 1994). Em pombos, segundo Foa & Menaker (1988), 70% da MEL circulante origina-se na pineal, 17% da retina e 13% de regiões não conhecidas. No entanto, o ritmo de secreção da MEL é determinado pela produção da pineal e da retina. Oshima *et al.* (1989), contudo demonstraram que a pineal e a retina contribuem em iguais proporções com o pico de secreção noturno deste hormônio.

Assim, embora os nossos resultados repliquem a literatura quando aves se encontram na situação CE, o mesmo não ocorre de maneira clara na situação CC, ou seja, a redução de MEL plasmática por 24h não é suficiente para provocar arritmia e aumentar de maneira significativa a emissão comportamental. Um ponto interessante dos dados é o baixo nível de AG no dois últimos horários da noite subjetiva na situação CC, apesar das baixas concentrações de MEL indicados pelas análises estatísticas. Esse dado possibilita tecer considerações acerca de algumas possíveis indicações. A primeira delas seria no sentido de postular que a MEL, embora promova redução na frequência de alguns comportamentos tais como atividade locomotora e alimentar, conforme discutido acima, não influencia diretamente o nível de AG e portanto o mesmo poderia estar diminuindo mesmo com as concentrações de MEL baixas. Devemos ressaltar contudo que na medida em que a secreção de MEL foi inibida por um período superior a 24h e inferior a 72h observamos manutenção de maiores níveis de AG durante um determinado tempo na fase escura do ciclo (no caso 3 a 4h), sugerindo que a MEL sinalizaria ou controlaria a redução de AG. Podemos inferir desta observação, que na medida em que esse mecanismo sinalizador está ausente o(s) oscilador(es)

interno(s) se modificaria(m) lentamente provocando, nos primeiros dias, apenas um atraso na expressão dos ritmos. Ou seja, a iluminação constante por esse período pequeno de tempo alteraria a organização circadiana de pombos, mas não seria suficiente para causar arritmia comportamental e aumento de AG em todos os horários.

Corroborando com essa segunda suposição está o fato de que tanto os trabalhos que se utilizaram de PX e EX conjuntas para reduzir as concentrações de MEL plasmáticas (Ebihara *et al.* 1987; Foa & Menaker, 1988) quanto aqueles que empregaram o claro constante (Yamada *et al.*, 1988) iniciaram as análises decorridos 20 dias da cirurgia ou da exposição ao claro constante. No primeiro caso, o longo tempo foi devido à necessidade de recuperação do processo cirúrgico. No segundo caso, ao fato de que quando em situação de claro constante, os ritmos estudados são perdidos após um tempo mínimo de 10 dias. Chabot & Menaker (1992), demonstraram que embora a infusão cíclica de MEL, em doses fisiológicas, arraste o ritmo do comportamento alimentar de pombos PX e EX colocados em escuro constante, após o término da infusão, pombos ainda mantêm a ritmicidade por alguns dias. Tal fato reforçou a tese dos pesquisadores, acima citada: da existência de outro(s) oscilador(es), que embora dependente(s) da ação da MEL poderia(m) responder pela manutenção da ritmicidade por mais algum tempo.

Poderíamos, ainda supor que o ciclo atividade repouso e os conseqüentes níveis AG dependem de uma modulação mais complexa envolvendo outras

relações entre um maior número de osciladores internos. Essa última questão pode ser abordada mediante dados que relacionam AG, MEL e B.

Semelhante ao verificado na literatura, em pombos (Joseph & Meier, 1973) e em outras aves (Chan & Phillips, 1973; Kovacs *et al.*, 1983; Meier *et al.*, 1978) um ritmo de secreção de B foi verificado na situação CE, com maior concentração deste hormônio às 6h e 24h e menores concentrações às 12h e 18h. Embora os nossos estudos e os demais, acima citados, apontem para um aumento de concentração de B plasmática durante a fase escura do ciclo claro-escuro, esta ritmicidade não é bem definida, pois pode ser influenciada por inúmeros fatores, tais como: variação sazonal (Rintamäki *et al.*, 1986), hibernação e migração (Boissin & Assenmacher, 1968) e estresse (Buttemer *et al.*, 1991; Wingfield *et al.*, 1982). Ritmos circadiano de secreção de glicocorticóides, que atingem valores máximos ao amanhecer, verificados em mamíferos (Van & Cauter & Aschoff, 1989; Rijnberk & Mol, 1989) são também influenciados por inúmeros estímulos, tais como: privação de sono, privação alimentar, imobilização, alterações drásticas de temperatura, dentre outros (Persengiev & Kanchev, 1991; Khan *et al.*, 1990).

Durante a situação CC, encontramos uma curva de B semelhante àquela verificada na situação CE, embora não tenhamos encontrado efeito de horário significativo na análise estatística, fato este que aponta para a interrupção do ritmo de secreção desse hormônio. Verificamos ainda, que as concentrações cumulativas de B plasmáticas foram significativamente maiores que aquelas verificadas na situação CE.

Joseph & Meier (1973) dosaram B plasmática em pombos expostos a: ciclo claro-escuro de 12h:12h (G12); ciclo claro-escuro de 16h:8h (G16) e 15 dias de claro constante (GC). A coleta do sangue foi realizada a cada 4h, para os três grupos. Os resultados indicaram picos de B 4h antes do acender das luzes para os grupos G12 e G16, sendo que a partir desse horário havia uma redução progressiva até o final do fotoperíodo. Após a exposição à luz constante, no entanto, o ritmo foi perdido. Na situação CE do nosso experimento, os maiores valores de B foram verificados às 24h e 6h, ou seja, durante o escuro e logo após o acender das luzes, resultados estes que se assemelham aos obtidos por Joseph & Meier. A ausência de diferença estatística significativa deveu-se provavelmente ao fato do pequeno número de amostras de sangue coletadas por horário, já que no experimento acima relatado foram coletadas 36 amostras em cada horário. Por outro lado, esses autores demonstraram uma clara interrupção do ritmo de secreção de B em condições de claro constante. Convém ressaltar que os animais permaneceram nessa situação por 15 dias.

Embora em nosso estudo o período de exposição à luz contínua tenha sido de apenas 24h, observou-se aumento significativo de concentração de B plasmáticas que poderia ser indicativo de estresse sofrido pela exposição aguda à situação experimental. Em pombos, as concentrações de B plasmáticas aumentam rapidamente frente a uma variedade de estímulos considerados estressantes, incluindo aumento ou diminuição de temperatura (Pilo *et al.*, 1985), exposição a diferentes regimes de luz e retirada freqüente de sangue (Westerhof *et al.*, 1994). Segundo Griffin (1989), mudanças ambientais podem provocar

alterações crônicas ou agudas na fisiologia do animal , as quais caracterizam, um maior ou menor grau de estresse. O estresse seria definido como um ajuste normal ou extremo da fisiologia de uma animal para enfrentar situações adversas do meio (Fraser *et al.*, 1975 em Griffin, 1989). Inicialmente, em respostas a estímulos estressantes apareceriam respostas controladas pelo sistema nervoso simpático adrenomedular, tais como aumento no metabolismo e na atividade cardiovascular. Se a situação estressante continua é desencadeado um segundo mecanismo, via sistema hipotálamo-hipofisário-adrenocortical, que acaba por aumentar a produção de secreção de glicocorticóides. O ciclo é completado por uma resposta de aprendizagem-adaptação condicionada pela produção de uma variedade de fatores neuroendócrinos (Griffin, 1989).

Conforme citado na introdução deste trabalho existem dados que sugerem que a MEL em pombos poderia atuar modulando a atividade da adrenal. (Mahata & De, 1991; Mahata *et al.*, 1988). No entanto, ao contrário do verificado com ratos, por exemplo, esta relação tem sido pouco investigada. Nestes roedores, inúmeros experimentos têm sugerido uma inter-relação modulatória entre a pineal e adrenal, sugerindo que uma das funções da pineal seja a de modular as reações fisiológicas de defesa e adaptação à síndrome do estresse. Assim, Persengiev & Kanchev (1991), demonstraram que ratos privados de sono por 48h têm os padrões circadianos de MEL completamente abolidos e um aumento da concentração plasmática deste hormônio ao longo das 24h do dia, bem como elevação de B. Demonstraram, ainda que nesta situação nem o claro constante foi eficiente para reduzir as concentrações de MEL plasmáticas, que flutuaram de

alguns poucos ng/ml a valores de até 600 ng/ml ao longo das 24h. Nesta segunda situação experimental a concentração de B plasmática também se elevou, sugerindo que a exposição à luz constante estaria agindo como um fator adicional de estresse. Khan *et al.* (1990) trabalharam com ratos normais e PX que após serem privados de alimento durante 24h sofriam: restrição física, redução de temperatura e 2h de luz contínua (RTL). Os resultados indicaram que os ratos normais, expostos a RTL 3h depois do apagar das luzes, bem como, ratos PX que recebiam injeção de MEL antes de serem submetidos ao RTL apresentavam um menor número de ulcerações gástricas e que as mesmas eram também menores, se comparados a ratos normais submetidos RTL 3h após o acender das luzes ou rato PX que recebiam apenas veículo. Já foi demonstrado, ainda, que a indução de estresse agudo em ratos (imobilização, o nadar forçado ou choque hipoglicêmico) alteram a produção de MEL pela pineal (Champney *et al.*, 1985 a e b).

Se a MEL atua como hormônio antiestresse, na situação CC em nosso experimento a redução das concentrações de MEL plasmáticas, inclusive durante o dia subjetivo, poderia estar contribuindo para elevar a produção de B.

No entanto, devemos nos lembrar de que na condição CE, durante a fase escura do ciclo claro-escuro encontramos baixa frequência de AG, alta concentração de MEL e de B plasmática. Esses dados permitem supor que as concentrações de B também poderiam modular o nível de AG. Por outro lado, na situação CC, durante a noite subjetiva, nos horários das 24h e 3h, encontramos baixa frequência de AG e baixas concentrações de MEL, porém elevada

concentração de B plasmática. Esses dados nos levaram a formular a seguinte questão: Qual o significado funcional desse aumento de B na condição CC? Levaram-nos ainda a fundamentar questões referentes à inter-relação modulatória entre os sistemas de MEL, B e comportamento.

Além da caracterização fundamental de B como um hormônio de condição de estresse, existem trabalhos que demonstram que a B pode reduzir ou estabilizar o metabolismo em aves. Buttemer *et al.* (1991) mediram o consumo de oxigênio de pardais, utilizando-se de um aparelho adaptado ao poleiro que registrava a circulação de ar. O consumo de oxigênio foi tomado como indicativos de maior ou menor taxa metabólica. Esses autores mediram ainda as concentrações de B plasmática dessas aves. As mesmas medidas foram tomadas com aves implantadas com capsula subcutâneo de B. Os resultados indicaram que embora o consumo mínimo de oxigênio fosse o mesmo para o grupo controle ou experimental, a taxa metabólica estava mais estável e bastante reduzida, nas aves implantadas. Além disso as aves tratadas com B ficavam mais tranqüilas, ou seja, retornavam à quietude mais rapidamente do que as não tratadas se acordadas durante a noite e reagiam menos à presença de humanos. Em um outro estudo com galinhas, monitoradas durante 24h injetou-se ACTH, dexametazona (agonista do cortisol), ou ainda, apenas veículo. Os resultados indicaram que durante o dia a taxa metabólica (medida pelo consumo de oxigênio) não se alterava nos três grupos, durante a noite, no entanto, animais que receberam ACTH ou dexametazona tinham uma redução da taxa metabólica e um consumo de oxigênio mais estável que os controles (Mitchall *et al.*, 1986). Segundo

Buttemer et al., esse decréscimo de metabolismo noturno poderia ser atribuído ao aumento da quietude noturna que a B provoca em pássaros e não a um efeito direto de B no metabolismo dessas aves.

Independentemente de se as concentrações de B plasmática reduz a atividade metabólica durante a noite por efeito direto no metabolismo das mesmas, ou se leva ao aumento de quietude que reduz o metabolismo, sugere-se que a elevação moderada de B plasmática poderia ser uma resposta adaptativa de aves ao estresse. Pássaros são ativos durante o dia e a economia de energia à noite é essencial para as atividades diurnas.

Conforme discutido acima, existem evidências que indicam que a interrupção do ritmo de secreção de MEL plasmática provocaria aumento de inúmeras atividades comportamentais em aves. Em nosso estudo, pombos expostos à situação CC mostraram um pequeno aumento de AG se comparados a pombos da situação CE. Contudo, esse aumento não foi estatisticamente significativo. Devemos ressaltar, porém, que as concentrações de B também estão elevadas na situação CC. Assim, se a B e MEL são hormônios relacionados com aumento de quietude, redução de metabolismo e de emissão de comportamentos podemos supor que a ausência de diferença na quantidade de AG verificada quando a situação CE foi comparada à situação CC possa ser devido ao efeito contrário destas duas alterações hormonais. Ou seja, o aumento da taxa de respostas comportamentais esperadas, após a redução de MEL, não ocorreu pois o aumento de B, anulou esse efeito.

Uma possível interação entre a MEL, B e alterações comportamentais em aves já foi proposta por Valentinuzzi & Ferrari (1997), na análise da habituação a sons em pombos. Conforme discutido na introdução deste trabalho, os resultados obtidos por estas pesquisadoras demonstraram que pombos expostos à situação CE habituavam apenas pela manhã, enquanto que a diferença noite-dia desaparecia em pássaros expostos a 48h de claro constante.

Deve ser ressaltado que os estudos que investigam o efeito do claro constante sob a ritmicidade comportamental e/ou hormonal de um modo geral usam iluminação intensa (1000 a 2000 lux). Neste sentido é interessante notar que no presente estudo a condição CC teve iluminação de 300 lux por 24h. Além disso, experimentos com apenas 24h de claro constante ou ainda com tempo menor que 15 dias não são relatados na literatura para pombos ou outras aves. Assim demonstramos não ser necessário expor pombos a altas intensidades luminosas, por longos períodos de tempo, quando se deseja interromper o ritmo de secreção de MEL e aumentar as concentrações cumulativas de B. Os dados do presente estudo corroboram trabalhos da literatura que discutem a ritmicidade circadiana de comportamento e das relações entre esse ritmo e MEL em diferentes espécies. Em conjunto, sugerem que a redução de MEL verificada em CC, que deveria causar um aumento na frequência de respostas pode estar sendo compensada pelo aumento de B, nesta mesma situação, que está vinculado ao aumento de quietude de aves. Esses dados estendem as observações referentes a pombos permitindo a análise de relações entre comportamento, MEL e B. Essas relações são estimulantes na medida em que fundamentam questões referentes a

inter-relações modulatórias complexas entre essas variáveis na determinação da ritmicidade biológica

EXPERIMENTO III

HABITUAÇÃO AO LONGO DE 24 HORAS EM POMBOS *COLUMBA LIVIA*, SUBMETIDOS A CLARO-ESCURO E CLARO CONSTANTE.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a habituação da exploração a estímulos sonoros em pombos, ao longo das 24 horas do dia, em duas situações de luminosidade: um ciclo claro-escuro de 12h:12h e a 24h de claro constante.

Materiais e Métodos

Sujeitos:

Foram utilizados 128 pombos machos, adultos (*Columba livia*), obtidos de um único fornecedor, pesando entre 350 e 450 gramas, mantidos em gaiolas-viveiros individuais de aço galvanizado (0,50m x 0,35m x 0,38m), alojados no biotério de aves do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Água e alimento eram fornecidos à vontade e trocados em dias alternados entre 13 e 14 horas. O alimento fornecido consistia de uma mistura de ração, quirera de milho, semente de girassol, casca de ovo, complementação vitamínica e areia. A temperatura do biotério era mantida ao redor de 24°C.

Assim que chegavam ao biotério, as aves eram lavadas, recebiam vermífugo e aplicações de inseticida. Visando a adaptação dos pombos às

condições de alojamento, as manipulações experimentais iniciaram-se após 20 dias no biotério.

Os animais foram divididos, de maneira aleatória, em dois 2 grupos, definidos segundo a situação experimental a que estavam expostos: ciclo claro-escuro 12h:12h (situação CE) ou 24h de claro constante (situação CC). Tanto os sujeitos expostos à situação CE (n=64) quanto aqueles da situação CC (n=64) foram atribuídos aleatoriamente a 8 grupos (n=8), em função do horário do teste de habituação, foram eles os grupos das: 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 e 3 horas. Na situação CE, os pombos foram mantidos sob o ciclo claro-escuro 12h:12h. A luz era sempre acesa às 6h e se apagava às 18h, durante todo o período de quarentena (20 dias), de adaptação às condições experimentais (10 dias) e nas sessões experimentais (2 dias). Na situação CC durante toda a quarentena e também no período de adaptação às condições experimentais, os pombos foram mantidos sob o ciclo de claro-escuro relatado acima, e 24h antes do início dos testes de habituação, foi introduzido a condição de 24h de claro constante.

Equipamentos:

A câmara de habituação, confeccionada de madeira, era forrada internamente por revestimento melamínico (fórmica) e externamente por material isolante termo-acústico (lã de vidro recoberto por placas de isopor). A parte frontal era composta por dois vidros, de 8mm de espessura cada, espaçados por 10mm, sendo o vidro interno temperado transparente e o externo laminado reflexivo. A

iluminação era dada por duas lâmpadas fluorescentes Super Compacta de 9 watts. No canto superior esquerdo de uma das paredes existia um alto falante Novik 80-watts. O estimulador sonoro (Berger AS-109) estava localizado em uma sala de controle, adjacente, 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.

As câmaras de habituação ficavam numa sala experimental com isolamento acústico. Entre a sala experimental e a sala de controle havia uma janela com vidro laminado unidirecional através da qual era possível monitorar e gravar as sessões de habituação (conjunto de filmadora, vídeo tape e TV). Para produzir um ruído de fundo, um circulador de ar permanecia ligado durante as sessões.

Procedimentos

1. Adaptação às condições do biotério e à câmara experimental

A adaptação dos pombos às condições de alojamento durou um mínimo de 20 dias (quarentena). Nenhuma manipulação experimental foi realizada neste período. Nos 10 dias seguintes, os animais começaram a ser manuseados diariamente, sendo retirados do biotério, colocados em uma saco de tecido (brim) preto, pesados e transportados até a câmara de habituação, onde permaneciam por 50 minutos. Tal procedimento foi repetido em horários da fase clara e escura

do ciclo claro-escuro, escolhidos aleatoriamente, visando adaptação à manipulação e à situação experimental. Todos os sujeitos foram expostos à câmara experimental no horário de realização do seu teste de habituação, pelo menos uma vez.

2. Habituação ao som

No dia do teste de habituação os animais eram colocados na câmara experimental, 20 min antes do início das apresentações do estímulo sonoro.

Foram realizadas duas sessões de habituação em dias consecutivos. Cada sessão consistiu numa seqüência de 60 estímulos sonoros (1000Hz e 85dB, 1s) com intervalo entre estímulos de 30s. O intervalo entre sessões foi de 24h (Figura 19).

3. Análise comportamental

Os comportamentos dos pombos foram observados e registrados de acordo com as categorias comportamentais definidas no catálogo de comportamentos (Experimento I). Foram elas: Exploratória (EXP); Pré-exploratória (PRÉ); Locomoção (LOC); Manutenção (MAN); Movimentos discretos de partes do corpo ou de todo o corpo (MOV) e Parado (PAR).

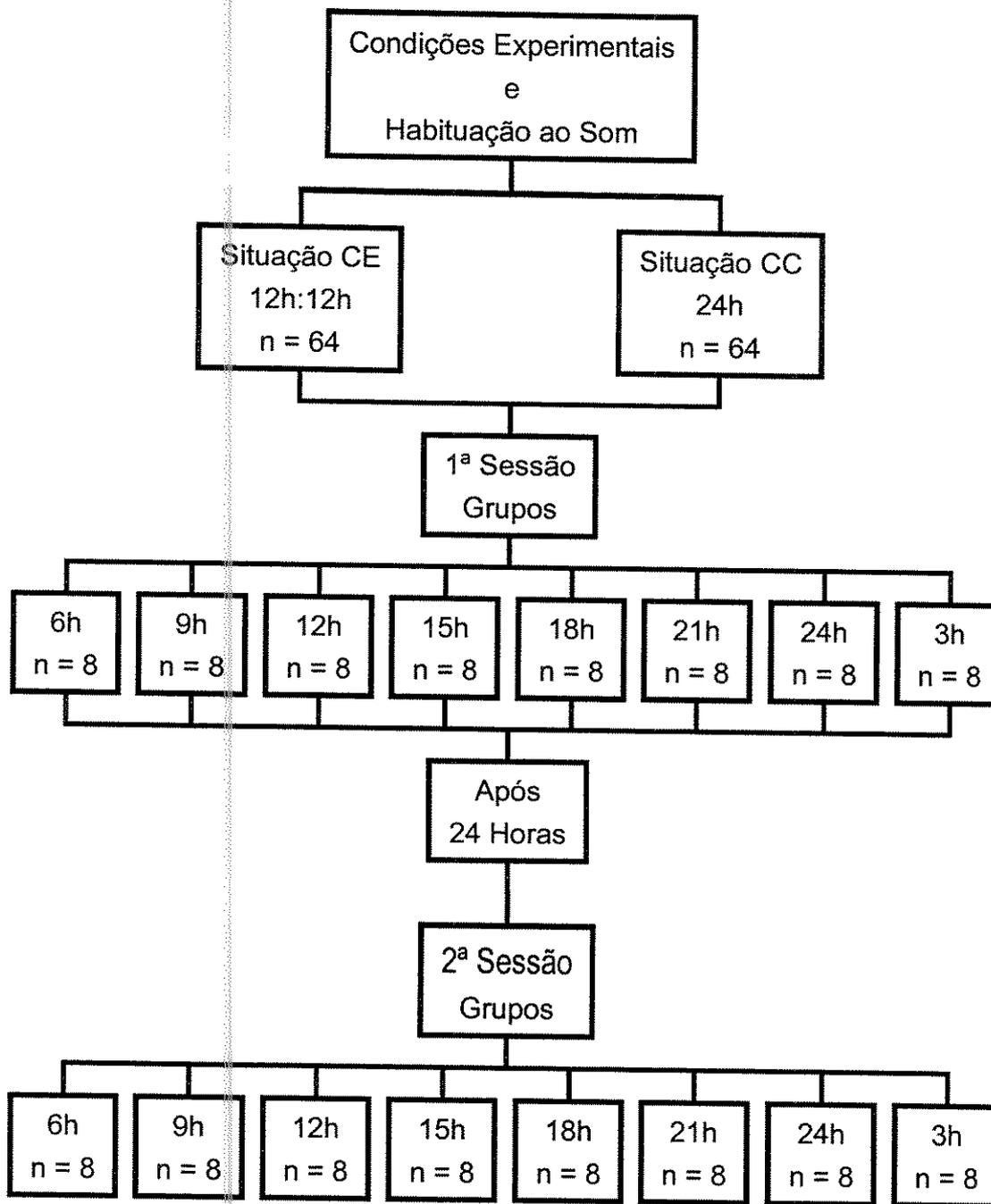


Figura 19 - Fluxograma do procedimento experimental.

Número de estímulos por sessão = 60; som (1s; 1000Hz; 85dB); intervalo entre estímulos = 30s

Embora comportamentos presentes nas categorias acima tenham sido anotados nas folhas de registro, este trabalho quantificou e analisou apenas aqueles agrupados na categoria EXP e PRÉ.

4. Controle da fidedignidade dos dados

Os comportamentos, correlacionados com os estímulos sonoros, eram observados diretamente e anotados, em folhas de registro pelo experimentador ao mesmo tempo em que ocorria a gravação das sessões em fitas de vídeo. As fitas eram posteriormente transcritas pelo experimentador, em folhas de registros. As dúvidas foram discutidas por dois observadores pela reanálise das fitas e das transcrições realizadas. A análise da fidedignidade entre ambos os observadores, foi realizada pela somatória dos acordos dividido pela soma das omissões, acordos e desacordos, o valor obtido foi multiplicado por cem ($A/A+O+D \times 100$).

5. Aquisição da habituação

A aquisição da habituação, em cada sessão, foi analisada por um critério que considerou, de maneira não exclusiva, dois índices de diminuição de respostas. Ambos os índices consideraram a diminuição de respostas EXP e PRÉ em relação ao bloco inicial de 5 estímulos. O índice de redução de respostas (CRC) considerava a ocorrência de freqüência média de respostas com valores \leq 50% do bloco inicial, durante 3 blocos sucessivos. A Razão Média de Decremento

(RMD), obtida a partir da média aritmética em cada sessão experimental deveria ser superior a 0,65. A razão de respostas foi calculada como $1 - (RBF / RBF + RBI)$, onde RBF significa total de respostas do bloco final e RBI total de respostas do bloco inicial.

Análise estatística:

Os comportamentos PRÉ e EXP correlacionados com a apresentação do estímulo sonoro, foram agrupados em blocos de 5 estímulos. Em cada horário de testes existiam 12 blocos de estímulos totalizando 60 estímulos. Para a análise estatística usou-se ANOVA, de três vias, com horário (H) como fator e sessão (S) e bloco (B) como medidas repetidas, seguida por comparações múltiplas com o teste T - Newman-Keuls. Utilizamos ainda uma ANOVA de duas vias, com horário (H) como fator e sessão como medida repetida, seguida por comparações múltiplas com o teste T-Newman-Keuls para comparar o bloco 1 da primeira sessão com o bloco 1 da segunda sessão, bem como, para verificar a existência de diferença na velocidade para que o CRC fosse atingido, nos diferentes horários.

Resultados

Habituação de comportamentos EXP e PRÉ na situação CE

A Tabela 1 mostra os horários em que ocorreu habituação ao estímulo sonoro. Esta tabela apresenta as RMD dos comportamentos PRÉ e EXP nas primeiras e segundas sessões, bem como o bloco em que o CRC foi atingido. Pudemos verificar que com relação aos comportamentos PRÉ, os dois critérios de habituação foram satisfeitos em todos os horários. A análise estatística corroborou este dados, o teste ANOVA não identificou efeito de horário quando foi considerado o bloco em que o CRC foi atingido [$F(7,56)=0,47$; $p=0,9$], sugerindo que a redução da emissão de comportamentos ocorreu na mesma velocidade em todos os horários testados. O mesmo não foi verificado para os comportamentos EXP, nos quais somente os grupos testados na fase clara do ciclo claro-escuro, excetuando-se a primeira sessão das 9h, atingiram os dois critérios de habituação estabelecidos. Nos horários de escuro do ciclo, o grupo testado às 18h atingiu o critério de RMD, porém não atingiu o critério de CRC. Nos demais horários, excetuando-se a segunda sessão do grupo das 24h, que atingiu o critério de RMD, nenhum dos dois critérios foi atingido. A análise estatística indicou um efeito significativo de horário [$F(7,56)=5,10$; $p<0,0002$], sugerindo que a redução da emissão de comportamentos ocorreu mais rapidamente em alguns horário que em outros.

Tabela 1 - Razão Média de Decremento (RMD); Número do bloco em que o critério de redução comportamental foi atingido (CRC). EXP = Categoria Exploratória; PRÉ = Categoria Pré Exploratória, nos diferentes grupos da situação CE.

Categorias	Grupos	Razão Média de Decremento		Bloco em que CRC foi atingido		Habituação	
		1ª S	2ª S	1ª S	2ª S	1ª S	2ª S
EXP	6h	0,79	0,67	10	9	Sim	Sim
	9h	0,70	0,84	-	7	Não	Sim
	12h	0,85	0,90	10	7	Sim	Sim
	15h	0,80	0,86	7	7	Sim	Sim
	18h	0,79	0,81	-	-	Não	Não
	21h	0,56	0,63	-	-	Não	Não
	24h	0,62	0,70	-	-	Não	Não
	3h	0,47	0,58	-	-	Não	Não
PRÉ	6h	1,00	0,91	5	4	Sim	Sim
	9h	1,00	1,00	4	4	Sim	Sim
	12h	1,00	1,00	4	4	Sim	Sim
	15h	1,00	1,00	4	4	Sim	Sim
	18h	1,00	1,00	4	4	Sim	Sim
	21h	0,83	0,86	5	4	Sim	Sim
	24h	0,93	1,00	4	4	Sim	Sim
	3h	0,91	0,90	4	4	Sim	Sim

Razão de Decremento = $\{1 - [\text{bloco final} / (\text{bloco final} + \text{bloco inicial})]\}$

CRC = 3 blocos sucessivos de estímulos, com emissão média de comportamento $\leq 50\%$ em relação ao bloco inicial.

Critério de habituação = atingir CRC e RMD $> 0,65$

Durante a primeira sessão, verificamos que o CRC foi atingido mais rapidamente às 15h (bloco 7), seguido pelos grupos das 6h e 12h (bloco 10). Na segunda sessão, os grupos das 9h, 12h, e 15h foram os primeiros a atingirem o CRC (bloco 7), seguido pelo grupo das 6h (bloco 9). A análise *post-hoc* indicou, no entanto, existirem diferenças significativas ($p < 0,05$) na primeira sessão apenas quando se comparou o grupo das 15h com o das 21h, 24h e 3h. Na segunda sessão, as diferenças ($p < 0,05$) estavam presentes quando se comparou o grupo das 15h com os grupos dos horários de escuro do ciclo claro-escuro. Existiram diferenças significativas ($p < 0,05$) ainda, quando se comparou o grupo das 9h e 12h com os grupos das 3h e 21h, bem como entre os grupos das 6h e 18h com o grupo das 21h.

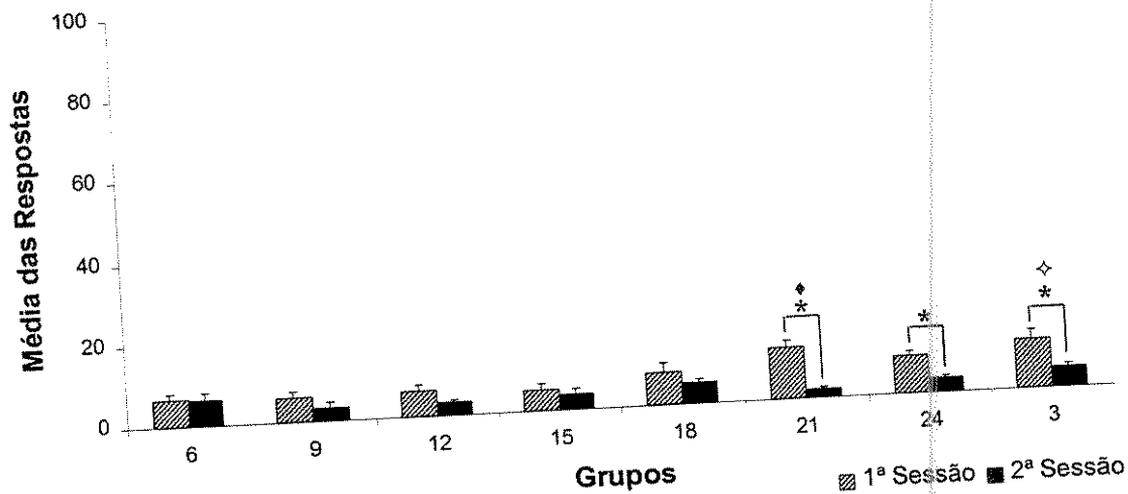
A Figura 20 mostra o número médio de respostas PRÉ e EXP, apresentado nas primeiras e segundas sessões ao longo das 24h. Com relação ao comportamento EXP, verificamos um efeito de horário [$F(7,56)=2,44$; $p < 0,03$], apontando para uma variação diurna na frequência de emissão de respostas comportamentais em função da apresentação dos estímulos sonoros. O teste *post-hoc* indicou que durante a primeira sessão de habituação, o grupo das 15h apresentou a menor frequência média de EXP ($38,63 \pm 5,48$) diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos seguintes horários: 6h ($60,50 \pm 9,55$); 9h ($64,25 \pm 6,48$); 18h ($61,00 \pm 8,36$); 21h ($73,38 \pm 5,84$); 24h ($64,75 \pm 4,87$) e 3h ($58,12 \pm 4,34$). O grupo das 12h ($45,50 \pm 5,24$), apresentou a segunda menor frequência média de respostas diferindo ($p < 0,05$) das 9h, 21h e 24h. Na segunda sessão, as menores frequências médias de respostas foram verificadas às 15h ($27,63 \pm 6,83$)

e 12h ($28,88 \pm 6,33$) que diferiram significativamente ($p < 0,05$) das 18h ($44,38 \pm 6,22$), 21h ($56,63 \pm 8,77$), 24h ($46,25 \pm 7,62$) e 3h ($52,75 \pm 6,40$). O grupo das 6h ($36,50 \pm 11,53$) e 9h ($31,38 \pm 7,34$) diferiram significativamente ($p < 0,05$) apenas dos grupos das 21h e 3h. Quando analisamos os comportamentos PRÉ, o efeito de horário não foi encontrado [$F(7,56) = 1,36; p = 0,3$]. O teste *post-hoc* indicou diferenças de frequência apenas na primeira sessão com as maiores médias de respostas ocorrendo às 21h ($12,63 \pm 1,71$) que diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos grupos das 6h ($6,50 \pm 1,52$), 9h ($5,88 \pm 1,51$), 12h ($6,13 \pm 1,69$), 15h ($5,13 \pm 1,34$) e 18h ($8,00 \pm 2,38$), seguido pelo grupo das 3h ($11,88 \pm 2,33$) que diferiu apenas dos horários da fase clara do ciclo claro-escuro.

A Figura 20 mostra, ainda, que a frequência de respostas EXP foi sempre maior nas primeiras sessões. A ANOVA revelou um claro efeito de sessão [$F(1,7) = 87,87; p < 0,001$]. Indicou, ainda, uma interação entre horário e sessão [$F(7,56) = 2,35; p < 0,04$], sugerindo que a habituação é dependente do horário do dia e da sessão experimental. As múltiplas comparações, teste Newman-Keuls, indicaram que a primeira sessão diferiu da segunda nos horários das 6, 9, 12, 21 e 24. Para os comportamentos PRÉ, também foi verificado efeito de sessão [$F(1,7) = 51,83; p < 0,001$], com interação entre horário e sessão [$F(7,56) = 4,19; p < 0,001$], a primeira sessão diferiu da segunda às 21, 24 e 3 horas.

A figura 21 mostra as curvas médias de respostas dos comportamentos das categorias PRÉ e EXP em função de blocos de cinco estímulos sonoros, nas primeiras e segundas sessões. A análise dessa figura indica uma redução na frequência de respostas EXP em função dos blocos de estímulo, em todos os

Pré Exploratória



Exploratória

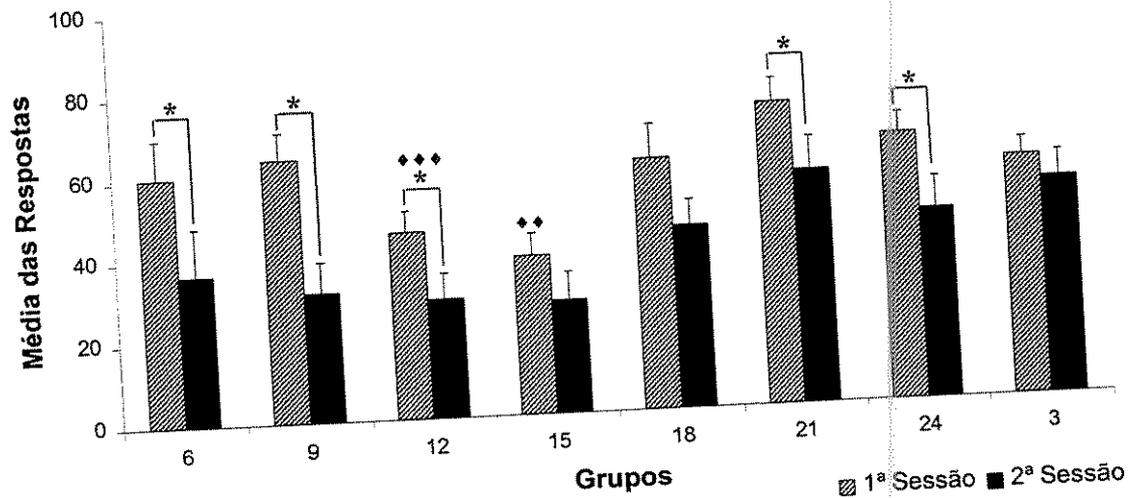


Figura 20 - Média \pm EPM das categorias Exploratória (EXP) e Pré Exploratória (PRÉ) na 1ª e 2ª sessão nos grupos das 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h, em pombos expostos ao ciclo claro-escuro 12h:12h.

Anova:
 EXP - Efeito de Horário (H) $[F(7,56)=2.44; p<0.03]^*$, Efeito de Sessão (S) $[F(1,7)=87.87; p<0.001]^*$ com interação significativa para $H \times S [F(7,56)=2.35; p<0.04]^*$.
 PRÉ - Efeito de Sessão (S) $[F(1,7)=51.83; p<0.001]^*$ com interação significativa para $H \times S [F(7,56)=4.19; p<0.001]^*$.

Comparações *Post-hoc* com o teste Newman-Kleus:

- * $p<0.05$, 2ª sessão x 1ª sessão
- ♦ $p<0.05$, em relação às 6h, 9h, 12h e 15h, na 1ª sessão.
- ♦♦ $p<0.05$, em relação às 6h, 9h, 12h, 15h e 18h, na 1ª sessão.
- ♦♦♦ $p<0.05$, em relação às 6h, 9h, 18h, 21h, 24h e 3h, na 1ª sessão, e 18h, 21h, 24h e 3h, na 2ª sessão.
- ♦♦♦♦ $p<0.05$, em relação às 9h, 21h e 24h, na 1ª sessão e 18h, 21h, 24h e 3h, 2ª sessão.

horários da fase clara do ciclo claro-escuro. Nos horários de escuro esta redução é verificada às 18h (duas sessões), e às 24h (segunda sessão). Contudo, como evidenciado na Tabela 1, o critério de habituação que leva em conta CRC não foi atingido, na primeira sessão do grupo das 9h e em nenhuma das sessões do período de escuro do ciclo claro-escuro. A análise estatística indicou um efeito de bloco [$F(11,77) = 35,06; p < 0,001$] e uma interação entre horário e bloco [$F(77, 616) = 2,23; p < 0,001$], e sessão e bloco [$F(11,77)=4,22; p < 0,001$]. Com relação aos comportamentos PRÉ, também verificamos uma redução na frequência comportamental do primeiro para o último bloco em todos os grupos. A ANOVA indicou um efeito de bloco para estes comportamentos [$F(11,77)=125,90; p < 0,001$], com interação significativa para sessão e bloco [$F(11, 77)=17,19; p < 0,001$] e horário sessão e bloco [$F(77, 616) = 2,00; p < 0,001$].

Realizamos, ainda, comparações entre o nível inicial médio de respostas inter-sessões (primeiro bloco de estímulos). Com relação aos comportamentos EXP a análise estatística indicou um efeito de sessão [$F(1,7)=4,58; p < 0,04$], e interação entre horário e sessão [$F(7,56)=2,18; p < 0,05$]. Verificamos que os grupos das 6h, 9h, 15h e 18h apresentaram quedas de 36%, 16%, 14% e 21%, respectivamente, enquanto que às 12, 21, 24 e 3 horas o primeiro bloco da segunda sessão apresentou valores médios de respostas ligeiramente superiores (7%, 4%, 5% e 11%, respectivamente). No entanto, o teste de múltiplas comparações, Newman-Keuls, indicou diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas no grupo das 6h. Quando a mesma análise foi realizada para os comportamentos PRÉ um efeito de sessão, foi também verificado [$F(1,7)=61,22; p < 0,0001$] com

Situação CE

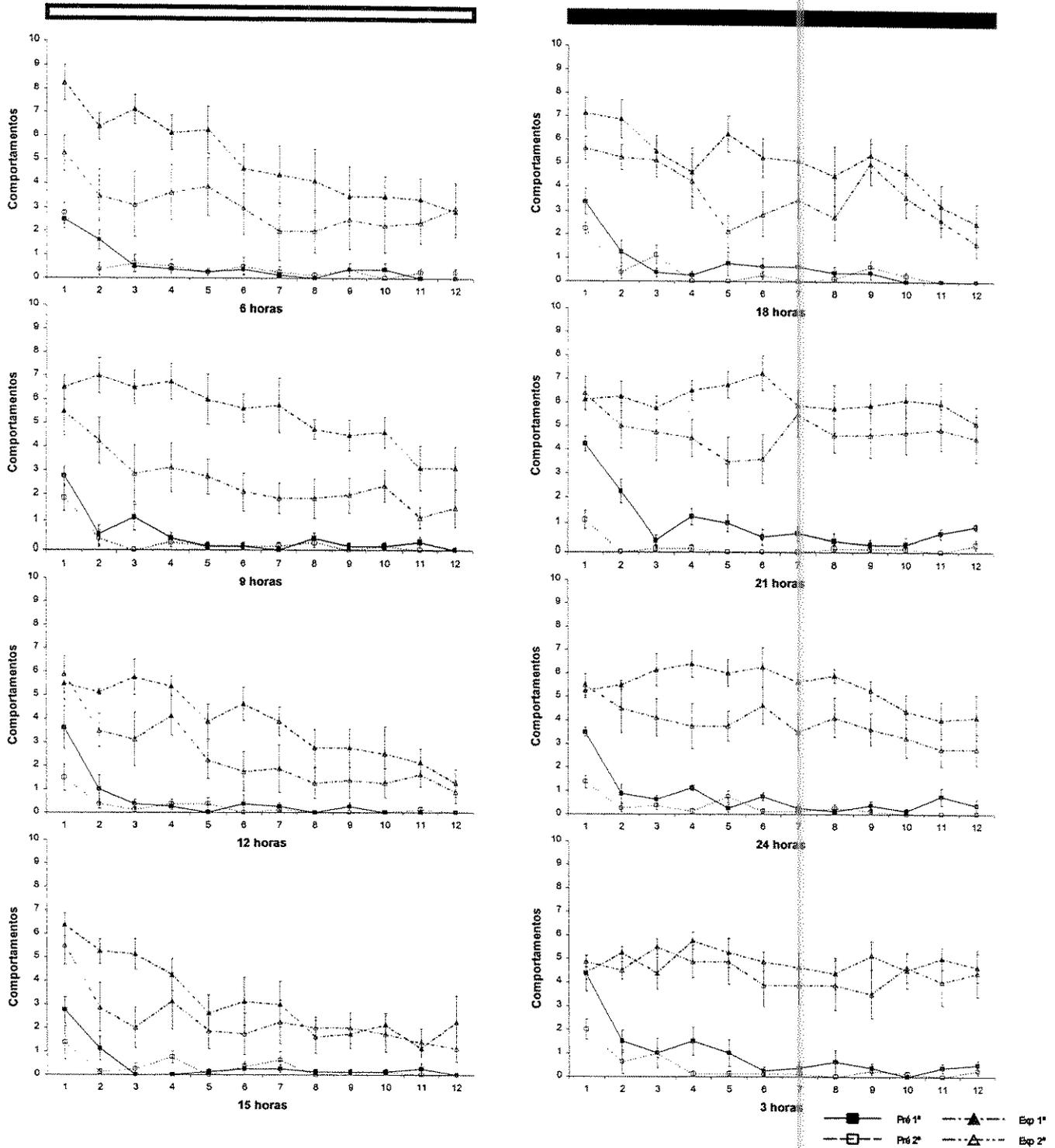


Figura 21 - Médias \pm EPM das somatórias das categorias Exploratórias (EXP) e Pré-Exploratórias (PRÉ) por blocos de 5 estímulos (B), obtidas nos testes de habituação, na 1ª e 2ª sessão (S), nos grupos das 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h (H).
 Anova:
 EXP - Efeito de H[F(7,56)=2,44; p<0,03]*, S[F(1,7)=87,87; p<0,001]* e B[F(11,77)=35,06; p<0,001]* com interação significativa para HxS[F(7,56)=2,35; p<0,04]*, HxB[F(77,616)=2,23; p<0,001]* e SxB[F(11,77)=4,22; p<0,001]*.
 PRÉ - Efeito de S[F(1,7)=51,83; p<0,001]* e B[F(11,77)=125,90; p<0,001]* com interação significativa para HxS[F(7,56)=4,19; p<0,001]*, SxB[F(11,77)=17,19; p<0,001]* e HxSxB[F(77,616)=2,00; p<0,001]*.

interação entre horário e sessão [$F(7,56) = 3,25; p < 0,006$]. Embora em todos os horários, excetuando-se às 6h (aumento de 10%), a quantidade média de respostas tenha sido inferior na 2ª sessão (queda igual a 32%, 59%, 50%, 33%, 73%, 61% e 54%, às 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h, respectivamente). O teste *post-hoc* indicou diferenças significativas apenas nos grupos das 12h, 21h, 24 e 3h.

Habituação de comportamentos EXP e PRÉ na situação CC

A Tabela 2 apresenta as RMD dos comportamentos PRÉ e EXP nas duas sessões experimentais, bem como o bloco em que o CRC foi atingido. Indica, portanto, em quais horários de teste ocorreu habituação ao estímulo sonoro. Assim, verificamos que em relação aos comportamentos PRÉ os dois critérios de habituação foram satisfeitos em todos os horários. O CRC foi atingido na primeira sessão nos grupos das 6h, 12h, 18h, 21h e 24h no bloco de número 4, seguidos pelos grupos das 3h (bloco 5), 9h (bloco 6) e 15h (bloco 8). Na segunda sessão, os grupos das 6h, 9h, 12h, 15h, 21h, e 24h atingiram CRC no bloco 4, e os grupos das 18h e 3h, no bloco 6. A análise estatística corroborou estes dados, o teste ANOVA não identificou efeito de horário quando foi considerado o bloco em que o CRC foi atingido [$F(7,56)=1,05; p=1,1$], sugerindo que a redução da emissão de comportamentos ocorreu na mesma velocidade em todos os horários testados.

Com relação ao comportamento EXP, excetuando-se os grupos testados nas primeiras sessões nos horários das 21h e 24h que não atingiram o critério de

Tabela 2 - Razão Média de Decremento (RMD); Número do bloco em que o critério de redução comportamental foi atingido (CRC). EXP = Categoria Exploratória; PRÉ = Categoria Pré Exploratória, nos diferentes grupos da situação CC.

Categorias	Grupos	Razão Média de Decremento		Bloco em que CRC foi atingido		Habituação	
		1ª S	2ª S	1ª S	2ª S	1ª S	2ª S
EXP	6h	0,79	0,89	9	8	Sim	Sim
	9h	0,67	0,88	9	7	Sim	Sim
	12h	0,85	0,75	8	5	Sim	Sim
	15h	0,95	0,94	8	5	Sim	Sim
	18h	0,83	0,90	12	4	Sim	Sim
	21h	0,77	0,83	-	10	Não	Sim
	24h	0,73	0,90	-	8	Não	Sim
	3h	0,84	0,69	11	4	Sim	Sim
PRÉ	6h	1,00	1,00	4	4	Sim	Sim
	9h	1,00	1,00	6	4	Sim	Sim
	12h	0,94	1,00	4	4	Sim	Sim
	15h	1,00	1,00	8	4	Sim	Sim
	18h	0,93	1,00	4	6	Sim	Sim
	21h	1,00	0,86	4	4	Sim	Sim
	24h	1,00	1,00	4	4	Sim	Sim
	3h	0,97	1,00	5	6	Sim	Sim

Razão de Decremento = $\{1 - [\text{bloco final} / (\text{bloco final} + \text{bloco inicial})]\}$

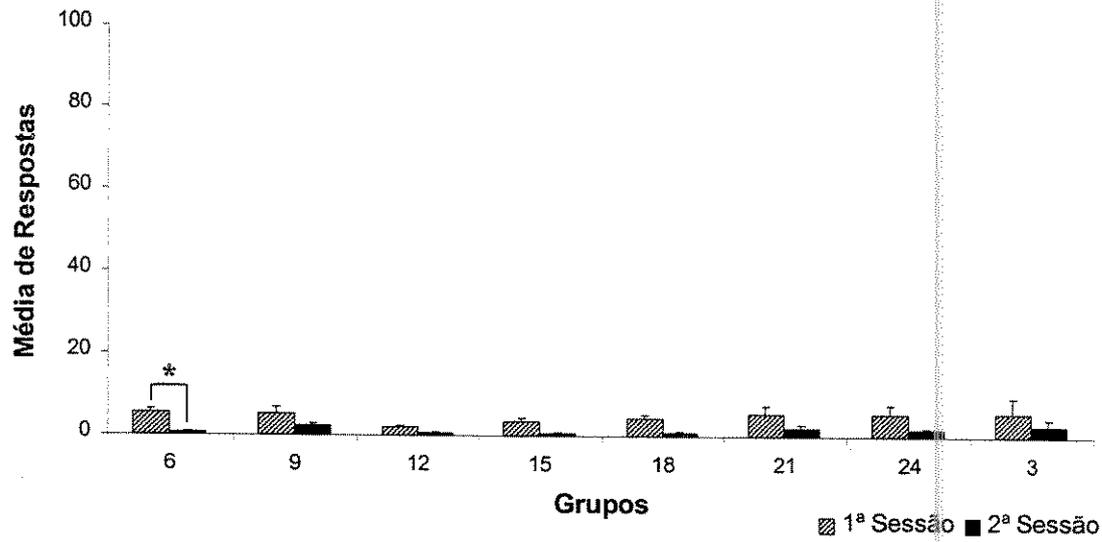
CRC = 3 blocos sucessivos de estímulos, com emissão média de comportamento $\leq 50\%$ em relação ao bloco inicial.

Critério de habituação = atingir CRC e RMD $> 0,65$

CRC estabelecido, todos os demais grupos mostraram habituação. Embora a análise estatística não tenha indicado um efeito significativo de horário [$F(7,56)=0,84$; $p=0,6$] a observação da Tabela 2 mostra que o CRC foi atingido em diferentes blocos ao longo das 24h. Assim, durante a primeira sessão o grupo das 12h e 15h foram os primeiros a atingirem CRC (Bloco 8), seguidos pelos grupos das 6h, 9h (bloco 9), 3h (bloco 11) e 18h (bloco 12). Na segunda sessão, o CRC foi primeiro atingido às 18h e 3h (bloco 4) seguidos pelos grupos das 15h e 12h (bloco 5), 9h (bloco 7), 6h, 24h (bloco 8) e 21h (bloco 10).

A Figura 22 mostra o número médio de respostas apresentados nas primeiras e segundas sessões, ao longo das 24h para os comportamentos EXP e PRÉ. Nenhum efeito de horário na análise de variância foi verificado, para qualquer dos dois comportamentos estudados sugerindo que não existiram variações na frequência de emissão de respostas comportamentais em função da apresentação dos estímulos sonoros ao longo das 24h do dia. Um claro efeito de sessão foi observado para EXP [$F(1,7) = 106,9$; $p<0,001$]. Múltiplas comparações, teste Newman-Keuls, indicaram que a primeira sessão diferiu da segunda nos grupos das 18h, 21h, 24h e 3h. Com relação aos comportamentos PRÉ o efeito de sessão também estava presente [$F(1,7) = 47,08$; $p<0,001$], o teste *post-hoc* evidenciou diferenças significativas ($p<0,05$) entre as sessões do grupo das 6h. No entanto, não foi verificada interação entre horário e sessão para EXP [$F(7,56) = 1,57$; $p=0,2$] e PRÉ [$F(7,56) = 0,58$; $p=0,8$], indicando que para esta situação experimental a habituação não é dependente do horário do dia e da sessão.

Pré Exploratória



Exploratória

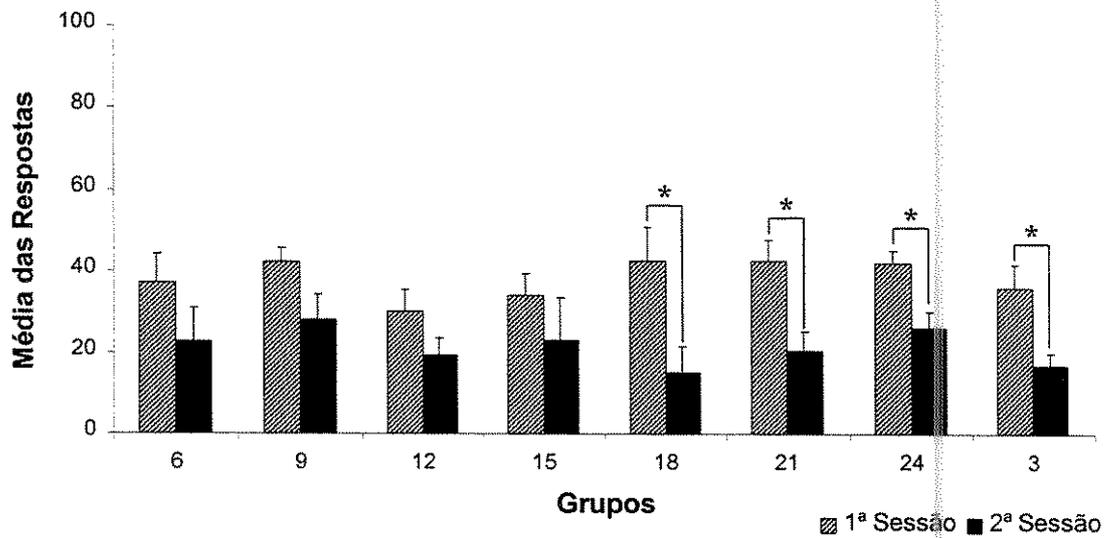


Figura 22 - Média \pm EPM das categorias Exploratória (EXP) e Pré Exploratória (PRÉ) nas 1ª e 2ª sessões nos grupos das 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h, em pombos expostos a 24 horas de claro constante.

Anova: EXP - Efeito de Sessão (S) [F(1,7)=106.90; $p < 0.001$]*.

PRÉ - Efeito de Sessão (S) [F(1,7)=47.08; $p < 0.001$]*.

Múltiplas comparações realizadas *post-hoc* com o teste Newman-Keuls:

* $p < 0.05$, 2ª sessão em relação a 1ª sessão.

A Figura 23 mostra as curvas médias de respostas dos comportamentos das categorias PRÉ e EXP em função de blocos de cinco estímulos sonoros, nas primeiras e segundas sessões. Com relação ao comportamento EXP o CRC não foi atingido na primeira sessão do grupo das 21h e 24h conforme evidenciado na Tabela 2. No entanto, a análise desta figura indica uma redução na frequência de respostas EXP do primeiro para o último bloco em todos os grupos. A análise estatística indicou um efeito de bloco [$F(11,77) = 74,23; p < 0,001$] e uma interação entre horário e bloco [$F(77, 616) = 2,06; p < 0,001$], sessão e bloco [$F(11,77) = 9,55; p < 0,001$] e horário, sessão e bloco [$F(77, 616) = 1,52; p < 0,01$]. Para os comportamentos PRÉ, também verificamos uma redução na frequência comportamental em função de sucessivas apresentações do estímulo sonoro. A ANOVA indicou um efeito de bloco para estes comportamentos [$F(11,77) = 53,46; p < 0,001$], com interação significativas para horário e bloco [$F(77,616) = 1,73; p < 0,001$], sessão e bloco [$F(11,77) = 25,82; p < 0,001$] e horário sessão e bloco [$F(77, 616) = 3,26; p < 0,001$].

Comparações entre o nível inicial médio de respostas inter-sessões (primeiro bloco de estímulos) foram ainda realizadas. A análise da frequência de emissão de comportamentos EXP indicou que às 6h, 15h, 18h, 21h e 3h ocorreram quedas de 14%, 7,48%, 34% e 24%, respectivamente, enquanto que às 9h e 12h as médias de respostas foram exatamente as mesmas. Somente no grupo das 24h foi encontrado um pequeno aumento (10%). Estes dados foram confirmados pela análise estatística que indicou um efeito de sessão [$F(1,7) = 6,57; p < 0,02$]. No entanto, o teste de múltiplas comparações, Newman-Keuls, indicou

Situação CC

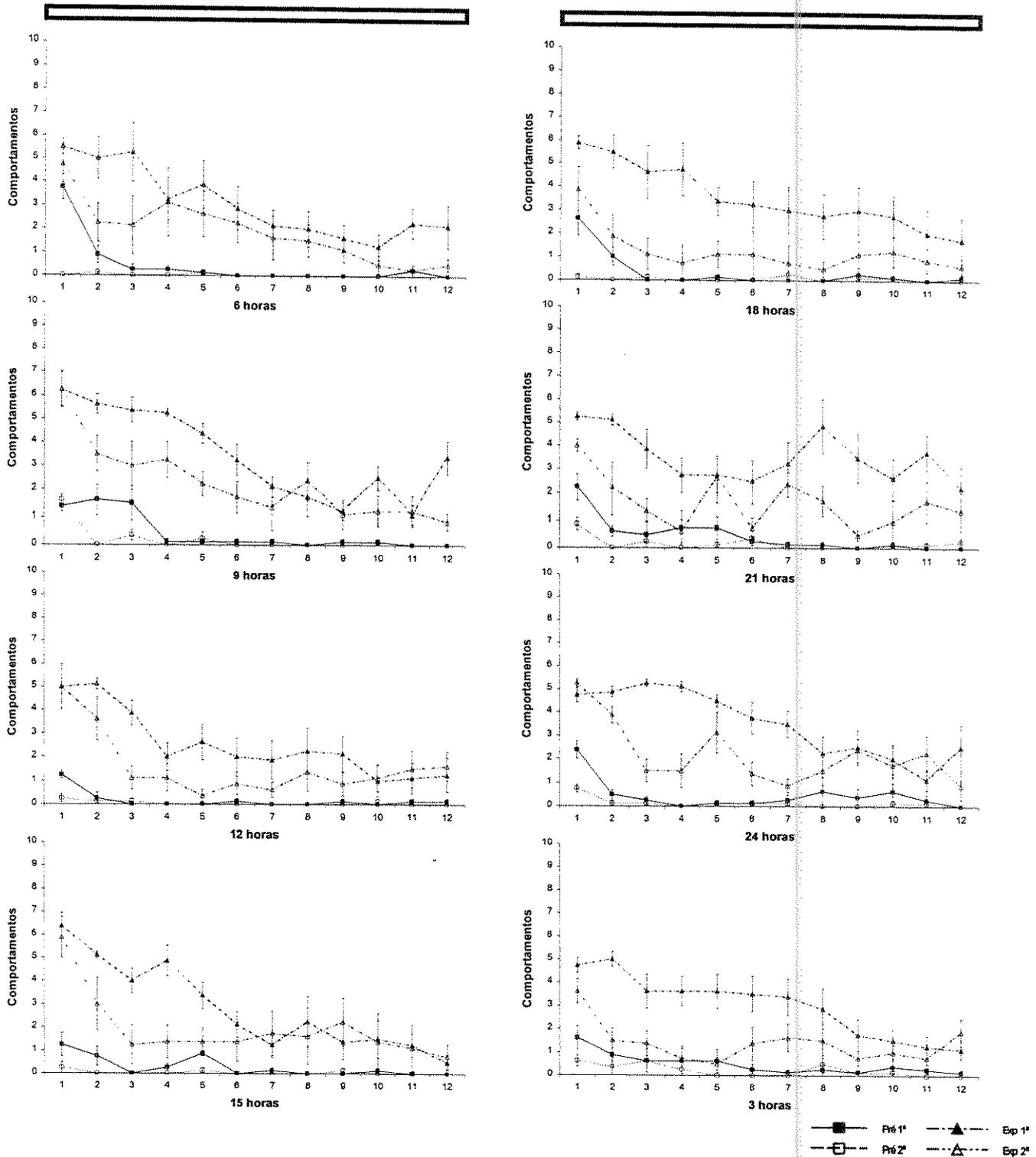


Figura 23 - Médias \pm EPM das somatórias das categorias Exploratórias (EXP) e Pré-Exploratórias (PRÉ) por blocos de 5 estímulos (B), obtidas nos testes de habituação, na 1ª e 2ª sessão (S), nos grupos das 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h (H).

Anova:
 EXP - Efeito de S[F(1,7)=106,90; $p < 0,001$]* e B[F(11,77)=74,23; $p < 0,001$]* com interação significativa para HxB[F(77,616)=2,06; $p < 0,001$]*, SxB[F(11,77)=9,55; $p < 0,001$]* e HxSxB[F(77,616)=1,52; $p < 0,01$]*.
 PRÉ - Efeito de S[F(1,7)=47,08; $p < 0,001$]* e B[F(11,77)=53,46; $p < 0,001$]* com interação significativa para HxB[F(77,616)=1,73; $p < 0,001$]*, SxB[F(11,77)=25,82; $p < 0,001$]* e HxSxB[F(77,616)=3,26; $p < 0,001$]*.

diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas no grupo das 18h. Com relação a PRÉ, verificamos uma redução de frequência de emissão de comportamentos nos grupos das 6h (100%), 12h, 15h (80%), 18h (95%), 21h (61%), 24h (68%) e 3h (61%), apenas no grupo das 9h isto não ocorreu (aumento de 18%). A ANOVA indicou efeito de sessão [$F(1,7)=97,45$; $p < 0,0001$], com interação significativa entre horário e sessão [$F(7,56)=7,66$; $p < 0,0001$]. A análise *post-hoc* apontou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a primeira e segunda sessão nos grupos das 6h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h.

Discussão

Os resultados do presente estudo mostraram uma clara variação noite-dia no processo de habituação do comportamento exploratório a estímulos sonoros em pombos, expostos a situação CE. Assim, todos os grupos testados durante a fase clara do ciclo claro-escuro habituaram, enquanto que habituação não foi verificada em nenhum grupo da fase escura.

Apesar do grupo das 9h (primeira sessão) não ter atingido o CRC, curvas de respostas típicas de habituação, com aceleração negativa, foram obtidas para todos os grupos da fase clara da situação CE, quando se analisou os comportamentos EXP. Embora a análise estatística não tenha indicado diferenças na velocidade de redução da emissão de comportamentos EXP, frente ao estímulo sonoro entre os grupos testados nesta fase, verificamos que durante a primeira sessão, o grupo das 15h atingiu o CRC quando 35 estímulos sonoros haviam sido

aplicados, enquanto que, às 6h e 12h foram necessários 50 estímulos. Durante a segunda sessão, excetuando-se o grupo das 6h que necessitou de 45 estímulos para atingir o CRC, todos os demais grupos o fizeram com 35 estímulos. Uma diferença inter-sessão foi evidenciada nos grupos das 6h, 9h e 12h, quando a sessão foi considerada como um todo. O grupo das 6h mostrou ainda, diferença inter-sessão quando consideramos apenas as frequências de respostas emitidas no primeiro bloco de estímulos.

Os resultados obtidos durante a fase clara da situação CE para EXP estão de acordo com os três princípios de habituação propostos por Thompson & Spencer (1966) segundo os quais: (a) dado que um estímulo particular elicia uma resposta, aplicações repetidas do estímulo resultam num decréscimo da resposta; (b) se o estímulo é suprimido a resposta tende novamente a reaparecer e; (c) a habituação tornar-se-á sucessivamente mais rápida, se repetidas séries de treinamento de habituação e recuperação espontâneas forem dadas.

Nos testes realizados na fase escura da situação CE, quando a resposta EXP foi analisada, verificou-se uma situação diferente. Apesar do grupo das 18h não ter atingido o CRC, em nenhuma das sessões experimentais, a RMD foi atingida. Este dado indicativo da redução no número médio de respostas do primeiro ao último bloco, está de acordo com o primeiro princípio de Thompson & Spencer (1966). Porém, conforme pode ser observado a curva de resposta EXP frente ao estímulo sonoro apresenta flutuações de frequência ao longo das sessões. Este fato pode justificar o não cumprimento do CRC, bem como a ausência de diferenças entre a primeira e a segunda sessão apontadas pela

análise estatística, que fere o terceiro princípio de habituação de Thompson & Spencer.

Nos demais horários desta fase, considerando ainda o comportamento EXP e excetuando-se a segunda sessão do grupo das 24h que atingiu a RMD, os critérios de habituação não foram atingidos contrariando o primeiro e o terceiro princípio de Thompson & Spencer. Ou seja, não se verificou redução gradual de respostas intra-sessão e apesar de existirem diferenças inter-sessões às 21h e 24h, a redução de respostas frente a estimulação sonora não foi suficiente para que se verificasse habituação. Vale lembrar que nestes horários a velocidade de redução comportamental foi lenta diferindo significativamente do grupo das 15h nas duas sessões. Os grupos das 21h e 24h diferiram ainda, na segunda sessão dos grupos das 9h e 12h. Quando considerados apenas os comportamentos emitidos no primeiro bloco de estímulos a comparação inter-sessões mostrou um aumento de emissão de respostas, na segunda sessão frente a estimulação sonora nestes três grupos.

Convém ressaltar os dados do grupo das 18h que mostraram flutuações ao longo das sessões podendo indicar maior variabilidade comportamental neste horário. Considerando que nesse horário a luz do biotério foi apagada, e que a alteração abrupta de luminosidade (acender ou apagar das luzes) interfere no nível de EXP, INT e LOC, bem como em AG (conforme verificado no Experimento I e II respectivamente), podemos sugerir que a alteração da luminosidade também influencie as características da habituação. Uma questão que pode surgir desta sugestão é o fato do grupo das 6h apresentar habituação apesar de também ser

submetido a alteração abrupta de luminosidade. Ocorre que às 18h os pombos foram retirados do biotério, que já estava escuro, e levados para a câmara de habituação que estava clara, ao contrário do grupo das 6h, que foi retirado do biotério após a luz ter sido acesa e transferidos para a câmara de habituação que também estava iluminada. Assim, as aves do grupo das 6h foram expostas a uma variação ambiental menor.

Os critérios de habituação dos comportamentos pré-exploratório foram atingidos em todos os grupos da situação CE. A análise das curvas médias de respostas mostraram aceleração negativa típica do processo de habituação e não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na velocidade de redução de respostas intra-sessão em nenhum dos grupos. Apesar de não ter sido encontrado efeito de horário, quando a frequência de emissão de respostas PRÉ frente ao estímulo sonoro foi analisada, verificamos que durante a fase escura a emissão média de respostas durante as primeiras sessões foi maior (21h, 3h, 24h e 18h, respectivamente) que na fase clara. Diferenças significativas inter-sessões, quando as sessões foram consideradas como um todo ocorreram nos grupos das 21h, 24h e 3h. Quando considerou-se apenas o primeiro bloco de estímulos, a primeira sessão diferiu da segunda nos mesmos grupos, acima citados, e também às 12h.

Os resultados obtidos na situação CE para os comportamentos EXP sugerem que o processo de habituação possa ser dependente do horário do dia. Valentinuzzi & Ferrari (1997) também verificaram uma diferença noite-dia no processo de habituação a sons em pombos. Segundo estas autoras, a

organização temporal do processo de habituação pode ter um importante valor adaptativo. Visto que pombos são animais diurnos, aumentar a sensibilidade de sistemas sensoriais não visuais, como o sistema auditivo, durante a noite, poderia estar compensando sua menor acuidade visual nesse período. Assim, podemos inferir que não conseguir aprender que o estímulo apresentado não causa nenhum risco, durante a ausência de luz, pode não significar um dispêndio energético desnecessário, e sim permitir a esta ave uma maior chance de sobrevivência.

Reforçando a suposição de Valentinuzzi & Ferrari (1997) de uma maior sensibilidade de outros sistemas sensoriais durante a fase escura da situação CE está o fato de verificarmos um aumento de comportamentos pertencentes a outras categorias comportamentais que não apenas a EXP e PRÉ, quando da apresentação do estímulo. Apareceram comportamentos pertencentes à categoria LOC (andar, circular) e MAN (limpar, coçar, bocejar, deglutir, defecar, sacudir-se, esvoaçar), além de vocalização. Esses comportamentos desapareciam totalmente quando a sessão terminava, e raramente estavam presentes durante os testes realizados na fase clara do ciclo. O aparecimento desses comportamentos aparentemente deslocados, que tornava a resposta ao estímulo sonoro exacerbada, indicam que a sensibilidade sensorial para este estímulo não era a mesma durante o dia e a noite e, portanto, as respostas a ele também eram diferentes.

Podemos nos perguntar, no entanto, por que os comportamentos pré-exploratórios apresentaram habituação em todos os grupos testados. Ou ainda, por que esses comportamentos não seriam dependentes da hora do dia.

Conforme já citado quando definidos, os comportamentos pré-exploratórios são comportamentos reflexos que estão relacionados à apresentação de estímulos novos de intensidade elevada e precedem as respostas exploratórias. Diferem, portanto, dos comportamentos exploratórios que independem da novidade ou intensidade dos estímulos. Provavelmente, isso explique o fato dos comportamentos PRÉ habitarem de maneira tão rápida e em todos os horários do dia. Após umas poucas repetições do estímulo sonoro, o seu grau de novidade diminuiria, resultando em respostas menos intensas. Porém, devemos nos lembrar de que uma maior frequência de emissão de PRÉ foi também verificada no horário noturno. Esse fato pode ser mais uma indicação de que os comportamentos são mais intensos se a magnitude da estimulação for ou parecer maior. Devemos nos lembrar ainda de que os comportamentos PRÉ englobam o estremecer, o murchar e o sobressalto. Qual seria a finalidade adaptativa de continuar por um longo período de tempo apresentando esse tipo de respostas?

A constatação de que o processo de habituação ao estímulo sonoro é diferente ao longo das 24h do dia em pombos expostos à situação CE, levou-nos a discutir a organização do sistema temporizador de aves, na tentativa de buscar explicações de quais mecanismos poderiam estar envolvidos com esta diferença verificada. Conforme citado na introdução deste trabalho, o sistema temporizador de aves é complexo e envolve sistemas oscilatórios inter-relacionados (Cassone & Menaker, 1984; Takahashi & Menaker, 1984; Takahashi *et al.*, 1980, 1992).

O ciclo ambiental claro-escuro regula a síntese de MEL pela glândula pineal e pela retina que como sabemos, expressam um ritmo com baixas concentrações

de produção durante o dia e altas concentrações durante a noite. Trabalhos, com aves, relacionando ritmos comportamentais e concentrações de MEL plasmáticas, têm sido realizados em grande número. Estes trabalhos têm apontado para uma relação antifásica entre este hormônio e os ritmos comportamentais estudados (Binkley, *et al.*, 1971; Chabot & Menaker, 1987; Ebihara & Kawamura, 1981; Ebihara *et al.*, 1984 e 1987; Foa & Menaker, 1988; Funchs, 1983; Gaston & Menaker, 1968; Gwinner 1989; Gwinner & Benziger, 1978; Gwinner *et al.*, 1987; Hamm & Menaker, 1980; Janik *et al.*, 1992; MacBride, 1973; McMillan, 1972; ; Oshima *et al.*, 1987 e 1989; Simpson & Follet, 1981; Underwood *et al.*, 1984; Underwood & Stopes, 1984 e 1985).

Questões concernentes ao papel desse hormônio na organização circadiana em geral (Cassone, 1990), bem como nos processos de aprendizagem e memória também vêm sendo discutidos (Farr *et al.*, 1979; Mangtani *et al.*, 1979; Dollins, *et al.*, 1993). A MEL é um hormônio solúvel em lipídios e pode, portanto, através do sistema circulatório penetrar em todas as áreas cerebrais (Wurtman *et al.* 1968, Cardinali, 1981). Além disso, a utilização de 2[¹²⁵I] para a localização dos sítios cerebrais aos quais a MEL se liga (Cassone, 1990, Cassone *et al.* 1995), demonstrou que no cérebro de aves, esses sítios estão amplamente distribuídos. Assim, foram encontrados sítios de ligação da MEL predominantemente em estruturas associadas com vias fotorreceptoras e visuais, bem como em vias do sistema auditivo, no vNSQ, em estruturas envolvidas com a vocalização, em estruturas envolvidas com o comportamento emocional, como o alerta e a excitação sexual. (Cassone, 1990; Cassone *et al.*, 1995; RivKees *et al.*, 1989).

Essa grande quantidade de sítios de ligações de MEL no sistema nervoso podem indicar que os sistemas sensoriais, motores e límbicos apresentem variação circadiana, uma vez que é conhecido o fato de que mecanismos hormonais podem regular ou modular padrões cíclicos observados na fisiologia cerebral.

Nessa linha de raciocínio poderíamos supor que a MEL, presente apenas nos horários de escuro, poderia atuar em estruturas cerebrais, envolvidas com o processo de habituação, influenciando o mesmo. Existem trabalhos que apontam para o envolvimento de estruturas telencefálicas com o processo de habituação, em aves. Assim, Adamo & Bennet (1967), demonstraram que o hiperestriado acessório (HA) de galinhas estaria envolvido com a orientação espacial da cabeça a estímulos sonoros. Lesões nessas estruturas promoveriam perda de memória de longa duração e não afetariam memória de curta duração. Lesões massivas no telencéfalo de pombos facilitaram o processo de habituação reduzindo o número de estímulos sonoros necessários para que a habituação ocorresse (Toledo & Ferrari 1991). Foi demonstrado também que em pombos o LPO, estaria envolvido com processos que regulam o alerta (Wesp & Goodman, 1978) e a existência de aferências auditivas terminando no N caudal (Benowitz, 1980). Em todas estas estruturas existem sítios de ligação de MEL.

Phillips & Berger (1992) demonstraram que a MEL teria um efeito direto sobre a alteração nos padrões de sono de pombos, verificada ao longo das 24h. Registros eletrofisiológicos destes animais indicaram que durante o ciclo claro-escuro o sono apresenta um ritmo circadiano, com maiores período de vigília e sonolência e menores períodos de sono de ondas lentas durante a fase clara do

ciclo, se comparados à fase escura. Esses autores demonstraram que a interrupção do ritmo de secreção de MEL e a redução de sua concentração plasmática a valores basais, causado pela exposição à luz intensa constante por apenas 24h eliminava o sono. Infusão de MEL restaurava o sono de ondas lentas e sono paradoxal aos níveis comparados com a fase escura do ciclo claro-escuro, com padrões eletrofisiológicos indistinguíveis daqueles obtidos durante a fase escura do ciclo. O fato de o sono ocorrer durante o período em que a MEL estava sendo injetada, indicou que ela atua diretamente como causadora de sono e não somente como um marcador de tempo.

Assim, a presença de sítios de ligação da MEL em áreas do telencefálicas envolvidas com o processo de habituação, no LPO envolvido com o alerta, em áreas límbicas, no sistema visual, no sistema auditivo tanto em vias sensoriais como em estruturas centrais, que detectam e processam a informação auditiva, bem como a sua capacidade de causar sono sugerem que esse hormônio pode estar envolvido com a mediação de processos de redução do alerta, aumento do sono, redução da acuidade visual e alteração da sensibilidade auditiva, ocorridas durante o período de escuro do ciclo. Estes fatores estariam contribuindo para ausência de habituação verificado no período de escuro do ciclo.

Sabemos que o nível de atenção tem um papel crítico em processos de aprendizagem. Segundo Buwalda *et al.* (1995), uma forma de avaliar o grau de atenção é pela resposta de imobilidade comportamental à uma repentina diminuição de ruído. Quanto maior o grau de imobilização, maior o nível de atenção. Em nosso experimento durante a fase escura da situação CE, conforme

já citado acima, os animais respondiam com comportamentos PRÉ, EXP, e também com outras categorias comportamentais (locomoção, manutenção). Tais comportamentos aconteciam tanto durante como nos intervalos entre os estímulos. O fato dos animais não reduzirem a atividade comportamental, no intervalo entre estímulos pode sugerir que o grau de atenção dos animais durante esta fase era menor, fato este que dificultou o aprendizado em questão.

Interessante ainda, foi verificar que durante a fase clara da situação CE obtivemos no grupo das 15h a maior velocidade de redução de respostas EXP intra-sessão, sugerindo uma melhor memória de curta duração nesse horário. A análise estatística mostrou, ainda um significativo efeito de sessão, já citado anteriormente, efeito este que evidencia memória de longa duração. Assim, a redução no nível inicial de respostas (comparação entre o primeiro bloco das duas sessões), bem como diferença inter-sessão no grupo das 6h podem ser indicativos de uma melhor memória de longa duração neste horário.

Trabalhos com mamíferos têm indicado alterações rítmicas na circuitaria neural envolvida com mecanismos de memória e aprendizagem (Valentinuzzi, 1999). Já se demonstrou, por exemplo, que os núcleos da rafe e os núcleos cerúleos produzem serotonina e noradrenalina, respectivamente, com um padrão rítmico, devendo, portanto, receber informações do relógio biológico. Estes dois núcleos enviam projeções ao hipocampo, estrutura que participa de processos de aprendizagem (Gray, 1995; Loughlin *et al.*, 1986). Por outro lado, estes dois neurotransmissores afetam mecanismos celulares essenciais para a potenciação

a longo prazo (LTP), que se têm sugerido como uma das bases fisiológicas da aprendizagem (Rosenzweig, 1996) e um indicativo da plasticidade sináptica.

Ritmo circadiano de excitabilidade neural no giro denteado do hipocampo, em ratos, também tem sido descrito (Barnes *et al.*, 1977; Cauller *et al.*, 1981). Assim, foi verificado que a quantidade de potenciais pós sinápticos excitatórios é maior durante a noite do que durante o dia, e que estas mudanças não se devem a fatores ambientais como luz, temperatura ou barulho ambiental. Harris & Teyler (1983) registraram LTP em fatias do giro denteado e área CA1 do hipocampo de ratos, em diferentes horas do dia. Foi observado mais LTP no giro denteado durante a noite do que durante o dia, enquanto que na área CA1 ocorreu o contrário. Estes dados foram interpretados como indicativos de que LTP pode ser o substrato da estocagem de informações de longo-prazo no cérebro, e portanto estaria reduzido no giro denteado durante o período de inatividade do animal, pois esta área não estaria relacionada com a codificação de memória ativa. O aumento de LTP na área CA1 refletiria aspectos da consolidação de informações adquiridas recentemente.

Não poderíamos deixar de considerar, ainda, que os resultados obtidos na situação CE possam ser resultado de mascaramento, antes do que um ritmo circadiano de aprendizado. Sabemos que o ciclo claro-escuro pode atuar como um mascarador externo. Aschoff (1987) medindo a temperatura cerebral em galinhas submetidas a um ciclo CE de 12h: 12h, detectou um ritmo com abruptos aumentos e diminuições de temperatura no momento de ligar e desligar as luzes, resultando numa onda quadrada, que contrastava com aquela obtida em condições de livre-

curso que possui um padrão senoidal, com uma amplitude de oscilação muito menor. Segundo Aschoff (1987) 33% da oscilação em condições de CE são resultados de mascaramento.

Valentinuzzi (1999) analisou a habituação de respostas locomotoras em camundongos C57BL/6J expostos a um campo aberto, utilizando-se de duas condições de luminosidade: ciclo claro-escuro 12h:12h (CE) e fotoperíodo esqueleto. Esse protocolo experimental visa eliminar os efeitos diretos do ciclo claro escuro. Assim, os animais eram retirados da condição CE e durante 3 dias eram mantidos num ciclo de 12h de luz branca (400lux) e 12h de luz verde, logo após passavam a receber 0,25h de luz branca, 11,5h de luz verde, 0,25 de luz branca e 12h de luz verde. Seus resultados indicaram que na condição CE, camundongos manifestavam um ritmo diurno da reatividade ao campo aberto, com maiores níveis de locomoção durante o período escuro do ciclo. Verificou ainda que a habituação a longo prazo dessa resposta aconteceu durante a fase clara, enquanto que a habituação a curto-prazo ocorreu apenas na fase escura. Por outro lado, em condições de fotoperíodo esqueleto, não foi observado nenhum efeito de fase no comportamento em teste de campo aberto. Os níveis de ambulação, assim como a habituação a curto e a longo-prazo, foram iguais tanto na fase ativa como na fase inativa. Esta autora discute os dados levantando duas questões interessantes: (a) sugere que a ativação comportamental produzida pela exposição a um campo aberto e a habituação a este contexto não manifestam ritmo circadiano. Os ritmos observados durante a situação CE podem ser efeito de mascaramento. Ou seja, só em condições de claro-escuro foi possível observar

uma variação temporal nesses processos, o que sugere que os ritmos observados são apenas respostas às flutuações diárias de iluminação externa; e (b) porém ressalta que a sensibilidade do método de medida utilizado no campo aberto (medida manual com distância entre as linhas utilizadas para quantificar os cruzamentos de 20cm), não tenha sido suficiente para detectar um efeito temporal no processo de habituação ao contexto nessa situação experimental, uma vez que em um outro experimento realizado utilizando-se o mesmo período fotoesqueleto, a habituação ao contexto mostrou um componente temporal.

Um possível efeito mascarador do próprio estímulo apresentado, ou seja o som, deve também ser discutido. O som quando apresentado durante à noite, poderia ter seu valor biológico aumentado. O significado de um estímulo, depende da bagagem genética (história filogenética) do animal, bem como, da aprendizagem prévia (história ontogenética) e das características do ambiente, que nesse caso seriam as condições de iluminação. A diferença observada entre os horários de claro e escuro no nosso experimento podem ser devido a um maior padrão de atividades dos pombos testados à noite em função de um maior significado do estímulo auditivo, o que estaria determinando mais reatividade ao estímulo sonoro durante as sessões noturnas.

A habituação a sons em pombos expostos a situação CC foi realizada visando investigar os efeitos do ciclo claro-escuro no processo de habituação, bem como o papel da MEL em tal tipo de aprendizagem. Os nossos resultados demonstraram que a variação diurna no processo de habituação, em função da hora do dia, bem como a interação entre horário e sessão não foram verificados

quando os pombos foram expostos à situação, em nenhuma das categorias comportamentais estudadas. Com relação à categoria EXP excetuando-se a primeira sessão das 21h e 24h todos os demais grupos habituaram. Apesar disso, não foram verificadas diferenças na velocidade de redução de respostas ao longo das 24h do dia. O mesmo ocorreu com relação aos comportamentos PRÉ.

Análise das curvas médias de respostas, exibidas por estes sujeitos demonstram alguns dados interessantes. Os animais testados nos horários do dia subjetivo apresentaram um comportamento muito semelhante aquele verificado na situação CE, quando a categoria EXP foi analisada. Todos exibiram uma curva de respostas típicas de habituação, mostrando aceleração negativa. Verificamos que na primeira sessão, os grupos das 15h e 12h atingiram CRC quando 40 estímulos sonoros haviam sido aplicados, enquanto que, às 6h e 9h foram necessários 45 estímulos. Durante a segunda sessão, todos os grupos reduziram o número de blocos atingindo o CRC mais rapidamente. O grupo das 6h, foi o que mais demorou para chegar a este critério (40 estímulos), seguido pelos grupos das 9h (35 estímulos), 12h e 15h (25 estímulos). Embora estes dados estejam de acordo com os três primeiros princípios de Thompson & Spencer (1966), não foram encontradas diferenças estatísticas significativas inter e intra-sessões durante o dia subjetivo.

Nos testes realizados durante a noite subjetiva, a análise das curvas médias de respostas de EXP indicaram uma situação diferente daquela verificada durante o dia subjetivo e durante a noite em CE. No grupo das 18h, embora tenha ocorrido habituação nas 2 sessões experimentais, o CRC na primeira sessão foi

atingido apenas no último bloco. O grupo das 21h e 24 não atingiram o CRC, durante a primeira sessão. O grupo das 3h habitou nas duas sessões atingindo CRC no bloco 1 e 3 respectivamente. A comparação do nível inicial de respostas (para o grupo das 18h) e a diferença inter-sessões, verificadas as 18h, 21h, 24h e 3h (o que provavelmente justifique o efeito de sessão encontrados) sugerem melhor memória de longa duração nestes horários. Como ocorreu com o dia subjetivo, não foram encontradas diferenças na velocidade de redução comportamental nos diferentes grupos da noite subjetiva.

A análise dos comportamentos pertencentes à categoria pré-exploratória indicaram que a habituação ocorreu em todos os horários com as curvas médias de resposta mostrando aceleração negativa típica deste processo, como ocorreu em CE. A comparação entre o nível inicial médio de respostas inter-sessões indicou diferenças significativas nos grupos das 6h, 12h, 15h, 18h, 21h, 24h e 3h. Foi verificado, ainda, efeito de sessão, quando se comparou as sessões como um todo, embora o teste *post-hoc* tenha mostrado diferenças apenas no grupo das 6h.

Os resultados obtidos durante a situação CC, para os comportamentos EXP, podem sugerir que o ciclo claro-escuro tenha um efeito significativo na habituação a estímulos sonoros. O fato de ainda verificarmos ausência de habituação em alguns horários da noite subjetiva durante a primeira sessão pode ser devido ao pouco tempo de exposição à luz constante. Assim, durante a situação CC, o ritmo de aprendizagem estaria se manifestando com uma amplitude menor em relação aos animais da condição CE, devido à ausência do ciclo claro-escuro que poderia estar atuando como agente mascarador.

Valentinuzzi & Ferrari (1997), também verificaram desaparecimento da grande diferença noite-dia no processo de habituação a sons em pombos quando os mesmos foram expostos a claro constante.

Devemos ressaltar contudo, que em pombos, como citado acima, a pineal e a retina são osciladores importantes. Assim, a exposição à luz constante pode alterar a organização circadiana dessas aves. Os dados do experimento II demonstraram que exposição a 24h de luz constante além de interromper o ritmo de MEL plasmático reduzindo sua produção a concentrações basais, também reduz as concentrações basais de MEL plasmática durante os horários do dia subjetivo. A habituação de comportamentos EXP a estímulos sonoros verificados durante a noite subjetiva da situação CC, assim como, a verificação de que nesta situação as aves atingiram o CRC nos grupos testados durante o dia subjetivo em blocos inferiores àqueles verificados na situação CE (excetuando-se a primeira sessão das 15h) nos levou a sugerir que a alteração da luminosidade provocou uma facilitação no processo de habituação. Ou seja, é possível que a ausência de variação temporal na habituação observada na situação CC seja resultado da supressão do ritmo de MEL.

A redução das concentrações plasmáticas de MEL poderia estar atuando aumentando o alerta, (durante a situação CC entre uma estimulação e outra o animal permanecia na maior parte do tempo parado), eliminando o sono, reduzindo a sensibilidade auditiva, melhorando o processamento visual, facilitando assim, a ocorrência de habituação. Experimentos futuros com infusão de MEL

durante os horários de claro do ciclo claro-escuro precisariam ser realizados para verificar o efeito do hormônio em tal tipo de aprendizado, testando esta hipótese.

Os nossos resultados evidenciaram que o processo de habituação não é determinado apenas pelas características do estímulo apresentado, uma vez que, o mesmo estímulo foi apresentado para todos os animais, e resultados diferentes foram observados. Esse tipo de aprendizagem é afetado pelas interações entre o estímulo e as condições bioquímicas/fisiológicas do animal. Tais condições são determinadas pela história filogenética e ontogenética da espécie e influenciadas pelo meio ambiente. Se a maioria das variáveis bioquímicas e fisiológicas de um organismo possui padrões rítmicos, então o processo de habituação aqui estudado pode também ser “regido” por esta organização temporal.

Assim, o presente estudo sugere que a habituação a estímulos sonoros envolve interações entre as características do estímulo, modulação circadiana de condições bioquímicas/fisiológicas e comportamentais do organismo. E acrescenta novas informações a respeito da possível relação entre variação endógena e ambiental desse tipo de processo de aprendizagem não associativa.

DISCUSSÃO GERAL

O conjunto de dados dos Experimentos I, II e III são importantes na medida em que permitem analisar os substratos hormonais da variação de atividade geral e de processos de habituação do comportamento exploratório a estimulação acústica ao longo das 24h, relacionando as variações diurna-noturna no comportamento e nas concentrações de MEL e B plasmáticas.

No Experimento I, os resultados indicaram variação de comportamento na situação CE ao longo das 24h do dia e maior freqüência de comportamentos durante a fase clara, do ciclo claro-escuro, se comparado à freqüência de comportamentos durante a fase escura. Além disso, foi verificado que nos horários do acender e apagar das luzes ocorreu aumento na freqüência comportamental de EXP, LOC MOV e INT. Esses dados foram interpretados como indicativos de que a alteração abrupta da luminosidade poderia introduzir um efeito de mascaramento sobre ritmos comportamentais exibidos por esses sujeitos. Assim, experimentos realizados nos horários já citados podem ter resultados modificados por esta alteração comportamental. A alteração da distribuição de freqüências de categorias comportamentais na situação de claro constante e a distribuição homogênea de comportamentos ao longo das 24h, exceto para os horários de 24h e 3h, forneceram evidências a favor do papel do fotoperíodo como um *zeitgeber* para os ritmos comportamentais.

Se os ritmos biológicos de um mesmo organismo costumam apresentar uma relação de fase característica entre si (Marques *et al.*, 1997) então podemos

supor que a variação de comportamentos ao longo das 24h na situação CE, além de estar sincronizada à alternância da fase de claro e de escuro do ciclo claro-escuro, estaria sincronizada com outros ritmos fisiológicos e bioquímicos. Na situação CC, a ausência do sincronizador externo alteraria a distribuição comportamental e a variação cíclica de outras variáveis fisiológicas, tais como os níveis hormonais.

Durante a situação CC, pelo menos dois hormônios sofreriam alterações mais drásticas: a MEL e a B. As relações entre variações na ritmicidade comportamental e as concentrações plasmáticas desses hormônio foram discutidas no Experimento II.

Como citado na introdução deste trabalho variações comportamentais, bem como, alterações bioquímicas e fisiológicas ao longo das 24 horas são comuns a todas as espécies de animais. Trabalhos relacionando ritmos comportamentais e concentrações de MEL plasmáticas, em aves, têm fornecido um conjunto de dados de interesse para a análise da organização temporal do comportamento. Existem, também, dados que sugerem que a MEL poderia estar atuando modulando a atividade da adrenal. Khan *et al.* (1990) postularam que a glândula pineal teria um importante papel na modulação do estresse e que a MEL atuaria como um hormônio anti-estresse. Assim o Experimento II discutiu questões referentes aos tipos de interações modulatórias entre a MEL, B e a variação diurna-noturna dos níveis de AG. Os resultados deste experimento: (a) confirmaram observações prévias que indicam uma relação inversa entre a ocorrência de comportamentos e as concentrações plasmáticas de MEL, em

pombos expostos à situação CE (Ebihara et al., 1984; Oshima et al., 1989); (b) reforçaram a importância do ciclo claro-escuro como agente sincronizador dos comportamentos; (c) replicaram dados da literatura indicando maior AG na fase clara da situação CE se comparados com os horários de escuro, bem como, uma distribuição mais homogênea de AG ao longo das 24h na situação CC; (d) indicaram que a luz constante de 300 lux por apenas 24h foi eficiente para causar interrupção da secreção rítmica de MEL, reduzir a secreção de MEL a concentrações inferiores às basais durante o dia subjetivo da condição CC, e elevar as concentrações plasmáticas de B .

Apesar dos resultados do Experimento II evidenciarem que durante a situação CC existiu um aumento de AG não foram demonstradas diferenças significativas entre AG da situação CC se comparadas a CE. Estes resultados foram explicados considerando-se: (a) ausências de picos comportamentais às 6h e 18h na situação CC; (b) tempo de exposição ao claro constante, que embora tenha sido suficiente para interromper o ritmo de MEL plasmático e reduzir as concentrações basais do hormônio, não foi suficiente para aumentar de maneira significativa a emissão de comportamentos; (c) modulação mais complexa envolvendo outras relações entre um maior número de osciladores internos.

Convém ressaltar que o sistema circadiano de aves, formado por pelo menos quatro estruturas, quais sejam, os olhos, pineal, vNSQ e fotorreceptores encefálicos, possui um sistema de interação complexo. Este, segundo o modelo proposto por Cassone & Menaker (1984), envolve um sistema de regulação neuroendócrino. Segundo estes autores este sistema sincroniza os múltiplos

osciladores e mantêm a estabilidade e a precisão do sistema circadiano. Assim, durante o dia subjetivo o vNSQ inibiria a pineal e os osciladores oculares através de uma via neural e durante a noite subjetiva a MEL liberada pela pineal atuaria no vNSQ inibindo-o. Segundo Gwinner *et al.* (1997) a ausência de MEL poderia provocar alterações em todo os sistema circadiano de aves.

Deve ser lembrado que: (a) uma das possíveis funções da MEL é a de modular as reações fisiológicas de defesa e adaptação à síndrome do estresse (Persengiev & Kanchev, 1991); (b) na situação CC a quantidade de B se eleva, sugerindo um maior estresse sofrido pela exposição à luz aguda; (c) a B, assim como a MEL vem sendo relacionada com aumento de quietude e de emissão de comportamentos em pombos. É lógico, então, justificar a ausência de diferenças na AG quando se compara a situação CE com a CC, postulando que o aumento da taxa de respostas comportamentais esperados após a redução de MEL não ocorreu, pois o aumento de B anulou tal efeito.

Os resultados do Experimento III também podem ser discutidos levando-se em conta a interação entre comportamentos, MEL e B.

Em seu conjunto, os dados do Experimento III foram importantes na medida em que: (a) demonstraram o processo de habituação das respostas EXP e PRÉ a estímulos sonoros em pombos, replicando dados da literatura (Toledo & Ferrari, 1991; Valentinuzzi & Ferrari, 1997); (b) mostraram uma variação ao longo das 24 horas do dia na habituação da resposta EXP a estímulos sonoros em pombos, ampliando os dados obtidos por Valentinuzzi & Ferrari (1997).

O fato dos animais terem habituado somente na fase clara do ciclo claro-escuro na situação CE, somado ao fato da menor velocidade de habituação em alguns horários da noite subjetiva na situação CC (21h e 24h), sugere uma organização temporal da aprendizagem de habituação da exploração ao som. No entanto, caracterizar ritmos circadianos de aprendizagem não é uma tarefa fácil. Inúmeras variáveis externas e internas, tais como o ciclo claro-escuro e o ritmo circadiano de atividade-reposo, podem interferir em processos de aprendizagem o que dificulta o controle das condições experimentais.

No Experimento III observamos que os pombos expostos à situação CE apresentavam comportamentos aparentemente deslocados. Assim, nos testes realizados no período de escuro do ciclo claro-escuro, os pombos andavam, circulavam, bocejavam, coçavam, limpavam, defecavam, sacudiam o corpo, vocalizavam e espreguiçavam. Os pombos testados durante a fase clara da situação CE não apresentavam esses comportamentos. Estas observações estariam indicando que o estado do animal não é o mesmo ao longo das 24h do dia e, conseqüentemente, as respostas frente à mesma estimulação também apresentam diferenças.

A diferença verificada quando se compara a fase clara com a escura da situação CE pode ainda ser devida ao valor biológico ou funcional do som. Assim, as condições de luminosidade poderiam interferir no valor do estímulo, ou seja, 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. Isso poderia explicar a dificuldade de habituação nos horários de escuro do ciclo claro-escuro (Valentinuzzi & Ferrari, 1997).

A variação temporal da aprendizagem pode ser gerada por um dos relógios do sistema circadiano de aves, ou pela interação dos mesmos, ou ainda, pela interação das numerosas variáveis fisiológicas que flutuam ao longo das 24h.

Durante a situação CC, a presença de claro constante determinou a interrupção da secreção rítmica de MEL e redução das concentrações de MEL plasmáticas. As alterações poderiam responder pela menor diferença de aprendizado entre o dia subjetivo e a noite subjetiva verificada nessa situação. Se: (a) a ausência de MEL provoca alterações em todo o sistema circadiano de pombos (Gwinner *et al.*) e (b) conforme discutido anteriormente (Cassone, 1990, Cassone *et al.*, 1995) receptores de MEL estão amplamente distribuídos no encéfalo de pombos, indicando que estruturas encefálicas seguramente respondem ao padrão circadiano de MEL, a ausência de MEL rítmica poderia deixar de afetar essas estruturas verificando-se, então, a perda do padrão circadiano. Isso resultaria num padrão menos evidente dos ritmos circadianos ou numa dessincronização entre eles. Por outro lado, poderia ser postulado que a presença do hormônio, durante a fase escura do ciclo claro-escuro, poderia responder pela ausência de habituação verificada nos horários de escuro da situação CE.

Deve ser ainda considerado que os animais expostos à situação CC podem estar sob efeito de estresse. 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. Sabemos que em aves concentrações de B aumentam frente a uma variedade de estímulos estressantes tais como: aumento ou diminuição de temperatura (Harvey *et al.*, 1884; Pilo *et al.*, 1985) privação de água e comida (Harvey *et al.*, 1980), captura e manipulação (Wingfield *et al.*, 1982), alterações nas condições de luminosidade (Joseph & Meier, 1973, Rintamäki *et al.*, 1986; Westerhof, *et al.*, 1994), 24h de luz constante (Experimento II). No Experimento III, na situação CC, temos presentes dois fatores que poderiam estar contribuindo para o aparecimento do estresse e conseqüente aumento na produção de B, mudança no ciclo claro-escuro e redução de MEL plasmática. Existem experimentos que indicam que um aumento de B plasmática, causado por estresse moderado, promovem alterações facilitatórias na capacidade de aprendizagem (Lupien & McEwen, 1997, Griffin, 1989, Loscertales *et al.*, 1997; Sandi & Rose, 1997; 1994 a, b). Além disso, como discute Valentinuzzi (1999) há evidências de que a B plasmática possa regular mecanismos celulares essenciais aos processos de LTP (Dana *et al.*, 1984). Neurônios do hipocampo de ratos possuem grande concentração de receptores específicos para a B e assim, a atuação cíclica do hormônio nesses receptores poderia mediar, direta ou indiretamente, processos de plasticidade neural envolvidos com a aprendizagem (Hall, 1982). Efeitos modulatório de B em LTP também foram observados em aprendizagem associativa e memória espacial (Lupien & McEwen, 1997).

Experimentos realizados com pintinhos recém-nascidos têm demonstrado que hormônios esteróides, como a B, atuam em receptores específicos cerebrais e promovem alterações sinápticas que melhoram o desempenho em esQUIVA passiva (Sandi & Rose, 1994 a e b; 1997). Recentemente Loscertales *et al.* (1997), investigaram memória de longa duração em pintinhos recém-nascidos, após a administração periférica de drogas que inibem (aminogluthimide e metyrapone) a secreção de B. Segundo os autores, existem experimentos que relatam que pintinhos recém-nascidos têm uma tendência inata de bicar objetos salientes no ambiente. Esse comportamento foi analisado colocando no chão da gaiola contas brancas e contas embebidas com uma substância (methylantranilate) que causam aversão condicionada pelas contas. No teste, 24h após o treino, foram colocadas na gaiola apenas as contas coloridas e o número de bicadas antes e depois do treino foi comparado. Existiam 3 grupos: um grupo controle que recebeu apenas veículo, outros dois grupos que receberam as drogas que bloqueavam a síntese de B. As injeções foram dadas intraperitonealmente, 60 minutos antes do treinamento. Os animais que sofreram inibição da síntese e secreção de B apresentaram um alto nível de respostas de bicar no teste, mostrando baixa retenção das informações aprendidas. Os autores sugeriram que a B teria um importante papel na aquisição e na manutenção deste tipo de aprendizado.

Os dados acima nos levam a sugerir que as alterações de B plasmática na situação CC poderiam estar contribuindo para o melhor desempenho ao longo das 24 horas. Podemos postular ainda, que as interações entre as concentrações de

B e MEL poderiam ter um papel relevante nas características do processo de habituação observadas no Experimento III. As relações entre os aumentos nas concentrações de B, observadas na situação CC, correlacionadas com a diminuição das concentrações de MEL, e o desaparecimento do seu ritmo característico, registradas no Experimento II, refletiriam uma interação entre as variações cíclicas desses hormônios. Essa interação endócrina caracterizaria processos de regulação hormonal sobre o sistema temporal. Essa interação garantiria a eficiência dos sistemas de ritmicidade endógena do organismo. As interações desse substrato hormonal e os sistemas neurais de ritmicidade biológica resultariam na modulação do comportamento e da aprendizagem de habituação ao longo das 24h.

Para estudar melhor o papel da B e da MEL nas características do processo de habituação, seria interessante realizar experimentos onde estes hormônios fossem administrados. A manipulação das concentrações plasmáticas de MEL e B, por administração exógena durante as fases do ciclo claro-escuro, ou durante as 24h em situação CC ou em escuro constante, e a análise da resposta exploratória frente a um estímulo acústico repetitivo, ao longo das 24h do dia, poderiam auxiliar no entendimento dos processos e mecanismos característicos das interações entre o substrato neuro-hormonal e a organização temporal da aprendizagem.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMO, N. I., & BENNETT, T. L. The effect of hyperstriatal lesions on head orientation to a sound stimulus in chickens. Experimental Neurology, v. 19, p.166 - 175, 1967.
- AGUÍLAR-ROBLERO, R. & DRÚCKER-COLIN, R. The role of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals. Bol. Estud. Med. Biol., v. 35, n. 1-2, p. 35 - 51, 1987.
- AMIR, S & STEWART, J. Resetting of circadian clock by a conditioned stimulus. Nature, v. 379, p. 542-545, 1996.
- ANDRADE, M. M. M. Padrões temporais das expressões da sonolência em adolescentes. São Paulo, Brasil, 166p. Dissertação de doutorado- Universidade de São Paulo, 1997.
- ANTONIADIS, R. J., MCDONALD, R.J. & RALPH, M.R. Circadian rhythm fragmentation predicts learning impairment in aged hamsters. V Latin American Symposium of Chronobiology, p. 20, 1999.

ARAUJO, J. F. Intermodulação de frequências: Modelo funcional para a organização dos seres vivos. Master's thesis, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, (1995).

ARAUJO, J. F & MARQUES., N. Circadian and ultradian rhythms of drinking behavior of albino rats maintained in constant darkness. Brasilian Journal of Medic. and Biol. Reser., v. 29, p. 1369-1372, 1996.

ASCHOFF, J. Masking of circadian rhythms by *Zeitgerbs* as opposed to entrainment. In: HEKKENS, W. TH, J. M., KERKHOF, G. H. & RIETVELD, W. J. (ed), Trends in Chronobiology, Peargamon Press, p. 149-161, 1987.

_____. Exogenous and endogenous componentes in circadian rhythms. Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol., v. 25, p. 11-28, 1960.

_____. Zeitgeber der Tierischen Tagesperiodik. Naturwisseuschaften, v. 41, p. 49-56, 1954.

_____. Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter Konstanten Umwelbedingungen. Naturwisseuschaften, v. 38, p. 506-507, 1951.

AVERS, C. J. Process and pattern in evolution. New York: Oxford University Press, 1989.

BARNES, C. A. , MCNAUGHTON, B. L., GODDARD, G. DOUGLAS, R. M. & ADAMEC, K. Circadian rhythm of synaptic excitability in rat and monkey central nervous system. Science, v. 197, 91-92, 1977

BENOWITZ, L. Functional Organization of the Avian Telencephalon. In: Sven O. Ebbesson, Comparative Neurology of the Telencephalon. Plenum Press, New York, 1980.

BENOWITZ, L. & LEE-TENG, E. Contrasting effects of three forebrain ablations on discrimination learning and reversal in chicks. J. Comp. Physiol. Psychol., v. 84 p. 391 - 397, 1973.

BELDHUIS, H. J. A., DITTAMI, J. P., & GWINNER, E. Melatonin and the circadian rhythms of feeding and perch-hopping in the European starling. *Sturnus vulgaris*. J. Comp. Physiol., v. A 164, p. 7-14, 1988.

BERGER, R. J. & PHILLIPS, N. H. Continuous bright light suppresses circadian rhythms of body temperature and sleep in fed and fasted pigeons. In MERCER, J. B. (Ed.). Thermal physiology, Excerpta Medica, Amsterdam, p. 673-678, 1989.

BERLYNE, D. E. Curiosity and Exploration. Science, v. 15 p. 25 - 33, 1960.

BINKLEY, S. Comparative pineal endocrinology: birds, reptiles, amphibians, fish and non-vertebrates. In BINKLEY, S. (ed). The Pineal: Endocrine and nonendocrine Function. Prentice Hall, Englewood Cliffs, Nj , P. 242-261, 1988.

BINKLEY, S., KLUTH, E. & MENAKER, M. Pineal function in sparrows: circadian rhythms and body temperature. Science, V. 174, p. 311-314, 1971.

BINKLEY, S., RIEBMAN, J. B. & REILLY, K. B. The pineal gland: a biological clock in vitro. Science, v. 202, p. 1198-1201, 1978.

BOISSIN, J. & ASSENMACHER, I. Rythmes circadiens des taux sanguin et surrénalien de la corticostérone chez la caille. C. R. Acad. Sci. Ser. D v. 267, p. 2193-2196, 1968.

BOLLES, R. C. Species - specific defense reactions and avoidance learning. Psychological Review ,v.77, p. 32 - 48, 1970.

BRADLEY, E. A. & YOUNG, J. Z. Are there circadian rhythms in learning by *Octopus*? Behavioral Biology, v. 13 p. 527 - 531, 1975.

BUTTEMER, W. A. , LEE, B., ASTHEIMER & WINGFIELD, J. C. The effect of corticosterone on standard metabolic rates small passerine birds. Comp. Physiol. B, v. 161, p. 427-431, 1991.

BUZSAKI, G. The "where is it?" reflex: Autoshaping the orienting response. Journal Exp. Anim. Behav., v. 37, p 461 - 484, 1982.

BUWALDA, B. NYAKAS, C. VOSSELMAN, H. J. & LUITEN, P. G. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotions in rats. Behavioural Brain Research, v. 67, n. 1, p. 85-90, 1995.

CARDINALI, D. P. Melatonin. A mammalian pineal hormone. Endocr. Rev., v. 2, p. 327-346, 1981.

CASSONE, V. M. Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. Trends in Neuroscience, v. 13, n. 11, p. 457-464, 1990.

CASSONE, V. M., BROOKS, D. S. Sites of melatonin action in sparrow brain. J. Exp. Zool., v. 260, p 309-311, 1991.

CASSONE, V. M., BROOKS, D. S., KELM, T. A. Comparative Distribution of ²[125I] Iodomelatonin Binding in the Brains of Diurnal Birds: Outgroup Analysis with Turtles. Brain Behav. Evol., v. 45, p. 241-256, 1995.

CASSONE, V. M., FORSYTH, A. M. & WOODLEE, G. L. Hypothalamic regulation of circadian noradrenergic input to the chick pineal gland. J. Comp. Physiol. A, v. 167, p. 187-192, 1990.

CASSONE, V. M. & MENAKER, M. Is the avian circadian system a neuroendocrine loop?. J. Exp. Zool., v. 232, p. 539-549, 1984.

.....
_____. SYMPATHETIC REGULATION OF CHICKEN PINEAL RHYTHMS, Brain Res., v. 272, p. 311-317, 1983.

CASSONE, V. M. & MOORE, R. Y. Retino-hypothalamic projections and suprachiasmatic nucleus of the house sparrow, *Passer domesticus*. J. Comp. Neurol., v. 266, p. 171-182, 1987.

CASSONE, V. M., SPEH, J. C., CARD, J. P. & MOORE, R. Y. Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. J. Biol. Rythms., v. 3, p. 71-91, 1988.

CATANIA, A. C. Aprendizagem: Comportamento, linguagem e cognição. 4^a ed. Artmed editora. Porto Alegre, p. 1-467, 1999.

.....
CAULLER, L. J. BOULOS, Z. & GODDARD, G. V. Contravarying circadian rhythms of EPSP and populaton spike in hippocampal dentale gyrus and their relation to state. Soc. Neurosci. Abstr., v. 7, p. 18., 1981.

CHABOT, C. C. & MENAKER, M. Effects of physiological cycles of infused melatonin on circadian rhythmicity in pigeons. J. Comp. Physiol. A, v. 170, p. 615-622, 1992.

_____ Environmental and endogenous control of feeding and perch hopping rhythmicity in the house sparrow. Soc. Neurosci. Abstr., v. 13, p. 1038, 1987.

CHABOT, C. C. & TAYLOR, D. H. Circadian modulation of the rat acoustic startle response. Behavioral Brain Research, v. 32, p. 81-88, 1992.

CHAMPNEY, T., CRAFT, S., WEBB, J. & REITER, R. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and hamsters: Effect of adrenalectomy and corticosterone implants. J. Neural. Transm., v. 64, p. 67-79, 1985a.

CHAMPNEY, T., STEGER, R., CHRISTIE, O & REITER, R. Alterations in components of the pineal melatonin synthetic pathway by acute insulin stress in the rat and Syrian hamster. Brain Res., v. 338, p. 25-32, 1985b.

CHAN, S. W. C. & PHILLIPS, J. G. Circadian variation in activity of the duck (*Anas platyrhynchos*) adrenal gland. Gen. Comp. Endocrinol., v. 20, p. 291-296, 1973.

CIPOLLA-NETO, J., MARQUES, N. & MENNA BARRETO, L. S. (Orgs). Introdução ao Estudo da Cronobiologia. São Paulo, EDUSP, 1988.

CONRAD, C. D. & STUMPFT, W. E. Direct visual input to the limbic system: crossed retinal projections to the nucleus anterodorsalis thalami in the tree shrew. Exp. Brain Res., v. 23, p. 141-149, 1975.

DANA, R. C. & MARTINEZ, J. L. Effect of adrenalectomy on the circadian rhythm of LTP. Brain Research, v. 308, p. 392-395, 1984.

DARWIN, C. Expression of the Emotions in Man and Animals. London, Murray, 1872.

DAVIES, J. A., NAVARATRA., V. & REDFERN, P. H. A 24-hour rhythm in passive-avoidance behavior in rats. Psychophysiology (Berl), v. 32, p. 211-214, 1973.

DAVIS, M. & GENDELMAN, P. M. Plasticity of the acoustic startle response in the acutely decerebrate rat. Journal of Comparative Physiology and Psychology, v. 91, n. 3, p. 549 - 563, 1977.

DEGUCHI, T. Circadian rhythm of serotonin N-acetyltransferase activity in organ culture of chicken pineal gland. Science, v. 203, p. 1245-1247, 1979.

DELIUS, J. D. A stochastic analysis of the maintenance behaviour of skylarks. Behaviour., v. 33, p. 137-178, 1969.

DIJK, D. J., DUFFY, J. F. & CZEISLER, C. A Circadian and sleep/wake dependent aspects of subjective alertness and cognitive performance. Journal of Sleep Research, v. 1, p. 112 - 117, 1992.

DOLLINS, A. B., LYNCH, H. J. WURTMAN, R. J. DENG, M. H. KISCHKA, K. U. GLEASON, R. E., & LIERBEMAN, H. R. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature and performance. Physiol. , v. 91, p. 1824-1828, 1994.

_____. Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance. Psychopharmacology, v. 112, 490-496, 1993.

DOLLINS, A. B., YNCH, H. J., WURTMAN, R. J., *et al.* Effects of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood and performance. Psychopharmacology, v. 112, p. 490-496, 1993.

EASTMAN, C. & RECHTSCHAFFEN, A. Circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. Physiol. Behav., v. 31, p. 417-427, 1983.

ENGELAGE, J. & BISCHOF, H. J. The organization of the tectofugal pathway in birds: a comparative review. In: Vision, Brain and Behavior in Birds. ZEIGLER, H. P. & BISCHOF (Eds.). MIT Press. Cambridge, MA, p. 137-158, 1993.

EBIHARA, S. & KAWAMURA, H. The role of pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of circadian locomotor rhythms in the Java sparrow. *Padda oryzivora*. J. Comp. Physiol, v. 141, p. 207-214, 1981.

EBIHARA, S., UCHIYAMA, K., YAMADA, H. GOTO, M. & SATO, K. Circadian organization in the pigeons. *Columba livia*: In: Comparative Aspects of circadian clocks. T. Hiroshige and K. Nonaka, eds., p. 84-94, 1987. Hokkaido University Press. Sapporo, Japan.

EBIHARA, S., UCHIYAMA, K. & OSHIMA, I. Circadian organization in the pigeon, *Columba livia*: the role of the pineal organ and the eye. Comp Physiol A, v. 154, p. 59-69, 1984.

ESKES, G. A. Functional significance of daily cycles in sexual behavior of the male golden hamster. In: ASCHOFF, S. DAAN, G. G. (Eds). Vertebrate Circadian Systems. Berlin, Springer-Verlag, p. 345-353, 1982.

FARR, A., PATERSON, A. T. & VICKERS, C. Seasonal variation in the learning capacity of goldfish. J. Physiol. (Lond). v. 289, p. 62-62, 1979.

FERRARI, E. A. M. Repertório comportamental de pombos em cativeiro - Simpósio sobre Psicologia de Aves. XXXIV Reunião Anual da SBPC, Campinas, SP: não publicado, 1982.

FERRARI, E. A. M., VALENTINUZZI, V. S. & SOUZA, C. M. Z. Ritmicidade biológica e a organização temporal da aprendizagem. Lecta, v. 15, n. 1 e2. p. 185-200, 1997.

FERRARI, E. A. M., TODOROV, J. C. & GRAEFF, F. G. Nondiscriminated avoidance of sckock by pigeons pecking a Key. Journal of the Experimental Analysis of Behavior, v. 19, p. 211 - 215, 1973.

FERSTER, C. B. & SKINNER, B. F. Schedules of reinforcement. New York: Appleton Century, Crofts., 1958.

FILE, S. E., Long-term retention of behavioral habituation in the rat. Animal Behav., v. 21, p. 585-589, 1973.

FOA, A. & MENAKER, M. Contribution of pineal and retinae to the circadian rhythms of circulating melatonin in pigeons. J. Comp. Physiol. A, v. 64, p. 25-30, 1988.

FOLKARD, S. Circadian performance rhythms: some practical and theoretical implications. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., v. 327, p. 543-553, 1990.

FOLKARD, S. & MONK, T. H. Shiftwork and performance. Hum. Fact. v. 21, p. 483-492, 1979.

FOLKARD, S., MONK, T. H., BRADBURY, R. & ROSENTHALL, J. Time of day effects in school children's immediate and delayed recall of meaningful material. Br. Journal Psychol., v. 68, p 45-50, 1977.

FORNEL, A.C.G. Habituação da exploração a sons em pombos (*Columba livia*): Efeitos de ordem de estímulos e de lesões telencefálicas. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas- Fisiologia) - Instituto de Biologia, UNICAMP, 1994.

FOX, J. E. Habituation and prestimulus inhibition of the auditory startle reflex in decerebrate rats. Physiology and Behavior, v. 23, p. 291-294, 1979.

FULLER, C. A., LYDIC, Q., SULZMAN, F. M. ALBERS, H. E., TEPPER, B., MOORE-EDE, M. C. Circadian rhythm of body temperature persists after suprachiasmatic lesion in the squirrel monkey. Am. J. Physiol., v. 241, n. 5, p. 385-391, 1981.

FUNCHS, J. Effects of pinealectomy and subsequent melatonin implants on activity in the house finch (*Carpodacus mexicanus*). J. Comp. Physiol. A, v. 153, p. 414-419, 1983.

FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva. Ribeirão Preto, Brazil: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

GABRIEL, M., SPARRENBORG, S. & KUBOTA, Y. Anterior and medial thalamic lesions, discriminative avoidance learning and cingulate cortical neural activity in rabbits. Exp Brain Res., v. 226, p. 33-42, 1981.

GAMLIN, P.D.R. & REINER, A. The edinger-Westphal nucleus: sources of input influencing accommodation pupilloconstriction and choroidal blood flow. J. Comp. Neurol., v. 306, p. 425-438, 1991.

GÄNSHIRT G. DAAN S. GERKEMA, M. P. Arrhythmic perch hopping and rhythmic feeding of starlings in constant light: Separate circadian oscillators?. J. Comp. Physiol A, v. 154, p. 669-674, 1984.

GASTON, S. & MENAKER, M. Pineal function: a biological clock in sparrows? Science, v. 160, p. 1125-1127, 1968.

GATES, A. I. Variations in efficiency during the day, together with practice effects, sex differences and correlation. University of California Publications in Psychology, v. 2 p. 1- 156, 1916.

GIMENES, M. BENEDITO-SILVA, A. & MARQUES, M.D. Chronobiologic aspects of a coadaptative process: the interaction of *ludwigia elegans* flowers and their more frequent bee visitors. Chronobiol. Int., v. 10, n. 1, p. 20-30, 1993.

GLICKMAN, S. E. & SROGES, R. W. Curiosity in zoo animals. Behaviour, v. 26, p. 151 - 188, 1966.

GOLOMBEK, D. A., CARDINALI, D. & AGUILAR-ROBLERO, R. Mecanismos de Temporização em Vertebrados. In: Cronobiologia: princípios e aplicações. Marques, N & Menna-Barreto, L. (org), Editora da Universidade de São Paulo, 1997.

GOLOMBEK, D. A., CHULUYUN, H.E., KANTEREWICZ, B. I. & CARDINALI, D. P. Increase pineal content coupled to restricted water availability in pavlovian conditioning paradigm in rats. J. neural transm., v. 98, p. 237-246, 1994.

GOODWIN, D. Pigeons and Doves of the world. Bristish Museum (Nat. Hist.) London, England , 1970.

GRAY, J. A. A model of the limbic system and basal ganglia: applications to anxiety and schizophrenia. In: The Cognitive Neurosciences, Gazzaniga, M. S. (ed), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 1995.

GRIFFIN, J. F. T. Stress and Immunity: a Unifying Concept. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 20, p. 263-312, 1989.

GROVES, P. M. & THOMPSON, R. F. Habituation: A dual process theory. Physiological Review, v. 77, p. 419 - 450, 1970.

GÜÉRIN, N., BOULENGUIEZ, S., REINBERG, A., COSTANZO, G. D. GURAN, P. & TOUITOU, Y. Weekly changes in psychophysiological variables of 8- to 10 year-old school girls. Chronobiol. Int., v. 10 , n. 6, p. 471 - 479, 1993.

GÜÉRIN, N., BOULENGUIEZ, S., REINBERG, A., *et al.* Diurnal changes in psychophysiological variables of school girls: comparison with regard to age and teacher's appreciation of learning. Chronobiol. Int., v. 8, n. 2, p. 131-148, 1991.

GÜNTÜRKIIN, O. MICELI, D. & WASANABE, M. Anatomy of avian thalamofugal pathway. In: Vision, Brain and Behavior in Birds. ZEIGLER, H. P. & BISCHOF, H. J. (eds). MIT Press, Cambridge, MA, p. 115-137, 1993.

GWINNER, E. Melatonin in the circadian system of birds: Model of internal resonance. In: Circadian Clocks and Ecology. T Hiroshige and K. Honma. eds., p. 127-153, 1989. Hokkaido University Press. Sapporo. Japan.

_____. Effects of pinealectomy on circadian locomotor rhythms in European starlings. J. Comp. Physiol., v. 126, p. 123-129, 1978.

GWINNER, E. & BENZIGER, I. Synchronization of a circadian rhythm in pinealectomized European starlings by daily injections of melatonin. J. Comp. Physiol., v. 127, p. 209-213, 1978.

GWINNER, E., HAU, M. & HEIGL, S. Melatonin: Generation and Modulation of Avian Circadian Rhythms. Brain Research Bulletin, v. 44, n. 4, p. 439-444, 1997.

GWINNER, E., SUBBARAJ, R., BLUHM, C. K. & GERKEMA, M. Differential effects of pinealectomy on circadian rhythms of feeding and perch hopping in the European starling. J. Biol. Rhythms, v. 2, p. 109-120, 1987.

HALBERG, F. Chronobiology: methodological problems. Acta Medica Romana, v. 18, p. 339-440. 1980.

HALL, E. D. Glucocorticoid effects on central nervous excitability and synaptic transmission. Int. Rev. Neurobiol. v. 23, p. 165-195, 1982.

HAMASSAKI, D. E. & BRITTO, L. R. G. Interhemispheric transfer of habituation in pigeons. Behavioural Brain Research, v. 23, p. 175 - 178, 1987.

HAMM, H. E. & MENAKER, M. Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. Proc Natl Acad Sci USA v. 77, p. 323-331, 1980.

HANS, J. BELDHUIS, A., DUTTAMI, J. P. & GWINNER, E. Melatonin and the circadian rhythms of feeding and perch-hopping in the European starling, *Sturnus vulgaris*. J. Comp. Physiol., A: p. 7-14, 1988.

HARRIS, K. M. & TEYLER, T. J. Age differences in a circadian influence on hippocampal LTP. Brain Research., v. 261, p. 69-73, 1983.

HARVEY, S., MERRY, B. J. & PHILLIPS, J. G. Influence of stress on the secretion of corticosterone in the duck (*Anas Platyrhynchos*). J. Endocr., v. 87, p. 161-171, 1980.

HARVEY, S., PHILLIPS, J. G. REES, A. & HALL, T. R. Stress and adrenal function. J. Exp Zool, v. 232, p. 633-645, 1984.

HENKE, H. The central part of avian visual system. In: Progress in Nonmammalian Brain Research, v. 1. NISTICO, G. & BOLIS, L. (eds). CRC Press, Boca Raton, Fla., p. 113-158, 1983.

HODGES, D. S. & CASSONE, V. M. The suprachiasmatic nucleus (SCN) on the chick: intrinsic anatomy, its efferents and afferents. Soc. Neurosci. Abstr., v. 15, p. 708.

HODOS, W., & KARTEN, H. J. Visual intensity and pattern discrimination deficits after lesions of the ectostriatum in pigeons. J. Comp. Neurol., v. 140, p. 53-68, 1970.

HOFFMAN, H. J. & BALSCHUN, D. Circadian difference in maze performance in C57BL/6 mice. Behav. Proc. v. 27, p. 77-84, 1992.

HOLLOWAY, F. A. & WANSLEY, R. Multiple retention deficits at periodic intervals after active and passive avoidance. Behavioral Biology, v. 9, p. 1-14, 1973 a.

_____ Multiphasic retention deficits at periodic intervals after passive-avoidance learning. Science, v. 180, p. 208-210, 1973 b.

HORLINGTON, M. Startle response circadian rhythms in rats: lack of correlation with motor activity. Physiology and Behavior, v. 5, p. 49-53, 1970.

HUNSICKER, J. P. & MELLGREN, R. L. Multiple deficits in the retention of an appetitively motivated behavior across a 24-h period in rats. Animal Learning and Behavior v. 5, n. 1, p. 14-16, 1977.

INFURNA, R.,N. Daily biorhythmicity influence homing behavior, psychopharmacological responsiveness, learning, and retention of suckling rats. J. Comp. Physiol. Psychol., v. 95, p. 896-914, 1981.

_____ Sucrose preference and LiCl illness induced aversion as a function of drug dose and phase of the illumination cycle. Physiol. Behav. v. 22, p. 955-961, 1979.

JANIK, D. DITTAMI, J. & GWINNER, E. The Effect of pinealectomy on Circadian plasma Melatonin levels in House Sparrows and European Starlings. J. of Biol. Rhythms,v. 7, n. 4, p. 277-286, 1992.

JISMÉNES, M. A. L. Efeito da hemidecorticação sobre o controle neuroendócrino do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, p. 36, 1989.

JOHN, T.M. & GEORGE, J. C. Physiological responses of melatonin implant pigeons to changes in ambient temperature. In: RILLIS, E. (ed) Photobiology: the science and its applications. Plenum Press, New York, in Press, 1990.

JOHNSON, M. P., DUFFY, J. F., DIJK, D. J., RONDA, J. M., DYAL, C. M. & CZEISLER, C. A. Short-term memory, alertness and performance: a reappraisal of their relationship to body temperature. Journal of Sleep Research, v. 1, p. 24-29, 1992.

JONES, B. N. Ethological Studies of Child Behaviour. Cambridge University Press Cambridge London, New York, Melbourne, p. 1-400, 1972.

JOSEPH, M. M. & MEIER, A. H. Daily Rhythms of Plasma Corticosterone in the Common Pigeon, *Columba livia*. General and Comparative Endocrinology, v. 20, p. 326-330, 1973.

KHAN, R., DAYA, S. & POTGIETER, B. Evidence for a modulation of the stress response by the pineal gland. Experientia, v. 46, p. 860-862, 1990.

KANDEL, E. R. & HAZKINS, R. D. The Biological Basis of Learning and Individuality. Scientific American, v. 267, n.3, p. 78 - 87, 1992.

Principles of Neural Science . Third Edition. Amsterdam: Elsevier, 1991.

KARNI, A., TANNE, D., RUBENSTEIN, B. S., ASKENASY, J. J. M. & SAGI, D. Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill. Science, v. 265, p. 679-682, 1994.

KARTEN, H. J. Visual lemniscal pathway in birds. In: Neural Mechanisms of Behavior in Birds. BRANDA, A. M. & MAXWELL, T. H. (eds). Plenum Press, New York, p. 409-430, 1969.

KASAL, C. A., MENAKER, M., PEREZ-POLO, J. R. Circadian clock in culture: N-acetyltransferase activity of chick pineal glands oscillates in vitro. Science, v. 203, p. 656-658, 1979.

KLEIN, D. Photoregulation of the mammalian pineal gland. In: EVERED, D & CLARK, S. (Eds.). Photoperiodism. Melatonin and the pineal gland. Pitman, London, p. 38-56, 1985.

KÖHLER, C. Habituation of the orienting response after medial and lateral septal lesions in the albino rat. Behav. Biol., v. 16, p. 63-72, 1976.

KOULACK, D. Recognition memory, circadian rhythms, and sleep. Perceptual and Motor Skills, V. 85, N. 1, p. 99-104, 1997.

KOVACS, K., PÉCZELY, P. & PETHS, G. Daily fluctuations of peripheral metabolism of corticosterone in male Japanese quails: a dynamic approach to the development of plasma corticosterone daily rhythm Comp. Biochem. Physiol.v. 75 A, p. 467-469, 1983.

KOVACEVIC, N., RAKIC., L. & RADIL, T. Alimentary learning in the fish *Serranus scriba* influence by circadian rhythmicity. Homeost. v. 33, n. 3, p. 153-154, 1991 a.

_____. T. Avoidance learning in the marine fish *Serranus scriba* influence by circadian rhythmicity. Homeost. v. 33, n. 3, p. 152-153, 1991b.

KRAUSE, D. N. & DUBOCOVICH, M. L. Regulatory sites in the melatonin system of mammals. Trens of Neuroscience, v. 13, n. 11, p. 464-467, 1990.

KRIEGER, T. D. Rhythms in CRF, ACTH, and Corticosteroids. In Endocrine Rhythms. T. Krieger. Raven Press, New York. p. 122-142, 1979.

KUPFERMANN, I. Learning and memory. In KANDEL, R. E., SCHWARTZ, H. J. & JESSEL, T. M. Principles of Neural Science, 1991.

LEATON, R. N., CASSELA, J. V. & BORSZERS, G. S. Short-term and long term habituation of the acoustic startle response in chronic decerebrate rats. Behav. Neurosc. , v. 99, p. 910-912, 1985.

LECONTE, P. Chronobiological rhythm constraints of memory processes. Arch. Gerontol. Geriati., v. 1, p. 21-25, 1989.

- LINDEN, R. Transplante de relógio biológico. Ciência Hoje v. 12, n. 71, p. 7, 1991.
- LINDROOS, O. F. C., LEINONEN, L. M. & LAAKSO, M. L. Melatonin binding to the anteroventral and aterodorsal thalamic nucleus in the rat. Neurosc. Lett., v. 143, p. 219-222, 1992.
- LOMBARD, W. P., The variations of the normal knee-jerk and their relation to teh activity of the central nervous system. Amer. J. Psychol, v. 1, p. 5-71, 1887.
- LOSCERTALES, M. ROSE, S. P. R. & SANDI, C. The corticosteroid synthesis inhibitors metyrapone and aminoglutethimide impair long-term memory for a pasive avoidance task in day-old chicks. Brain Research., v. 769, p. 357-361, 1997.
- LOUGHILIN, S. E., FOOTE, S. L. & BLOON, F. E. Efferent projections of the nucleus locus ceruleos: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. Neuroscience, v. 18, n. 2, p. 291-306, 1986.
- LUPIEN, S. J. & MCEWEN, B. S. The acute effects of corticoteroids on cognition: integration of animal and human model studies. Brain Research Reviews, v. 24, p. 1-27, 1997.

MACBRIDE, S. Pineal Biochemical Rhythms of the Chicken (*Gallus domesticus*).

PhD dissertation. University of Pittsburgh, 1973.

MACDONALD, R.A. & RALPH, M. R. Disruption of circadian rhythms impairs retention but not acquisition of place learning in rats. V Latin American Symposium of Chronobiology, p. 19-20, 1999.

MAHATA, S. K. & DE. K, Effect of melatonin on norepinephrine, epinephrine, and corticosterone contents in the adrenal gland of three avian species. *J. Comp. Physiol. B.* v. 161, p. 81-84, 1991.

MAHATA, S. K., MANDAL, A. & GHOSHJ, A. Influence of age and splanchnic nerve on the action of melatonin in the adrenomedullary catecholamine content and blood glucose level in the avian group. *J. Comp. Physiol B*, v. 158, p. 601-607, 1988.

MANGTANI, P. PATERSON, A. T. & VICKERS, C. The pineal in golfish: effects on learning capacity an gonadal activity. *J. Physiol.* (Lond). v. 295, p. 64-65, 1979.

MARIMUTHU, G., RAJAN., & CHANDRASHENKARAN, M. K. Social entrainment of the circadian rhytm in the flight activity of the microchiroteran bat *Hipposideros sperois*. *Behav. Ecol. Sociol.*, v. 8, p. 147 - 150, 1981.

MARQUES, M. D. & WATERHOUSE, J. M. Masking and the evolution of circadian rhythmicity. Cronobiol. Int., v. 11, p. 146-155, 1994.

MARQUES, M. D., GOLOMBEK, D. A., & MORENO, C. Adaptação temporal. In: Cronobiologia: princípios e aplicações. Marques, N & Menna-Barreto, L. (org), Editora da Universidade de São Paulo, 1997.

MCMILLAN, J. P. Pinealectomy abolishes the circadian rhythm of migratory restlessness. J. Comp. Physiol. A, v. 79, p. 105 -112, 1972.

MENAKER, M. & ZIMMERMANN, N. Role of the pineal in the circadian system of birds. Amer. Zool., v. 16, p. 45-55, 1976.

MEIER, A. H., FIVIZANNI, A. J. & OTTENWELLER, J. E. Daily rhythms of plasma corticosterone binding activity in the white throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*. Life Sci., v. 22, p. 401-406, 1978.

MICHELL, M. A., MACLEOD, M. G. & RAZA, A. The effects of ACTH and dexamethazone upon plasma thyroid hormone levels and heat productions in the domestic fowl. Comp. Biochem. Physiol., v. 38 A, p. 207-215, 1986.

MISTLLBERGER, R. Circadian pitfalls in experimental designs employing food restriction. Psychobiology, v. 18, n. 1, p. 23-29, 1990.

MOORE, R. Y. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.*, v. 42, p. 2783-2789, 1983.

MOORE, R. Y. & EICHELER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, v. 42, p. 201-206, 1972.

MOORE, R. Y. & LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 146, p 114, 1972.

MOORE-EDE, M. C., SULZMAN, F. M. & FULLER, C. A. The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system. Harvard University Press, Cambridge, 448p., 1982.

MORGAN, P. J. & WILLIAMS, L.M. Central melatonin receptors: implications for a mode of action. *Experientia*, v. 45, p. 955-965, 1989.

NELSON, K. The temporal patterning of courtship behavior in the glandulocaudine fishes (Ostariophysi, Characidae). *Behaviour*, v. 24, p. 90-146, 1964.

NESCA, M. & KOULACK, D. Recognition memory, sleep and circadian rhythms. Can. J. Exp. Psych., v. 48, n. 3, p. 350-379, 1994.

NORGREN, R. B. Neural basis of circadian rhythms. Bird Behavior, v. 8, p. 57-66, 1990.

OSHIMA, I., YAMADA, H., GOTO, M., SATO, K. & EBIRAHARA, S. Pineal and retinal melatonin is involved in the control of circadian locomotor activity and body temperature rhythms in the pigeon. J. Comp. Physiol. A, v. 166, p. 217-226, 1989.

OSHIMA, I., YAMADA, H., SATO, K. & EBIRAHARA, S. The phase relationship between the circadian rhythms of locomotor activity and circulating melatonin in the pigeon (*Columba livia*). Gen. Comp. Endocrinol., v. 67, p. 409-414, 1987.

PAGE, T. L. Masking in invertebrates. Chronobiol. Int., v. 6, p. 3-11, 1989.

PATTERSON, T. L. & PETRINOVICH, L. F. Studies of habituation II: Effect of massive stimulus presentation. J. Comp. Physiol. Psychol., v. 93, p. 351-359, 1979.

PLAPPERT, C. F., PILZ, K. D. & SCHNITZLER, H. U. Acoustic startle response and habituation in freezing and non-freezing rats. Behav. Neurosci., v. 107, p. 981-987, 1993.

PEREYRA, P., DE LA IGLESIA, H. O. & MALDONADO, H. Training-to-testing intervals differente from 24 hours impair habituation in the crab *Chasmagnatus*. Physiol. Behav., v. 59, p. 19-25, 1996.

PERSENGIEV, S. P. & KANCHEV, L. N. Melatonin and Adrenal Cortex Steroid production: In Vivo and in vitro studies. Folia Histochemica Et Cytobiologica, v. 29, p. 15-18, 1991.

PHILLIPS, N. H. & BERGER, R. J. Melatonin infusions restore sleep by continuous bright light in pigeons. Neuroscience Letters, v. 145, p. 217-220, 1992.

PILO, B., JOHN, T. M., GEORGE, J. C. & ETCHES, R. J. Liver Na⁺ k⁺ - ATP-ase activity and circulating levels of corticosterone and thyroid hormones following cold and heat exposure in the pigeon. Comp. Biochem Physiol., v. 80, p. 103-106, 1985.

PITTENDRIGH, C.S. Entrainment. In: Handbook of Behavioral Neurobiology - Biological Rhythms, vol 4. J. ASCHOFF (org.). New York, Plenum Press. p. 95-124, 1981.

PITTENDRIGH, C.S. On the mechanism of entrainment of circadian rhythms by light cycles. In Circadian Clocks, p. 277-297, 1965. Amsterdam: North Holland.

RALPH, C. L., FOSTER, R. G. DAVIS, F. C. & MENAKER, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. Science, v. 247, p. 975-978, 1990.

REITER, R. Pineal melatonin: cell biology of the synthesis and of its physiological interaction. Endocr. Rev., v. 12, p. 151- 180, 1991.

RICHTER, C. P. Sleep and activity: their relation to the 24-hour clock. Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis., v. 45, p. 8-27, 1967.

_____. Biological Clocks in Medicine and Psychiatry. Springfield, C. C. Thomas, 1965.

RIJNBERK, A. & MOL, J. A. Adrenocortical function. In: Clinical biochemistry of domestic animals, 4th ed. J. J. Kaneko, ed. Academic Press Inc., San Diego., p. 610-629, 1989.

RINTAMÄKI H., HISSA R. ETCHES, R. J. SCANES, C. G., BALTHAZART, J. & SAARELA, S . Seasonal changes in some plasma hormones in Pigeons: Diurnal variation under natural photoperiods with constant or seasonally

changing ambient temperature. Comp. Biochem. Physiol., v. 84 A, p. 33-38, 1986.

RIVKEES, S. A., CASSONE, V. M. WEAVAER, D. R. & REPERT, S.M. Melatonin receptors in chick brain: characterization and localization. Endocrinology, v. 125, p. 363-368, 1989.

ROSENZWEIG, M. R. Aspects of the search for neural mechanisms of memory. Annu. Rev. Psychol., v. 47, n. 1, p.32, 1996.

ROSENZWEIG, M. R. & LEIMANN, A. L. Physiol. Psychol. D. C. Massachusetts: Health & Company, 1982.

ROSENWASSER, A. M. & ADDLER, N. T., Structure and function in circadian timing system: Evidence for multiple coupled circadian oscillators. Neurosci. Biobehav. Rev., v. 10, p. 431-448, 1986.

RUSAK, B. Vertebrate behavior rhythms. In: Handbook of behavioral neurobiology - biological rhythms, vol 4. J. ASCHOFF (org.). New york, Plenum Press, p. 183-213, 1981.

RUSAK, B. & ZUCKER, I. Neural regulation of circadian rhythms. Physiol. Rev., v. 59, p. 449-526, 1979.

SABBATINI, R.M.E. Comportamento espécie-específico e estimulação elétrica cerebral: Uma abordagem neuroetológica e quantitativa. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Medicina de ribeirão Preto- USP, 1977.

SAKSIDA, L. M. & WILKIE, D. M. Time-of day discrimintaion by pigeons, *Columba livia*. Animal Learning and Behavior, v. 22, n. 29, p. 142-154, 1994.

SANDI, C. & ROSE, S. P. R. Training-dependent biphasis effects of corticosterone in memory formation for a passive avoidance learning task in chicks, Psychopharmacology, v. 133, p. 152-160, 1997.

_____. Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidanc learning paradigm. Brain Res. v. 647, p. 106-112, 1994a.

_____. Corticosterone receptor antagonists are amnestic for avoidance learning in day-old chicks. Eur J. Neurosci., v. 6, p. 1292-1297, 1994b.

SAUNDERS, D. S. Insect Clocks. Pergamon Press, Second edition, Great Britain, 1982.

SELIGMAN, M. P. E. On the generality of law of learning. Psychological Psychological Review, v. 77, p. 406 - 418, 1970.

SELIGMAN, M. P. E. & HAGER, J. L. Biological Boundaries of Learning. New York; Appleton-Century-Crofts, 1972.

SHARPLESS, S & JASPER, H. Habituation of the arousal reaction. Brain., v. 79, p. 655 - 680, 1956.

SHIMIZU, T. & KARTEN, H. J. The avian visual system and the evolution of the neocortex. In: Vision, Brain and Behavior in Birds. ZEIGLER, H. P. & BISCHOF, H.J. (eds). MIT Press, Cambridge, MA, p. 137-158, 1993.

SKINNER, B. F. Selection by consequences. Science, v.213, p. 501-504.

_____. Science and Human Behavior. New York: Appleton-Century-Crofts, 1953.

SHIMIZU, T. & KARTEN, H. J. The avian visual system and the evolution of the neocortex. In Vision, Brain and Behavior in Birds. Zeigler, H. P. & Bischof, H. J. MIT Press, Cambridge MA, p. 137-158, 1993.

SIMPSON, S. M. & FOLLET, B. F. Pineal and hypothalamic pacemakers: their role in regulation circadian rhythmicity in Japanese quail. J. Comp. Physiol., v. 144, p. 381-389, 1981.

SOKOLOV, E. N. Neural models and the orienting influence. In Brazier M. M. (Ed),
The central nervous system and behavior.III, New York: Macy Foundation,
1960.

STEPHAN, F. K. & KOVACEVIC, N. S. Multiple retention deficit in passive
avoidance in rats is eliminated by suprachiasmatic lesions. Behavioral
Biology, v. 22, p. 456-462, 1978.

STEPHAN, F. K. & ZUCKER, i. Circadian rhythms in drinking behavior and
locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, v. 69, p. 1583-1586, 1972.

STOCKGRAND LTD. CIDtech Ultraspecific Melatonin antoserum for
Radioimmunoassay. School of Biological Sciences, Department of
Biochemistry University of Surrey, 1984.

TAKAHASHI, J. S. & MENAKER, M. Role of the Suprachiasmatic nucleus in the
circadian system of the house Sparrow *Passes domesticus*. J. Neurosc. v. 2, p.
815-828, 1992.

TAKAHASHI, J. S. , MURAKAMI, N., NIKAIDO, S. S. , PRATT, B.L. &
ROBERTSON, L. M. The avian pineal, a vertebrate model system of the
circadian oscillator: cellular regulation of circadian rhythms by light, second

messengers, and macromolecular synthesis. Rec. Prog. Hormone Res., v. 45, p. 279-352, 1992.

TAKAHASHI, J. S. & MENAKER, M. Circadian rhythmicity: Regulation in the time domain. In: Biological Regulation and Development, GOLDBERGER, R. F. & YAMAMOTO, K. R. (orgs). New York, Plenum Press, v. 3B. p. 285-303, 1984.

TAKAHASHI, J. S., HAMN, H. & MENAKER, M. Circadian rhythms of melatonin release from superfused chicken pineal glands in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 77, p. 3219-3222, 1980.

THOMPSON, R. F. & SPENCER, W. A. Habituation: A Dual-Process Theory. Psychological Review., v. 77, p. 419-450, 1966.

TINBERGEN, N. The study of instinct. Oxford: Oxford Univ. Press, 1951.

TOLEDO, C. A. B. Facilitação da Habituação da Resposta Exploratória a Estímulos Sonoros em Pombos Destelencefalados. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas apresentada ao 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, v. 24, p. 187-190, 1991.

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

TUREK, F. W. Circadian Rhythms. Recent Progress in Hormone Research, v. 49, p. 43-89, 1994.

_____. Circadian neural rhythms in mammals. Annu. Rev. Physiol., v. 47, p. 49-64, 1985.

TUREK, F. W. & VAN CAUTER, E. Rhythms in reproduction. In: The physiology of Reproduction. KNOBIL, E. & NEIL, J. D. (orgs). New York, Raven Press, p. 1789-1830, 1988.

TUREK, F. W., PINTO, L. H., VILATERNA, M. H., PENEV, P. D., ZEE, P. C. & TAKAHASHI, J. S. Pharmacological and genetic approaches for the study of circadian rhythms in mammals. Frontiers in Neuroendocrinology, v. 16, p. 191-223, 1995.

UNDERWOOD, H., BINKLEY, S., SIOPEL, T. & MOSHER, K. Melatonin rhythms in the eyes, pineal bodies and blood of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). Gen. Comp. Endocrinol., v. 56, p. 70-81, 1984.

UNDERWOOD, H. & GROSS, G. Vertebrate circadian rhythms: retinal and extra-retinal photoreception. Experientia, v. 38, p. 1013-1019, 1982.

UNDERWOOD, H. & SIOPEL, T. Circadian organization of the Japanese quail. J. Exp. Zool., v. 232, p. 557-566, 1984.

_____. Melatonin rhythms in quail: regulation by photoperiod and circadian pacemakers. J. Pineal Res., v. 2, p. 133-143, 1985.

VALENTINUZZI, V. S. Modulação Temporal de Processos de Aprendizagem. Implicações Práticas e Teóricas. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-apresentada ao Instituto de Biologia, UNICAMP, 1999

VALENTINUZZI, V. S. Variação Circadiana da Habituação da Resposta Exploratória a Estímulos Sonoros em Pombos (*Columba livia*), submetidos a Condição Claro-Escuro e Claro Constante. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas apresentada ao Instituto de Biologia, UNICAMP, 1993.

VALENTINUZZI, V. S. & FERRARI, E. A. M. Habituation to sound during morning and night sessions in pigeons (*Columba livia*). Physiology Behavior, v. 62, n. 6, p. 1203- 1209, 1997.

VAN CAUTER, E., & ASCHOFF, J. Endocrine and other biological rhythms. In: DE GROOT, L. I. (ed), Endocrinology, p. 2658-2705. Philadelphia:Saunders, 1989.

VAN CAUTER, E., KERKHOFS, M., CAUFRIEZ, A., VAN ONDERBERGEN, A., THORNER, M. O. & COPINSCHI, G. J Clin. Endocrinol. Metab., v. 74, p. 1441-1450, 1992.

VISWANATHAN, N. Presence-absence cycles of the mother and not light-darkness are the zeitgeber for the circadian rhythm of newborn mice. Experientia, v. 45, n.4, p. 383-385, 1989.

VECSEI, P., PENKE, B. KATZY, R. BACKL., Radioimmunological determination of plasma cortisol. Experientia, v. 28, n. 9, p. 1104-1105, 1972.

WANSLEY, R. A. & HOLLAWAY, F. A. Oscillations in retention performance after passive avoidance training., Behavioral Biology, p. 296-302, 1976

WESP, R. & GOODMAN, I. Fixed interval responding by pigeons following damage to corpus striatal and limbic brain structures (Paleostriatal complex and Parolfactory lobe). Phys. and Behavior., v. 20, p. 571-577, 1978.

- WESTERHOF, I., MOL, J. A., VAN DEN BROM, W. E., LUMEIJ., J. T. & RIJNBERK, A. Diurnal Rhythms of plasma corticosterone concentrations in racing Pigeons (*Columba livia domestica*) Exposed to different light regimens, and the influence of frequent blood sampling. Avian Diseases, v. 38, p. 428-434, 1994.
- WHITMAN, C. D. The behavior of Pigeons. Posthumous Works. v. III, 257, n. 3. Cornege Institute, Washington, D.C., 1919.
- WILKIE, D. M., SAKSIDA, L. M. SANSONP., LEE A. Properties of time-place learning by pigeons, *Columba livia*. Behav. Proc. v. 31, p. 39-56, 1994.
- WILKIE, D. M. Time-place learning. Current Directions Psych. Sc., p. 85-89, 1995.
- WILSON, M. A. & MCNAUGHTON, B. L. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science, v. 265, p. 676-679, 1994.
- WINGFIELD, J. C., SMITH, P. J. & FARNER, D. S. Endocrine responses of white-crowned sparrows to environmental stress. Condor, v. 84, p. 399-409, 1982.
- WURTMAN, R. J. AXELROLD, J. & KELLY DE. The pineal. Academic Press, New Work, 1968.

- XAVIER, G. F., SAITO, M. I. & STEIN, C. Habituation of exploratory activity to new stimuli, to the absence of a previously present stimulus and to new context, in rats. Quat. J. Exp. Psychol., v. 13b, p. 157-175, 1991.
- 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*). J. Comp. Physiol. A, v. 163, p. 459-463, 1988.
- YANO, J. OSHIMA, S. & GOTOH, J., Effects of various lighting regimes on diurnal rhythms of EEG components in the chicken. Poult. Sci., v. 53, p. 918-923, 1974.
- YELLON, S. M. & HILLIKER, S. Influence of acute melatonin treatment and light on the circadian melatonin rhythm in the Djungarian hamster. J. of Biological Rhythms, v. 9, 71-81, 1994.
- ZEIGLER, H. P. Effects of forebrain lesions upon activity in pigeons. J. Comp. Neurol., v. 120, p. 183-194, 1963.
- ZEIGLER, H. P. & KARTEN, H. J. Brain mechanisms and feeding behavior in the pigeon (*Columba livia*) I: quinto-frontal structures. J. Comp. Neurol., v. 152, p. 59-82, 1973a.

ZEIGLER, H. P. & KARTEN, H. J. Brain mechanisms and feeding behavior in the pigeon (*Columba livia*) II: analysis of feeding behavior deficits following lesions of quito-frontal structures. J. Comp. Neurol., v. 152, p. 83-102, 1973b.

ANEXO 1

Catálogo de comportamentos de Pombos *Columba livia* em cativeiro.

Categoria I - Movimentos discretos de partes do corpo ou de todo o corpo.

Incluem-se nesta categoria deslocamentos discretos e independentes de partes do corpo em relação ao próprio corpo, ou de todo o corpo, sem que o animal se desloque no espaço.

I.1 Movimentos discretos de partes do corpo

I.1.1 Movimentos da(s) asa(s)

a) Abaixar asa (ASA)

C - asa levantada ou encostada no corpo ;

R - deslocar a asa no sentido cabeça-pé e ântero-posterior ou pósterio- anterior;

P - aumentar a superfície de contato da asa com a lateral do corpo diminuindo a distância entre ela e a superfície de apoio.

b) Abduzir asa (ABA)

C - asa em contato com superfície lateral do corpo ;

R - deslocar lateralmente a asa em direção à cabeça;

P - asa fora de contato com a superfície lateral do corpo aumentando a distância (ou ângulo) entre ela e o corpo.

c) Aduzir asa (ADA)

C - asa abduzida;

R - deslocar lateralmente a asa em direção aos pés;

P - asa em contato com superfície lateral do corpo diminuindo a distância (ou ângulo) entre ela e o corpo.

d) Bater asa (BAS)

C - asa abduzida ou aduzida;

R - estender as asas, abduzindo e aduzindo-as alternada e sucessivamente;

P -

e) Balançar asa (BLA)

C - asa em contato com a superfície lateral do corpo;

R- movimentos repetidos de levantar e abaixar uma das asas, deslocando-a sucessivamente de cima para baixo, num mesmo ponto;

P -

f) Estender asa (ESA)

C - asa abduzida ou aduzida;

R - mover lateralmente a asa de modo a aumentar o ângulo entre suas partes, abrir a plumagem;

P - aumentar a extensão da asa.

g) Rotar asa (s) (ROA)

C - asa (s) aduzida (s) ou abduzida(s);

R - deslocar a parte axial da (s) asa (s) em torno do seu eixo ântero-posterior;

P -

h) Levantar asa (LEA)

C - asa em contato com a superfície lateral do corpo;

R - deslocar a asa no sentido pé - cabeça e ântero-posterior;

P - reduzir a superfície de contato da asa com a lateral do corpo aumentando a distância entre ela e a superfície de apoio.

I.1.2 Movimentos com o bico

a) Abrir bico (ABB)

C - partes superior e inferior do bico unidas;

R - deslocar mandíbula inferior e mandíbula superior no sentido pé-cabeça, respectivamente;

P - mandíbulas superior e inferior separadas, aumentando o ângulo entre si.

b) Bicar (BIC)

C - bico fora de contato de objeto próximo;

R - aproximar o bico do objeto, encostá-lo fechado ou aberto no objeto, deslizar o bico sobre a região de contato e afastá-lo;

P -

c) Fechar bico (FEB)

C- bico aberto;

R - deslocar a mandíbula e o maxilar superior no sentido cabeça-pé, respectivamente;

P- parte inferior e superior do bico unidas.

I.1.3 Movimentos do pescoço, papo e cabeça

a) Abrir olhos (ABO)

C - pálpebras em contato uma com a outra;

R - movê-las em sentido contrário;

P - íris, pupila e córnea ficam visíveis

b) Balançar cabeça (BAC)

C - cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - inclinar ventral e dorsalmente a cabeça, alternada e sucessivamente;

P - alterar a posição da cabeça no espaço, em relação ao eixo longitudinal.

c) Encolher pescoço (ENO)

C - pescoço estendido ou afastado da parte superior do tronco;

R - mover pescoço no sentido cabeça - pés e na direção do papo;

P - diminuir o comprimento do pescoço e a distância cabeça-papo.

d) Endireitar a cabeça (END)

C - pescoço inclinado;

R - estender o pescoço, alinhando cabeça e tronco;

P - eixos longitudinais da cabeça e do tronco formando ângulo de aproximadamente 90°.

e) Fechar olhos (FEO)

C - pálpebras afastadas uma da outra;

R - movê-las em sentido contrário;

P - pálpebras em contato uma com a outra.

f) Inclinar ventralmente a cabeça (INV)

C - cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - estender o pescoço e flexioná-lo no sentido cabeça-pé e para frente;

P - diminuir a distância entre a cabeça e a parte superior ventral do tronco.

g) Inclinar cabeça dorsalmente (IND)

C - cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - estender pescoço e flexioná-lo no sentido cabeça-pé e para trás;

P - diminuir a distância entre a cabeça e a parte superior dorsal do tronco.

h) Inclinar cabeça lateralmente (INL)

C - cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - flexionar lateralmente o pescoço;

P - diminuir a distância entre a cabeça e a parte lateral superior do tronco.

i) Inflar o papo (INP)

C - cabeça encolhida;

R - mover a musculatura e eriçar penas do papo;

P - o papo torna-se proeminente em relação ao tronco.

j) Oscilar cabeça (OSC)

C - pescoço encolhido ou cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - movimentar a cabeça no plano horizontal em relação ao eixo longitudinal com deslocamento restrito da direita para a esquerda e vice-versa;

P -

k) Piscar (PIS)

C - olhos abertos;

R - fechar e abrir os olhos alternada e sucessivamente;

P -

I) Sacudir cabeça (SAC)

C - cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - oscilar a cabeça e balançá-la rápida e sucessivamente;

P - alterar bruscamente a posição da cabeça .

I.1.4 Movimentos com a cauda

a) Abaixar cauda (ABC)

C - cauda levantada ou alinhada com o eixo longitudinal do tronco;

R - deslocar a cauda no sentido cabeça-pé;

P - diminuir a distância entre a cauda e a superfície de apoio.

b) Abrir cauda (ABR)

C - cauda alinhada ao eixo longitudinal do tronco;

R - deslocar lateralmente as penas da cauda separando-as;

P - aumento da largura da cauda.

c) Levantar cauda (LEC)

C - cauda abaixada ou alinhada com o eixo longitudinal do tronco;

R - deslocar a cauda no sentido pé-cabeça;

P - aumentar a distância entre a cauda e a superfície de apoio.

d) Sacudir cauda (SAU)

C -

R - deslocar a cauda de um lado para o outro, rápida, sucessiva e repetidamente;

P - movimentos bruscos da cauda.

I.1.5 Movimentos com a perna

a) Agachar (AGA)

C - em pé;

R - flexionar as duas pernas, deslocando o corpo em direção à superfície de apoio;

P - encostar a parte ventral inferior do tronco na superfície de apoio.

b) Apoiar-se numa perna (APA)

C - em pé;

R - flexionar uma das pernas;

P - pé da perna flexionada fora de contato com superfície de apoio e encostado na parte ventral inferior do tronco.

c) Bater pé (BAP)

C - em pé;

R - deslocar de modo súbito, alternada e sucessivamente as pernas no sentido pé-cabeça e vice-versa;

P - ora um ora outro pé em contato com superfície de apoio e acima da mesma, alternada e sucessivamente.

d) Estender perna (ESP)

C - perna flexionada;

R - mover a perna aumentando o ângulo entre suas partes;

P - afastar o pé da região ventral do tronco.

e) Flexionar perna (FLP)

C - em pé;

R - deslocar a perna em direção ao tronco;

P - aproximar o pé da região ventral do tronco, colocando-o sob a plumagem.

f) Levantar-se (LEV)

C - agachado;

R - estender as pernas;

P - aumento da distância entre a parte ventral do corpo e a superfície de apoio.

g) Pisotear (PST)

C - em pé;

R - flexionar uma das pernas e estendê-la, flexionar a outra perna e estendê-la, alternada e sucessivamente;

P - ora um, ora outro pé em contato com o ponto de apoio inicial, sem que ocorra deslocamento espacial.

h) Sacudir perna (SAP)

C - em pé;

R - flexionar a perna, semi-rotar e estendê-la, rápida e sucessivamente;

P - alterar posição da perna no espaço.

I.1.6 Movimentos das penas

a) Eriçar penas (ERI)

C - penas em contato com a superfície do corpo;

R - levantar as penas;

P - extremidades das penas afastadas da superfície do corpo.

b) Eriçar penas do papo (EPP)

C - penas em contato com a superfície do corpo;

R - levantar as penas da região do papo;

P - extremidades das penas afastadas da superfície do papo.

c) Separar penas (SEP)

C - penas em contato com a superfície do corpo;

R - deslocar as penas em sentido contrário;

P - penas fora de contato entre si.

I.2 - Movimentos de todo o corpo

a) Balançar corpo (BAL)

C - em pé;

R - inclinar o tronco para frente e para trás alternada e sucessivamente;

P - alterações do tronco no espaço no eixo ântero-posterior.

b) Desencostar (DET)

C - pombo encostado a um objeto ou a outro pombo;

R - deslocamento do corpo em direção oposta ao objeto ou ao outro pombo;

P - ausência de contato com o objeto ou outro pombo.

c) Empinar-se (EPO)

C - em pé;

R - estender pescoço, inclinar dorsalmente a cabeça e ântero-posteriormente o tronco;

P - maior distância entre cabeça e pé e menor distância entre a cauda e superfície de apoio.

d) Encolher-se (ENC)

C- em pé, cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - semi flexionar as pernas, encolher pescoço;

P - menor distância entre o corpo e a superfície de apoio.

e) Encostar (ECO)

C - corpo ou parte do corpo fora de contato com objeto ou outro pombo;

R - deslocar parte do corpo em direção ao objeto ou outro pombo;

P - contato com objeto ou outro pombo.

f) Equilibrar-se (EQU)

C - pés no poleiro ou em contato com borda da cuba de alimento e/ou água;

R - pisotear e balançar o corpo;

P - permanecer na mesma superfície de apoio inicial.

g) Inclinar-se (INC)

C -

R - estender o pescoço, deslocar corpo no sentido pósterio-ânterior, semiflexionar as pernas;

P - aumentar a distância entre a cauda e a superfície de apoio.

h) Oscilar corpo (OSO)

C - em pé;

R - semi-rotar o corpo da direita para a esquerda e vice-versa alternada e sucessivamente, pode ocorrer pisotear;

P -

Categoria II - Pré-exploratória

Incluem-se nesta categoria comportamentos reflexos, eliciados por apresentação de estímulos novos e ou intensos e que precedem imediatamente as reações exploratórias

a) Estremecer (EST)

C -

R - movimento rápido e intenso do corpo ou do tórax, em várias direções, por um breve período;

P-

b) Murchar (MUR)

C -

R - contração generalizada e lenta da musculatura peitoral e do tronco, simultaneamente ou não a empinar o corpo, a cabeça permanece imóvel;

P - aparência esquia e tensa do corpo.

c) Sobressalto (SOB)

C -

R- estremecer o corpo, estender o pescoço e balançar o corpo simultaneamente, inclinação dorsal da cabeça;

P -

Categoria III - Exploratória

Incluem-se nesta categoria reações relacionadas à orientação e à investigação de parte ou do ambiente como um todo.

a) Alerta (ALE)

C - pescoço encolhido ou cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - extensão total do pescoço no sentido pé-cabeça, com fixação e/ou inclinação lateral ou oscilação da cabeça, os olhos permanecem totalmente abertos;

P -

b) Ciscar (CIS)

C - em pé;

R - deslizar um pé sobre a superfície de apoio, ou ambos, alternada e repetidamente, podendo aproximar o bico da mesma.

P -

c) Estender pescoço (ESO)

C - pescoço encolhido ou cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - mover pescoço no sentido pés-cabeça;

P - aumentar o comprimento do pescoço e a distância cabeça-papo.

d) Explorar (EXP)

C - pescoço encolhido ou cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - movimentar a cabeça em várias direções, repetidamente;

P -

e) Fixação (FIX)

C - pescoço encolhido ou cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - manutenção da cabeça e do olhar direcionados a um ponto fixo do ambiente, extensão restrita do pescoço, imobilidade tensa, com ou sem inclinação da cabeça;

P -

f) Semi-rotação da cabeça (ROC)

C - pescoço encolhido ou cabeça e tronco alinhados, formando ângulo de aproximadamente 90°;

R - deslocar a cabeça no plano horizontal em torno de seu eixo longitudinal, descrevendo um movimento lateral contínuo em torno de 90°, ou descrevendo um movimento de 180° de um lado para outro;

P - alterar a posição da cabeça no espaço para um lado ou para outro.

Categoria VI - Manutenção

Incluem-se nesta categoria os comportamentos relacionados com os cuidados com o corpo e reações vegetativas

a) Beber (BEB)

C -

R - inclinar ventralmente a cabeça, introduzir bico aberto na água, inclinar dorsalmente a cabeça e deglutir sucessivamente;

P - ingestão de água.

b) Bocejar (BOC)

C -

R - inclinar dorsalmente a cabeça, abrir totalmente o bico, oscilar a cabeça, fechar os olhos e fechar o bico, sucessivamente;

P -

c) Coçar (COC)

C -

R - aproximar o pé do corpo, encostar o pé em algum ponto de sua superfície, estender e flexionar a perna alternada e sucessivamente sobre a região de contato.

P -

d) Comer (COM)

C -

R - inclinar ventralmente a cabeça, introduzir bico aberto no alimento e prender o alimento com o bico, inclinar dorsalmente a cabeça e deglutir sucessivamente;

P - ingestão de alimento.

e) Defecar (DEF)

C -

R - mover o corpo no sentido postero-ânterior, inclinar ventralmente a cabeça, levantar a cauda e expelir excrementos pelo orifício da coacla, sucessivamente;

P -

f) Deglutir (DEG)

C -

R - inclinar dorsalmente a cabeça, contrair repetidamente a musculatura do papo e pescoço impelindo a substância para dentro;

P -

g) Espirrar (ESI)

C -

R - balançar bruscamente a cabeça, espirrar ar através do bico (e narinas) de modo súbito e explosivo;

P -

h) Espreguiçar (ESG)

C -

R - Inclinar ventralmente o corpo, estender uma das pernas e asa ipsilateral, simultaneamente abaixar a asa contralateral lentamente, respectivamente;

P -

i) Estremecer cabeça (EMC)

C -

R - movimentar brusca e rapidamente a cabeça em várias direções;

P -

j) Limpar (LIP)

C -

R - aproximar o bico da superfície do corpo, encostar bico em algum ponto de sua superfície, prender e soltar, com o bico, sucessivamente uma ou duas penas, ou ainda, bicar rápida e sucessivamente uma região do corpo.

P -

k) Sacudir-se (SAS)

C - em pé;

R - oscilar corpo e balançá-lo, rápida e sucessivamente, eriçar as penas;

P - alterações bruscas e rápidas do corpo no espaço.

l) Tremer (TRE)

C -

R - contrações rápidas e repetidas da musculatura e movimentos das penas do corpo;

P -

m) Vomitar (VOM)

C -

R - inclinar ventralmente a cabeça e o corpo, abduzir as asas, estremecer o corpo, fechar os olhos, abrir o bico e expelir material pelo mesmo, respectivamente;

P -

Categoria V - Locomoção

Incluem-se nesta categoria os comportamentos relacionados com deslocamento do corpo no espaço

a) Andar (AND)

C - em pé ou agachado;

R - deslocar membros inferiores alternada e sucessivamente, encostando ora um ora outro pé em diferentes pontos da superfície de apoio;

P - mudança de posição do corpo para frente ou para o lado em relação à posição inicial.

b) Andar em ré (ANR)

C - em pé ou agachado;

R - deslocar membros inferiores alternada e sucessivamente, encostando ora um, ora outro pé em diferentes pontos da superfície de apoio;

P - mudança de posição do corpo para trás em relação à posição inicial.

c) Cair (CAI)

C- pés no poleiro ou parede;

R - balançar corpo, pisotear e bater asas;

P - pés fora da superfície de apoio inicial e deslocamento do corpo para superfície de apoio inferior.

d) Circular (CIR)

C - em pé ou agachado;

R - andar em torno de um eixo longitudinal descrevendo um círculo;

P -

e) Descer (DES)

C - pés em contato com uma superfície no plano superior do piso;

R - estender uma das pernas, apoiando o pé no piso ou plano inferior e em seguida repetir o movimento com a outra perna;

P - Deslocamento do corpo para a superfície de apoio inferior.

f) Esvoaçar (ESV)

C -

R - bater as asas simultânea e repetidamente e flexionar as pernas e deslocar verticalmente o corpo no ar;

P -

g) Pular (PUL)

C - em pé;

R - flexionar pernas e estendê-las simultânea e abruptamente;

P - pés instantaneamente fora da superfície de contato.

h) Subir (SUB)

C - em pé;

R - pular em direção a um plano de apoio acima da superfície ou flexionar uma das pernas e colocá-la em contato com a superfície acima da superfície de apoio, flexionar a outra perna e colocá-la em contato com a nova superfície de apoio;

P - pés em contato com superfície de apoio acima da inicial.

i) Virar-se (VIR)

C-

R - semi-rotar o corpo todo;

P- alteração da posição do corpo, descrevendo um ângulo inferior a 360°.

Categoria VI - Comportamentos de interação

Incluem-se nesta categoria os comportamentos relacionados com a interação de um animal com outro do mesmo sexo ou do sexo oposto.

VI.1 - Macho - Macho

VI.1.1 Agonistas

a) Avançar (AVA)

C - Pombo 1 (P_1) circulando, tendo Pombo 2 (P_2) no seu campo visual;

R - P_1 inclina o corpo, abaixa e abre a cauda, simultaneamente; na seqüência imediata, abduz e estende as asas, infla o papo, eriça as penas e impulsiona o corpo em direção ao P_2 ;

P- P_2 fica em alerta ou se afasta.

b) Bicar outro (BIA)

C - pombos em pé, P_2 próximo do P_1

R - P₁ estende pescoço e bica a cabeça ou pescoço de P₂;

P- P₂ fica em alerta ou se afasta de P₁.

c) Golpear com a asa (GOA)

C - P₁ com o corpo empinado e próximo de P₂;

R - P₁ levanta uma das asas, flexiona e a abaixa, enquanto simultaneamente, flexiona, rota e estende a outra asa em direção ao P₂, inclinando o corpo;

P- P₂ fica em alerta ou se afasta de P₁; P₁ movimenta a asa ruidosamente.

d) Golpear com o bico (GOB)

C - P₁ em pé , com bico aberto ou fechado e próximo de P₂;

R - P₁ estende o pescoço, inclina a cabeça e o tronco no sentido ântero-posterior, impulsiona a cabeça e o pescoço na direção de P₂ e bica sua cabeça ou pescoço;

P - P₂ fica em alerta ou se afasta de P₁.

e) Locomover-se atrás do outro (LOA)

C - P₁ em pé tendo P₂ no seu campo visual;

R - P₁ anda ou voa ou corre, em direção à P₂;

P - diminuição da distância entre ambos ou manutenção da mesma no caso de P₂ também se movimentar.

f) Lutar (LUT)

C- P₁ e P₂ em pé e próximos;

R - pombos golpeiam um ao outro com a asa e/ou com o bico, prendem parte do corpo do oponente com o bico, batem asas e vocalizam;

P- repetição destes comportamento às vezes por ambos os pombos.

g) Ameaçar (AME)

C - P_1 em pé e próximo de P_2 ;

R - P_1 estende totalmente o pescoço no sentido pé-cabeça e eriça as penas do pescoço, em seguida, semi-rota e/ou inclina lateralmente e/ou balança a cabeça, pisoteia podendo ou não vocalizar;

P- P_2 fica em alerta ou se afasta de P_1 .

VI.2 - Macho - Fêmea

VI.2.1 - Cortejamento

a) Afastar (AFA)

C - Macho (P_m) próximo da Fêmea (P_f);

R - P_f anda, corre ou voa em direção oposta a P_m ;

P - aumento da distância entre os pombos

b) Aproximar-se do outro (APO)

C - P_1 e P_2 parados, próximos um do outro;

R - um ou ambos os pombos , andam, correm ou voam;

P - diminuição da distância entre P_1 e P_2 .

c) Avançar (AVC)

C - P_m circulando tendo P_f no seu campo visual

R - P_m inclina o corpo, abaixa e abre a cauda, simultaneamente, abduz e estende as asas, infla o papo, eriça as penas e impulsiona o corpo em direção a P_f ;

P - diminuição da distância entre os pombos, P_f pode agachar-se.

d) Bicar outro (BIO)

C - P_m em pé, próximo de P_f que pode estar em pé ou agachado;

R - P_m bica cabeça ou região orbital de P_f ;

P - P_f permanece agachado e fecha os olhos enquanto é bicado na região orbital.

e) Cortejar circulando (CIC)

C - P_m em pé, próximo de P_f ;

R - P_m empinado, cauda aberta e levantada, pisoteia, estende totalmente o pescoço, eriça penas do pescoço, enquanto anda descrevendo um círculo em torno de um ponto no espaço, ao lado do P_f , vocalizando;

P - P_f permanece próxima de P_m ou se afasta.

f) Entrar embaixo do outro (EBO)

C - P_m agachado com o tronco inclinado, cauda levantada, pescoço encolhido e/ou penas do papo eriçadas, tendo P_f no seu campo visual;

R - P_m anda agachado até P_f , introduz cabeça entre as penas de parte do corpo de P_f (abaixo da cauda, do tronco ou pescoço);

P - P_m cabeça parcial ou totalmente embaixo de parte do corpo de P_f , e manutenção da postura agachado.

g) Locomover-se atrás do outro (LOC)

C - P_m em pé tendo P_f no seu campo visual;

R - P_m anda próximo e atrás de P_f ;

P - diminuição da distância entre ambos ou manutenção da mesma no caso de P_f também se movimentar.

h) Montar (MON)

C - P_f agachado, asas parcialmente abduzidas e abaixadas;

R - P_m sobe sobre o dorso do P_f , encostando cada um de seus pés na região de articulação das asas com o tronco do P_f , move a cauda, enquanto agacha, empurra a cauda do P_f para o lado, abaixa a cauda, inclina o corpo ventralmente, levanta-se, bate as asas e pula para o assoalho; na seqüência o P_m sacode o corpo, o P_f levanta-se e ambos andam em fila indiana.

P -

i) Cortejar agachado (CAG)

C - agachado, pescoço encolhido, papo encostado na superfície de apoio e penas do papo eriçadas;

R - balançar a cabeça e ao mesmo tempo abaixar e levantar uma ou as duas asas, de modo repetitivo e estereotipado, podendo ou não ocorrer vocalização;

P -

VI.3 - Macho - Fêmea / Macho - Macho / Fêmea - Fêmea

a) Vocalizar (VOC)

C -

R - movimentar a musculatura do papo;

P - emissão de sons.

Categoria VII - Posturas

Incluem-se nesta categoria as posturas apresentadas pelos animais.

a) Agachado (AG0)

C - pernas flexionadas e corpo próximo à superfície de apoio;

R - permanecer nesta posição, podendo emitir outros comportamentos;

P -

b) Em pé (EMP)

C - pés em contato com superfície de apoio, perna estendida mantendo distância entre o tronco e a superfície de apoio;

R - permanecer nesta posição, podendo emitir outros comportamentos;

P -

c) Encolhido (ENL)

C - pernas semi flexionadas, diminuindo a distância entre o tronco e a superfície de apoio, pescoço encolhido e corpo aparentando tamanho menor se comparado a ele mesmo anteriormente;

R - permanecer nesta posição, podendo emitir outros comportamentos;

P -

d) Encostado (ENT)

C - parte do corpo em contato com parte de objeto ou de outro sujeito ;

R - permanecer nesta posição, podendo emitir outros comportamentos;

P -

Categoria VIII - Parado

Nesta categoria é registrada toda a ausência de respostas observável.

a) Parado (PAO)

C - em pé, agachado ou encolhido;

R - ausência observável de respostas;

P - imobilidade relaxada.

b) Dormindo (DOR)

C - em pé, uma perna flexionada e asa ipsilateral abaixada;

R - olhos fechados e respiração lenta e regular;

P -

Definições auxiliares

a) Deslizar

C - estrutura A em contato com estrutura B;

R - deslocar A, mantendo o contato durante o deslocamento;

P - mudança de posição de A no espaço.

b) Deslocar

C - estrutura A numa posição no espaço;

R - mover A;

P - mudança de posição em relação à posição inicial.

c) Estender

C - estrutura A articulada com estrutura B;

R - mover A no sentido do eixo longitudinal de articulação com B;

P - aumento do ângulo formado pelas faces dos eixos longitudinais de A e B.

d) Empurrar

C - estrutura A do P1 , em contato com objeto (B) ou parte do corpo do P2 (C);

R - exercer pressão e deslocar B ou C, mantendo contato;

P - mudança de posição de B ou C no espaço.

e) Flexionar

C - estrutura A alongada e articulada com estrutura B;

R - mover A em relação ao seu ponto de articulação com B;

P - diminuição do ângulo formado pelas faces ventrais, dorsais ou laterais nos diferentes planos dos eixos longitudinais de A e B.

f) Introduzir

C - estrutura A próxima de estrutura B;

R - deslocar ou deslizar ou transportar A em direção às faces internas de B;

P - A parcial ou totalmente envolvido pelas faces internas de B.

g) Mover

C - estrutura A em contato com estrutura B;

R - estender o(s) músculo(s) ou contraí-lo(s), num padrão organizado;

P - mudança na posição de uma ou mais estruturas em relação a outras e em relação ao ambiente.

h) Prender

C - objeto em contato com estrutura do corpo;

R - manter objeto imóvel e em contato com as faces internas da estrutura do corpo;

P - manutenção do contato.

i) Rotar

C - estrutura A articulada ou posicionada à estrutura B;

R - mover estrutura A em torno de seu eixo longitudinal, descrevendo um ângulo de 360°;

P - giros da estrutura em torno desse eixo.

j) Semi-rotar

C - estrutura A articulada ou posicionada à estrutura B;

R - mover estrutura A em torno do seu eixo longitudinal, descrevendo um ângulo igual ou inferior a 180°;

P - giro da estrutura em torno desse eixo.

k) Soltar

C - objeto (estrutura B) preso por parte do corpo (estrutura A);

R - deslocar A em direção oposta à B;

P - B fora de contato com A (cai quando não está sobre uma superfície de apoio).

l) Tirar de dentro

C - estrutura A dentro da estrutura B;

R - deslocar, atritar, deslizar ou transportar A em direção a abertura de B;

P - saída de A através da abertura de B e ausência de contato entre A e B.

m) Transportar

C - objeto preso ou em contato com uma estrutura do corpo;

R - deslocamento coordenado da estrutura do corpo e do objeto;

P - mudança na posição do objeto no espaço, sem atrito com outros objetos.

Termos auxiliares às definições

Face ventral: a face de uma estrutura, ou parte do corpo voltada para a região anterior do corpo

Face dorsal: a face de uma estrutura, ou parte do corpo voltada para a região posterior do corpo

Proximal: diz-se da estrutura ou parte da estrutura mais próxima do tronco do que outra estrutura ou parte desta.

Distal: diz-se da estrutura ou parte da estrutura mais afastada do tronco do que outra estrutura ou parte

Eixo longitudinal: linha reta imaginária que passa pela maior dimensão de uma estrutura.