

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LUÍS OTÁVIO SIQUEIRA



**MODULAÇÃO CIRCADIANA DA APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM POMBOS:  
ANÁLISE DA SENSIBILIZAÇÃO E DO CONDICIONAMENTO CLÁSSICO  
AVERSIVO DA RESPOSTA AO SOM.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Luís Otávio Siqueira*  
*Elenice*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese de Doutorado apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular. Área de Fisiologia

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

**Campinas – SP**

**2006**

Si75m

Siqueira, Luís Otávio

Modulação circadiana da aprendizagem e memória em pombos: análise da sensibilização e do condicionamento clássico aversivo da resposta ao som / Luís Otávio Siqueira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

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

1. Ritmos circadianos. 2. Aprendizagem - Fisiologia. 3. Condicionamento clássico. 4. Pombo.  
I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Circadian modulation of learning and memory in pigeons: analysis of sensitization and classical fear conditioning of acoustic response.

**Palavras-chave em inglês:** Circadian rhythms; Learning Physiology; Classical conditioning; Pigeons.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Luiz Silveira Menna-Barreto, José Lino Oliveira Bueno, Liana Lins Melo, Francesco Langone.

**Data da defesa:** 03/03/2006.

Data da Defesa: 03/03/2006

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



Prof. Dr. Luiz Silveira Menna-Barreto



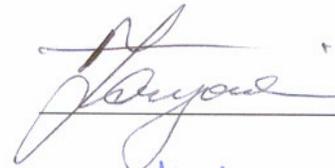
Prof. Dr. José Lino Oliveira Bueno



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Filomena Ceolim



Prof. Dr. Francesco Langone



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liana Lins Melo



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Leite Hunziker



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Celia Spadari-Bratfisch



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar ao Estado de São Paulo, por manter uma instituição como a **FAPESP**, que financiou o presente trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **ELENICE A. DE MORAES FERRARI** pela oportunidade de desempenhar o meu trabalho e crescer profissionalmente.

Aos tantos colegas de laboratório que por aqui passaram.

Agradeço em especial ao amigo **ANDRÉ SCHWAMBACH VIEIRA** pelas várias noites de trabalho.

Ao amigo **FERNANDO CANOVA**, que também dedicou algumas noites de trabalho.

Ao amigo **WASHINGTON LUIZ GOMES** pelas suas assistências técnicas e principalmente pela amizade desenvolvida nesses anos.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e Biofísica que tanto me ajudaram.

A minha professora de inglês **MARIA DO CARMO CASTELLO BRANCO** pela sua amizade, por me ensinar e orientar no estudo da língua inglesa.

Aos meus amigos **DANIEL DUARTE SIMÕES** e **LUCAS AZEVEDO ABREU** que a tanto tempo dividem uma mesma casa e pela amizade e confiança conquistada.

Aos meus tios **VALTER DE OLIVEIRA** e **NEUZA GRACIOLI DE OLIVEIRA** que por todo o período de graduação me acolheram, auxiliaram, me deram carinho e moradia. Esse foi um dos principais auxílios que recebi para desenvolver meus estudos.

Aos meus primos **ANDRÉ LUIZ GRACIOLI DE OLIVEIRA**, **LUCIANA GRACIOLI DE OLIVEIRA IACCOVACCI**, **FERNANDO LUIZ GRACIOLI DE OLIVEIRA** e **CLAUDIA GRACIOLI DE OLIVEIRA**

Ao meu irmão **LUÍS HENRIQUE SIQUEIRA** por me auxiliar sempre que necessário, pela amizade e respeito.

À minha mãe **VALDETE ANTÔNIA DE OLIVEIRA** por todo seu esforço, dedicação, companheirismo. Se hoje estou conseguindo alcançar mais um objetivo, com certeza devo tudo a ela.

**SIQUEIRA, L. O. MODULAÇÃO CIRCADIANA DA APRENDIZAGEM E MEMÓRIA EM POMBOS: ANÁLISE DA SENSIBILIZAÇÃO E DO CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AVERSIVO DA RESPOSTA AO SOM. 2006.**

O comportamento exploratório garante a inspeção, a localização, a identificação e a avaliação precisa de eventos ambientais. A exploração também é abordada como sendo relacionada com a curiosidade do animal direcionada a novos estímulos. Os comportamentos reflexos que precedem as reações exploratórias, caracterizando-se, portanto, como comportamentos pré-exploratórios e também têm importante função adaptativa. Poucos estudos analisaram a influência da hora do dia sobre respostas incondicionadas e condicionadas ao som. Dessa forma, o presente estudo investigou a variação circadiana da amplitude da resposta aversiva ao som em pombos. Experimento I, usou um equipamento de registro automatizado da amplitude da resposta acústica, formado por uma câmara experimental, com uma célula de carga acoplada ao piso e interface dos sinais a um microcomputador utilizado para controle, armazenamento e análise dos dados. O Experimento II analisou a sensibilização da resposta em diferentes horários do dia usando: (a) linha de base com apresentação de 5 estímulos acústicos com intervalo entre sons de 30s; (b) treino, iniciado 5 min após o último som, com dois choques elétricos, intervalo entre choques de 5 min e (c) teste, iniciado 10 min após o último choque, com 40 estímulos acústicos. Os animais dos grupos controles permaneceram na caixa experimental sem estimulação. O Experimento III usou intervalos (a) entre o término da linha de base e o início do treino, (b) entre os dois choques e (c) entre o último choque e o teste foram de 1 min. O Experimento IV investigou o condicionamento clássico de traço, utilizando grupos: Experimental, com três associações som-choque; Randômico, com 3 choques e 3 sons casualizados e Controle, expostos à caixa experimental. Em todos os experimentos usou-se fotoperíodo esqueleto com pulsos de luz (15 min) às 6h (ZT00) e às 18h (ZT12) e sub-grupos em cada horário de teste: ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 e ZT22. De um modo geral, os dados mostraram que tanto a sensibilização quanto o condicionamento clássico aversivo resultaram em alterações da amplitude da resposta ao som que variaram em função do horário de teste, com amplitudes máximas na transição dia-noite e mínimas na transição noite-dia. O conjunto desses dados indicam a modulação do aprendizado aversivo pelo sistema temporizador circadiano.

**SIQUEIRA, L. O. CIRCADIAN MODULATION OF LEARNING AND MEMORY IN PIGEONS: ANALYSIS OF SENSITIZATION AND CLASSICAL FEAR CONDITIONING OF ACOUSTIC RESPONSE, 2006.** Exploratory behavior allows the inspection, localization, identification and the correct evaluation of the environmental events. The exploration also is related with curiosity related to new stimuli. The reflex behaviors that precede the exploratory reactions are characterized as pre-exploratory and also have an important adaptive function. There are few studies that analyze the influence of time of the day on this response. Thus, the present study investigated the circadian variation of response to aversive sounds in pigeons. Experiment I, used a new equipment especially designed for automatic recording of response of acoustic response amplitude. The system is composed by an experimental chamber, with a load cell under the floor and a computer interface for control, storage and data analysis. Experiment II analyzed the sensitization of sound response in different times of the day. The experimental protocol used: (a) baseline with 5 acoustic stimulus presentation with inter-stimulus-interval between sounds of the 30s; (b) training, starting 5 min after the last sound, with a presentation of two electric shocks with interval between electric shocks of the 5 min and (c) test, starting 10 min after the last shock, with 40 acoustic stimuli. The Control Group animals received no stimulation. Experiment III, used 1min time intervals between (a) the end of the baseline and the training, (b) the two electric shocks and (c) the last electric shock and test. Experiment IV investigated the trace fear conditioning, using 2 groups: Experimental, with 3 sound shock associations; Random, with 3 shocks and 3 sounds in the random order and Control, only exposed to experimental chamber. All the experiments used a skeleton photoperiod with 2 light pulses (15 min) to 6h (ZT00) and 18h (ZT12) and sub-groups for each time of test: ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 and ZT22. In a general, the data showed that both sensitization and classical fear conditioning resulted in increases of the amplitude of sound responses with variations depending on the time of the test. Taken together, the data indicated a modulation of aversive learning by the circadian pacemaker.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	10
1. 1. A modulação da magnitude das respostas ao som e o processo de sensibilização .....	11
1. 2. A modulação da magnitude das respostas ao som e o processo de condicionamento clássico aversivo .....	16
1. 3. Bases neurais de respostas ao som.....	18
1. 4. Organização temporal da resposta ao som.....	23
1.4.1. Sistema temporizador circadiano em aves e mamíferos .....	24
2. OBJETIVOS .....	31
2.1. Objetivos gerais.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
Estudo 1. Processos temporais na sensibilização da resposta acústica em pombos .....	34
Introdução .....	34
2. Materiais e Métodos .....	36
2.1. Animais.....	36
Procedimento .....	37
Resultados .....	39
Discussão.....	43
Estudo 2. Variação circadiana da resposta condicionada ao som após o condicionamento clássico aversivo em pombos.....	49
1. INTRODUÇÃO .....	49
2. Materiais e Métodos.....	50
2.3. PROCEDIMENTO: .....	51

3. Resultados .....	55
3.1. Magnitude da resposta durante o teste ao som - registros no intervalo entre 0-1s após o som.....	55
3.2. Magnitude da resposta durante o teste ao som - registros no intervalo entre 1 - 4s após o som.....	60
3.3. Categorias comportamentais observadas durante o teste ao som.....	63
DISCUSSÃO .....	68
4. DISCUSSÃO GERAL .....	74
5. CONCLUSÕES .....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
APÊNDICE .....	102
Revista Brasileira de Engenharia Biomédica (no prelo) .....	103
Sistema automático de análise comportamental em pombos.....	103
Resumo .....	104
Abstract .....	105
Extended Abstract .....	106
Introdução .....	110
Materiais e métodos .....	112
Sistema de Análise Comportamental .....	112
Câmara Experimental.....	113
Microcomputador.....	114
Circuitos de condicionamento do sinal da célula de carga .....	115
Circuitos de controle dos estímulos.....	116
Software para controle do sistema .....	120

	9
Análise Comportamental .....	124
Experimento 1: Análise do sobressalto acústico em pombos.....	124
Procedimento Experimental .....	124
Análise estatística .....	125
Experimento 2: Análise do sobressalto acústico em ratos. ....	125
Procedimento Experimental .....	125
Análise estatística.....	126
Resultados .....	126
Experimento 1 .....	126
Experimento 2 .....	127
Discussão e conclusões.....	128
Agradecimentos.....	132
Referências .....	132

## 1. INTRODUÇÃO

O comportamento exploratório, também referido como exploração, garante a inspeção, a localização, a identificação e a avaliação precisa de eventos ambientais (ADES, 1968; BERLYNE, 1960; BUZSAKI, 1982). Desse modo, os seus componentes vegetativos, reflexos e operantes relacionam-se de maneira direta com as características físicas e funcionais do estímulo. A exploração também é considerada como tendo relações com a curiosidade animal, direcionada a novos estímulos (GLICKMAN e SROGES, 1966). Na investigação dessa classe comportamental as respostas de orientação a estímulos acústicos ou luminosos foram bastante estudadas (ADAMO e BENETT, 1967; HAMASSAKI e BRITTO, 1987; TOLEDO e FERRARI, 1991; FORNEL, 1994; SOKOLOV, 1963). Pode-se considerar que a resposta de orientação faz parte de uma classe que inclui um padrão de reações eliciadas por diferentes tipos de estimulações e que resulta na focalização de um estímulo, por exemplo um som inesperado, cujo valor adaptativo se relacionaria com o aumento da capacidade de processamento sensorial (GRAY, 1975; STADDON, 1983; SOKOLOV, 1960).

Os comportamentos reflexos que precedem as reações exploratórias, caracterizando-se, portanto, como comportamentos pré-exploratórios, também têm importante função adaptativa. Entre esses comportamentos temos o sobressalto, que geralmente antecede o comportamento exploratório. A função biológica de respostas incondicionadas ao som, tais como a resposta de orientação e o sobressalto, pode ser também relacionada com a defesa contra a lesão, a predação ou com a preparação do animal para as respostas rápidas de luta e de fuga.

O sobressalto é uma resposta reflexa e pode ser eliciado por estímulos acústicos, táteis e visuais (KOCH, 1999). A resposta do sobressalto consiste em uma contração rápida e generalizada dos músculos esqueléticos ao longo do corpo evocados por um rápido, intenso e inesperado

estímulo tátil, visual ou acústico. Envolve tanto as reações dos músculos esqueléticos quanto os componentes vegetativos, tais como a taquicardia, a taquipnéia, a piloereção, a midríase e a exoftalmia, (KOCH, 1999; MIYAZATO, *et al.* 1999; YEOMANS e FRANKLAND, 1996).

Embora o sobressalto seja uma resposta reflexa e relativamente simples, pode ser modulado por uma variedade de fatores externos e internos ao organismo. Isto significa que a magnitude do sobressalto pode ser aumentada ou atenuada dependendo de diferentes condições (DAVIS, 1989; PILZ e SCHNITZLER, 1996; FALLS e DAVIS, 1995; HITCHCOCK e DAVIS, 1991; KOCH, 1999). Nesse sentido, os processos de habituação e de sensibilização, considerados como formas de aprendizado não associativo, atuam na modificação das propriedades das respostas aos estímulos sonoros (PILZ e SCHNITZLER, 1996).

### **1. 1. A modulação da magnitude das respostas ao som e o processo de sensibilização**

O sobressalto pode ser reduzido por manipulações experimentais que impliquem em procedimentos de habituação, de inibição latente e de pré-pulso inibitório (FOX, 1978; KOCH e SCHNITZLER, 1997). O estudo desses procedimentos com roedores e humanos tem interesse experimental, teórico e clínico, sendo significativo para o conhecimento sobre os mecanismos que controlam o medo e para o desenvolvimento de estratégias para a supressão do medo patológico (KOCH, 1999).

Na última década, observou-se um crescente número de investigações sobre o fenômeno chamado de pré-pulso inibitório que resulta na diminuição do responder. Esse processo de redução da magnitude do sobressalto acústico é observado em situações nas quais um estímulo acústico de menor intensidade antecede o estímulo que elicia o sobressalto. Dessa forma, é utilizado para investigar a modulação de mecanismos sensório-motores (FOX, 1978; KOCH e SCHNITZLER,

1997) que são relacionados com os mecanismos envolvidos na atenção (HITCHCOCK *et al.* 1989; HITCHCOCK e DAVIS, 1991).

O declínio da amplitude da resposta de sobressalto que ocorre após a repetição de uma mesma estimulação, num curto intervalo de tempo, é considerado indicativo de habituação a curto-prazo ou de curta-duração. Por outro lado, a redução da amplitude da resposta de sobressalto que se mantém entre várias sessões de estimulações repetitivas é referida como indicativa de habituação a longo-prazo ou de longa-duração. Uma grande influência na conceituação da habituação foi dada pela teoria do duplo processo, proposta por Groves e Thompson (1970). Esta teoria postula a existência de dois processos independentes e opostos - habituação e sensibilização - colocando assim a contraposição entre a diminuição e o aumento da resposta em função da apresentação repetida de um mesmo estímulo. A sensibilização da resposta refere-se ao fato de que a repetição prolongada de um mesmo estímulo pode freqüentemente aumentar em vez de diminuir o responder (GROVES e THOMPSON, 1970). A habituação envolveria processamentos neurais numa via estímulo-resposta (E-R) enquanto que a sensibilização envolveria processamentos que por um conjunto de vias, sistemas e regiões que determinam o nível geral de resposta do organismo, que é referido como sistema de estado. Esses dois sistemas inferidos por Groves e Thompson (1970) são supostamente independentes, sendo ativados por mecanismos neuronais separados e, nesse sentido, podem ocorrer com um certo isolamento, dependendo do estímulo, do treino e de variáveis do organismo. Contudo, os dois processos interagem na modulação do resultado comportamental comum.

Na medida que o sobressalto também pode ser considerado como uma resposta protetora, é possível esperar que em situações caracterizadas pela estimulação aversiva ocorra um aumento da sua magnitude. Assim, o processo de sensibilização pode ocorrer quando uma série de estímulos sonoros é antecedida pela apresentação de um estímulo aversivo ou muito intenso.

Nessa situação, o animal passa a responder ao som com magnitude significativamente maior, em comparação a situações em que não ocorre a estimulação aversiva (PLAPPERT, *et al.*, 1999; PLAPPERT, *et al.*, 2001; RICHARDSON, 2000), sendo que o estímulo aversivo, tal como um choque elétrico, é identificado como o estímulo sensibilizador. Desse modo, um dos interesses no estudo da sensibilização reside nas suas relações com o estado emocional do medo, dado que esse processo resulta no aumento da magnitude de respostas de defesa, tal como o sobressalto (DAVIS, 1989).

Num experimento típico de sensibilização do sobressalto (Figura 1), ratos recebem estímulos acústicos para a determinação de uma linha de base de sua resposta ao som. A seguir, um grupo de ratos recebe uma série de choques elétricos antes de ser novamente exposto ao som. Observa-se, então, que esses animais exibem uma magnitude de sobressalto maior em relação aos controles que não receberam os choques (DAVIS, 1989; KIERNAN e WESTBROOK, 1993).

Usando esse procedimento, Davis (1989) analisou a resposta de sensibilização do sobressalto ao som em ratos. O primeiro estímulo acústico foi apresentado 20 s após o último choque. Os resultados sugeriram uma facilitação da resposta de sobressalto, indicando a sua sensibilização.

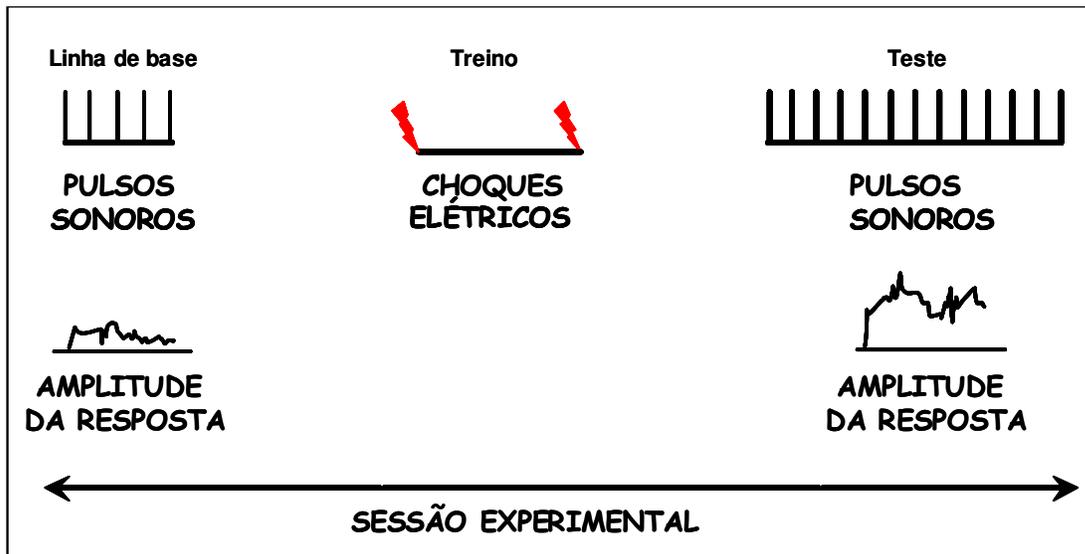


Figura 1. Representação esquemática de um procedimento típico de sensibilização aos estímulos sonoros.

Muitos estudos analisaram a sensibilização em função de intervenções no sistema nervoso central. Por exemplo, Hitchcock *et al.* (1989) relataram que imediatamente (1 s) após uma série de 10 estimulações elétricas, com intervalo de 1 s entre estímulos, ocorreu um aumento na sensibilização do sobressalto em ratos. Após lesão bilateral do núcleo central da amígdala, observaram a diminuição da resposta ao som. Lesões no núcleo lateral e basolateral da amígdala, também bloquearam o aumento do sobressalto acústico imediatamente após uma série de 10 estímulos elétricos com taxa de disparo de 1 choque por segundo (SANANES e DAVIS, 1992). Por outro lado, Boulis e Davis (1992) demonstraram que estimulações elétricas no núcleo coclear ventral, núcleo ventral do lemnisco lateral e núcleo reticular pontino caudal (PnC), podem aumentar a sensibilização da resposta ao som imediatamente após a apresentação de uma série de 10 estímulos aversivos (choques).

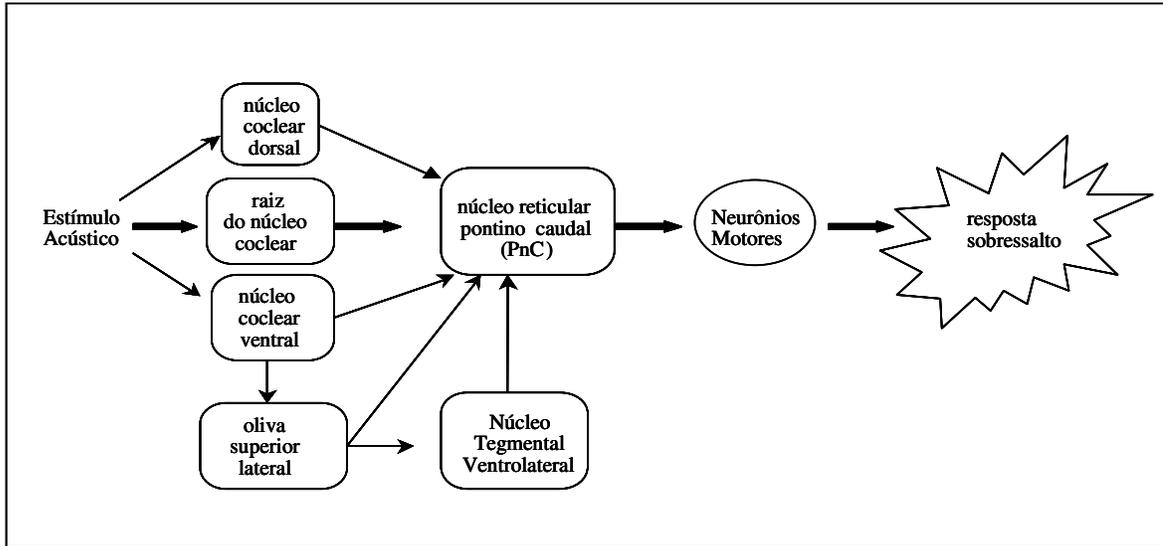


Figura 2. Via neural hipotética que medeia o sobressalto acústico em mamíferos. (adaptado de Davis *et al.*, 1982)

A sensibilização do sobressalto por choques elétricos influencia o circuito primário do sobressalto ao nível do PnC (DAVIS *et al.* 1982). A via primária que medeia o sobressalto é composta por um circuito serial do tronco encefálico com sinapses no núcleo coclear ventral, lemnisco lateral ventral e formação reticular pontino caudal (Figura 2). Recentemente foi proposto que as células gigantes do núcleo reticular pontino caudal são indispensáveis para a organização do sobressalto em ratos (KOCH 1999; PILZ e SCHNITLER 1996; YEOMANS e FRANKLAND, 1996). Segundo Koch (1999) existiria uma projeção direta da parte medial do núcleo central da amígdala, dirigindo-se ao PnC por meio da divisão caudal da via amigdalofugal (HITCHCOCK *et al.*, 1989). Ao mesmo tempo, existem núcleos relés interpostos entre o núcleo central da amígdala e o PnC, que contribuem para a sensibilização, tal como a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo tegmental lateral dorsal (HITCHCOCK *et al.* 1989; HITCHCOCK e DAVIS, 1991) e os núcleos mesencefálicos (FRANKLAND e YOMANS, 1995). Embora o papel do PnC no aumento do sobressalto seja conhecido, não se sabe se os efeitos dessas projeções na sensibilização do

sobressalto seriam mediados por uma facilitação pré-sináptica dos aferentes auditivos ou por uma excitação pós-sináptica dos neurônios do PnC (KOCH, 1999).

## **1. 2. A modulação da magnitude das respostas ao som e o processo de condicionamento clássico aversivo**

O aumento da amplitude das respostas ao som ocorre também em outras situações de aprendizagem, tal como no condicionamento clássico ou Pavloviano. No condicionamento clássico aversivo, a ocorrência de estímulos discretos é associada repetidamente com a apresentação de estímulos aversivos tais como o choque elétrico. Estabelece-se, assim, uma relação de contingência entre os dois estímulos. Nessa situação, o som ou uma luz que é pareada a um choque, torna-se um estímulo condicionado, isto é, adquire controle sobre os comportamentos relacionados com o choque, que é um estímulo incondicionado (DAVIS, 1992; FENDT e FANSELOW, 1999; GREBA *et al.*, 2000; LeDOUX, 2000). Com base no intervalo de tempo entre a apresentação do som e do choque elétrico, dois procedimentos experimentais podem ser distinguidos: o procedimento de condicionamento de atraso e o procedimento de condicionamento de traço. O procedimento de condicionamento de atraso é aquele onde o estímulo incondicionado (choque elétrico) é apresentado imediatamente após o estímulo neutro (som) ou simultâneo ao término desse estímulo (DAVIS, 1992; FENDT e FANSELOW, 1999; KOCH, 1999).

A aprendizagem que resulta dessa situação geralmente é referida como medo condicionado, podendo ser avaliada pela potenciação das respostas ao som ou pelo *freezing* ao contexto do condicionamento. De fato, após poucos pareamentos som-choque, o estímulo condicionado passa a induzir um aumento da amplitude da resposta ao estímulo associado com o choque, de *freezing* ao contexto do condicionamento e alterações de respostas neurovegetativas, como o aumento da pressão sangüínea, taquicardia, piloereção, aumento da pressão, arterial, dilatação da pupila e

alterações hormonais (ANDERSON *et al.*1985; DAVIS, 1992; PILZ e SCHNITZLER, 1996; GREBA *et al.*, 2000; QUINN *et al.*, 2002; SACCHETTI *et al.*, 2002; MISANE *et al.*, 2005). O condicionamento ao som ou ao contexto pode ser adquirido com um único treino e podem ser estudados independentemente um do outro (KOCH, 1999; MISANE *et al.*, 2005).

Para a medida da resposta condicionada de medo, o teste é normalmente realizado de 4h – 24h após o treino. Os comportamentos podem ser analisados no mesmo ambiente onde o treino foi realizado ou em ambientes diferentes. No primeiro caso, o animal é re-exposto ao ambiente sem que ocorra nenhuma estimulação. Já no segundo caso, o ambiente pode ter dimensões, materiais, iluminação e odores diferentes do ambiente de treino, porém o mesmo som do treino é reapresentado. Dessa forma, podemos extrair duas informações diferentes. No primeiro caso temos a informação do condicionamento ao contexto e no segundo a informação do condicionamento ao som.

A modulação da resposta ao som verificada na potenciação do sobressalto pelo medo foi estudada com um procedimento originalmente introduzido em 1951 (BROWN, *et al.*, 1951) e posteriormente divulgado por Davis e colaboradores (DAVIS, *et al.*, 1993; FALLS e DAVIS, 1995; HITCHCOCK e DAVIS, 1991; ROSEN *et al.* 1992). A partir dos estudos de Davis esse modelo experimental foi muito investigado com o objetivo de conhecimento da organização neural do comportamento de medo condicionado, especialmente com relação às funções do hipocampo e da amígdala (QUINN *et al.*2002; SACCHETTI, *et al.*2002; SANTINI *et al.* 2001). A potenciação do sobressalto pelo medo é operacionalmente definida pela ocorrência de um sobressalto com amplitude aumentada numa situação em que o estímulo sobressaltante, o som, é pareado com um estímulo, uma luz, que foi anteriormente condicionado a um estímulo aversivo, um choque elétrico (DAVIS *et al.* 1992). Esse processo é específico à modalidade de estímulo usada na aquisição do medo, não se generaliza para outras modalidades, sendo máximo se o som sobressaltante for

apresentado após o estímulo condicionado, exatamente no mesmo momento em que ocorreria o choque (DAVIS *et al.* 1993; DAVIS *et al.* 1994; KOCH, 1999). Por outro lado, se o estímulo condicionado for apresentado repetidamente sem ser seguido pelo estímulo incondicionado, observa-se que a magnitude do sobressalto se reduz e o animal deixa de responder ao estímulo. Dessa forma, o animal passa a aprender que esse estímulo não indica mais a presença do estímulo aversivo, ou seja, ocorre um processo de extinção do valor condicionado do estímulo e da potenciação da resposta (HITCHCOCK *et al.* 1989; HITCHCOCK e DAVIS, 1991; FRANKLAND e YOMANS, 1995). Assim, na extinção tal como na habituação ocorre um decréscimo da magnitude da resposta ao longo do treino; a diferença é que o processo de habituação é não-associativo, em que um estímulo contínuo ou repetitivo não é associado com nenhum outro enquanto que a extinção é um processo no qual a associação entre os estímulos é rompida pela apresentação apenas do estímulo condicionado (DAVIS, 1992; PILZ e SCHNITZLER, 1996; KOCH, 1999; LeDOUX, 2000; MISANE *et al.*, 2005).

### **1. 3. Bases neurais de respostas ao som**

Pode-se afirmar que a investigação sobre as bases neurais do medo condicionado e a compreensão da organização neural do medo e da ansiedade desenvolveram-se principalmente na última década do século XX (FENDT e FANSELOW, 1999). Inúmeros estudos foram conduzidos, desenvolvendo-se testes de respostas de medo incondicionado e condicionado (GRAEFF *et al.*, 1993; CAMPEAU e DAVIS, 1995; MISERENDINO *et al.* 1990; ROGAN *et al.* 1997).

No estudo das bases neurais do sobressalto potenciado pelo medo é verificado que existe um modelo relativamente completo da circuitaria envolvida no aumento do sobressalto (KOCH, 1999). Nesse contexto, o complexo amigdalóide desempenha um importante papel tanto na aquisição como na expressão do medo condicionado. As lesões no núcleo central ou basolateral

da amígdala, bloqueiam a ocorrência do medo, numa situação em que se usa o procedimento do sobressalto potenciado pelo medo (DAVIS *et al.* 1993). A associação entre um estímulo neutro e um estímulo aversivo ocorreria nos núcleo lateral e basolateral da amígdala (CAMPEAU e DAVIS, 1995; MISERENDINO *et al.* 1990; ROGAN *et al.* 1997), que constituem locais onde ocorrem convergências de projeções das regiões corticais e talâmicas que transmitem informações sensoriais e de projeções de núcleos que processam informações nociceptivas, tais como, o complexo nuclear parabraquial e os núcleos talâmicos intralaminares posteriores (DAVIS *et al.* 1994). O córtex perirrinal envia informações sobre o estímulo condicionado visual ou auditivo para a amígdala (CAMPEAU e DAVIS, 1995; ROSEN *et al.* 1992). Microinjeções de AP5, um antagonista do receptor NMDA, na amígdala basolateral previnem a aquisição do medo no paradigma do medo condicionado, indicando que o receptor NMDA está envolvido nos processos subjacentes à associação entre o estímulo neutro e o evento aversivo (CAMPEAU *et al.*, 1992; MISERENDINO *et al.*, 1990). A associação entre o estímulo incondicionado e o estímulo condicionado, provavelmente muda as propriedades dos circuitos intra-amigdalóides (CAMPEAU e DAVIS, 1995; ROGAN *et al.*, 1997). Então, o estímulo condicionado, aumenta a atividade neuronal do núcleo central da amígdala, e este, por meio de projeções para o PnC, induz um aumento da excitabilidade dos neurônios do PnC, levando a um aumento do sobressalto (KOCH, 1999). Interessantemente, o sobressalto potenciado pelo medo, pode ser readquirido mesmo quando ocorre a destruição massiva da amígdala após vários treinos (KIM e DAVIS, 1993), entretanto não são conhecidas quais as estruturas cerebrais seriam responsáveis pela reaquisição do medo nessa situação (KOCH, 1999).

Alguns estudos indicaram que as sinapses – relés, interpostas entre a amígdala e o PnC, são importantes para a potenciação do sobressalto pelo medo e para o aumento da resposta do sobressalto acústico após choques elétricos. Os núcleos mesencefálicos são os alvos das fibras da

via amigdalofugal que transmitem os efeitos do aumento do sobressalto no PnC para estruturas do tronco encefálico, ou talvez diretamente à medula espinhal (FRANKLAND e YEOMANS, 1995; YEOMANS e POLLARD, 1993). Assim, a substância cinzenta mesencefálica também desempenha um importante papel para a sensibilização do sobressalto pelos choques elétricos (FENDT *et al.*, 1994), tanto quanto a expressão (FENDT *et al.*, 1996; FENDT, 1998) ou a supressão da potenciação do sobressalto pelo medo (FENDT *et al.*, 1996; FENDT, 1998; WALKER *et al.*, 1997). Os núcleos dorsolaterais e ventrolaterais da substância cinzenta periaquedutal desempenham papéis inversos na regulação do medo (FENDT e FANSELOW, 1999; WALKER e DAVIS, 1997). O núcleo tegmental laterodorsal também se projeta para o PnC (KOCH *et al.*, 1993; KOCH, 1999) e também desempenha um papel na potenciação do sobressalto pelo medo (HITCHCOCK e DAVIS, 1991).

Dessa forma, provavelmente a amígdala funcionaria como um centro de comando para o aumento dessa resposta e também influenciaria a potenciação do sobressalto pelo medo por meio de múltiplas vias descendentes dos núcleos da substância cinzenta periaquedutal, núcleos tegmental laterodorsal e os núcleos mesencefálicos (KOCH, 1999). Cada um desses núcleos está conectado a diferentes centros somatossensoriais e vegetativos. As projeções desses complexos grupos celulares para o PnC determinariam o grau de aumento da resposta do sobressalto acústico (Figura 3). Ocorreria, assim, dependendo de uma constelação específica de condições internas ou externas numa dada situação, o envolvimento de diferentes sistemas neurais eferentes da amígdala para a modulação das respostas de proteção contra o estímulo que indica perigo (KOCH, 1999).

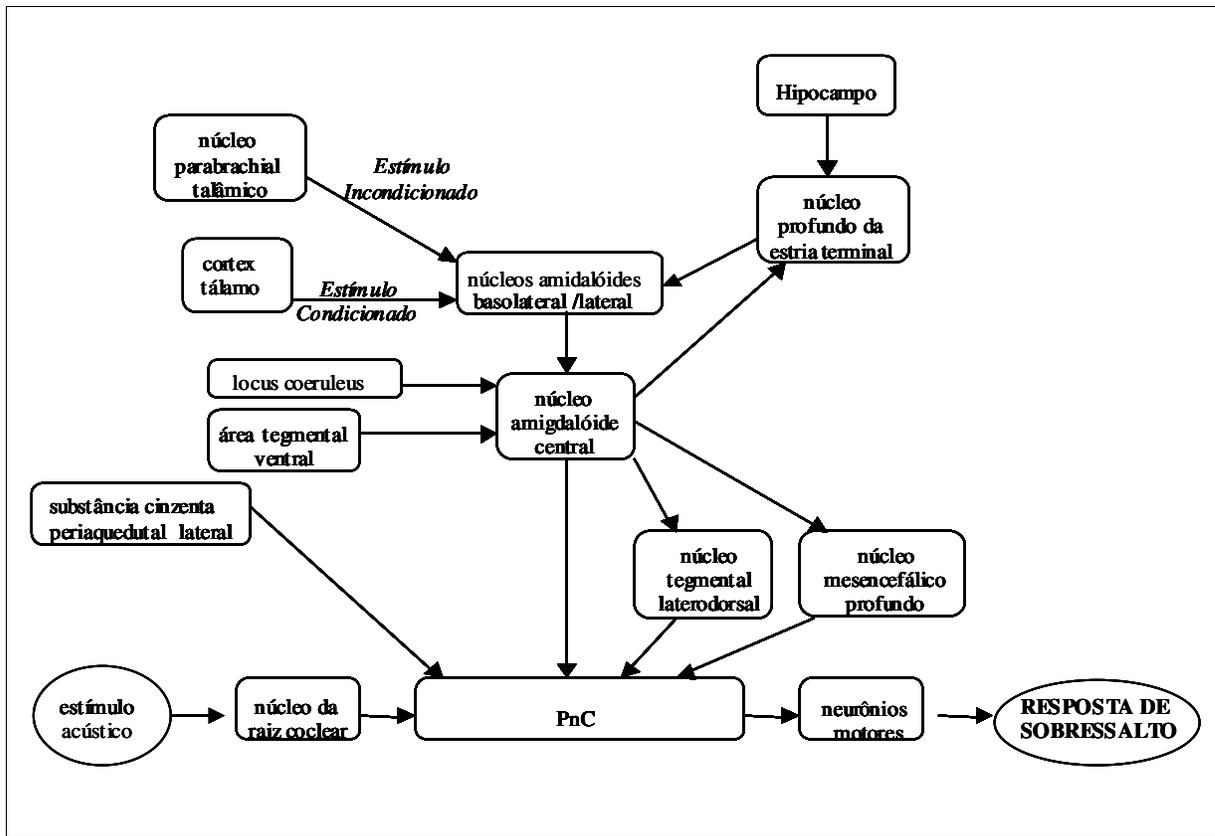


Figura 3. Vias neurais que participam da potenciação do sobressalto pelo medo e via neural das estruturas relacionadas com o condicionamento clássico aversivo. (adaptado de Koch, 1999).

A maior parte do conhecimento sobre o condicionamento ao medo deriva de estudos com mamíferos, e a investigação dos processos neurais subjacentes ao medo condicionado coloca em foco a amígdala como um sistema essencial (FANSELOW e LeDOUX, 1999; FENDT e FANSELOW, 1999; LeDOUX, 1996). Nos últimos anos, foi considerado que outras estruturas, tais como o hipocampo, também estão envolvidas com o condicionamento do medo (BAST et al, 2001; BRITO *et al.*, 2006; KIM & FANSELOW, 1992).

Nesse contexto, foram levantadas questões referentes, por exemplo, ao papel do hipocampo no condicionamento ao contexto e a estímulos discretos, como também no condicionamento de

traço em comparação ao de atraso (KEAY e BANDLER, 2001; GRILLON e BAAS, 2003; McECHRON, *et al.*, 2004; RUNYAN e DASH, 2005).

Da mesma forma, os estudos do condicionamento de atraso em camundongos e ratos, revelaram que injeções pré-treino de antagonista do receptor NMDA, como MK801 ou APV, no ventrículo lateral ou no hipocampo dorsal (HPd) induzem um prejuízo no medo contextual, enquanto o medo ao som permanece inalterado (BAST *et al.*, 2003; FANSELOW *et al.*, 1994).

Também é interessante notar que estudos com o condicionamento de traço, usando um intervalo de tempo entre 1s até 30s entre o estímulo neutro e o incondicionado, mostraram que ocorria um prejuízo tanto na memória contextual quanto na memória ao som em camundongos e ratos (MCECHRON *et al.*, 1998; QUINN *et al.*, 2002).

Também usando a resposta de congelamento (*freezing*) como medida de medo, Quinn *et al.* (2002) fizeram lesões excitotóxicas no HPd após o treino de associações som-choque com o condicionamento de traço. Uma semana após o treino, os animais foram testados ao som e ao contexto. Os ratos que tiveram lesão no hipocampo exibiram menos *freezing* durante a apresentação do som e a re-exposição ao contexto, em comparação aos controles. Assim, os autores sugerem que o HPd participaria da consolidação do medo condicionado adquirido por condicionamento de traço.

Por outro lado Fendt *et al.* (2005) investigaram os efeitos de lesões excitotóxicas realizadas no HPd antes do condicionamento de traço num procedimento de potenciação do sobressalto. A lesão do HPd bloqueou a aquisição do condicionamento ao som, mas não afetou o condicionamento ao contexto. Esses dados indicariam que sem o HPd participaria do condicionamento ao som, mas não do condicionamento contextual, quando o medo é medido pela potenciação do sobressalto pelo medo.

De forma semelhante, Wanisch *et al.* (2005) mostraram que a formação hipocampal intacta é importante para a expressão do condicionamento de traço. Nesse estudo, foi examinado o papel dos receptores NMDA e da síntese protéica no HPd para a memória após o condicionamento de traço. O bloqueio de receptores NMDA, por meio de infusão do antagonista AP5 no HPd, antes do condicionamento, atenuou a resposta de *freezing* ao som, de forma dose dependente, quando o teste foi realizado 24h após o treino. Da mesma forma, o bloqueio da síntese protéica por anisomicina no HPd também prejudicou a resposta de *freezing* ao contexto.

Brito *et al.* (2005) verificaram a expressão do produto do IEG *zenk* tanto no HPd quanto no hipocampo ventral (HPv) de pombos, durante a aquisição do condicionamento aversivo de atraso, com maior marcação de núcleos Zenk-positivos no hipocampo ventromedial. Além disso, Sperandéo *et al.*, (2005) também verificaram maior marcação de núcleos Zenk-positivos no hipocampo ventromedial de pombos induzida pela evocação de memória contextual aversivo.

#### **1. 4. Organização temporal da resposta ao som**

Nessa área de conhecimento sobre as funções e organização neural de repostas a estímulos sonoros, encontra-se em menor número os estudos preocupados em examinar a influência da hora do dia sobre essas respostas (CHABOT e TAYLOR, 1992; VALENTINUZZI *et al.* 2000).

Isso é notável quando confrontado com o fato de que os seres vivos apresentam capacidade de modificação de suas reações, oscilações na síntese de hormônios, alterações na capacidade de concentração ou atenção ao longo das 24h do dia, sendo possível especular que o horário do teste em que o organismo é submetido, poderia ser uma variável determinante para medir o aprendizado e memória. A mais conhecida e evidente variação rítmica é vista no ciclo atividade-reposo. Essa oscilação define um ritmo biológico que foi até agora melhor estudado - o ritmo circadiano – ou

seja, aquele que compreende oscilações num período de aproximadamente 24h (MOORE-EDE, 1982; CHABOT e TAYLOR, 1992). Tais mudanças circadianas nas variáveis biológicas, em condições naturais, estão sincronizadas ao ciclo externo claro/escuro, resultantes do ambiente físico da rotação da Terra no seu eixo, condição na qual o período é 24h (MOORE-EDE, 1982; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002; MARQUES e BARRETO, 1988). Assim a ritmicidade biológica pode ser sincronizada por fatores ambientais externos. A principal pista para os organismos sincronizarem o seu relógio biológico com o ambiente consiste no ciclo claro/escuro (PITTENDRIGH, 1981; YAMAZAKI *et al.*, 2000; HAMADA *et al.*, 2001).

#### 1.4.1. Sistema temporizador circadiano em aves e mamíferos

Nas últimas décadas foram muito estudados os aspectos fisiológicos, histológicos e moleculares dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo em mamíferos. Porém, poucos estudos estão concentrados em esclarecer a localização e o funcionamento dos NSQ em aves (YOSHIMURA *et al.*, 2001).

Em mamíferos, sabe-se que o principal mecanismo gerador e sincronizador dos ritmos circadianos reside nos NSQ, localizados lateralmente na região anterior do hipotálamo, acima do quiasma óptico, e que o principal sinal para os ajustes desse marcapasso circadiano é o ciclo claro - escuro (GOLEMBEK *et al.*, 2004). Outras estruturas que fazem parte desse sistema são: a via retino-hipotalâmico (TRH), a glândula pineal com o seu hormônio melatonina, e o folheto intergeniculado talâmico. Sob condições de iluminação constante, o ritmo circadiano assume períodos de livre curso de aproximadamente 24h. O mecanismo de sincronização é mediado por mudanças diárias de fase induzida pela luz no marcapasso circadiano (PITTENDRIGH, 1981).

Em roedores, cada NSQ consiste entre 8000 a 10000 células (VAN DEN POL, 1980; ABRAHAMSON e MOORE, 2001; MOORE *et al.*, 2002). Nos mamíferos as pistas visuais alcançam

o NSQ via TRH, uma via neural que se inicia nas células ganglionares da retina e se projetam para o NSQ do hipotálamo (MORIN, 1994; KIM *et al.*, 2001). A informação fótica que estimula o NSQ, via TRH é suficiente para a sincronização do marcapasso circadiano em condições de claro escuro (RUSAK e BOULOS, 1981). Os mecanismos intercelulares da comunicação entre o TRH e NSQ não são conhecidos. Também não é claro se todas as células do NSQ são capazes de gerarem oscilações rítmicas em mamíferos (REPERT e WEAVER, 2002). Por exemplo, em *hamsters*, foi evidenciado que regiões do NSQ com marcação de células imunorreativas para vasopressina (VIP), contém células caracterizadas por possuírem uma expressão rítmica do mRNA *per1* e *per2*. Em contraste, não foram observados neurônios marcados na região caudal do NSQ em *hamsters* (HAMADA *et al.*, 2001). Porém, não é bem compreendido como as células individuais que constituem esse núcleo realizam a dupla função de oscilação e restauração dos ritmos (KARATSOREOS *et al.*, 2004).

As aves, tão bem quanto os mamíferos, possuem uma notável capacidade de perceber informações fóticas sobre o ambiente pela retina, glândula pineal e fotorreceptores encefálicos (CASSONE e MENAKER, 1984; FOSTER e SONI, 1998; KOJIMA e FUKADA, 1999). Porém, as aves possuem um complexo sistema de temporização circadiana em comparação com os mamíferos. Seu sistema de temporização compreende as estruturas: olhos, fotorreceptores encefálicos, a glândula pineal e o NSQ do hipotálamo. A glândula pineal secreta o hormônio melatonina durante a noite em todas as espécies estudadas, *in vivo* e *in vitro*, e acredita-se que essa liberação hormonal possa estar influenciando o comportamento circadiano do organismo (BINKLEY, 1981; TAKAHASHI e MENAKER, 1982; CANTWELL e CASSONE, 2002).

Estudos mostram que lesões na pineal (PX) são capazes de abolir a atividade motora (EBIHARA e KAWAMURA, 1981; GASTON e MENAKER, 1968; GÜNTÜRKÜN *et al.*, 1993), a temperatura corpórea em pardais (BINKLEY *et al.*, 1979).

Outro órgão que produz ritmicamente a melatonina é a retina. E como na glândula pineal, a maior produção é observada na fase de escuro (BINKLEY *et al.*, 1979; HAMM E MENAKER, 1980). Assim, a enucleação bilateral (EX) em pardais é capaz de prejudicar a ritmicidade circadiana da atividade locomotora e a temperatura corporal, enquanto que a PX/EX abole esses ritmos em pombos (EBIHARA *et al.*, 1984).

Em aves, o NSQ também desempenha um papel importante na sincronização do organismo por estímulos fóticos, da mesma forma que em mamíferos (CASSONE, 1988; YOSHIMURA, 2000; YOSHIMURA, 2001; YASUO, 2003). Porém, não há o preciso conhecimento de uma estrutura homóloga ao NSQ de mamíferos. Estudos anatômicos recentes no cérebro de aves descreveram um grupo de células adjacentes à base do terceiro ventrículo, diretamente acima do quiasma óptico, chamado de NSQ, devido a sua similaridade com o NSQ de mamíferos (CROSBY e SHOWERS, 1969; YOSHIMURA, 2001; YASUO, 2003; BRANDSTÄTTER e ABRAHAM, 2003). Os primeiros estudos de lesão sugeriram que este grupo de células podia na verdade, representar a estrutura funcional equivalente ao NSQ de mamíferos (EBIHARA e KAWAMURA, 1981; SIMPSON *et al.*, 1981; TAKAHASHI e MENAKER, 1982). Entretanto, os limites desse grupo de células em diferentes espécies de aves e a clara descrição na extensão rostro-caudal e das propriedades citoarquitetônicas ainda não são totalmente conhecidas (BRANDSTÄTTER e ABRAHAM, 2003).

Assim, na tentativa de descobrir qual seria o marcapasso circadiano em aves, duas estruturas na região hipotalâmica foram indicadas como possíveis candidatos: o núcleo pré-óptico periventricular, também chamado de núcleo supraquiasmático medial (mNSQ) e o núcleo supraquiasmático visual (vNSQ) (CANTWELL e CASSONE, 2002; YOSHIMURA, *et al.*, 2001). Estudos citoarquitetônicos demonstram que o mNSQ localiza-se adjacente ao terceiro ventrículo, na face rostral do quiasma óptico, e essa localização é comparável àquela do NSQ de mamíferos. O outro candidato para o NSQ de aves, o vNSQ é localizado mais caudal e lateralmente ao mNSQ.

O vNSQ foi proposto como o NSQ de aves, e por isso, também pode ser considerado como o marcapasso circadiano primário em aves (BRANDSTÄTTER e ABRAHAM, 2003). Essa suposição foi primariamente baseada na presença de projeções da retina, que em mamíferos constituem um dos padrões que caracterizam o NSQ (UNDERWOOD *et al.*, 2001), na presença de sítios ligantes de melatonina (CASSONE e BROOKS, 1991) e possivelmente por uma atividade metabólica rítmica (CASSONE, 1988; LU e CASSONE, 1993).

Estudos de lesão no vNSQ sugerem que esse grupo de células possa, na verdade, representar uma estrutura funcionalmente equivalente ao NSQ em mamíferos (EBIHARA e KAWAMURA, 1981; SIMPSON *et al.*, 1981; TAKAHASHI e MENAKER, 1982).

De fato, Cassone e colaboradores propõem que o vNSQ de aves é comparável ao NSQ de mamíferos (CASSONE e MENAKER, 1984; CASSONE e BROOKS, 1991; CASSONE, 1988; CANTWELL e CASSONE, 2002). Esses estudos são baseados em similaridades anatômicas e fisiológicas entre as estruturas de aves e mamíferos, que são oriundas de estudos na distribuição da projeção retino-hipotalâmica, imunohistoquímica e ritmicidade da captação da 2-deoxiglicose (2DG). Esses estudos também demonstraram que lesões no vNSQ eliminam o ritmo da produção de norepinefrina na glândula pineal de galinha (CASSONE *et al.*, 1990).

Cassone (1988) mostrou que a captação da 2-DG no vNSQ e outras estruturas diencefálicas no cérebro de pardais, tais como o núcleo geniculado lateral dorsal e núcleo anterior lateral, exibem uma variação da ritmicidade circadiana. Seus resultados demonstraram maiores atividades e maior taxa de metabolismo nesse grupamento de neurônios ao meio-dia, tanto para os animais testados na condição de claro-escuro, quanto na condição de iluminação constante. Essa condição de iluminação constante foi fornecida por uma luz vermelha tênue para evitar o efeito do estresse causado pelo escuro. Esses dados demonstram que essas estruturas são moduladas ritmicamente e que o vNSQ pode ser a estrutura homóloga ao NSQ de mamíferos.

Cassone e Menaker (1984) propuseram um modelo para explicar como ocorre a interação das estruturas circadianas em aves. Segundo esse modelo, chamado de sistema de regulação neuroendócrina o vNSQ seria inibido pela liberação de MEL na circulação sanguínea pela pineal. Este sistema neuroendócrino sincronizaria os múltiplos osciladores garantindo a estabilidade e a precisão do sistema circadiano.

Cantwell e Cassone (2002) mostraram uma variação rítmica circadiana da captação da 2-deoxiglicose nas estruturas visuais do cérebro de galinhas. Esses resultados mostraram que as mudanças circadianas da captação de 2-DG no vNSQ é mais alta no dia e mais baixa na noite. Esse dado é consistente com aqueles encontrados no vNSQ de pardais (CASSONE, 1988) e do NSQ de mamíferos (SCHWARTZ, 1990). Nesses estudos (CASSONE, 1988; CANTWELL e CASSONE 2002) foi demonstrado que a captação da 2-DG é um método eficiente para a determinação da atividade dessas estruturas e que também pode ser usado em estudos que analisam a ritmicidade circadiana em aves.

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que o mNSQ é anatomicamente comparável ao NSQ de mamíferos. Uma projeção direta da retina ao mNSQ foi observada por Shimizu *et al.* (1994) e por Norgren e Silver (1989). Lesões realizadas no mNSQ prejudicam a ritmicidade circadiana em várias espécies de aves, embora permaneça a possibilidade de que essas lesões afetaram tanto o mNSQ quanto o vNSQ (EBIHARA e KAWAMURA, 1981; SIMPSON e FOLLET, 1981; TAKAHASHI e MENAKER, 1982). Dessa forma, estudos que utilizam lesões nessas condições podem não ser a ferramenta mais adequada para verificar a homologia dessas estruturas.

Assim, Yoshimura *et al.* (2001) estudaram quais são as estruturas hipotalâmicas relacionadas com a expressão e manutenção da ritmicidade circadiana em aves. Os resultados, por meio da técnica de hibridização *in situ* mostraram que em diversas espécies de aves, ocorria a

expressão dos genes *qClock*, *qPer2*, *qPer3* no mNSQ, sendo que a expressão do gene *qPer2* foi mais óbvia do que os outros genes. Seus resultados não indicaram expressão dos genes no vNSQ nesses animais. Assim, para confirmar seus dados no hipotálamo de codorna, foi analisada a expressão do gene *qPer2* no mNSQ de outras espécies de aves. Tal como em codornas, a expressão do gene *qPer2* foi observada no mNSQ de pardais, galinhas e pombos. Entretanto, não se observou expressão dos genes no vNSQ. Assim, os resultados fornecem uma forte evidência que o mNSQ seria o oscilador circadiano em aves, fundamentada primeiramente no fato de que os genes *clock* são expressos no mNSQ, mas não no vNSQ. Além disso, a expressão do *qPer2* no mNSQ exibe uma ritmicidade circadiana.

#### 1.4.2. Ritmicidade circadiana, comportamento e aprendizagem

A ritmicidade circadiana foi descrita em diferentes atividades tais como o desempenho na roda de atividade, comer e beber. Recentemente, foram relatadas variações circadianas em ratos submetidos ao labirinto em cruz elevado, testados em fases diurna e noturna sob diferentes condições de iluminação (RUSAK, 1981; BERTOGLIO e CAROBREZ, 2002). Como esses ritmos comportamentais também persistem em condições ambientais constantes, com período de aproximadamente 24h são considerados como ritmos que são gerados endogenamente (CHABOT e TAYLOR, 1992). Esses ritmos são controlados por um oscilador ou relógio interno que pode ser sincronizado por um estímulo ambiental, especialmente pelas condições fóticas (DAAN e PITTENDRIGH, 1976).

Tal como outros comportamentos, o sobressalto acústico também apresenta variações ao longo do dia. Davis e Sollberger (1971) relataram que em ratos mantidos em condição claro-escuro ocorre um aumento da amplitude do sobressalto durante a fase escura, quando comparado com a fase de claro. Em outro estudo, Horlington (1970) analisou o nível de atividade e o sobressalto durante a fase inativa e durante a fase ativa. Os resultados mostraram que os animais

responderam com maiores amplitudes do sobressalto na fase de atividade em comparação com a fase de inatividade, porém não ocorreram mudanças na atividade motora nas duas fases. Esses dados sugerem uma independência entre estes e o ritmo de atividade locomotora.

Chabot e Taylor (1992) relatam que a amplitude do reflexo de sobressalto acústico em ratos exibe uma robusta ritmicidade diária, com amplitudes entre 50% a 100% maior durante a fase de escuro, quando comparadas com a fase de claro. Além disso, de acordo com medidas feitas sob diferentes intensidades acústicas, em vários momentos do dia, foi verificado que não ocorre variação no limiar auditivo do rato nesse período de 24h (CHABOT e TAYLOR, 1992). O conjunto desses dados sugere, assim, que o reflexo do sobressalto acústico é endogenamente modulado por um sistema de marcapasso circadiano. Frankland e Ralph (1995) analisaram a amplitude do sobressalto acústico em ratos, comparando diferentes horários da hora circadiana, demonstrando que em condições ambientais constantes a amplitude do sobressalto foi maior na noite subjetiva.

Em um estudo preliminar em nosso laboratório demonstraram em pombos submetidos ao fotoperíodo esqueleto uma variação da magnitude do sobressalto acústico em dois momentos do dia, sendo um grupo testado no dia subjetivo e o outro na noite subjetiva. Os resultados indicaram que os pombos testados no dia subjetivo apresentaram uma maior magnitude do sobressalto acústico no início da sessão em relação aos testados na noite subjetiva e uma taxa de redução do sobressalto significativamente maior na manhã subjetiva. As diferenças entre os grupos experimentais podem ser interpretadas como modulação circadiana do horário do teste na magnitude da resposta.

Influências da hora do dia foram também discutidas em estudos que analisaram a memória em diferentes testes comportamentais e em diferentes espécies tais na sensibilização em aplísia (FERNANDEZ *et al.* 2003), no condicionamento contextual em camundongos e pombos (CHAUDHURY e COLWELL, 2002; VALENTINUZZI *et al.*, 2001; FERRARI *et al.*, 1999), e em

humanos (KOULACK 1997; MAURY e QUEINNEC 1992; NESCA e KOULACK 1994; TESTU e CLARISSE, 1999). Esses estudos indicaram que os mecanismos de aprendizado e memória são relacionados com o contexto, o qual inclui a hora do dia em que o teste ocorreu (RALPH *et al.*, 2001), embora Fernandez *et al.* (2003) considerem que é a hora do treino em vez da hora do teste que determina o ritmo da sensibilização de longo prazo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

No sentido de estender análises prévias e aquelas de outros estudos do laboratório, o presente estudo pretendeu analisar a resposta ao som em pombos em diferentes horários do dia, ou seja, para investigar a modulação da expressão dessa resposta pelo sistema temporizador circadiano. Para isso, foram analisados os processos de aprendizagem aversiva ao som em pombos caracterizados por sensibilização e condicionamento clássico. Os pombos foram submetidos a um esquema de iluminação em fotoperíodo esqueleto no sentido de controlar efeitos de o mascaramento que ocorrem em iluminação com ciclo claro-escuro.

As análises foram conduzidas após um procedimento de sensibilização, com o objetivo de verificar se a potenciação da magnitude do sobressalto em função desse tipo de aprendizagem mostra variações ao longo do dia. Além disso, com o objetivo de verificar se essas variações mantêm um mesmo tipo de oscilação, independentemente das condições estabelecidas para a aprendizagem, essas análises foram também realizadas numa outra condição de aprendizagem dada por associações som-choque num condicionamento de traço.

### **2.2. Objetivos específicos**

Em seu conjunto o presente trabalho foi direcionado aos seguintes objetivos específicos:

1. Para a avaliação automatizada da amplitude da resposta ao som, padronizar um sistema de registro comportamental automatizado em pombos para avaliar a amplitude e a latência da resposta ao som.
2. Analisar as variações das amplitudes das respostas ao som após o treino de sensibilização ao longo do período de 24 h.
3. Analisar as variações das amplitudes das respostas ao som após o treino de sensibilização ao longo do período de 24 h com diferentes intervalos, curtos e longos, entre os estímulos durante a sensibilização.
4. Analisar as variações das amplitudes das respostas ao som após o treino em condicionamento clássico aversivo ao longo do período de 24 h.

Para atender aos objetivos propostos foram realizados diferentes experimentos. Inicialmente, foi desenvolvido e a padronizado um equipamento de registro automatizado do comportamento em pombos, para detectar com precisão a latência e a amplitude das respostas ao som. A seguir foram conduzidos os estudos sobre a variação da resposta ao som em diferentes horários do dia, com o procedimento de sensibilização e de condicionamento clássico aversivo.

### **2.3. Organização do texto da tese**

O relato dos trabalhos experimentais, que constituem o núcleo central desta tese, está organizado em dois estudos. O Estudo 1 analisa o processo de sensibilização da resposta acústica após a estimulação aversiva em função dos horários de teste ao longo do dia e dos intervalos entre estímulos. O Estudo 2 analisa a variação da resposta condicionada ao som após o treino em condicionamento clássico aversivo em diferentes horários do dia.

Na seção de Apêndice são apresentados dois artigos, formatados em acordo com as regras das revistas nas quais foram publicados. O primeiro é referente ao desenvolvimento e padronização do equipamento de registro automatizado do comportamento de pombos, para

detectar com precisão a latência e a amplitude das respostas ao som. Esse artigo está formatado de acordo com as normas da *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. Nele são descritos com detalhes a padronização do equipamento e as técnicas de registro automático da amplitude e da latência das respostas ao som que são utilizados no Estudo 1 e Estudo 2. O segundo artigo é referente a uma publicação no periódico *Biological Rhythm Research* com dados parciais sobre a variação da sensibilização da resposta ao som em pombos em diferentes horários do dia.

### **3. RESULTADOS**

## **Estudo 1. Processos temporais na sensibilização da resposta acústica em pombos**

### **Introdução**

O estudo da modulação circadiana do aprendizado e da memória é conduzido com diferentes espécies de animais sugere que um relógio oscilador circadiano modula a capacidade do aprendizado e da memória. De fato, certos mecanismos oscilatórios sugerem um ritmo no aprendizado e na memória (RAGHAVAN *et al.*, 1999; KOLE *et al.*, 2001; TAPP e HOLLOWAY, 1981). Estudos em humanos (KOULAK, 1999; MAURY e QUEINNEC, 1992; NESCA e KOULAK, 1994; TESTU e CLARISSE, 1999) e em camundongos e pombos (CHAUDHURY e COLWELL, 2002; VALENTINUZZI *et al.*, 2001; FERRARI *et al.*, 1999) indicam que os mecanismos de aprendizado são relacionados com a hora circadiana em que o treino ocorre. A hora do treino determina também o ritmo circadiano da sensibilização de longo prazo (FERNANDEZ *et al.*, 2003; RALPH *et al.*, 2002; SIQUEIRA *et al.*, 2005).

Os processos temporais relacionados à organização circadiana do aprendizado e da memória necessitam de mais investigações. Assim, questões importantes relacionadas sobre como o aprendizado e a memória modulam o sistema de temporização circadiana estão, agora, emergindo e requerem mais investigações. Por exemplo, é bem estabelecido que a luz é capaz de reajustar o relógio, dependendo da intensidade e da hora circadiana em que for apresentada (MOORE-EDE *et al.*, 1992). Entretanto, a efetividade da luz como estímulo reajustador pode ser modulada por propriedades aversivas condicionadas (AMIR e STEWART, 1999). De fato, após a exposição à luz em um contexto previamente associado com o choque observou-se supressão tanto da expressão da proteína Fos no núcleo supraquiasmático (NSQ) quanto da mudança de

fase no ritmo de desempenho na roda de atividade (AMIR e STEWART, 1998). Uma outra fonte de evidência encontra-se no fato de que os núcleos central e basolateral da amígdala têm expressões rítmicas da proteína *Period 2* (PER 2) diametricamente opostas e diferencialmente afetadas pela adrenalectomia (LAMONT *et al.*, 2005). Esse conjunto de resultados indica que as variáveis relacionadas à emoção, motivação e cognição podem modular os ritmos circadianos fisiológicos e comportamentais regulados pelo NSQ. Eles também levantam questões relacionadas aos papéis modulatórios e como essas variáveis podem influenciar os processos circadianos. Entre essas variáveis nós podemos mencionar tanto a intensidade quanto os parâmetros relacionados à frequência e duração e o intervalo entre estímulos (IEE) que são bem conhecidos como determinantes das características comportamentais do aprendizado (DAVIS, 1989; KIERNAN e WESTBROOK, 1993; KOCH, 1999).

Por exemplo, sensibilização, uma forma não associativa de aprendizagem, que se refere ao aumento da magnitude da resposta após a administração de choques elétricos, é afetada por tais variáveis (DAVIS, 1989; PILZ e SCHNITZLER, 1996; PLAPPERT *et al.*, 1999; PLAPPERT *et al.*, 2001). Estudos da sensibilização da resposta do sobressalto acústico (RSA) indicam que tanto a RSA quanto a sensibilização exibem uma modulação circadiana (HORLINGTON, 1970; KOCH, 1999; SIQUEIRA *et al.*, 2005). A RSA é uma resposta rápida a um estímulo intenso e repentino que provavelmente tem uma função protetora contra a injúria, um predador ou um estímulo inesperado (DAVIS *et al.*, 1993; FALLS e DAVIS, 1995; DAVIS e SOLLBERGER, 1971; KOCH, 1999).

O presente estudo investigou se os intervalos entre estímulos (IEE) afetam a amplitude da sensibilização da resposta ao som e sua variação circadiana. Variou-se a duração dos intervalos entre os choques e entre o último choque e a apresentação do primeiro estímulo sonoro no teste. A

variação circadiana foi investigada por meio de testes realizados a cada 4h, ao longo do período de 24h.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Animais

Os sujeitos usados foram pombos machos adultos *C. livia* (N=169), pesando 350-400 g, adquirido de um mesmo fornecedor. Eles foram mantidos individualmente em gaiolas viveiros (2 m X 2.5m x 2.40 m) com temperatura controlada (25°C) e um ciclo de luz 12:12h (luzes ligadas às 6:00h e desligadas 18:00h) durante um período de 15 dias antes da manipulação experimental. Água e comida foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram distribuídos randomicamente em grupos experimentais, expostos ao treinamento de sensibilização, e em grupos controles, expostos à câmara experimental sem nenhuma estimulação. Os grupos foram usados para avaliações comportamentais conduzidos a cada 4 h durante o dia. Em cada um dos grupos, experimentais e controles, foram usados (n=8) animais. Condições diferentes de IEE foram programadas no Experimento 1 e no Experimento 2. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de experimentação com animais (Instituto de Biologia, UNICAMP, Brasil) e foi conduzido de acordo com o guia internacional de ética para investigação de dor experimental em animais consciente (ZIMMERMAN, 1983).

**Equipamentos:** A câmara experimental utilizada foi uma caixa de acrílico transparente (30X30X50), alojada dentro de uma câmara de madeira ventilada localizada dentro de uma sala com isolamento acústico. A estimulação acústica foi fornecida através de um alto falante localizado dentro da câmara, localizado na parede do lado direito (altura de 25 cm). A câmara experimental foi conectada a um computador com um *software* para o controle da apresentação dos estímulos e para o registro das análises gráficas da amplitude das respostas. A magnitude da resposta para

cada estímulo foi medida por um acelerômetro localizado embaixo do piso, o qual detectava a movimentação dentro da caixa em unidades (kgf). A magnitude da resposta (M) foi gerada automaticamente dentro de uma janela temporal de 4s e foi reportada como a diferença entre a amplitude máxima registrada para cada tentativa (A) e o peso do pombo (W).

## **Procedimento**

### **Habituação à câmara experimental**

Após 15 dias de adaptação às condições de biotério, os pombos foram manuseados diariamente e transportados dentro de um saco preto de algodão para a câmara experimental. Os animais foram habituados por um tempo de 50 min. Este procedimento foi repetido por 4 dias que precederam imediatamente o teste.

### **Fotoperíodo Esqueleto**

Um fotoperíodo esqueleto (FPE) foi usado para evitar possíveis efeitos de mascaramento do ciclo claro-escuro normal (ASCHOFF, 1987; PITTENDRIGH, 1965). A introdução do FPE foi gradual. Três dias antes do início das análises comportamentais, a fase de escuro de 12 h foi substituída por uma iluminação tênue de luz vermelha (2 lux); essa modificação foi repetida por dois dias. No terceiro dia, um fotoperíodo esqueleto foi instalado, com dois pulsos de luz branca (80 watts) de 15-min separado um do outro por 11:45 h de luz vermelha tênue. O pulso de luz branca matinal ocorreu às 6:00 h, hora circadiana convencionalmente referida com um *zeitgeber* zero (ZT00). A hora dos testes então, corresponderam à ZT02; ZT06; ZT10; ZT14; ZT18; ZT22. Todos os procedimentos foram conduzidos sob luz vermelha tênue.



(teste). Em ambas condições de longo IEE e curto IEE os animais controles foram retestados na câmara experimental, por 45 min, sem nenhuma estimulação e a magnitude da resposta foi medida a cada 30 s.

**Análise Estatística:** Os dados relativos à amplitude da resposta foram analisados usando uma ANOVA de duas vias com grupo (experimental e controle) e hora (horário dos testes) como fatores. Comparações relacionadas às diferenças de fase (dia x noite) e latência (curta e longa latências) foram conduzidas com ANOVA de medidas repetidas. Múltiplas comparações *post hoc* foram feitas usando o teste de Tukey-Kramer.

## Resultados

A variação da magnitude da resposta dos estímulos acústicos ao som em função de diferentes horas do dia na condição de longa duração do IEE é apresentada na Figura 5. Cada ponto representa a diferença entre os valores da amplitude durante o teste e o valor da amplitude durante a linha da base (Teste menos LB). As análises da amplitude foram realizadas para respostas de curta latência (0-1 s) e respostas de longa latência (1-4 s). Os pombos Experimentais mostraram maiores amplitudes das respostas de longa latência (Painel B) quando comparadas com as respostas de curta latência (Painel A) e aos grupos controles. Valores relativos das respostas de curta latência foram observadas nos testes conduzidos em diferentes horas do dia. As comparações estatísticas das amplitudes observadas nas respostas de curta latência não indicaram efeitos significativos de grupo ( $F_{[1, 82]} = 0,02$ ;  $p = 0,89$ ) ou hora do teste ( $F_{[5, 82]} = 1,61$ ;  $p = 0,17$ ). Contrariamente, as amplitudes de respostas de longa latência dos pombos experimentais mostraram uma clara variação em acordo à hora do dia, com maiores valores observados durante a noite, com pico no ZT14. As análises estatísticas conduzidas para respostas de longa latência com o teste ANOVA indicaram um efeito de grupo ( $F_{[1, 82]} = 4,65$ ;  $p < 0,05$ ), da hora do teste ( $F_{[5, 82]} =$

3,03;  $p < 0,05$ ), com uma interação significativa entre grupo e hora do teste ( $F_{[5,5]} = 2,97$ ;  $p < 0,05$ ) que pode ser relacionada com as maiores diferenças observadas à noite. As análises *post hoc* com o teste Tukey-Kramer mostraram diferenças significantes entre o Grupo Experimental ZT14 quando comparado com os outros grupos experimentais e controles ( $p < 0,05$ ).

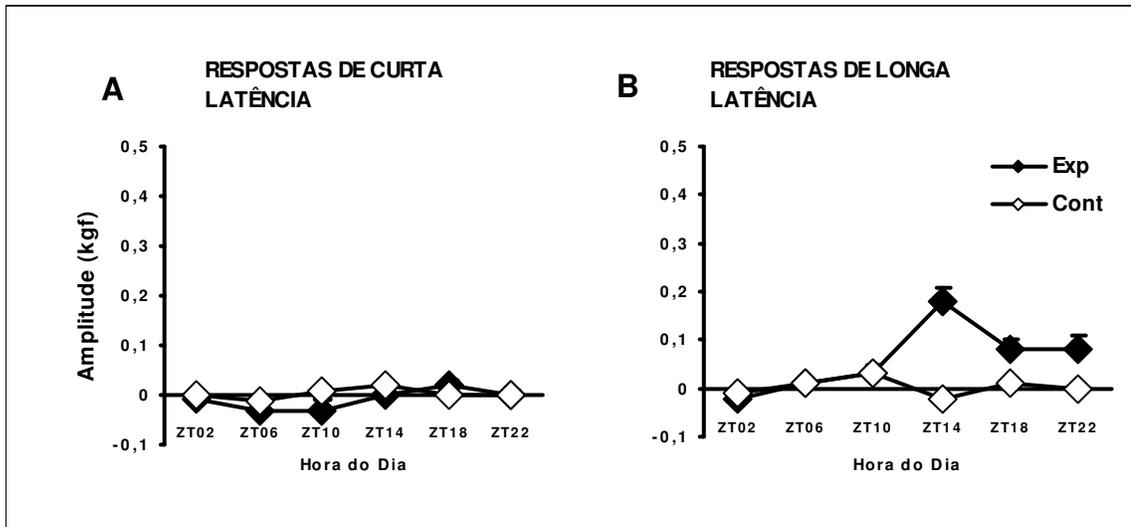


Figura 5. Valores médios da diferença entre a amplitude da resposta acústica durante o Teste e a Linha de Base para respostas de curta (0-1 s) e longa latência (1-4 s) para intervalo longo entre estímulos. O cálculo entre a diferença do Teste menos a Linha de base foi considerada somente para os cinco primeiros estímulos durante o teste. A magnitude dos Grupos Controles foi medida a cada 30 segundos. Barras Verticais indicam o erro padrão médio (EPM).

A Figura 6 apresenta a variação da magnitude da resposta aos estímulos acústicos em função das diferentes horas do dia na condição de curta duração do IEE. Cada ponto representa a diferença entre o valor da amplitude durante o teste e a amplitude durante a linha de base (Teste menos LB). As análises das amplitudes foram realizadas para respostas de curta latência (0-1 s) e

respostas de longa latência (1-4 s). Os pombos experimentais mostraram maiores amplitudes das respostas de longa latência (Painel B) em comparação com as respostas de curta latência (Painel A) e aos grupos controles. As amplitudes das respostas de curta e longa latência mostraram uma clara variação em acordo com a hora do dia, com maiores amplitudes durante a noite. A amplitude das respostas dos animais controles permaneceu sem variação nas diferentes horas do dia. As análises estatísticas para respostas de curta e longa latência com o teste de ANOVA indicaram (Painel A) um efeito de grupo ( $F[1, 66]= 13,61$   $p<0,001$ ) e hora do teste ( $F[5, 66]= 2,56$   $p<0,05$ ) com maiores amplitude durante à noite. Análises *post hoc* com o teste Tukey-Kramer mostraram uma diferença significativa entre os grupos experimentais ZT14 com ZT02 e ZT06 e todos os grupos controles. A ANOVA indicou um efeito de grupo ( $F[1, 66]= 19,43$   $p<0,001$ ), de fase ( $F[5, 66]= 2,97$   $p<0,05$ ) e uma interação significativa ( $F[5, 5]= 1,41$   $p<0,05$ ), com maiores diferenças à noite. Análises *post hoc* com o teste Tukey-Kramer mostraram uma diferença significativa entre os grupos experimentais ZT14 com ZT02 e ZT06 e todos os grupos controles.

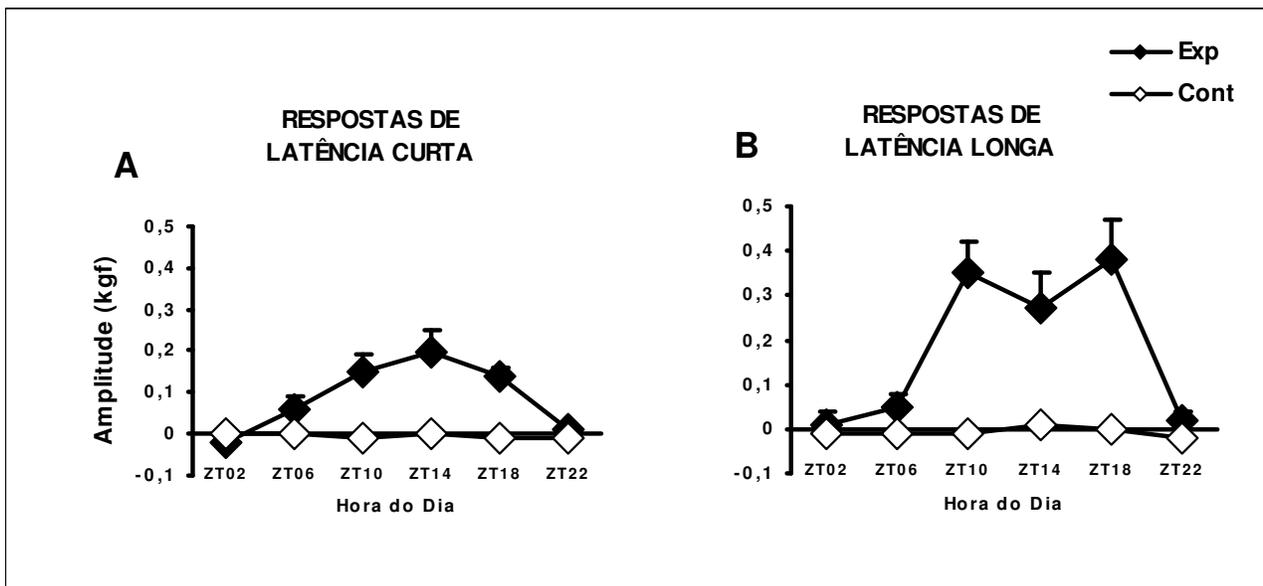


Figura 6. Valores médios da diferença entre a amplitude da resposta acústica durante o Teste e a Linha de Base para respostas de curta (0-1 s) e longa latência (1-4 s) para intervalo curto entre estímulos. O cálculo entre a diferença do Teste menos a Linha de base foi considerada somente

para os cinco primeiros estímulos durante o teste. A magnitude do comportamento dos Grupos Controles foi medida a cada 30 s. As barras verticais indicam o erro padrão médio (EPM).

A Figura 7 compara as diferenças na resposta aos estímulos acústicos em função da fase do ciclo: os dados do dia foram agrupados com os resultados dos ZT02, ZT06 e ZT10; os dados da noite foram obtidos dos resultados agrupados de ZT14, ZT18 e ZT22. Os dados foram relatados nas condições de IEE de longa e curta duração como um índice relativo (amplitude durante o teste/ amplitude durante a linha de base) para as respostas de curta e longa latência. Os valores relativos maiores que 1, indicam um aumento da resposta durante o teste (sensibilização). Na condição de IEE de longa duração, houve uma clara diferença entre a sensibilização do dia e noite para os dados das respostas de longa latência.

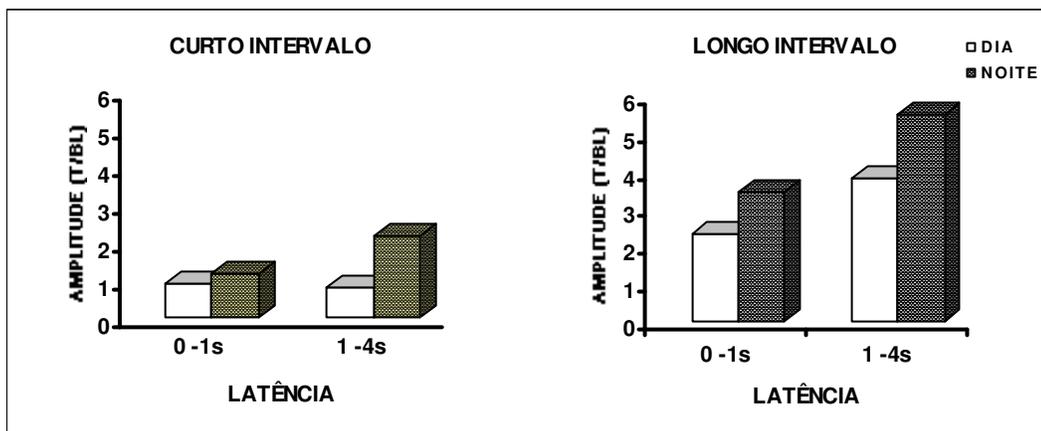


Figura 7. Taxa média de sensibilização calculada para o dia (ZT02, ZT06, ZT10) e para noite (ZT14, ZT18, ZT22) como função das respostas de curta e longa latência. Os valores foram calculados em cada sessão como o coeficiente da amplitude da amplitude do Teste/Linha de Base.

As análises estatísticas com ANOVA de medidas repetidas confirmaram diferenças significativas para fase ( $F[1, 43]= 9,91$ ;  $p < 0,01$ ) e latência da resposta ( $F[1, 43]= 5,61$ ;  $p < 0,05$ ).

As comparações *post hoc* com o teste Tukey-Kramer indicaram um efeito de fase somente para as respostas de longa latência, com maiores valores à noite ( $p < 0,05$ ). Na condição de intervalos de curta duração, também foram observadas diferenças entre a sensibilização do dia e da noite. Nesta condição a ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significantes em função da fase ( $F[1, 31] = 5.48$ ;  $p < 0,05$ ) e em função da latência da resposta ( $F[1, 31] = 4,46$ ;  $p < 0,05$ ). As análises *post-hoc* com o teste Tukey-Kramer confirmaram que durante à noite, as amplitudes das respostas foram maiores ( $p < 0,05$ ) e que as respostas de longa latência a noite, tiveram maiores amplitudes ( $p < 0,05$ ).

## **Discussão**

O presente estudo mostrou que a apresentação de choques com intervalos entre estímulos curtos (1 min) resulta na sensibilização da resposta acústica, como indicado pelas medidas da magnitude da resposta acústica após o treino relativamente aos valores da LB. Os aumentos na magnitude da resposta após a exposição aos choques elétricos com curto intervalo entre estímulos foram maiores para os animais testados durante a noite. Esse resultado revelou um efeito da hora do dia na sensibilização da resposta em pombos após a exposição aos choques elétricos. Entretanto, intervalos entre estímulos longos (5min e 10 min) resultaram predominantemente em magnitudes das respostas durante o teste que foram comparativamente menores. Nesse sentido, um pico noturno discreto na magnitude da resposta acústica também foi observado. Assim, os dados mostraram que, tanto na condição de intervalos entre estímulos curtos e longos, a magnitude da resposta foi maior à noite. Dessa forma, esses dados revelaram oscilações na magnitude da sensibilização da resposta acústica nos pombos que foram expressas sob uma condição de intervalos entre estímulos curtos e longos, durante o dia. Isso corrobora os dados de estudos prévios indicando a modulação dos processos de aprendizado e memória pelo sistema

temporizador circadiano (CHAUDHURY e COLWELL, 2002; FERNANDEZ *et al.*, 2003; SIQUEIRA *et al.*, 2005; CHABOT e TAYLOR, 1992a; CHABOT e TAYLOR, 1992b; FRANKLAND e RALPH, 1995). Esse argumento é adicionalmente suportado pela falta de um claro efeito rítmico nos dados dos animais controles, sugerindo que o efeito do ritmo diário na sensibilização foi devido a uma modulação dos processos de aprendizagem pelo sistema temporizador circadiano. Dessa forma, os presentes dados são relacionados aos estudos em mamíferos que indicaram uma modulação circadiana da resposta acústica (HORLINGTON, 1970; CHABOT e TAYLOR, 1992b; FRANKLAND e RALPH, 1995).

Com isso, um ponto principal deste estudo é a contribuição ao conhecimento da organização circadiana dos processos de aprendizagem e da oscilação da sensibilização da resposta aos estímulos acústicos em diferentes horários do dia. Dessa forma, tanto o treino quanto o teste foram conduzidos durante uma única sessão e os resultados do presente estudo indicaram uma variação da hora do dia no aprendizado e na recuperação. Nesse sentido, nossos dados não confirmam aqueles que indicam que o aprendizado de curto prazo não é modulado pelo marcapasso circadiano ou sujeito a um prejuízo pelas mudanças no marcapasso circadiano (FERNANDEZ *et al.*, 2003; REIJMERS *et al.*, 2001). Eles, então, sugerem a importância de pesquisas futuras envolvendo os mecanismos circadianos de aprendizado e memória de curto e longo prazo.

Vale a pena dizer que a amplitude da resposta acústica sensibilizada oscila durante as diferentes horas do teste, em ambas condições de intervalo de tempo. O pico dessa oscilação ocorreu no início da fase de noite ZT 14 e as mínimas amplitudes ocorreram no ZT 22 e ZT 02, isto é, na transição da noite para o dia e no início do dia. Nossos dados sugerem que no início da fase de noite pode ocorrer a regulação de mecanismos fisiológicos e comportamentais pelo sistema circadiano que resulta em aumento da sensibilização, enquanto antes do amanhecer e no início do dia, esse sistema controla mecanismos que resultam na diminuição da sensibilização. De fato, é

bem conhecido que ritmos diurnos em processos fisiológicos e comportamentais estão sob o controle de um sistema de mensuração do tempo chamado relógio circadiano que é geralmente reajustado por pistas ambientais temporais, como a luz. Em mamíferos, o oscilador central do sistema circadiano – o NSQ – regula a expressão cíclica de um limitado número de genes relógios (tais como, *Per*, *Cry*, *Bmal1*, etc.) e centenas de genes (YOSHIMURA *et al.*, 2001; HAMADA *et al.*, 2001; HIROTA e FUKADA, 2004). Na verdade, Lamont *et al.*, (2005) relataram recentemente um ritmo diário significativo da expressão do PER2 no núcleo central da amígdala que foi máximo no início da fase de escuro ZT13 e mínimo no ZT1, o início da fase de luz. Interessantemente, esse padrão diário da expressão do PER2 no núcleo central amígdala é comparável ao encontrado no presente estudo para a sensibilização da resposta acústica na condição de curta duração do intervalo entre estímulos.

Assim, nossos dados podem ser considerados indicativos de que o relógio circadiano está envolvido também na modulação da retenção da memória que envolve a sensibilização após a estimulação aversiva em pombos. Entretanto, nós ainda necessitamos de melhores explicações de quais vias e sistemas neuroquímicos desempenham um papel nessa ação. De acordo com Saper *et al.* (2005) o NSQ de mamíferos pode modular as estruturas cerebrais que são envolvidas no processamento do medo e da dor por meio de uma complexa rede neural que inclui aferentes diretos ao núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH). As eferências do NSQ alcançam o DMH por meio de uma via ventral e dorsal à zona adjacente sub-paraventricular (SPZ) que são, respectivamente, relacionadas aos comportamentos e ao ciclo de sono-vigília. No contexto do presente estudo esta evidência é especialmente interessante porque se sabe que o DMH e também a substância cinzenta periaquedutal, que é um dos seus aferentes, desempenham um importante papel na organização dos comportamentos relacionados à defesa e agressão e no processamento de dor nos mamíferos. Assim, nós podemos considerar que a variação na

sensibilização, como observado em nossos dados pode resultar do processamento numa rede neural comparável ao descrito em (FANSELOW, 2000). Além disso, tais mecanismos regulatórios podem ser também relacionados aos sinais hormonais originados de retroalimentação que modulam o sistema circadiano, semelhantes àquelas que envolvem as interações entre a melatonina e corticosterona (LAMONT *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2001).

Os presentes dados indicaram que a resposta ao som envolve uma seqüência comportamental com respostas com curta e longa latência. Respostas de curta latência referem-se à classe de resposta acústica reflexa que pode ser caracterizada como a RSA (DAVIS, 1989; KOCH, 1999; DAVIS *et al.*, 1993), enquanto respostas de longa latência podem ser referidas como comportamento exploratório, com características de um comportamento operante. O efeito de sensibilização foi claramente observado após IEE curtos com o aumento da magnitude nas duas classes de respostas acústicas. Assim, a magnitude da resposta reflexa foi negativamente afetada pelo longo IEE, como indicado pela diminuição da magnitude observada durante os testes conduzidos em diferentes horários do dia. Entretanto, nós podemos dizer que a longa duração do IEE inibiu a sensibilização da RSA, mas não a sensibilização da resposta acústica de longa latência. Entretanto, IEE longo resultou em pouca variação da resposta acústica de longa latência nos diferentes horários quando comparado à condição de curto IEE.

Na verdade, a diferença na magnitude da resposta acústica observada nas condições de curta e longa duração do IEE constituiu um aspecto próprio do presente estudo que levanta questões importantes e necessita de melhores explicações. Neste contexto, pode ser interessante lembrar fatores relacionados a processos neurais de integração sensório-motora subjacentes a essa resposta. A diminuição da resposta poderia, nesse contexto, ser referida às mudanças na eficiência sináptica entre os neurônios sensoriais e motores. Pode-se lembrar por exemplo, uma via relativamente simples que é localizada no tronco cerebral e ativa neurônios motores craniais e

espinais que medeiam a RSA. Um importante elemento dessa via é o núcleo caudal da formação reticular pontino caudal (PnC). Interessantemente, esse núcleo é também o alvo de várias entradas de núcleos cerebrais que estão envolvidos na modulação (i.e., sensibilização) da RSA. Essas mudanças no processamento da resposta sináptica envolvem uma extensa rede neural que inclui entradas de outras estruturas, tais como amígdala e outras estruturas do sistema límbico. Então, o efeito da estimulação aversiva recente - IEE curto- no circuito neural, isto é, quando a estimulação aversiva precede imediatamente a estimulação auditória pode ser relacionada a uma transmissão sináptica forte no núcleo integrativo que se projeta para os neurônios motores. Por outro lado, com IEE longo o efeito da estimulação recente pode diminuir com a passagem do tempo. Adicionalmente, o animal terá tempo suficiente para responder às outras fontes de estimulação do ambiente, com exploração, por exemplo, ativando outras vias neurais mais complexas. Tais considerações relacionam-se com o fato de que os pombos reagem ao choque com as respostas incondicionadas, tais como, um sobressalto robusto, pular, correr, voar e vocalizar. Caracteristicamente, após tais respostas incondicionadas o animal apresentará a exploração, que pode, então, preceder uma intensa imobilidade, identificada como comportamento de *freezing* (BAST *et al.*, 2003; BRITO *et al.*, 2005; FANSELOW, 2000). Se o IEE é suficientemente longo para produzir a ocorrência de comportamentos exploratórios ou *freezing* é possível considerar que eles possam representar uma expressão comportamental de medo condicionado a um contexto potencialmente perigoso. Em tais casos, a exposição do animal aos pulsos sonoros no mesmo contexto onde o choque foi apresentado pode resultar em processos de inibição comportamental. Provavelmente, a diminuição na magnitude da resposta observada relativa à LB e aos animais controles pode ser relacionada a tais fatos. Entretanto, é válido notar que ainda se requer um melhor entendimento dos processos comportamentais e neurais referente à sensibilização da

resposta ao som após a exposição aos choques elétricos, principalmente quando os aspectos da modulação circadiana são considerados.

Uma consideração final pode ser dirigida ao fato de que em ambas condições de IEE as maiores magnitudes das respostas acústicas foram observadas à noite. Um claro efeito de fase foi observado com a sensibilização ocorrendo predominantemente durante a noite. Isso pode ter um significado biológico para os animais diurnos como os pombos e o processamento auditório pode ser crítico para a percepção de pistas que são importantes para a segurança e sobrevivência. Como evidenciado pelo presente estudo, a exposição prévia aos estímulos perigosos, tais como o choque, pode afetar diferencialmente o processamento da informação durante a noite.

## **Estudo 2. Variação circadiana da resposta condicionada ao som após o condicionamento clássico aversivo em pombos.**

### **1. INTRODUÇÃO**

A maior parte do nosso conhecimento sobre condicionamento do medo baseia-se em dados de experimentos que usaram o condicionamento clássico aversivo (FANSELOW, 2000). Nessa situação, ocorre a programação das associações entre um estímulo neutro (*CS*, do inglês *conditioned stimulus*) e um estímulo incondicionado (*US*, do inglês *unconditioned stimulus*) que podem variar, embora se observe que o estímulo condicionado geralmente se sobreponha a ou tenha seu término contíguo ao *US*. O procedimento no qual existe contigüidade entre o início do *US* e o término do *CS* é referido como condicionamento de atraso (KRUPA *et al.* 1993; LAVOND *et al.* 1993; MCCORMICK *et al.* 1982). Em outro tipo de procedimento, a apresentação do *CS* é separada do *US* por um intervalo de tempo, sendo conhecido como condicionamento de traço (WOODRUFF, 1993; WOODRUFF e PAPKA 1996). Esses dois tipos de procedimentos de condicionamento, atraso e de traço, parecem ativar circuitos nos quais diferentes regiões cerebrais são criticamente envolvidas nos processos comportamentais resultantes. Nesse sentido é interessante que alguns trabalhos colocaram um papel funcional mais proeminente do hipocampo na aquisição da resposta condicionada em situações de condicionamento de traço (LAVOND *et al.* 1993; MCCORMICK *et al.* 1982; MCECHRON *et al.*, 1998; QUINN *et al.*, 2002).

Nos estudos sobre variações do condicionamento do medo realizado por Chaudhury (2002) e Ferrari *et al.* (2000) foram usados esquemas de condicionamento de atraso. Ferrari *et al.* (2000) avaliaram alterações condicionadas no comportamento de *freezing* ao contexto e no comportamento exploratório ao *CS* (som) em pombos, em dois horários, respectivamente às 7:30h

e 19:30h. Valentinuzzi *et al.* (2001) estudaram o condicionamento clássico aversivo durante a fase de atividade e repouso de camundongos submetidos ao fotoperíodo esqueleto, em dois diferentes horários do dia, com testes em 5 dias sucessivos. Observou-se uma diferença significativa entre os grupos da manhã e da noite subjetiva na expressão e na extinção do medo condicionado ao contexto. Como houve evidência da variação temporal do condicionamento ao contexto, mas não do condicionamento ao som, supôs-se que o relógio biológico agiria por diferentes vias neurais.

**1.2. Objetivo:** No sentido de estender nossas análises prévias e aquelas de outros estudos do laboratório, o presente estudo investigou as variações da resposta ao som em diferentes horários do dia, em pombos submetidos a associações som-choque num condicionamento de traço. Nesse esquema houve um intervalo de 1s entre o término do som e o início do choque.

## **2. Materiais e Métodos**

**2.1. Sujeitos:** Foram utilizados pombos, machos, adultos, derivação não controlada da espécie *Columba lívia*, adquiridos de um mesmo fornecedor. Após a chegada ao biotério de aves, esses animais foram mantidos em quarentena, recebendo banho e tratamento para controle de parasitas internos e externos. Durante esse período, os animais passaram por manipulações de caráter dessensibilizatório, profilático (administração de anti-helmínticos) e terapêutico (extinção de escabiose). Em seguida, foram alojados em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum* (mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração especial para aves, areia e farinha de ostra). Os pombos foram identificados numericamente e catalogados. O peso do animal foi acompanhado periodicamente. Ventilação higiênica periódica foi promovida por exaustores e o controle de temperatura foi promovido pelo uso de condicionadores de ar. Nestas condições os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12h, com a luz se acendendo às 6:00h. Esses sujeitos foram atribuídos a diferentes grupos, sendo que em cada grupo houve 6 subgrupos

organizados de acordo com o horário do teste. Os testes foram realizados a cada 4h, ao longo do período de 24h. O Grupo Experimental (n=30) foi exposto a 3 associações som-choque em condicionamento clássico aversivo. O Grupo Controle Randômico (n=30) foi submetido a 3 choques elétricos e a 3 estimulações sonoras numa seqüência aleatória. O Grupo Controle ao Contexto (n=30) foi exposto somente à caixa experimental.

**2.2. Equipamento:** Foi utilizada uma caixa construída em acrílico (30X30X50cm), onde os animais receberam estímulos acústicos através de um alto falante localizado lateralmente à caixa, e situado 40 cm acima de sua base. O registro do sobressalto acústico foi medido por células fotorreceptoras de pressão localizadas sob o piso dessa caixa. Esse equipamento de análise comportamental estava conectado a um micro computador, o qual era utilizado para análise gráfica da amplitude da resposta. Os dados desses registros foram posteriormente transferidos para um programa de análise comportamental desenvolvido pelo Centro de Engenharia Biomédica (CEB – UNICAMP) que corrigia o peso do animal para analisar a amplitude do comportamento.

### **2.3. PROCEDIMENTO:**

**2.3.1. Habituação às condições de biotério:** os pombos foram colocados no biotério, com controle de ciclo claro-escuro (12:12h) por um período mínimo de quinze dias antes do experimento.

**2.3.2. Fotoperíodo esqueleto (FPE):** Depois deste período, a fase de escuro foi substituída por 12 horas de luz tênue vermelha, condição que continuou por dois ciclos. Imediatamente após dois dias, iniciou-se um fotoperíodo esqueleto, dado por dois pulsos de luz branca intensa de 15 minutos de duração, separados por 12 horas de luz tênue vermelha, condição que continuou pelo resto do experimento (ver Estudo 1).

**2.3.3. Habituação à caixa experimental:** Após um período mínimo de 15 dias de adaptação às condições do biotério, os animais passaram por um processo de habituação à caixa experimental por quatro dias consecutivos, durante 50 min/dia.

**2.3.4. Treino em Condicionamento clássico aversivo:** A sessão de treino em condicionamento foi realizada após 4 dias de habituação à caixa experimental. Durante o treino os pombos foram colocados na caixa experimental iluminada com luz vermelha (mesma condição do biotério) e limpa com solução hidroalcoólica 10%. Os animais foram submetidos a associações som-choque num esquema de condicionamento de traço onde entre o término do som (1000Hz, 100dB, 1-s) e o início do choque (10mA, 35-ms) houve um intervalo de 1 s. Os pareamentos dos estímulos ocorreram a cada 5 min, numa sessão de 20 min. Os animais do Grupo Controle Randômico foram submetidos aos estímulos sons e choques elétricos, mas numa ordem aleatória, em que não houve programação de contingência ou contigüidade entre eles. Durante a sessão seguiu-se a ordem som (aos 2 min), choque (aos 4 min, 9min), som (12 min), choque (14 min) e som (16 min). Os animais controles permaneceram na câmara experimental sem apresentação de estímulos.

### **2.3.5. Re-exposição ao contexto do Condicionamento**

Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram re-expostos à câmara experimental, sob as mesmas características contextuais do treino (odor e condição de iluminação), durante 20 minutos. Durante essa sessão foi registrada a cada 30 s a magnitude em (kgf) dos comportamentos exibidos pelo animal e foi gravado em fita VHS a ocorrência de comportamentos. Os dados referentes ao condicionamento ao contexto não são apresentados neste trabalho.

### **2.3.6. Teste ao Som**

Terminado o tempo de re-exposição ao contexto, os animais eram retirados da câmara experimental e transportados num saco de algodão para outra sala e, após 10 min, recolocados na

câmara. No intervalo entre um teste a condição de iluminação era alterada por uma lâmpada incandescente amarela e a câmara era limpa com algodão embebido na solução de ácido acético 10%, sendo o odor substituído por outro. No teste ao som foram submetidos a 40 pulsos sonoros (1 s) para a análise resposta ao som. Durante essa sessão foi registrada a magnitude em (kgf) dos comportamentos exibidos pelo animal e foi gravada em fita VHS a ocorrência de comportamentos.

**2.3.7. Análise comportamental:** As sessões foram gravadas em VHS, usando uma câmara de vídeo com dispositivo de controle para filmagem em baixa luminosidade (SONY, com *night shot*), para posterior análise da ocorrência das categorias comportamentais:

**Pré-exploração:** Comportamentos reflexos, (sobressalto, estremecimento, murchar) eliciados por apresentação de estímulos novos e ou intensos e que precedem imediatamente as reações exploratórias.

**Exploração:** Reações relacionadas à investigação de parte ou do ambiente como um todo, incluindo rotação ou semi-rotação da cabeça, estender o pescoço, fixação do olhar em um determinado ponto, movimentos combinados e sucessivos da cabeça e pescoço.

**Imobilidade tensa (*Freezing*):** O animal se mantém imóvel, em pé ou agachado, com base alargada, extensão restrita do pescoço, desnível da asa em relação à cauda, olhos totalmente abertos, respiração ofegante, cabeça e olhos fixos numa direção, geralmente no canto da caixa, com apoio peitoral no piso ou parede.

**Movimentos Gerais:** 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.

**Imobilidade relaxada (Parado) :** A ausência de respostas observáveis, estando o pombo imóvel, em pé, pescoço encolhido, flexão ventral da cabeça, sem apoio peitoral.

**Manutenção:** Comportamentos relacionados com os cuidados do corpo e reações vegetativas, tais como limpar, coçar, vomitar, dormir.

**Locomoção:** Comportamentos relacionados com deslocamento do corpo no espaço, tais como andar, voar, esvoaçar, pular, circular.

A transcrição das fitas para o registro dos comportamentos foi feita com o auxílio de um software, Etholog (Ottoni, 2000), que registra e analisa quantitativamente a ocorrência do comportamento, o momento que este ocorre e na duração mediante a observação direta, que era efetuada pelo experimentador. O controle de fidedignidade foi feito por meio do cálculo de índice de acordo com um segundo observador. As fitas eram revistas e as transcrições discutidas.

### 2.3.8. Análise estatística

Durante a sessão de teste ao som, em cada um dos diferentes horários, a magnitude da resposta ao som foi registrada em janelas temporais de 0-1 s e de 1- 4s. Para analisar modificações do responder ao longo da sessão foi analisada a magnitude do responder em cada metade da sessão (inicial e final). Na análise estatística com ANOVA, considerou-se a amplitude como variável dependente e estímulos, horário e metade da sessão como fatores. As múltiplas comparações *post hoc* foram feitas com o teste de Tukey-Kramer. O nível de significância foi definido em  $p \leq 0,05$ .

Uma taxa de decremento foi calculada como a diferença entre a magnitude no primeiro bloco de 5 estímulos menos o controle, e o último bloco de 5 estímulos menos o controle [(BL1- controle) - (BL final – controle)]. Na análise estatística com ANOVA de uma via, considerou-se horário como fator. As múltiplas comparações *post hoc* foram feitas com o teste de Tukey-Kramer. O nível de significância foi definido em  $p \leq 0,05$ .

A partir da transcrição da gravação de cada sessão, obteve-se registros dos comportamentos aos estímulos sonoros, a cada 30 s. Foi calculado o número médio de ocorrências para blocos de 5 estímulos, num total de 8 blocos por sessão, em cada uma das categorias comportamentais. Para os animais controles os dados médios se referem a 5 blocos de intervalos de 30 s. As comparações estatísticas foram feitas com a análise de variância múltipla (MANOVA), considerando os comportamentos em cada categoria e o horário do teste. O nível de significância foi definido em  $p \leq 0,05$ .

### **3. Resultados**

#### ***3.1. Magnitude da resposta durante o teste ao som - registros no intervalo entre 0-1s após o som.***

A Figura 8 mostra as amplitudes médias da resposta ao som, para cada um dos 6 horários em que o teste foi realizado, para os animais do grupo Experimental, Randômico e Controle. Para que fosse possível observar as características do responder no início e no final da sessão, comparou-se a magnitude da resposta na primeira metade e na segunda metade da sessão de teste ao som. Podemos observar que os animais dos grupos Experimentais e Randômicos mostraram maiores amplitudes da resposta ao som na primeira metade da sessão experimental em relação à segunda metade. Os animais do grupo Experimental ZT02 e ZT22 tiveram as maiores diferenças entre a metade inicial e a final em relação aos outros horários, indicando que foi nesses horários que ocorreu maior diminuição da amplitude da resposta durante a sessão, o que poderia caracterizar uma extinção da resposta condicionada ao som. Por outro lado, no ZT14 observa-se pequeno decréscimo da magnitude da resposta na metade final da sessão, sugerindo ausência de extinção da resposta condicionada. Os animais do grupo Randômico também mostraram que nos diferentes horários a magnitude inicial foi maior em relação à segunda metade, evidenciando diminuição da

amplitude durante a sessão, exceto em ZT22. Os animais dos grupos controles mostraram diferenças muito pequenas ou ausência de diferenças entre as metades das sessões, nos horários testados. A ANOVA indicou um efeito de grupo [ $F_{2, 72} = 7,51; p < 0,05$ ] e um efeito de metade da sessão [ $F_{1, 72} = 19,05; p < 0,001$ ], e uma interação entre grupo e metade da sessão com valor de significância limítrofe [ $F_{2, 1} = 3,11; p = 0,0505$ ]. O teste de Tukey-Kramer mostrou diferenças entre o grupo controle e os grupos experimental e randômico ( $p < 0,05$ ). A amplitude da resposta na primeira metade da sessão realizada em ZT10 (16h) foi diferente da segunda parte das sessões realizadas em ZT02, ZT18 e ZT22 ( $p < 0,05$ ). Os animais experimentais tiveram diferenças significativas entre a primeira metade e segunda metade da sessão ( $p < 0,05$ ), em relação à parte final das sessões dos animais do grupo randômico ( $p < 0,05$ ) e em relação aos controles ( $p < 0,05$ ).

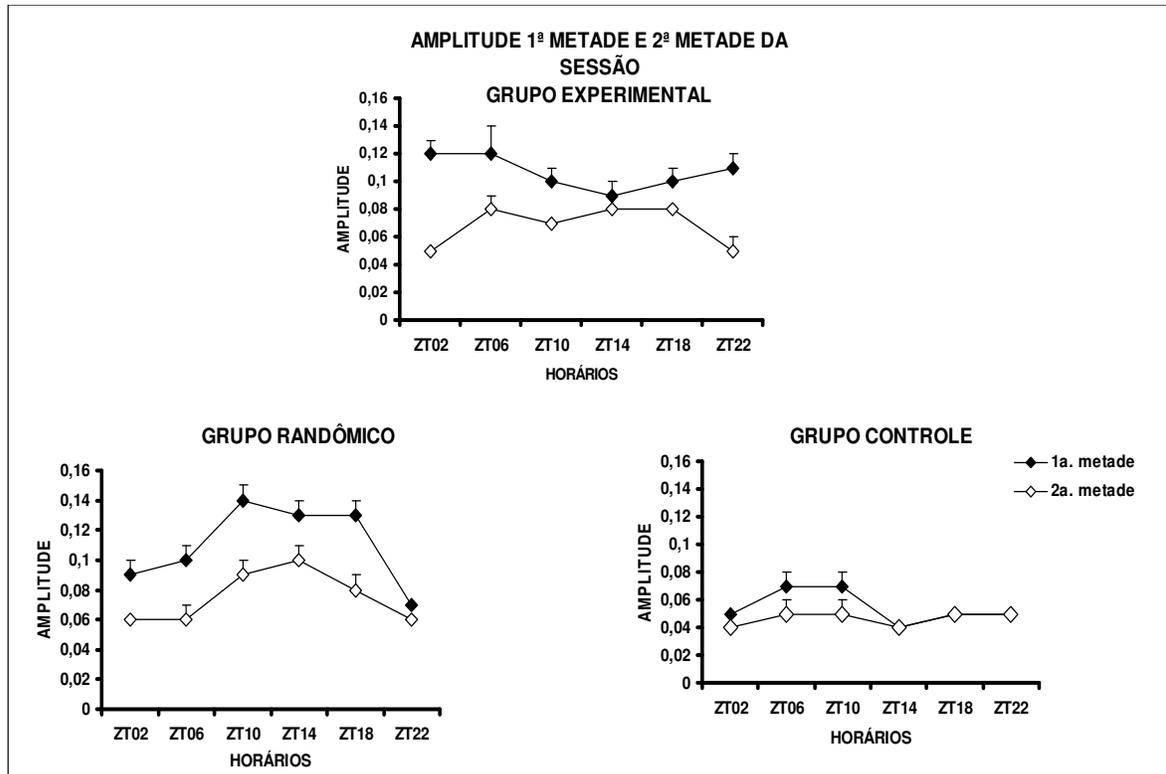


Figura 8. Média ( $\pm$  e.p.m) da amplitude da resposta ao som para os animais dos Grupos Condicionado, Randômico e Controle nos 6 horários de teste. Os dados se referem à média da resposta ao som para cada horário. Barras verticais indicam e.p.m. (erro padrão da média).

A Figura 9 mostra a taxa de decremento da magnitude da resposta ao som ao longo da sessão de teste ao som, para os animais do grupo Experimental e Randômico. A taxa de decremento compara a magnitude no primeiro e no último bloco de estímulos do teste, considerando o valor residual da diferença em relação à magnitude dos controles. Esse valor residual tem a vantagem de excluir as alterações que fossem devidas ao ritmo circadiano de atividade, característico da situação. Assim, a taxa de decremento foi calculada como a diferença entre a magnitude no primeiro bloco de 5 estímulos menos o controle, e o último bloco de 5 estímulos menos o controle [(BL1- controle) - (BL final – controle)]. No grupo Experimental (Condicionado) o valor condicionado do estímulo foi maior para os animais testados no ZT14,

quando a taxa de decremento foi menor que zero. Também se observa que os animais ZT02 e ZT22 apresentaram valores próximos de taxa de decremento, da mesma forma que os animais ZT06 e ZT10. Os animais do grupo Randômico apresentaram um aumento gradual da taxa de decremento da resposta ao longo do dia, e uma gradual diminuição ao longo da noite. A ANOVA indicou um efeito significativo de horário [ $F_{5,48} = 4,48$ ;  $p < 0,01$ ], uma interação significativa entre grupo e horário [ $F_{5,5} = 3,60$ ;  $p < 0,05$ ], mas nenhuma diferença entre os grupos [ $F_{1,48} = 0,06$ ;  $p > 0,05$ ]. Análises *post hoc* com o teste de Tukey-Kramer mostraram diferenças significativas entre o grupo experimental ZT14 com ZT02 e com ZT10 do grupo randômico.

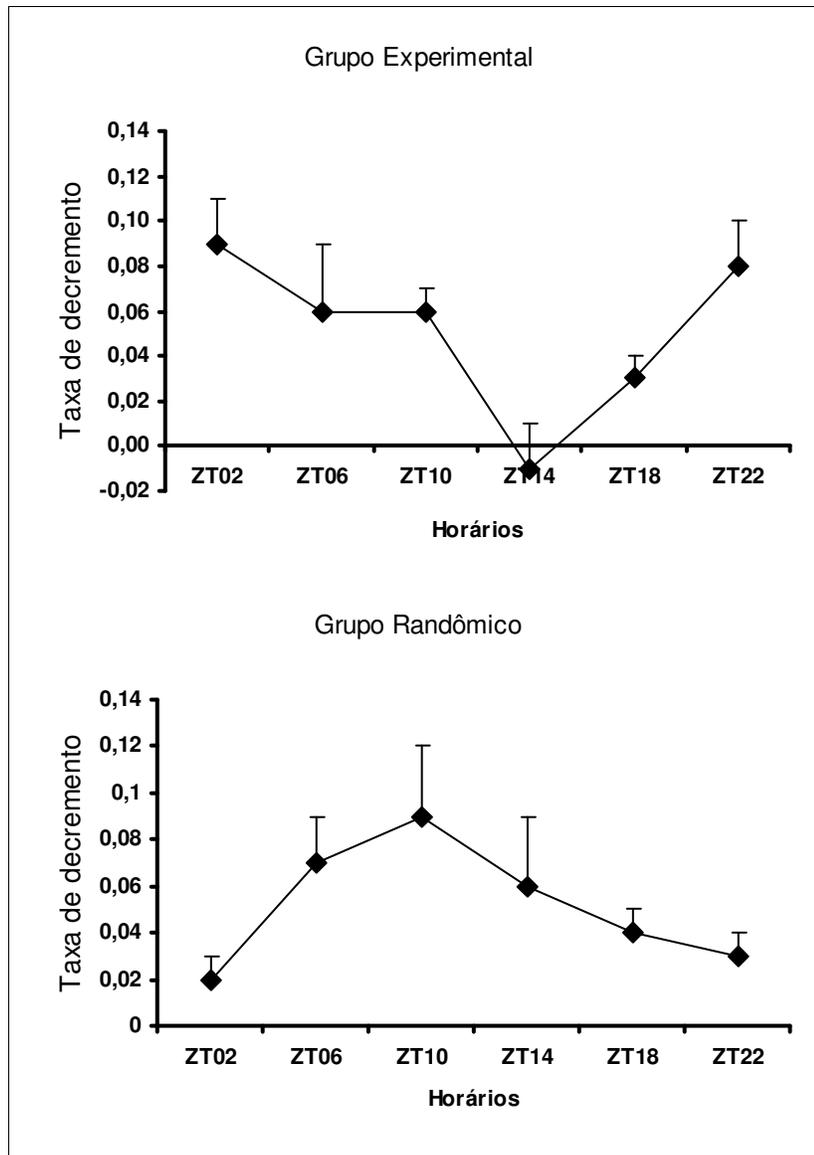


Figura 9. Taxa de decremento da magnitude inicial (primeiro bloco de 5 estímulos) e final (último bloco de 5 estímulos) da resposta, no intervalo de 0-1s, durante o teste ao som em função dos diferentes horários. Cada valor expressa a diferença em relação ao valor médio do grupo controle [(BL1- controle) - (BL final – controle)].

### 3.2. Magnitude da resposta durante o teste ao som - registros no intervalo entre 1 - 4s após o som.

A Figura 10 mostra as amplitudes médias da resposta ao som para cada um dos 6 horários em que o teste foi realizado para os animais dos grupos Experimental, Randômico e Controle. Podemos observar que os animais dos grupos Experimentais mostraram maior amplitude da resposta ao som na primeira metade da sessão experimental em relação à segunda metade no horário ZT10 e ZT22. Nos demais horários a amplitude inicial diminuiu pouco ou nada durante a sessão, sugerindo ausência de extinção da resposta condicionada. Os animais dos grupos Randômicos mostram maior amplitude inicial, exceto em ZT22. Para os animais do grupo Controle observa-se que apenas em ZT10 houve maior amplitude inicial, quando foi observado uma maior movimentação do animal na caixa experimental na primeira metade da sessão. O teste ANOVA indicou diferença significativa entre grupos [ $F_{2,72} = 12,52$   $p < 0,0001$ ], horário [ $F_{5,72} = 2,47$   $p < 0,05$ ] e uma interação significativa entre grupo e horário [ $F_{2,5} = 4,06$   $p < 0,001$ ]. Comparações *Post hoc* com o teste de Tukey Kramer indicaram diferenças significativas para o grupo randômico do horário ZT14, para os demais horários e grupos. O teste Tukey-Kramer indicou que os animais randômicos tiveram diferenças significativas de amplitude quando testados às 16h (ZT10) e 20h (ZT14) em relação aos seus horários das 4h (ZT22), 8h (ZT02) e 12h (ZT06), em relação ao ZT02, ZT14, ZT18 e ZT22 dos experimentais e em relação aos controles ( $p < 0,05$ ).

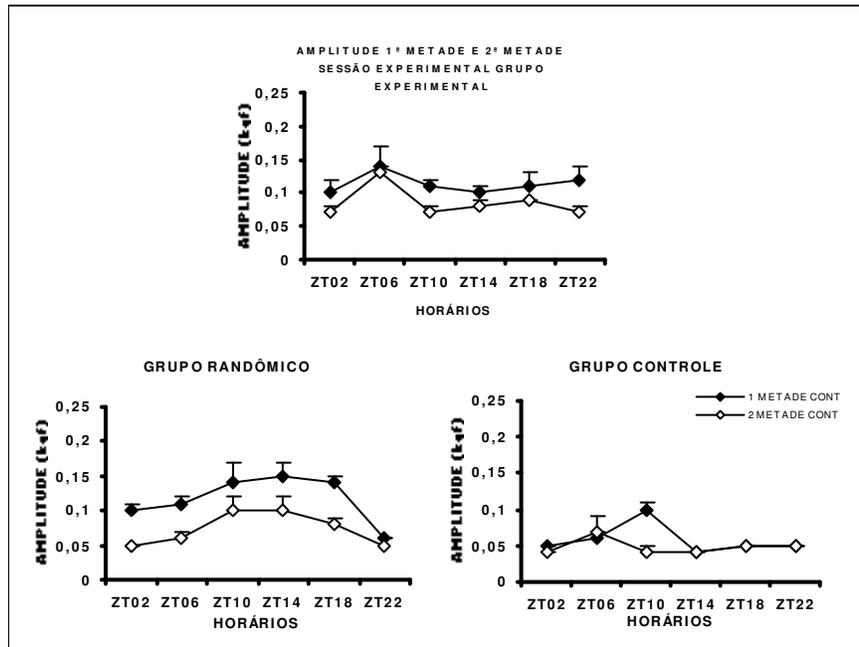


Figura 10. Média ( $\pm$  e.p.m) da amplitude da resposta ao som para os animais dos Grupos Condicionado, Randômico e Controle nos 6 horários de teste. Os dados se referem à média da resposta ao som para cada horário. Barras verticais indicam e.p.m. (erro padrão da média).

A Figura 11 mostra a taxa de decremento para os animais do grupo Experimental e Randômico. A taxa de decremento foi calculada como a diferença entre o primeiro bloco de 5 estímulos e o controle, menos o último bloco de 5 estímulos e o controle  $[(BL1 - \text{controle}) - (BL \text{ final} - \text{controle})]$ . Os resultados indicam que o valor condicionado do estímulo foi maior para os animais do grupo Experimental ZT14, considerando-se que a amplitude inicial da resposta se mantém no final da sessão, gerando assim taxas de decremento próxima a zero. Os animais ZT02, ZT06 e ZT22 têm maior decremento na amplitude, evidenciando maior extinção da resposta. Também se

observa que os animais ZT10 e ZT18 apresentaram uma taxa de decremento intermediária. Os animais do grupo Randômico apresentaram menores taxas de decremento nos horários ZT02, ZT10 e ZT22. O teste ANOVA indicou uma interação significativa entre grupo e horário [ $F_{1,5} = 2,59$ ,  $p < 0,05$ ]. Análises *post hoc* com o teste de Tukey-Kramer mostraram diferenças significativas entre o grupo Experimental ZT14 e os animais do grupo Experimental ZT22.

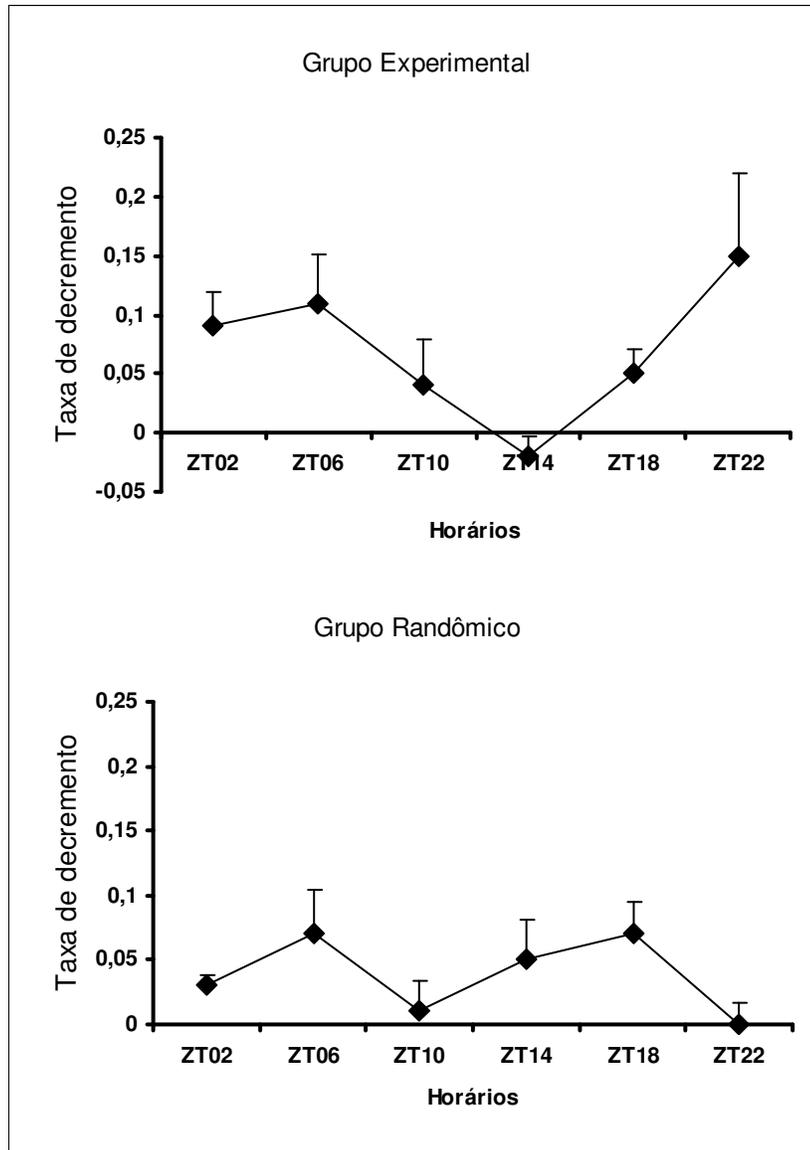


Figura 11. Taxa de decremento da magnitude inicial (primeiro bloco de 5 estímulos) e final (último bloco de 5 estímulos) da resposta, no intervalo de 0-1s, durante o teste ao som em função dos

diferentes horários. Cada valor expressa a diferença em relação ao valor médio do grupo controle [(BL1- controle) - (BL final – controle)].

### **3.3. Categorias comportamentais observadas durante o teste ao som**

A Figura 11 mostra curvas de registros dos comportamentos de diferentes categorias, em função de blocos de 05 estímulos, durante a sessão de teste ao som, realizada para o grupo Experimental em diferentes horários (ZT02; ZT06; ZT10; ZT14; ZT18; ZT22). Podemos ver que os animais mostram uma elevada ocorrência de exploração que predomina em todos os horários de teste, embora também se observe a ocorrência de outras classes comportamentais como movimentos gerais, locomoção e pré-exploratórios. A análise estatística com MANOVA confirmou que houve diferença significativa do comportamento exploratório ( $F_{5, 29} = 6,47$ ;  $p < 0,001$ ), sendo evidenciada diferença significativa entre ZT02 e ZT06, ZT10, ZT14 e ZT22 ( $p < 0,05$ ; Tukey-Kramer). Não foram detectadas diferenças significativas na ocorrência das demais categorias: parado ( $p > 0,05$ ), pré-exploratório ( $p > 0,05$ ), *freezing* ( $p > 0,05$ ), locomoção ( $p > 0,05$ ), movimentos gerais ( $p > 0,05$ ) e manutenção ( $p > 0,05$ ).

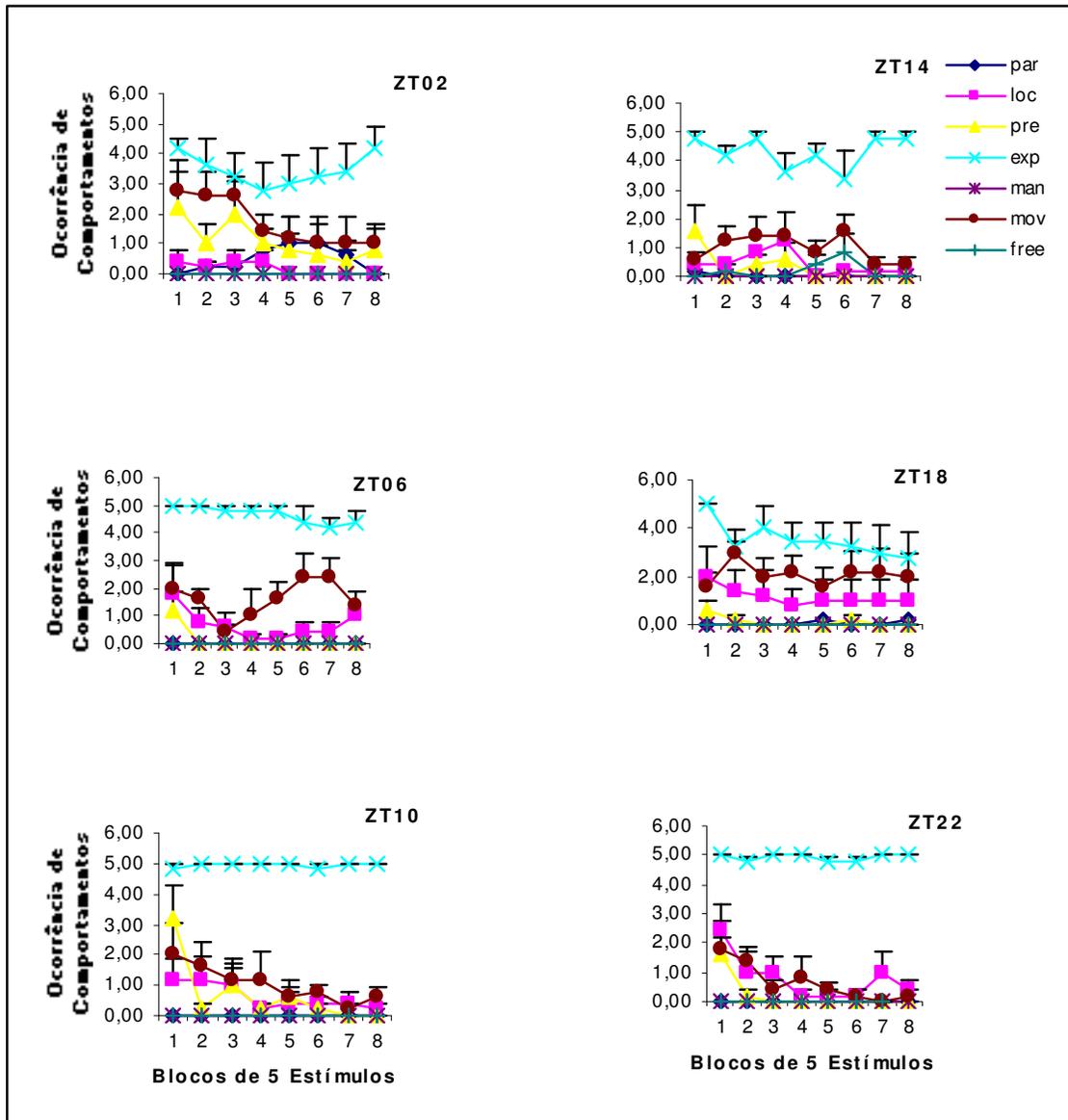


Figura 11. Variação da ocorrência de comportamentos ao som, apresentado a cada 30s, para os pombos do Grupo Experimental em cada horário (ZT02; ZT06; ZT10; ZT14; ZT18; ZT22). Categorias comportamentais: par (parado), loc (locomoção), pre (pré-exploratório), exp (exploratório), man (manutenção), mov (movimentos gerais), free (*freezing*).

A Figura 12 mostra a ocorrência registros dos comportamentos de diferentes categorias, em função de blocos de 05 estímulos, durante a sessão de teste ao som para os animais do grupo Randômico. Observa-se uma alta ocorrência de comportamentos exploratórios em todos os horários testados. A análise estatística com MANOVA indicou que a variação do comportamento exploratório ( $F_{5, 29} = 2,32$ ;  $p=0,054$ ) apresentou valor limítrofe de significância. Não foram detectadas diferenças significativas na ocorrência das demais categorias: parado ( $p>0.05$ ), pré-exploratório ( $p>0.05$ ), *freezing* ( $p=0.066$ ), locomoção ( $p>0.05$ ), movimentos gerais ( $p>0.05$ ) e manutenção ( $p>0.05$ ).

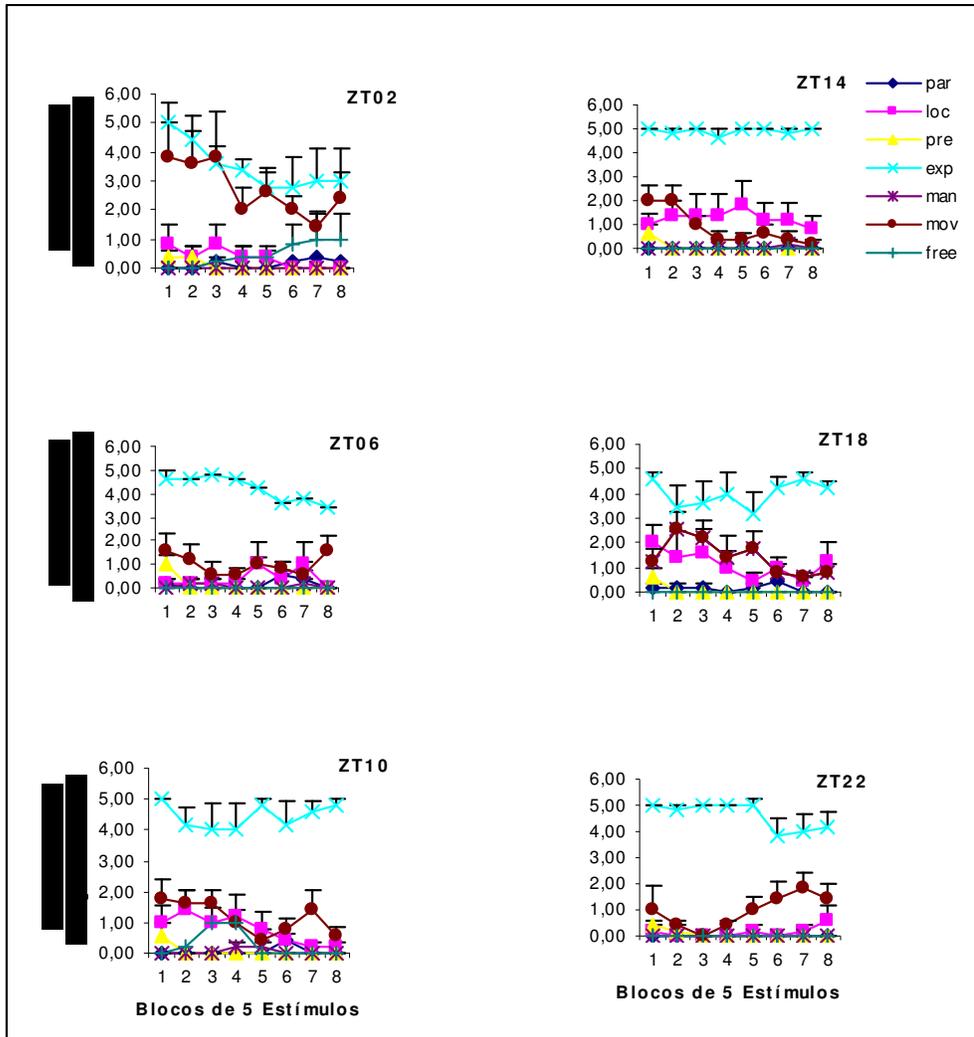


Figura 12. Variação da ocorrência de comportamentos da resposta ao som a cada 30s, para os pombos do Grupo Randômico em cada horário (ZT02; ZT06; ZT10; ZT14; ZT18; ZT22). A legenda da figura indica as categorias comportamentais correspondentes: par (parado), loc (locomoção), pre (pré-exploratório), exp (exploratório), man (manutenção), mov (movimentos gerais), free (freezing).

A Figura 13 mostra a ocorrência dos comportamentos de diferentes categorias, em função de blocos de 05 estímulos, durante a sessão de teste ao som, para os animais do grupo Controle. Diferentemente dos outros grupos que foram treinados com som e choque, os animais controles apresentaram valores elevados de classe comportamental Parado que predomina nos horários ZT02 e ZT14. Não foram detectadas diferenças significativas na ocorrência de nenhuma das categorias comportamentais ( $p > 0,05$ ).

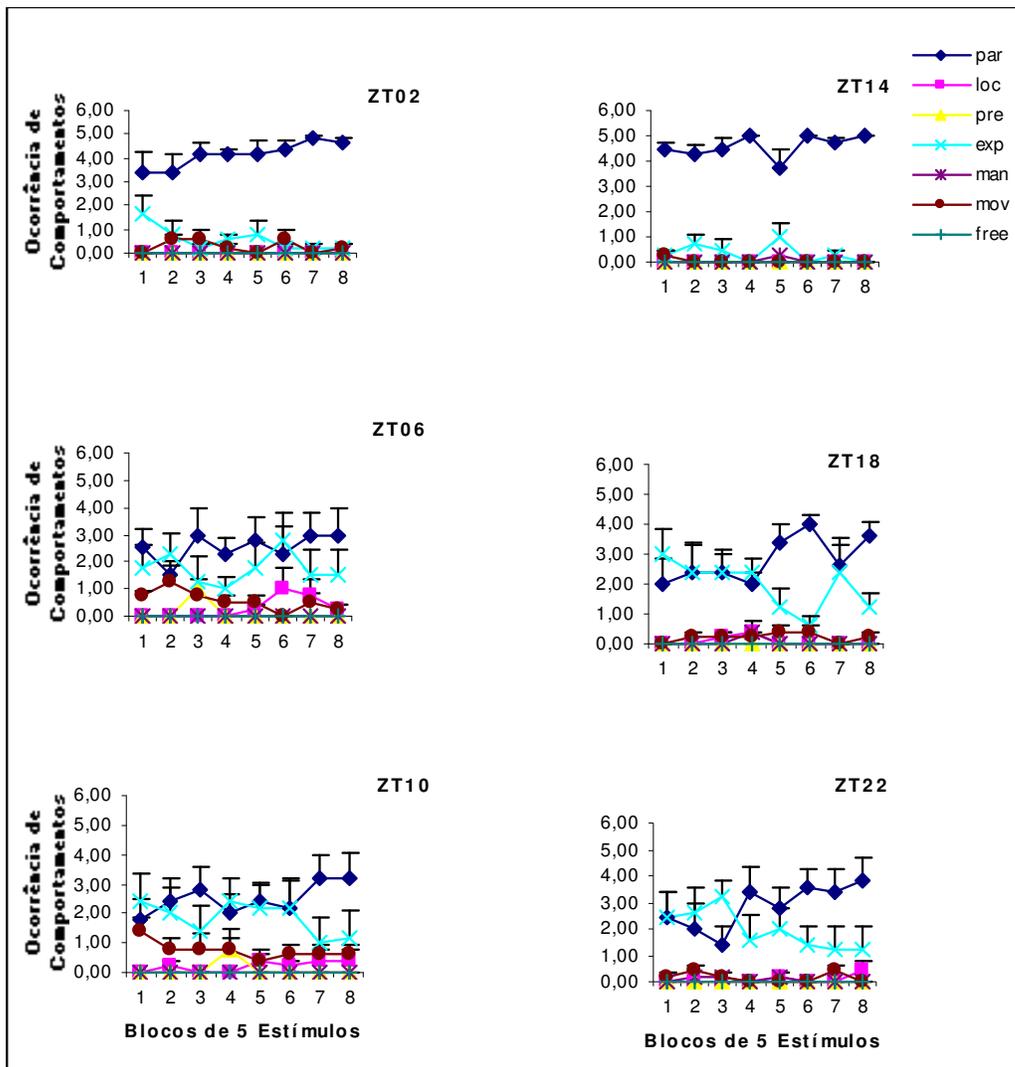


Figura 13. Variação da ocorrência de comportamentos ao contexto, registrados a cada 30s, para os pombos do Grupo Controle em cada um dos horários de teste (ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18, ZT22). Categorias comportamentais: par (parado), loc (locomção), pre (pré-exploratório), exp (exploratório), man (manutenção), mov (movimentos gerais), free (*freezing*).

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que os animais dos grupos Experimentais apresentaram amplitude da resposta ao som no início e no final da sessão que diferiram nos diferentes horários. Para as respostas com latência entre 0-1 s, o grupo experimental apresenta

maior amplitude no início da sessão, exceto no horário das 20h (ZT14). Para as respostas com latência entre 1-4 s o responder no início da sessão foi maior, exceto para ZT06, ZT\$ e ZT18. O decréscimo da amplitude da resposta na segunda metade poderia ser indicativo de extinção da resposta condicionada ao som enquanto que a inexistência de diferenças entre as duas metades da sessão seria indicativa de ausência de extinção e, portanto, maior força do condicionamento. nos diferentes horários no grupo Experimental. Os animais do grupo controle não apresentaram variações significativas da amplitude da resposta ao longo da sessão em nenhum horário de teste.

A análise da taxa de decremento entre o primeiro bloco e o último bloco de 5 estímulos também indicou que não houve variação da amplitude inicial e final da resposta ao som nos animais testados no horário ZT14, do grupo Experimental. Esse resultado parece confirmar que o valor condicionado do estímulo foi maior para os animais testados no ZT14. O decremento da amplitude em ZT02, ZT06 e ZT22 indicaria menor condicionamento ao som e ocorrência de extinção. Nesse sentido, esses dados também sugerem que a aquisição do valor condicionado do som e a força da resposta condicionada ao CS não foram similares em diferentes horários, sugerindo uma modulação temporal.

Os animais do grupo Randômico apresentaram um aumento gradual na taxa de decremento da amplitude da resposta ao longo do dia, e uma gradual diminuição ao longo da noite, que indica uma variação no responder inicial e final nos diferentes horários. Ou seja, diferentemente ao observado nos animais condicionados, parece que os animais do grupo randômico tiveram uma diminuição da amplitude de resposta mais evidente para os horários noturnos. Isso aconteceu tanto para as respostas de latências 0-1 s quanto para as respostas com latências 1-4 s e, nos dois casos, a exceção foi o horário das 4h (ZT22), quando a amplitude não diminuiu ao longo da sessão. Esses dados podem ser considerados sugestivos de que o valor funcional do som diminuiu com a

sua apresentação repetitiva, como seria esperado acontecer em animais submetidos a estímulos não pareados.

Os animais condicionados mostraram classes de comportamentos de exploração, locomoção e também pré-exploratório (que inclui o sobressalto). Os comportamentos mais evidentes quando os mesmos foram testados ao som foram explorar, que se manteve ao longo da sessão e, também, sobressalto, estremeção, andar, esvoaçar e pisotear, que, contudo, aparecem com amplitudes mais altas no início da sessão. Esses comportamentos nos dão indícios de que os animais poderiam estar apresentando um padrão relacionado com fuga de uma situação aversiva ou medo. Na verdade, esse padrão de comportamentos apresentados numa seqüência rápida e repetitiva é identificado como *Tentativa de fuga (TTF)* da situação ao ambiente (SCARPIM *et al.*, 2005). Porém, de um modo geral, os dados comportamentais indicam que os animais responderam com maiores freqüências de exploração que são mantidas durante toda a sessão. Esse dado pode ser considerado como uma potenciação do comportamento exploratório. Entretanto, seria interessante considerar que, frente às evidências de medidas da magnitude da resposta ao som, os registros de amplitude da resposta evidenciarão o conjunto dos comportamentos, maior no início da sessão, e não apenas do comportamento exploratório. Também os animais Randômicos, durante o teste ao som, apresentaram comportamentos de exploração, locomoção e movimentos do corpo, com magnitudes elevadas, expressando a *tentativa de fuga (TTF)* em todos os horários de teste. Esse comportamento característico de situações aversivas poderia estar relacionado com o fato de que sons e choques incontroláveis ocorreram em diferentes momentos da sessão de treino num contexto semelhante. Assim, pode-se aventar a possibilidade de que essa condição estabeleceria um provável efeito da imprevisibilidade da ocorrência desses estímulos no contexto. Por outro lado, na medida em que o choque foi apresentado na mesma câmara, embora com diferente iluminação e odor, seria possível considerar

que tenha, mesmo assim, ocorrido um certo grau de condicionamento ao contexto. Assim, pode-se notar que para os animais COND e RAND, ocorreram respostas *TTF*, e, sugerindo que os animais RAND também estariam respondendo a um contexto aversivo. Esse constitui um aspecto interessante cuja discussão deve ser aprofundada.

Os animais dos grupos controles apresentaram uma elevada ocorrência de postura de imobilidade relaxada (parado) e menor ocorrência de exploração e locomoção, o que pode ser interpretado como menor reatividade ao contexto. Esses dados são interessantes pois indicam que os animais Experimentais e Randômicos mostraram respostas ao som e que a variação da resposta não foi referente à ritmicidade característica do ciclo atividade repouso.

O presente estudo, assim, adiciona observações interessantes ao conjunto de escassos estudos que analisam a ritmicidade no condicionamento clássico aversivo, com evidências de um maior condicionamento em períodos de transição dia-noite (ZT10) e início da noite (ZT14) da resposta ao som que foi associado ao choque. Os dados relacionam-se, desse modo, com a modulação de processos de aprendizagem e memória, embora não se possa precisar qual das fases – aquisição, consolidação ou recuperação – seria mais influenciada por essa modulação. Provavelmente, experimentos com treino e teste em horários diferentes, poderiam acrescentar informações a esse respeito.

Neste estudo houve 4 sessões de habituação à câmara experimental (50 min) em 4 dias consecutivos antes do treino. Já em outros estudos sobre o condicionamento clássico aversivo (FANSELOW, 2000; CHAUDHURY e COLWELL 2002; PILZ e SCHNITZLER, 1996) os animais não são habituados à caixa experimental, ou seja, os animais não são pré-expostos ao ambiente que posteriormente serão submetidos ao pareamento som-choque. De forma semelhante, os experimentos realizados em nosso laboratório, também não habitua os animais na mesma caixa onde serão realizados os pareamentos som-choque. Esses animais são habituados durante 4 dias

em uma outra caixa diferente a que os animais serão submetidos ao teste ao som, que é diferente do contexto de treino. Assim, é possível considerar que o fator pré-exposição à câmara experimental possa ter afetado o condicionamento. Já que o mesmo foi exposto durante várias vezes à mesma câmara sem apresentação de estímulos, as relações de probabilidade de associação entre o choque-som-contexto podem ter sido diminuídas e assim o animal responderia com menor força de condicionamento ao contexto e ao som. Esse resultado poderia ser indicativo de um processo de inibição latente. Ou seja, o procedimento de pré-exposição ao contexto influenciaria o processo comportamental de condicionamento ao estímulo pré-exposto, reduzindo a força do condicionamento (CRUZ *et al.*, 1993; MELO *et al.*, 2003). Deve ser lembrado que, tanto o sobressalto como o condicionamento clássico aversivo pode ser reduzido por manipulações experimentais que impliquem em procedimentos de habituação, de ou de apresentação de pré-pulso inibitório (FOX, 1978; KOCH e SCHNITZLER, 1997; GODDARD 2003; WHEELER 2003; ZHANG *et al.*, 2004).

Dessa forma, pode ser interessante realizar modificações no procedimento experimental de futuros experimentos visando mostrar que o fato dos animais terem sido pré-expostos à caixa experimental pode ter ocorrido uma interferência negativa na aprendizagem e a expressão do medo condicionado ao contexto e conseqüentemente a expressão da ritmicidade ao contexto. Assim, podem ser sugeridas manipulações como: (a) retirar as sessões de habituação à caixa experimental; (b) realizar sessões de habituação em outra caixa experimental, porém por um menor período de tempo (c) habituação na caixa experimental na qual o animal será exposto ao som, porém com iluminação e odores diferentes da sessão de treino e teste.

Finalmente, os presentes dados também podem ser analisados em relação aos obtidos anteriormente na análise do processo de sensibilização. No estudo anterior a sensibilização foi estudada com um intervalo de 5 min entre os dois choques elétricos. Dez minutos após esse treino,

iniciou-se a sessão de teste onde o animal recebeu 40 pulsos sonoros com intervalos 30 s entre cada pulso. Esse estudo nos mostrou que essa forma de aprendizado não associativo mostra uma ritmicidade circadiana, com maiores amplitudes da resposta ao som na fase de inatividade do animal, sendo que o pico ocorre no ZT14 (SIQUEIRA *et al.*, 2005). Porém não houve diferenças significativas no horário de teste para as respostas reflexas ao som (latências menores que 1 s). A redução do intervalo de tempo entre os estímulos para 1 min resultou em variação da resposta reflexa ao som em função do horário, com os maiores valores de amplitude da resposta ao som nos animais experimentais testados na fase de inatividade, com pico da resposta no horário ZT14 (SIQUEIRA *et al.*, submetido). Do mesmo modo, a amplitude do responder ao som condicionado aversivamente também mostrou oscilações ao longo do dia, com maior condicionamento ocorrendo na transição dia-noite e no ZT14. Portanto, pode-se considerar que houve uma variação circadiana semelhante nos dois casos de análise de respostas a um som com propriedades aversivas, sugerindo que processos subjacentes semelhantes atuem em ambas situações. Em seu conjunto, os dados estimulam questões direcionadas a análises dos sistemas neurais subjacentes e das interações com o sistema temporizador circadiano (LAMONT *et al.*, 2005; SAPER *et al.*, 2005).

#### **4. DISCUSSÃO GERAL**

A presente investigação mostrou que em condições de estimulação aversiva, tanto na sensibilização quanto no condicionamento som-choque, os pombos apresentaram uma variação da aprendizagem em função dos horários do teste com maiores amplitudes da resposta ao som nos horários da noite. As diferenças entre os grupos experimentais e a falta de um efeito rítmico nos animais controles sugerem que o efeito da rítmicidade diária seria devido a uma modulação dos processos de aprendizado pelo sistema de temporização circadiana. Paralelamente, deve-se destacar que o equipamento utilizado para o registro automático da amplitude e da latência da resposta a estímulos acústicos em pombos foi adequado para registrar com precisão tanto a amplitude da resposta ao som quanto a sua latência em situações de aprendizagem de habituação, sensibilização ou condicionamento a estímulos sonoros.

O presente trabalho está em acordo com os estudos focados em avaliar a organização temporal do aprendizado ao longo do período de 24 h, os quais são interessantes por mostrarem alterações comportamentais ao longo do dia sob as mesmas condições de estimulações. Conforme já discutido anteriormente, as espécies animais apresentam variações comportamentais, bem como, alterações bioquímicas e fisiológicas ao longo das 24 h. Trabalhos relacionando ritmos comportamentais, variações nas concentrações de hormônios e alterações na atividade de estruturas neurais em aves forneceram um conjunto de dados de interesse para a análise da organização temporal circadiana do comportamento (HORLINGTON, 1970; CHABOT e TAYLOR, 1992; VALENTINUZZI et al. 2000).

Um ponto principal do presente estudo é a contribuição ao conhecimento da organização circadiana dos processos de aprendizagem e da oscilação circadiana da sensibilização da resposta aos estímulos acústicos. Após estimulações com choques elétricos os animais mostraram variações da amplitude da resposta ao som em relação à LB, as quais caracterizaram o processo de sensibilização. Porém os resultados mostraram que os pombos experimentais apresentaram

maiores amplitudes de resposta ao som quando testados à noite, sugerindo assim uma atuação do sistema de temporização circadiana nesse processo. É interessante ainda notar que essa oscilação circadiana foi expressa no processo de sensibilização tanto quando foram usados intervalos entre estímulos curtos como também com intervalos longos.

De fato, em ambas condições de intervalos entre estímulos observaram-se picos da resposta ao som no início da fase de noite, no horário ZT 14, e mínimas amplitudes no ZT 22 e ZT 02, isto é, na transição da noite para o dia e no início do dia. Dessa forma, nossos dados sugerem que no início da fase de noite pode ocorrer a regulação de mecanismos fisiológicos e comportamentais pelo sistema circadiano que resulta em aumento da sensibilização, enquanto antes do amanhecer e no início do dia, esse sistema controlaria mecanismos que resultam na diminuição da sensibilização. Esses dados tornam-se muito interessantes quando relacionados com estudos recentes de Lamont *et al.* (2005) e Saper (2005).

Na verdade, recentemente Lamont *et al.* (2005) relataram que no núcleo central da amígdala de ratos ocorre um ritmo diário significativa da expressão da proteína PER2, produto do gene *per 2*, que foi máxima no início da fase de escuro, no ZT13, e mínima no ZT1, o início da fase de luz. Interessantemente, esse padrão diário da expressão de PER2 no núcleo central amígdala é similar àquele encontrado no presente estudo para a sensibilização da resposta acústica. Além disso, sabe-se que a amígdala e os sistemas neurais com os quais se conectam modulam as respostas protetoras que ocorrem frente a estímulos aversivos que indicam perigo, relacionando-se a um conjunto de condições internas ou externas de uma dada situação (KOCH, 1999).

Assim, a existência de ritmos circadianos na expressão dos genes relógios, tais como, *Per1* e *Per2*, em outras regiões encefálicas que participam do controle de comportamentos específicos, tais como aqueles relacionados com o medo, é importante na medida que evidencia as relações

entre o sistema temporizador e essas estruturas. Esse tipo de evidência é encontrado em Saper *et al.* (2005) que mostram que o NSQ de mamíferos pode modular as estruturas cerebrais que são envolvidas no processamento do medo e da dor por meio de uma complexa rede neural que inclui aferentes diretos ao núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH). As saídas do NSQ alcançam o DMH por meio de uma via ventral e de uma via dorsal à zona adjacente sub-paraventricular (SPZ) que são, respectivamente, relacionadas aos comportamentos e ao ciclo sono-vigília. No contexto do presente estudo esta evidência é especialmente interessante porque se sabe que o DMH e também a substância cinzenta periaquedutal, que é um dos seus alvos, desempenham um importante papel na organização dos comportamentos relacionados à defesa e à agressão, como também no processamento de dor nos mamíferos (KOCH, 1999; MIYAZATO, *et al.* 1999; YEOMANS e FRANKLAND, 1996). Considerando-se que em aves as respostas ao som fazem parte do repertório comportamental de defesa seria interessante investigar a existência de um circuito neural comparável a esse. Além disso, como há poucos estudos que analisam as estruturas cerebrais anatômicas envolvidas na expressão e manutenção da ritmicidade circadiana em aves e os resultados encontrados são controversos, uma maior investigação a partir de novos experimentos contribuiriam na elucidação da localização, função e interações entre essas estruturas cerebrais.

Convém ressaltar que o sistema circadiano de aves apresenta interações complexas que envolvem um sistema de regulação neuroendócrino, sincronizando múltiplos osciladores e garantindo a estabilidade e a precisão do sistema. Assim, durante o dia, o vNSQ inibiria a pineal e os osciladores oculares através de uma via neural e durante a noite a melatonina liberada pela pineal atuaria no vNSQ inibindo-o. As relações entre esse sistema temporizador com outros sistemas envolvidos no comportamento e na cognição ainda necessitam ser elucidadas. O

presente estudo parece contribuir nesse sentido, na medida que estimula uma discussão que integra diferentes tipos de dados.

O conjunto de resultados do presente trabalho mostrou que a apresentação de choques com curtos intervalos entre-estímulos (1 min) resultou na sensibilização da resposta acústica como indicado pelas medidas de amplitude após o treino e relativo aos valores da linha de base. Entretanto, os intervalos entre estímulos de longa duração (5 min e 10 min) resultaram predominantemente em menores amplitudes das respostas reflexas ao som comparativamente às respostas reflexas após intervalos entre estímulos de curta duração (1 min). Por outro lado, foram observadas variações na amplitude da resposta exploratória nos intervalos entre estímulos de longa duração. Assim, os dados mostraram que tanto os intervalos entre estímulos de curta duração como de longa duração, a amplitude da resposta foi maior à noite.

Porém, uma questão colocada pelos dados seria referente ao por que houve uma sensibilização de maior amplitude e maior duração quando o intervalo entre os estímulos foi de curta duração. Como já discutimos, no primeiro estudo de sensibilização, esses intervalos foram de 5 min e de 10 min e no segundo estudo de sensibilização, os intervalos foram de 1 min. Uma possibilidade seria de que a aplicação de choques em curtos intervalos de tempo provocaria alterações sensoriais e emocionais que seriam cumulativas. Ou seja, o estímulo nociceptivo que é processado por vias sensoriais específicas, que são integradas em circuitos sensório-motores, resulta em percepção de dor e em ativação de respostas motoras características. Quando os estímulos se sucedem em curtos intervalos de tempo, as mudanças ocorridas nos circuitos neuronais e comportamentais serão mantidas ao longo do tempo e o animal estará respondendo principalmente às características do estímulo apresentado. Por outro lado, quando a aplicação do estímulo aversivo é seguida por um longo intervalo de tempo, haverá tempo suficiente, antes da

apresentação do estímulo seguinte, para que os animais passem a responder também ao ambiente em que esses estímulos estão ocorrendo. Assim, outros processos cognitivos e comportamentais passariam a ser importantes. Como consequência lógica dessas suposições teríamos também que considerar que diferentes processos e mecanismos neurais estariam sendo ativados nas diferentes condições.

Dessa forma, os experimentos sobre a sensibilização mostraram que independentemente dos intervalos de tempo entre os estímulos, as maiores amplitudes de resposta ao som no teste foram observadas à noite. Porém, os dados com intervalos longos entre estímulos mostraram que somente as respostas de longa latência foram significativamente diferentes dos animais treinados durante o dia. Portanto, os resultados sugerem que durante a noite, os animais processam as informações sobre o som, choque e contexto antes de emitir os comportamentos de esvoaçar, pisotear, circular, andar. Comportamentos que estão relacionados com o medo. Provavelmente, após a estimulação aversiva, tenha ocorrido a ativação de várias estruturas neurais envolvidas com o medo, dor e também estruturas cerebrais envolvidas na percepção do ambiente.

Se essa discussão estiver correta, os animais associaram o ambiente ao estímulo aversivo. Com isso, o processo de sensibilização poderia não ser um tipo de aprendizado não associativo como alguns autores discutem. Por exemplo, Richardson e Elsayed (1998) analisaram o papel do condicionamento ao contexto da sensibilização. Em seus estudos, os autores dividiram os ratos em dois grupos. Um grupo foi treinado e testado no mesmo contexto e o outro grupo foi treinado e testado em contextos diferentes. Os resultados mostraram que o condicionamento da resposta ao som aconteceu somente quando os ratos eram treinados e testados na mesma caixa. Esses autores consideraram que o efeito sensibilizador seria mediado por condicionamento contextual. Do mesmo modo, Richardson (2000) discute que como alguns resultados mostram que a amplitude da resposta ao som é maior quando o animal é treinado e testado no mesmo contexto, a

sensibilização é um modelo apropriado para o estudo do condicionamento ao contexto, porém não seria um modelo apropriado para o estudo do medo incondicionado.

Os presentes dados indicaram que a resposta ao som envolve uma seqüência comportamental com respostas de curta e de longa latência. As respostas de curta latência, registradas no intervalo de 0 -1 s, referem-se à classe de resposta acústica reflexa que pode ser caracterizada como RSA (DAVIS, 1989; DAVIS, *et al.* 1993; KOCH, 1999). As respostas de longa latência registradas no intervalo de tempo entre 1- 4 s, podem ser classificadas como comportamento exploratório, podendo ter funções características de um comportamento operante.

No sentido de ampliar a análise do controle aversivo da resposta ao som, investigou-se também essa resposta após o condicionamento clássico aversivo. Os resultados mostraram que os animais dos grupos experimentais (que receberam a associação som-choque) e randômico (que receberam som e choque não pareados) apresentaram uma maior amplitude da resposta ao som no início da sessão experimental em comparação aos controles (animais que foram somente expostos à caixa experimental), indicando o efeito da exposição a sons e choques, pareados ou não pareados. Nos dois grupos também se observou uma diminuição da amplitude da resposta ao som ao longo da sessão. Esse decréscimo da resposta é indicativo de extinção da resposta condicionada ao som no grupo condicionado. Os animais do grupo controle não apresentaram variações significativas da resposta ao longo da sessão em nenhum horário de teste. Os animais do grupo condicionado, testados nos horários ZT02, ZT06 e ZT22, apresentaram um menor condicionamento ao som em relação aos outros horários testados.

Os comportamentos mais evidentes quando os pombos foram testados ao som foram explorar, locomoção (andar, esvoaçar) e pisotear, contudo com amplitudes mais altas no início da sessão. Os animais condicionados mostraram classes de comportamentos de exploração,

locomoção e também pré-exploratório (que inclui o sobressalto). Esses comportamentos indicam uma demonstração de medo ao contexto pelos animais, pois esse padrão de comportamentos apresentados numa seqüência rápida e repetitiva é geralmente identificado como *Tentativa de fuga (TTF)* da situação (FANSELOW, 2000; CHAUDHURY 2002; KOCH, 1999; REIS *et al.*, 1999; BRITO *et al.* 2005; SPERANDÉO, 2005; SCARPIM *et al.*, 2006).

Os animais dos grupos controles apresentaram uma elevada ocorrência de postura de imobilidade relaxada (parado) e menor ocorrência de exploração e locomoção, o que pode ser interpretado como menor reatividade ao contexto. Esses dados são interessantes pois indicam que os animais dos grupos condicionado e randômico responderam ao som e que a variação da resposta não foi referente a um maior atividade do animal, pois os animais do grupo controle permaneceram predominantemente em imobilidade relaxada.

Os nossos dados corroboram resultados de outros estudos na medida que mostram que o condicionamento produziu um aumento na força da resposta condicionada ao som. Contudo, embora o aumento na amplitude seja considerável ele diminui ao longo da sessão, indicando uma extinção rápida. Assim, os dados obtidos podem nos indicar que uma característica do nosso procedimento possa ter gerando essa diferença. Especificando, em nosso estudo houve 4 sessões de habituação à câmara experimental (50 min) em 4 dias consecutivos antes do treino. Já em outros estudos sobre o condicionamento clássico aversivo (FANSELOW, 2000; CHAUDHURY 2002; PILZ e SCHNIZLER, 1996) os animais não são habituados à caixa experimental, ou seja, os animais não são pré-expostos ao ambiente que posteriormente serão submetidos ao pareamento som-choque. De forma semelhante, os experimentos realizados em nosso laboratório, também não habitua os animais na mesma caixa onde serão realizados os pareamentos som-choque. Esses animais são habituados durante 4 dias em uma outra caixa diferente a que os animais serão submetidos ao teste ao som, que é diferente do contexto de treino. Assim, acreditamos que o fator

pré-exposição à câmara experimental possa estar envolvido num condicionamento menos vigoroso. Já que o mesmo foi exposto durante várias vezes à mesma câmara sem apresentação de estímulos, as relações de probabilidade de associação entre o choque-som-contexto podem ter sido diminuídas e assim o animal responderia com menor força de condicionamento ao contexto e ao som. Esse resultado poderia ser explicado por um processo de inibição latente. Ou seja, o procedimento de pré-exposição ao contexto influenciaria o processo comportamental de condicionamento ao estímulo pré-exposto, reduzindo a força do condicionamento (MELO *et al.*, 2003)

Uma consideração final pode ser endereçada ao fato que ambas condições de aprendizagem as maiores magnitudes das respostas acústicas foram observadas à noite. Um claro efeito de fase foi observado com a sensibilização ocorrendo predominantemente durante a noite. Isso pode ter um significado biológico para os animais diurnos como os pombos e o processamento auditório pode ser crítico para a percepção de pistas que são importantes para a segurança e sobrevivência. Como evidenciado pelo presente estudo, a exposição prévia aos estímulos perigosos, tais como o choque, pode afetar diferencialmente o processamento da informação durante a noite.

## **5. CONCLUSÕES**

1. A análise do processo de sensibilização ao som, após exposição a choques, mostrou que a amplitude da resposta ao som variou em função do horário de teste, com maiores amplitudes de resposta à noite, no horário ZT14, na transição do dia para a noite.
2. A sensibilização da resposta ao som também mostrou ser modulada pelo tempo entre os estímulos, sendo mais intensa quando os estímulos aversivos foram aplicados a curtos intervalos (1 min) em relação aos longos intervalos (5 min).
3. As maiores amplitudes da resposta ao som foram observadas à noite, independentemente dos diferentes intervalos nos quais os animais foram testados.
4. No procedimento de condicionamento clássico aversivo, os animais também apresentaram variações da resposta nos diferentes horários de teste.
5. A amplitude da resposta ao som, após condicionamento aversivo por associações som-choque, mostrou variações ao longo dos horários do dia que foram semelhantes às encontradas após sensibilização.
6. Os animais apresentaram maior condicionamento ao som durante a noite em relação aos animais testados durante o dia.

Desse modo, o trabalho contribui para o conhecimento da organização circadiana dos processos de aprendizagem e da memória, especificamente sobre a sensibilização e o condicionamento clássico aversivo da resposta aos estímulos acústicos em pombos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSON, E. E.; MOORE, R. Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* v. 916, p. 172-191, 2001.
- ABS, M. Physiology and behaviour of the pigeon. *New York: Acad. Press*, 1983.
- ADAMO, N. I. E.; BENNETT, T. L. The effect of hyperstriatal lesions on head orientation to a sound stimulus in chickens. *Exp. Neurol.*, v. 19, p. 166-175, 1967.
- ADES, C. A resposta de levantar-se no rato branco. *Cienc. Cult.* v. 20, p. 59-72, 1968.
- AMIR, S.; STEWART, J. Conditioned fear supresses light-induced resetting of the circadian clock. *Neuroscience*, v. 86, p. 345-351, 1998.
- AMIR, S.; STEWART, J. The effectiveness of light on the circadian clock is linked to its emotional value. *Neuroscience*, v. 88, p. 339-345, 1999.
- ANDERSON, D. C.; CROWELL, C. R.; SIROKI, L. Activity, startle magnitude, and prolonged food and water deprivation: two further failures to duplicate. *Bull. Psych. Soc.*, v. 23, n. 4, p. 423-426, 1985.
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous componentes in circadian rhythms. Cold Spring Habor Symposium. *Quant. Biol.*, v. 25, p. 11-28, 1960.
- ASCHOFF, J. Masking and circadian rhytms by *Zeitgebers* as opposed to entrainment. In: Hekkens WT, Kerhof GH, Rietvelt WJ, eds. *Trends Chronobiol.*, New York: Pergamon Press, p. 149-161, 1987.
- BAST, T.; ZHANG, W. N.; FELDON, J. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus*, v. 13, p. 657-675, 2003.

- BAST, T; ZHANG, W. N.; FELDON, J. Hippocampus and classical fear conditioning. *Hippocampus*, v. 11, n. 6, p. 828-831, 2001.
- BERLYNE, S. Curiosity and Exploration. *Science*, v. 15, p. 25-33, 1960.
- BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav. Brain Res.*, v. 132, n. 2, p. 135-143, 2002.
- BINKEY, S; HRYSHCHYSHYN, M; REILLY, K. N-acetyltransferase activity responds to environmental lighting in the eye as well as in the pineal gland. *Nature*, v. 28, p. 479-481, 1979.
- BINKLEY, S. A. Pineal biochemistry: comparative aspects and circadian rhythms. In RJ Reiter (Ed.), *The pineal gland, vol 1*, CRC, Boca Raton, FL, p. 155-172, 1981.
- BOORD, R. L. The anatomy of the avian auditory system. *Ann. N. y. Acad. Sci.*, v. 167, p. 186-198, 1969.
- BOULIS, N. M.; DAVIS, M. Footshock-induced sensitization of electrically elicited startle reflexes. *Behav. Neurosci.*, v. 103, p. 504-508, 1989.
- BRANDSTÄTTER, R.; ABRAHAM, U. Hypothalamic circadian organization in birds. I. Anatomy, functional morphology, and terminology of the suprachiasmatic region. *Cronobiol. Int.*, v. 20, p. 637-655, 2003.
- BRITO, I.; BRITTO, L. R. G.; FERRARI, E. A. M. Classical tone-shock conditioning induces Zenk expression in the pigeon hippocampus. *Behav. Neurosc.* (in press)
- BUZSAKI, G. The "where is it?" reflex: Autoshaping the orienting response. *J. Exp. Anim. Behav.*, v 37, p. 461-484, 1962.

CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. **J. Neurosci.** v. 15, p. 2312-2327, 1995.

CANTWELL, E. L.; CASSONE, V. M. Daily and circadian fluctuation in 2-deoxy[<sup>14</sup>C]-glucose uptake in circadian and visual system structures of the chick brain: Effects of exogenous melatonin. **Brain Res. Bull.**, v. 575, p. 603-612, 2002.

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.; MENAKER, M. Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? **J. Exp. Zoo.** v. 232, p. 539-549. 1984.

CASSONE, V. M.; SPECH, J. C.; CARD, J. P.; MOORE, R. Y. Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. **J. Biol. Rhythms**, v. 3, p. 71-92, 1988.

CASSONE, V. M.; SPECH, J. C.; CARD, J. P.; MOORE, R. Y. Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. **J. Biol. Rhythms**, v. 3, p. 71-92, 1988.

CHABOT, C. C.; TAYLOR, D. H. Circadian Modulation of the Rat Acoustic Startle Response. **Behav. Neurosc.**, v. 106, p. 846-852, 1992a.

CHABOT, C. C.; TAYLOR, D. H. Daily Rhythmicity of the Rat Acoustic Startle Response. **Physiol. Behav.**, v. 51, p. 885-889, 1992b.

CHAUDHURY, D.; COLWELL, C. S. Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. **Behav. Brain Res.**, v. 133, p. 95-108, 2002.

COLE, A. J.; SAFFEN, D. W.; WORLEY, P. F. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neuron by synaptic NMDA receptor activation. **Nature**, v. 340, p. 474-476, 1989.

- CROSBY, E. L.; SHOWERS, M. J. L. Comparative anatomy of the preoptic and hypothalamic areas. In Haymaker, E. Andersen and W.J.H Nauta (Eds), *The hypothalamus*, Thomas, Springfield, IL, p. 61-135, 1969.
- CRUZ, A. P.; BUENO, J. L.; GRAEFF, F. G. Influence of stimulus preexposure and of context familiarity on conditioned freezing behavior ***Braz. J. Med. Biol. Res.*** v. 66, p. 26, p. 615-21, 1993.
- DAVIS, M. Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. ***Behav. Neurosc.***, v. 130, p. 495-503, 1989.
- DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. ***Trends Pharmac. Sci.***, v. 13, p. 35-41, 1992.
- DAVIS, M.; FALLS, W. A.; CAMPEAU, S.; KIM, M. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis. ***Behav. Brain Res.***, v. 58, p. 175-198, 1993.
- DAVIS, M.; GENDELMAN, D. S.; TISCHLER, M. D.; GENDELMAN, P.M. A primary acoustic startle circuit: lesions and stimulations studies. ***J. Neurosc.***, v.2, p. 791-805, 1982.
- DAVIS, M.; SOLLBERGER, A. Twenty-four periodicity of the startle response in rats. ***Psycho. Science***, v. 25, p. 37-39, 1971.
- EBIHARA, S.; KAWAMURA, H. The role of the pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of circadian locomotor rhythms in the Java sparrow, *Padda oryzivora*. ***J. Comp. Physiol. A***, v. 141, p. 207-214, 1981
- EBIHARA, S.; UCHIYAMA, K.; OSHIMA, I. Circadian organization in the pigeon, *Columba livia*: The role of the pineal organ and the eye. ***J. Comp. Physiol.***, v. 154, p. 59-69, 1984.
- FALLS, W. A.; DAVIS, M. Lesions of the central nucleus of the amygdala block conditioned excitation, but not conditioned inhibition of fear as measured with the fear-potentiated startle effect. ***Behav. Neurosc.***, v. 109, p. 379-387, 1995.
- FANSELOW M. Contextual fear, gestalt memories and the hippocampus. ***Behav. Brain Res.***, v. 110, p. 73-81, 2000.

FEIFEL, D.; REZA, T. L. Effects of neurotensin administered into the ventral tegmental area on prepulse inhibition of startle. ***Behav. Brain Res.*** v. 106, p. 189-193, 1999.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. ***Neurosci. Biobehav. Reviews.***, v. 23, p. 743-760, 1999.

FENDT, M.; KOCH, M.; SCHNITZLER, H. U. Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. ***Behav. Brain Res.***, v. 74, p. 127-134, 1996.

FERNANDEZ, R. I.; LYONS, L. C.; LEVENSON, J.; KHABOUR, O.; ESKIN, A. Circadian modulation of long-term sensitization in *Aplysia*. ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, v. 100, p. 14415-14420, 2003.

FERRARI E. A. M. Some issues about temporal organization of learning in pigeons. VI LASC, Natal, RN, 2001.

FERRARI, E. A. M.; AZEVEDO, A. P.; CIPOLLI, J. A. A.; VALENTINUZZI, V. S. Temporal analysis of Pavlovian fear conditioning in pigeons submitted to a skeleton photoperiod. *V Latin American Symposium of Chronobiology*, Buenos Aires, Argentina, 1999, p. 14.

FERRARI, E. A. M.; FALEIROS, L.; CERUTTI, S. M.; OLIVEIRA, A. M. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. ***Behav. Brain Res.***, v. 101, p. 93-103, 1999.

FLESHLER, M. Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat. ***J. Comp. Physiol. Psychol.***, v. 60, p. 200-207, 1965.

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

- FORTUNE, E.; MARGOLIASCH, D. Citoarchitetonica organization and morphology of cells of the field L complex in male zebra finches (*Taenopygia grittata*). **J. Comp. Neurol.**, v. 325, p. 388-404, 1992.
- FOSTER, R. G.; SONI, B. G. Extraretinal photoreceptors and their regulation of temporal physiology. **Rev. Reprod.** v. 3, p. 145-150, 1998.
- FOX, J. E. Habituation and prestimulus inhibition of the auditory startle reflex in decerebrate rats. **Physiol. Behav.**, v. 23, p. 291-297, 1978.
- FRANKLAND, P. W.; RALPH, M. R. Circadian Modulation in the Rat Acoustic Startle Circuit. **Behav. Neurosci.**, v. 109, p. 43-48, 1995.
- GASTON, S.; MENAKER, M. Pineal function: the biological clock in the sparrow? *Science*. v. 160, p. 1125-1127, 1968
- GLICKMAN, S. E.; SROGES, R. W. Curiosity in zoo animals. **Behavior**, v. 26, p. 151-188, 1966.
- GODDARD, M. J. Latent inhibition of US signal value. **Q. J. Exp. Psychol. B**, v. 52, n. 2, p. 177-192, 2003.
- GOLEMBEK, D. A.; AGOSTINO, P. V.; PLANO, S. A.; FERREYRA, G. A. Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. **Neurochem. Inter.**, v. 45, p. 929-936, 2004.
- GREBA, Q.; GIFKINS, A.; KOKKINIDIS, L. The involvement of ventral tegmental area cholinergic muscarinic receptors in classically conditioned fear expression as measured with fear-potentiated startle. **Brain Res.** v. 870, n.1-2, p. 135-141, 2000.
- GRILLON, C.; BAAS, J. A review of the modulation of the startle reflex by affective states and its application in psychiatry. **Clinical Neurophysiol.**, v. 114, p. 1557-1579, 2003.
- GROVES, P. M.; THOMPSON, R. F. Habituation: a dual process theory. **Psychol. Review**, v. 77, p. 419-450, 1970.

- GÜNTÜRKÜN, O.; MICELI, D.; WATANABE, M. Anatomy of the avian thalamofugal pathway. In: Zeigler, HP; Bischof, H; eds. Vision, brain, and behavior in birds. **Cambridge, MA**: The MIT press. p. 25-46, 1993
- HAMADA, T.; LESAUTER, J.; VENUTI, J. M.; SILVER, R. Expression of period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 7742-7750, 2001.
- HAMASSAKI, D. E.; BRITTO, L. R. G. Interhemispheric transfer of habituation in pigeons. **Behav. Brain Res.**, 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. 4998-5002, 1980.
- HIROTA, T.; FUKADA, Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. **Zoolog. Sci.**, v. 21. P. 358-368, 2004.
- HITCHCOCK, J. M.; DAVIS, M. Efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. **Behav. Neurosci.**, v. 105, p. 826-842, 1991.
- HITCHCOCK, J. M.; SANANES, C. B.; DAVIS, M. Sensitization of the startle reflex by footshock: blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem. **Behav. Neurosci.**, v. 103, p. 509-518, 1989.
- HITCHCOCK, J. M. e DAVIS M. The efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm, **Behav Neurosci.**, v. 105, p. 826-842, 1991.
- HORLINGTON, M. Startle response circadian rhythm in rats: lack of correlation with motor activity. **Physiol. Behav.** v.5, p. 49-53, 1970.

KARATSOAREOS, I. N.; YAN, L.; LESAUTER, J.; SILVER, R. Phenotype Matters: Identification of Light-Responsive Cells in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurosci.* v. 24, n. 1, p. 68-75, 2004.

KARTEN, H. J. The organization of the ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*). I. Diencephalic projections of the inferior colliculus (nucleus mesencephalic lateralis, pars dorsalis). *Brain Res.*, v. 11, p. 143-153, 1967.

KEAY, K. A.; BANDER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to types of stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 25, p. 669-678, 2001.

KIERNAN, M. J.; WESTBROOK, R. F. Effects of exposure to a to-be-shocked environment upon the rats freezing response: evidence for facilitation, latent inhibition and perceptual learning. *Exp. Physiol.*, v. 46B, p. 271-288, 1993.

KIM, M.; DAVIS, M. Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia in rats with amygdala lesions assessed with the fear-potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* v. 107, n. 6, p. 1088-1092, 1993.

KOCH, M. The neurobiology of startle. *Progr. Neurobiol.*, v. 59, p. 107-128, 1999.

KOCH, M.; KLING, C.; BECKER, C. M. Increased startle responses in mice carrying mutations of glycine receptor subunit genes. *Neuroreport*, v.7, p. 806-808, 1996.

KOCH, M.; SCHNIZLER, H-U. The acoustic startle response in rats-circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav. Brain Res.*, v. 98, p. 35-49, 1997

KOJIMA, D.; FUKADA, T. Non-visual photoreception by a variety of vertebrate opsins. *Novart.Fdn. Symp.*, v. 224, p. 347-364, 1999.

- KOLE, M. H.; KOOLHAAS, J. M.; LUITEN, P. G.; FUCHS, E. High-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents and the excitability of pyramidal neurons in the hippocampal CA3 subfield in rats depend on corticosterone and time of day. **Neurosci. Lett.**, v. 307, p. 53-56, 2001.
- KOULACK, D. Recognition memory, circadian rhythms, and sleep. **Percept. Mot. Skills**, v. 85, p. 99-104, 1997.
- LAMONT, E. W.; ROBINSON, B.; STEWART, J.; AMIR, S. The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 4180-4184, 2005.
- LANHAN, A.; WORLEY, P. Immediate-early genes and synaptic function. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 70, p. 37-43, 1998.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 23, p.155-184, 2000.
- LEHMANN, J.; PRYCE, C. R.; FELDON, J. Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. **Behav. Brain Res.**, v. 104, n. 1-2, p. 113-117, 1999.
- LEITNER, D. S.; POWERS, A. S.; STITT, C. L.; HOFFMAN, H.S. Midbrain reticular formation involvement in the inhibition of acoustic startle. **Physiol. Behav.**, v. 26, p. 259-268, 1980.
- LI, L.; FULTON, J. D.; YEOMANS, J. S. Effects of bilateral electrical stimulation of the ventral pallidum on acoustic startle. **Brain Res.** v. 836, p. 164-172, 1999.
- LIMA, T. C. M.; DAVIS, M. Involvement of cyclic AMP at the level of the nucleus reticularis pontis caudalis in the acoustic startle response. **Brain Res.** v.700, p. 59-69, 1995.
- LU, J.; CASSONE, V. M. Daily melatonin administration synchronizes circadian patterns of brain metabolism and behavior in pinealectomized house sparrows, *Passer domesticus*. **J. Comp. Physiol. A** v. 173, p. 775-782, 1993.

- MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. Cronobiologia: Princípios e Aplicações. **Ed. Fiocruz**, p. 321, 1988.
- MAURY, P.; QUEINNEC, Y. Influence of time of 24-hour day on depth of processing in recall memory. **Br. J. Psychol.**, v. 83, p. 249-260, 1992.
- MCECHRON, M. D.; CHENG, A. I.; GILMARTIN, M. R. Single neurons in the dentate gyrus and CA1 of the hippocampus exhibit inverse patterns of encoding during trace fear conditioning. **Behav. Neurosci.** v. 119, n. 1, p. 164-79, 2005.
- MISANE, I.; TOVOTE, P.; MEYER, M.; SPIESS, J.; OGREN, S. O.; STIEDT, O. Time-dependent involvement of the dorsal hippocampus in trace fear conditioning in mice. *Hippocampus*. v. 15, n 4, p. 418-426, 2005.
- MISERENDINO, M. J. D.; SANANES, C. B. MELIA, K. R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature**, v. 345, p. 716-718.
- MIYAZATO, H.; SKINNER R. D.; GARCIA-RILL E. Sensory gating of the P13 midlatency evoked potential and the startle response in the rats. **Brain Res.**, v. 822, p. 60-71, 1999.
- MOORE, R. Y.; SPEH, J. C.; LEAK, R. K. Suprachiasmatic nucleus organization. **Cell Tissue Res.**, v. 309, p. 89-98, 2002.
- MOORE-EDE, M. C.; SULZMAN, F. M.; FULLER, C. A. The clocks that time us. Physiology of the circadian timing system. **Harvard University Press**, 488p. 1982.
- MORIN, L. P. The circadian visual system. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v. 19, p. 102-127, 1994.
- NECKER, R. HEARING. In M. ABS (Ed). (1983), Physiology and Behavior of the Pigeon, **New York: Academic Press**. p.193-219.

- NESCA, M.; KOULACK, D. Recognition memory, sleep and circadian rhythms. **Can. J. Exp. Psychol.**, v. 48, p. 359-379, 1994.
- NORGREN, R.; SILVER, R. Retinohypothalamic projections and the suprachiasmatic nucleus in birds. **Brain Behav. Evol.** v. 34, p. 73-83, 1989.
- PILZ, P. K. D.; SCHNITZLER, H-U. Habituation and Sensitization of the Acoustic Startle Response in Rats: Amplitude, Threshold, and Latency Measures. **Behav. Brain Res.**, v. 66, p. 67-79, 1996.
- PITTENDRIGH, C. S. In: Aschoff, J (Ed.), Handbook of behavioral neurobiology: Biological rhythms, circadian system: Entrainment. **Plenum Press**, New York, p 95-124, 1981.
- PITTENDRIGH, C. S. On the mechanism of entrainment of circadian rhythms by light cycles. In: **Circadian Clocks**. Amsterdam: North Holland, p. 277-297, 1965.
- PLAPERT, C. F.; PILZ, P. K. D.; BECKER, K.; BECKER, C. M.; SCHNITZLER, H-U. Increased sensitization of acoustical startle response in spasmodic mice with mutation of the glycine receptor alpha 1-subunit gene. **Behav. Brain Res.**, v. 121, p. 57-67, 2001.
- PLAPERT, C. F.; PILZ, P. K. D.; SHNITZLER, H-U. Interaction between acoustic and electric sensitization of the acoustic startle response in rats. **Behav. Brain Res.**, v. 103, n. 2, p. 195-201, 1999.
- QUINN, J. J.; OOMMEN, S. S.; MORRISON, G. E.; FANSELOW, M. S. Post-training excitotoxic lesions of the dorsal hippocampus attenuate forward trace, backward trace, and delay fear conditioning in a temporally specific manner. **Hippocampus**. v.12, n, 4, p. 495-504, 2002.
- RAGHAVAN, A. V.; HOROWITZ, J. M.; FULLER, C. A. Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. **Brain. Res.**, v. 833, n. 2, p. 311-314, 1999.
- RALPH, M. R.; KO, C. H.; ANTONIADIS, E. A.; SECO, P.; IRANI, F.; PRESTA, C.; MCDONALD, R. J. The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. **Behav. Brain Res.**, v. 136, p.179-184, 2002.

- REIJMERS, L. G.; LEUS, I. E.; BURBACH, J. P.; SPRUIJT, B. M.; VAN REE, J. M. Social memory in the rat: circadian variation and effect of circadian rhythm disruption. *Physiol. Behav.*, v. 72, p. 305-309, 2001.
- REIS, F.; SCHENKA, A. A.; MELO, L. L.; FERRARI, E. A. M. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*)". *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 32, p. 1127-1131, 1991.
- REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, v. 418, p. 935-942.
- RICHARDSON R. Shock sensitization of startle: learned or unlearned fear? *Behav Brain Res.*, v. 110, p. 109-117, 2000.
- ROGAN, M. T.; STÄUBLI, U. V.; LEDOUX, J. E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, v. 390, p. 604-607, 1997.
- ROSEN, J. B.; HITCHCOCK, J. M.; MISERENDINO, M. J. D.; FALLS, W. A. CAMPEAU, S.; DAVIS, M. Lesions of the perirhinal cortex but not of the frontal, medial prefrontal, visual, or insular cortex block fear-potentiated startle using a visual conditioned stimulus. *J. Neurosci.*, v. 12, p. 4624-4633, 1992.
- RUNYAN, J. D.; DASH, P. K. Inhibition of hippocampal protein synthesis following recall disrupts expression of episodic-like memory in trace conditioning. *Hippocampus*, v. 15, n.3. p. 333-339, 2005.
- RUSAK, B. Vertebrate behavior rhythms, In: J. Aschoff Handbook of behavioral neurobiology – Biological Rhythms, 4 J. New York, *Plenum Press*, p 183-213, 1981.
- RUSAK, B; BOULOS, Z. Pathways for photic entrainment of mammalian circadian rhythms. *Photochem. Photobiol.*, v. 34, n. 2, p.267-273, 1981.

SACCHETTI, B.; LORENZINI, C. A.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C.; ROBERTO, M.; TASSONI, G.; BRUNELLI, M. Time-dependent inhibition of hippocampal LTP in vitro following contextual fear conditioning in the rat. ***Eur. J. Neurosci.*** v. 15, n. 1, p. 143-50, 2002.

SANANES, C. B.; DAVIS, M. N-methyl-D-aspartate lesions of the lateral and basolateral nuclei of the amygdala block fear-potentiated startle and shock sensitization of startle. ***Behav. Neurosci.***, v. 106, p. 72-80, 1992.

SANDBAK, T.; RIMOL, L. M.; JELLESTAD, L. K.; MURISON, R. Relating acoustic startle reactivity and plasticity to alcohol consumption in male wistar rats. ***Physiol. Behav.*** v. 68, p. 723-733, 2000.

SANTINI, E.; MULLER, R. U.; QUIRK, G. J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. ***J. Neurosci.*** v. 21, n. 22, p. 9009-9017, 2001.

SAPER, C. B.; SCAMMELL, T. E.; LU, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. ***Nature***, v. 437, p. 1257-1263, 2005.

SAVAGE, L. M.; SWEETM, A. J.; CASTILLO, R.; LANGLAIS, P. J. The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rats. ***Behav. Brain Res.*** v. 82, p. 133-147, 1997.

SCHWARTZ, W. J. Different in vivo metabolic activities of suprachiasmatic nuclei of Turkish and golden hamsters. ***Am. J. Physiol.***, v. 259, n. 5 Pt 2, p.R1083-108-51, 1990.

SHIMIZU, T.; COX, J.; KARTEN, H. J.; BRITTO, L. R. G. Cholera toxin mapping of the retinal projections in pigeons (*Columba livia*), with emphasis on retinohypothalamic connections. ***Visual Neurosci.***, v.11, p. 441-446, 1994.

SIMPSON, S. M.; FOLLET, B. K. Pineal and hypothalamic pacemakers: their role in regulating circadian rhythmicity in Japanese quail. ***J. Comp. Psychol. A*** v. 144, p. 381-389, 1981.

SIQUEIRA, L. O.; VIEIRA, A. S.; FERRARI, E. A. M. Time-of-day variation in the sensitization of the acoustic response in pigeons. ***Biol. Rhythm Res.***, v. 36, p. 151-157, 2005.

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

SOUSA, C.M.Z. (1999), *Organização Temporal de Processos de Aprendizagem: Variação de Concentrações de Melatonina e Corticosterona, Atividade Geral e Habituação a Som, em Pombos sob condições de Claro-Escuro e Luz Constante*. Tese de Doutorado, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Unicamp. p. 216.

SOUZA, C. M. Z.; SILVA, A. A. M. R.; CALDAS, M. C. S.; VALENTINUZZI, V. S.; FERRARI, E. A. M. Diurnal variation of plasmatic melatonin, corticosterone and variation of general activity in pigeons under light-dark cycle and Constant light. ***Biol. Rhythm Res.***, v. 32, p. 243-254, 2001.

STADDON, J. E. R. Adaptive behavior and learning. In: \_\_\_\_\_. *Variation and selection of behavior*. New York: Cambridge, 1983. cap 3, p. 20-46.

STOROZEVA, Z. I.; PLETNICOV, M. V. Habituation of acoustic startle in rats- a functional ablation study. ***Neuroreport***, v. 5, n. 16, p. 2065 – 2068, 1994.

SZABO, I.; HAZAFI, K. Elicitability of the acoustic startle reaction after brainstem lesions. ***Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*** v. 27, p. 155-165, 1965.

TAKAHASHI, J; MENAKER, M. Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. ***Neurosci.***, v. 2, p. 815-828, 1982.

TAPP, W. N.; HOLLOWAY, F. A. Phase shifting circadian rhythms produces retrograde amnesia. ***Science***, v. 211, n.4486, p. 1056-1058, 1981.

TESTU, F.; CLARISSE, R. Time-of-day and day-of-week effects on mnemonic performance. ***Chronobiol. Int.***, v. 16, p. 491-503, 1999.

TOLEDO, C. A. B.; FERRARI, E. A. M. Habituation to sound stimulation in decerebrate pigeons (*Columba livia*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 187-190, 1991.

UNDERWOOD, H.; STEELE, C. T.; ZIVKOVIC, B. Circadian organization and the role of the pineal in birds. **Microsc. Res. Tech.** v. 53, n. 1, p. 48-62, 2001.

VALENTINUZZI, V. S.; BUXTON, O. M.; CHANG, A.; SCARBROUGH, K.; FERRARI, E. A. M.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Locomotor response to an open field during C57BL/6J active and inactive phases. Differences depended on conditions of illumination. **Physiol. Behav.**, v. 69, p. 269-275, 2000.

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

VALENTINUZZI, V. S.; KOLKER D. E.; VITATERNA, M. H.; FERRARI, E. A. M. Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. **Anim. Learn. Behav.**, v. 29, p. 133-142, 2001.

VAN DEN POL, A. N.; FINKBEINER, S. N.; CORNELL-BELL, A. H. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 2648-2664, 1992.

WALKER, D. L.; CASSELLA, J. V.; LEE, Y.; DE LIMA, T. C. M.; DAVIS, M. Opposing roles of the amygdala and dorsolateral periaqueductal gray in fear-potentiated startle. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 21, p. 743-753, 1997.

WANISCH, K.; TANG, J.; MEDERER, A.; WOTJAK, C. T. Trace fear conditioning depends on NMDA receptor activation and protein synthesis within the dorsal hippocampus of mice. **Behav. Brain Res.** v. 157, n. 1, p. 63-69 2005.

- WHEELER, D. S.; CHANG, R. C.; MILLER, R. R. Massive preexposure and preexposure in multiple contexts attenuate the context specificity of latent inhibition. *Learn. Behav.* v. 31, n. 4, p. 378-386, 2003.
- YAMAZAKI, S.; NUMANO, R.; ABE, M.; HIDA, A.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; BLOCK, G. D.; SAKAKI, Y.; MENAKER, M.; TEI, H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. v. 288, n. 5466, p. 682-685, 2000.
- YASUO, S.; YOSHIMURA, T.; BARTELL, P. A.; LIGO, M.; MAKINO, E.; OKABAYASHI, N.; EBIHARA, S. Effect of melatonin administration on *qPer2*, *qPer3*, and *qClock* gene expression in the suprachiasmatic nucleus of Japanese quail. *Eur. J. Neurosci.*, v. 16, p. 1541-1546, 2002.
- YEOMANS, J. S. e FRANKLAND, P. W. The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res. Rev.*, v. 21, p. 301-314, 1996.
- YEOMANS, J. S.; POLARD, B. A. Amygdala efferents mediating electrically evoked startle-like responses and fear potentiation of acoustic startle. *Behav. Neurosci.*, v. 107, p. 596-610, 1993.
- YOSHIMURA, T.; SHINOBU, Y.; YOSHIKAZU, S.; MAKINO, E.; YOKOTA, Y.; EBIHARA, S. Identification of the suprachiasmatic nucleus in birds. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 280, p. 1189-2001, 2001.
- YOSHIMURA, T.; YASUO, S.; SUZUKI, Y.; MAKINO, E.; YOKOTA, Y.; EBIHARA, S. Identification of the suprachiasmatic nucleus in birds. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 280, p. 1185-1189, 2001.
- ZHANG, W. N.; MURPHY, C. A.; FELDON, J. Behavioral and cardiovascular responses during latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned freezing. *Behav. Brain Res.* v. 154, n. 1, p. 199-209, 2004.
- ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16. p. 109-110, 1983.



*Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* (no prelo)

**Sistema automático de análise comportamental em pombos**

*Automatic behavioral analysis system in pigeons*

Título Resumido para Impressão no Cabeçalho: Análise comportamental em pombos

Autores

Luís Otávio Siqueira

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Instituto de Biologia - IB

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Cidade universitária Zeferino Vaz

Caixa Postal 6109

13083-970 – Campinas - SP

siqueira@unicamp.br

elenice@unicamp.br

Joaquim Miguel Maia

Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - (CEFET-PR)

DAELN - Departamento Acadêmico de Eletrônica

CPGEI - Programa de Pós-graduação em Eng. Elétrica e Informática Industrial

Av. Sete de Setembro, 3165

80230-901 - Curitiba - PR

joaquim@cefetpr.br

## Resumo

Este trabalho apresenta o projeto e os testes de um equipamento para registro automatizado da amplitude e da latência da resposta de sobressalto acústico em pombos. O sistema desenvolvido é formado por uma câmara experimental, com uma célula de carga acoplada ao piso para ser utilizada como sensor de força, circuitos para geração de estímulos (luz, som ou choque) e circuitos de condicionamento e interfaceamento dos sinais a um microcomputador utilizado para controle, armazenamento e análise dos dados. O *software* para controle do sistema foi desenvolvido utilizando-se linguagem C para operar em plataformas DOS ou Windows, com rotinas de controle para o protocolo experimental (número, duração e taxa de repetição dos estímulos) e rotinas gráficas para apresentar as curvas de amplitude da resposta em relação ao tempo, armazenamento dos dados no disco e processamento. Os dados são armazenados em arquivos e podem ser analisados estatisticamente com outros aplicativos computacionais. Foram realizados testes comportamentais com pombos e ratos, expostos a 20 estímulos sonoros (1 kHz, 100 dBA, duração de 1 s e taxa de repetição de 30 s). Os animais do grupo controle permaneceram na caixa durante 30 minutos sem receber estímulos. A amplitude do sobressalto, medida em kgf, foi registrada durante 4 s e analisada em janelas temporais de 1 s imediatamente após o som. Os testes com ratos apresentaram resultados semelhantes aos da literatura e indicaram a eficiência do sistema. Comparativamente aos ratos, os pombos apresentaram menor amplitude e maior latência e indicaram diferenças comportamentais entre as duas espécies. O equipamento mostrou-se adequado para as investigações neurobiológicas e comportamentais que usam modelos animais.

Palavras-chave: Análise comportamental, registro automático, pombos, ratos, resposta de sobressalto acústico.

**Abstract**

*This work presents the design and testing of an apparatus for automatic recording of the magnitude and latency of acoustic startle response in pigeons. This system includes one experimental chamber with a load cell coupled to its floor (which is used as a force sensor to measure the amplitude of the response to the stimulus), stimuli generation circuits (light, sound or shock) and interfacing circuits (to a microcomputer that is used for control, storage and data analysis). The software used to control the system was developed using C language and run under DOS or Windows operational systems. There are routines to implement the experimental protocol (number, duration and repetition rate of stimuli) and graphics routines to show the amplitude of the startle response curves as a function of time. The data may be saved in the disk for further statistical analysis with other programs. Behavioral tests with exposure to 20 tone-pulses (1 kHz, 100 dBA, 1 s, every 30 s) were carried out with pigeons and rats. The control group animals remained in the chamber during 30 min without receiving any acoustic stimulation. The magnitude of startle was recorded (in kgf) during 4 s and analyzed in temporal windows of 1 s. The tests with rats corroborate the literature and indicate the efficiency of the system. Compared to rats, the pigeons presented lower magnitude and longer latency of acoustic response, indicating behavioral differences between the two species. The equipment was considered adequate for neurobiological and behavioral investigations which use automatic recording of acoustic stimuli responses.*

*Keywords: Behavioral analysis, automatic recording, pigeons, rats, acoustic startle response.*

## **Extended Abstract**

### *Introduction*

The acoustic startle response (ASR) is a relatively simple response, characterized by a rapid contraction of skeletal muscles that follows unexpected and intense acoustic stimuli. The ASR has been observed in many mammalian species including humans. In the study of startle in rodents, several investigators used the automatic detection of response amplitude. However, studies of acoustic startle in birds are scarce. Previous studies in our laboratory analyzed the acoustic response in pigeons with the direct observation of the behavior, a methodology that provides a descriptive analysis of the behavior but no direct measurement of parameters such as amplitude and latency. Since the acoustic startle response provides a simple behavioral assay for the study of behavioral and neurobiological issues, the purpose of the present work was the design and construction of an equipment for automatic recording of the amplitude and latency of responses to acoustic stimulation in pigeons and rats.

### *Material and Methods*

*Behavioral Analysis System* - The system for automatic behavioral analysis (Figure 1) includes basically (a) a transparent acrylic experimental chamber 50 cm x 30 cm x 30 cm that provides the experimental environment where stimuli are presented. The experimental chamber has a 20 kg load cell coupled to its floor (Figure 2) that is used as a force sensor to measure the amplitude of the response to the stimulus; (b) circuits for generation and control of stimuli such as light, sound or electric shock; (c) circuits for conditioning and interfacing the signals to an IBM PC compatible microcomputer that is used for the control, storage and data analysis and (d) a panel with control keys.

*Figure 3 shows the block diagram of the circuits used to acquire the signals of the load cell. The signals are amplified using an instrumentation amplifier and interfaced to the microcomputer using an analog to digital acquisition board.*

*Figure 4 shows the block diagram of the control circuits to generate light, acoustic or electric stimuli. The parameters of the stimulus (duration, repetition rate, amplitude) are scheduled according to the manual setting of the control panel keys or by software control. The light stimulus is generated within a range between 0 and 60 Watts. The acoustic stimulus was generated by a 50 Watts sound speaker. Frequency of sound may vary between 400 Hz and 2 kHz. The electric stimulus consists of pulses with amplitude of 15 V and duration controlled between 50 ms and 5 s. The system allows the application of independent, simultaneous or combined stimulus.*

*The control software permits to configure the experimental protocol by setting the number, duration and repetition rate of the stimulus (Figure 6). It has also graphic routines to display the acquired signals and allows the measurement of the magnitude of the animal startle response. The latency duration and the weight of the animal are also recorded automatically (Figure 7 and Figure 8). The data may be also saved in disk to be analyzed using other programs.*

### *Behavioral tests*

*In Experiment 1, 24 male, adult pigeons maintained under a light dark cycle (12:12 h; lights on at 6:00 a.m.) were used. These animals were distributed in two groups: Experimental Group (EG, n = 12), submitted to sound stimulation, and Control Group (CG, n = 12) which was exposed only to the experimental chamber.*

*In Experiment 2, the animals were 10 male, adult rats maintained under a light dark cycle (12:12 h; lights on at 6:00 a.m.) were used. These animals were distributed in two groups:*

*Experimental Group (EG, n = 5), submitted to acoustic stimulation, and Control Group (CG, n = 5) which was exposed only to the experimental chamber.*

*The pigeon was habituated (in 50min session) to the experimental chamber for four days. In the fifth day, the animal had a 20 min test session with the presentation of a series of 40 tone pulses (1000 Hz, 100 dBA, 1 s). The interval between stimuli was 30 s. The control pigeons remained 30 min in the experimental chamber without any programmed stimulus presentation. The automatic trigger presentation of sound began immediately after the animal was left inside the experimental chamber.*

*Statistical analysis was carried out by two-way ANOVA, with groups and blocks of stimuli as factors. Multiple post hoc comparisons used the Tukey-Kramer's test.*

### *Results and Discussion*

*Experiment 1 data (Figure 9(a) and 9(b)) showed variation of the acoustic response magnitude as a function of the stimulus repetition rate. The mean magnitude of the acoustic response of the experimental group was 0.10 kgf in the first five stimuli with mean latency of 350ms, which decreased abruptly after the second block of stimuli. The decrease in the response as a function of the stimulus repetition rate indicates response habituation to sound stimulation. The Control pigeons showed steady response magnitude, with steady values around 0.02 kgf throughout all the session. This data indicated that the pigeons were already habituated to the experimental chamber.*

*Experiment 2 data (Figure 10(a) and 10(b)) showed that the mean magnitude of the acoustic response of the experimental group of rats was 0.60 kgf in the first five stimuli with mean latency of 200 ms. The control rats showed steady response magnitude around 0.05 kgf during the session. These findings are consistent with previous research on acoustic elicited startle in the rat.*

*Thus, we might say that the results of the present study indicate two points of interest. First, the equipment is efficient for the automatic recording of the magnitude and latency of the response to acoustic stimuli and may contribute to the investigation of the behavioral and neural plasticity of this response in pigeons and rats. Additionally, the study describes differences in the characteristics of the acoustic startle in rats and pigeons, which raise issues for future comparative investigations.*

## Introdução

A análise do comportamento permite a compreensão de interações entre o organismo e o ambiente e constitui um dos principais alicerces da neurociência moderna. As diferentes relações entre os estímulos do ambiente e as respostas do organismo definem diferentes classes de comportamentos que são relacionadas a diferentes substratos neurobiológicos. Assim, em situações de apresentação de estímulos sonoros inesperados, de amplitudes maiores que 80 dBA, ocorrem respostas que são caracterizadas por contração rápida e generalizada da musculatura do tronco, com movimentação brusca do corpo no espaço. Esse padrão define uma resposta de sobressalto acústico (Fleshler, 1965; Szabo, 1965; Miyazato *et al.*, 1999; Koch, 1999).

A análise comportamental e neurobiológica do sobressalto acústico é utilizada em várias linhas de pesquisas, com diferentes espécies de mamíferos, incluindo roedores, primatas não humanos e humanos (Koch, 1999), abordando questões relativas aos circuitos neurais subjacentes (Koch, 1999; Lima and Davis, 1995; Miyazato *et al.*, 1999), efeitos de drogas de ação no sistema nervoso central (Davis *et al.*, 1982; Feifel and Reza, 1999; Sandbak *et al.*, 2000) e lesões neurais (Lima and Davis, 1995; Fendt *et al.*, 1996; Savage *et al.*, 1997), processos de aprendizagem e memória, dentre as quais destacam-se a sensibilização e habituação (Groves and Thompson, 1970; Fox, 1979; Pilz and Schnitzler, 1996), além de questões clínicas relacionadas com ansiedade, estresse e distúrbios de atenção. Em ratos, o sobressalto acústico foi analisado em um grande número de estudos (Fox, 1979; Koch *et al.*, 1996; Savage *et al.*, 1997; Miyazato *et al.*, 1999; Koch, 1999), permitindo uma caracterização de sua latência entre 100 ms e 200 ms (Leitner *et al.*, 1980; Lima and Davis, 1995) e dos circuitos neurais subjacentes (Davis *et al.*, 1982; Miyazato *et al.*, 1999; Koch, 1999).

Quando o estímulo acústico é apresentado contínua ou repetitivamente, sem associação com algum perigo em potencial ou outra consequência, o animal pode aprender que esse estímulo não tem significado funcional. Assim, a sua resposta modifica-se, diminuindo em frequência ou magnitude, ou seja, o animal deixa de responder ao estímulo irrelevante. Esse tipo de aprendizagem denomina-se habituação, processo considerado como uma forma de aprendizado não associativo (Fox, 1979; Storozeva and Pletnicov, 1994; Pilz and Schnitzler, 1996; Plapert *et al.*, 1999; Plapert *et al.*, 2001).

Estudos do sobressalto acústico em aves são raros, embora o pombo forneça um modelo animal profícuo para estudos comportamentais. De fato, tal como os roedores, os pombos contribuíram para o conhecimento dos processos de aprendizagem e da organização neural subjacente a eles (Valentinuzzi and Ferrari, 1997; Ferrari *et al.*, 1999). Estudos anteriores no nosso laboratório analisaram o sobressalto e o comportamento exploratório em pombos por meio da observação direta do comportamento (Reis *et al.*, 1991; Souza, 1999). Essa metodologia permite uma análise descritiva do comportamento, porém não analisa diretamente os parâmetros relativos à amplitude e latência. Desse modo, tais estudos contrastam com os estudos do sobressalto acústico em ratos que analisam e discutem, principalmente, as variações na magnitude e na latência desse comportamento. Torna-se, assim, interessante a investigação sistemática dessa resposta em pombos com equipamentos eficientes para o registro automatizado de magnitude e latência de respostas a estímulos sonoros. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver um equipamento para a detecção e registro automatizado da amplitude e da latência da resposta de sobressalto acústico em pombos. Os objetivos específicos foram: (a) desenvolver um procedimento com a utilização de um novo equipamento de registro automatizado do comportamento; (b) elaborar um novo programa computacional para controle e análise dos

dados do sistema; (c) registrar dados experimentais em pombos e ratos; (d) analisar dados inéditos obtidos em pombos; (e) comparar os resultados obtidos em ratos com os dados da literatura.

## Materiais e métodos

### Sistema de Análise Comportamental

O sistema desenvolvido é formado basicamente por uma caixa experimental para confinamento do animal, com uma célula de carga acoplada ao piso para ser utilizada como sensor de força, circuitos para geração de estímulos tais como luz, som ou choque e circuitos de condicionamento e interfaceamento dos sinais a um microcomputador compatível com um computador pessoal que é utilizado para controle, armazenamento e análise dos dados. A Figura 1 mostra um esboço do sistema desenvolvido e as partes componentes do mesmo são descritas a seguir:

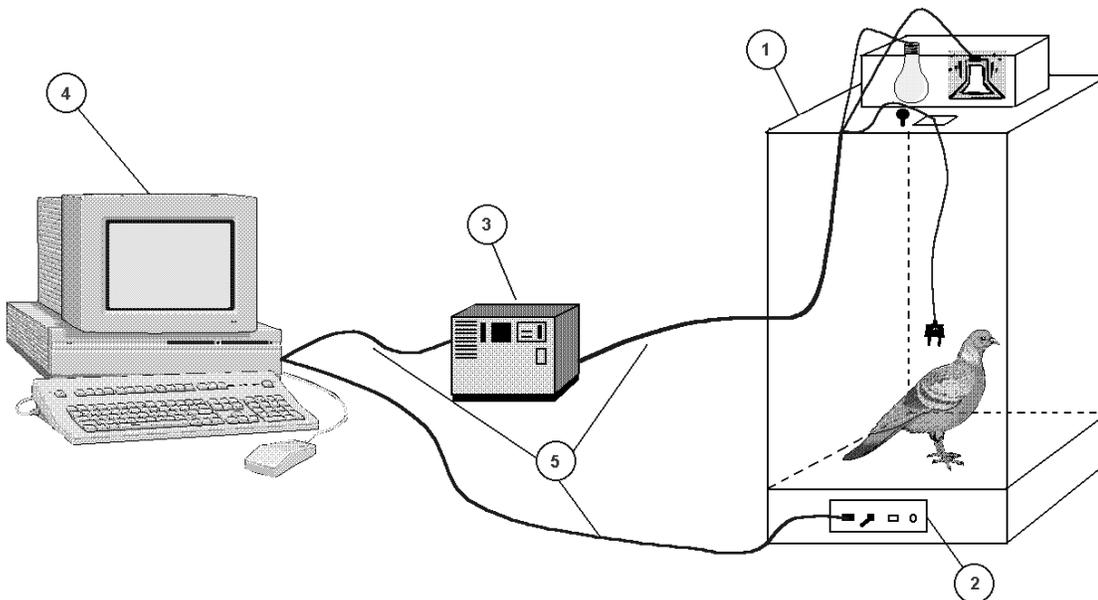


Figura 1. Sistema de Análise Comportamental de Pombos: (1) câmara experimental; (2) circuitos de condicionamento do sinal da célula de carga utilizada para medir a amplitude do sobressalto em

resposta aos estímulos; (3) circuitos de controle para gerar estímulos luminosos, sonoros e elétricos (choque); (4) microcomputador utilizado para controle do sistema, processamento e análise dos dados; (5) cabos de conexão entre as unidades do sistema. *Figure 1. Pigeons Behavioral Analysis System: (1) experimental chamber; (2) load cell signal conditioning circuit, used to measure the startle amplitude response to the stimulations; (3) control circuits to generate light, sound or electric stimuli; (4) microcomputer used to control the system, processing and data analysis; (5) cables to connect the system units.*

### **Câmara Experimental**

A câmara experimental foi montada em acrílico transparente (50 cm de altura, 30 cm de largura e 30 cm de profundidade). No piso da mesma foi adaptada uma plataforma de alumínio (28 cm x 28 cm x 4 mm de espessura), com uma chapa de acrílico de mesmas dimensões em cima, fixada através de 2 parafusos na célula de carga que é utilizada para medir a magnitude da resposta do sobressalto. A parte inferior da célula de carga foi fixada em uma base de acrílico (30 cm x 30 cm e 10 mm de espessura), utilizando-se 3 parafusos.

A Figura 2 mostra um esboço de como a célula de carga foi acoplada ao piso da câmara experimental. A caixa contendo os circuitos de condicionamento de sinal da célula de carga foi fixada na base da câmara experimental (item dois nas Figuras 1 e 2).

O alto-falante foi acoplado no lado direito da câmara experimental, a 50 cm do piso e a lâmpada foi acoplada no teto da mesma, onde há uma passagem para o cabo a ser conectado ao eletrodo implantado no animal (posição intrapúbica), utilizado para aplicação do estímulo elétrico.

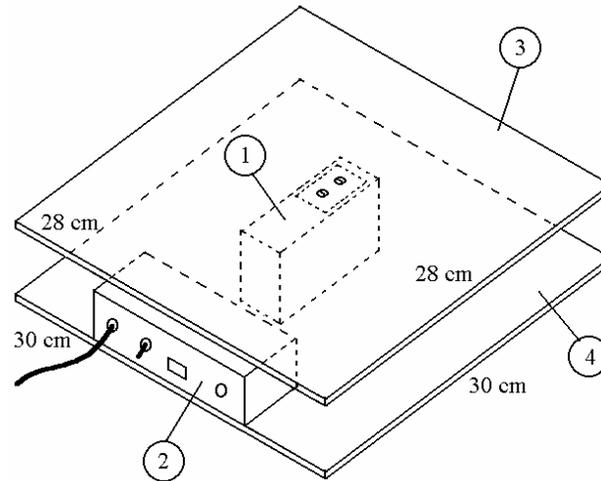


Figura 2. Diagrama esquemático mostrando a conexão da célula de carga ao piso da câmara experimental: (1) célula de carga; (2) caixa com os circuitos de condicionamento do sinal da célula de carga; (3) piso da câmara experimental, fixado apenas à célula de carga através de dois parafusos; (4) base da câmara experimental. *Figure 2. Schematic diagram showing the connection of the load cell to the floor of the experimental chamber: (1) load cell; (2) box containing the load cell signal conditioning circuits; (3) floor of experimental chamber, fixed only to the load cell using two screws; (4) base of the experimental chamber.*

### Microcomputador

Para controle do sistema foi utilizado um microcomputador compatível com IBM-PC, no qual foi instalado uma placa de aquisição de dados da Lynx, modelo CAD12/36, com 16 entradas e 16 saídas digitais (nível TTL), 3 contadores e 16 canais de conversão analógico-digital (A/D) de 12

bits, excursão dos sinais de entrada na faixa entre  $\pm 5$  Volts, resolução de 2,5 mV/bit e taxa de amostragem máxima de 60.000 amostras por segundo (60 ksps). Um dos canais A/D da placa foi utilizado para adquirir o sinal analógico da célula de carga e digitalizá-lo para processamento. Seis canais digitais de saída foram utilizados para gerar os sinais de controle da taxa de repetição, duração e amplitude dos estímulos a serem aplicados ao animal.

### **Circuitos de condicionamento do sinal da célula de carga**

Foi utilizada uma célula de carga Modelo SP-20 fabricada pela Interface Instrumentação Científica e Industrial. A célula tem capacidade para até 20 kg e seus transdutores são montados internamente em uma configuração de ponte de Wheatstone, necessitando-se apenas acoplar as tensões de alimentação para gerar um sinal diferencial. No sistema foi utilizada uma fonte de alimentação simétrica ( $\pm 5$  VDC).

O sinal foi condicionado utilizando-se um amplificador de instrumentação INA101 da Burr-Brown, com um *trimpot* multivoltas de 500  $\Omega$  para ajuste do ganho, o que permite um ganho máximo de 81 V/V, e outro de 100 k $\Omega$ , com as extremidades conectadas aos pinos 6 e 7 e o centro à tensão de alimentação positiva (+5 V), para ajuste de zero do sistema.

O ajuste de zero foi feito de forma que a saída do amplificador fosse igual a 0 Volts quando não havia pesos sobre a plataforma da câmara experimental, compensando desta forma o peso da mesma. O ganho do amplificador, aproximadamente 50 V/V, foi ajustado utilizando-se pesos padrões de 0,5 kg, 1 kg e 2 kg, de modo que a saída fosse de 0,5 V, 1 V e 2 V, respectivamente.

Após a amplificação, o sinal foi aplicado a um dos canais A/D da placa de aquisição da Lynx e processado diretamente no microcomputador. A Figura 3 mostra o diagrama em blocos do circuito de condicionamento do sinal da célula de carga.

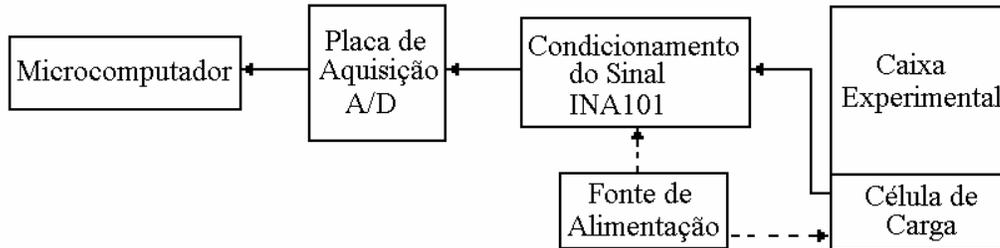


Figura 3. Diagrama em blocos dos circuitos de condicionamento e interfaceamento do sinal da célula de carga ao microcomputador utilizando uma placa de aquisição analógico-digital (A/D).

*Figure 3. Block diagram of the load cell signal conditioning and interface circuits to a microcomputer using an analogical to digital acquisition board (A/D).*

### **Circuitos de controle dos estímulos**

A Figura 4 mostra o diagrama em blocos dos circuitos desenvolvidos para controlar os estímulos a serem aplicados ao animal na gaiola de confinamento. Como já mencionado anteriormente, o sistema permite a geração de estímulos luminosos, sonoros e elétricos (choque), controlados pelo microcomputador e pelas chaves no painel do equipamento. Para gerar cada um dos estímulos, foram utilizados os seguintes componentes:

1) Luz: Foi utilizada uma lâmpada incandescente de 60 Watts, com intensidade controlada entre 0 e 60 Watts por um potenciômetro no painel do equipamento. O potenciômetro foi acoplado ao circuito integrado TCA780 de forma a controlar o ângulo de disparo (entre 0 e 90 graus nos semiciclos positivo e negativo do sinal da rede) do triac TIC226D. A duração/taxa de repetição do

estímulo é controlada por *software*. A calibração do ângulo de disparo do triac em relação à posição do potenciômetro no painel do equipamento foi feita utilizando-se um osciloscópio digital (Tektronix - TDS210). A tensão rms foi medida utilizando-se os recursos do osciloscópio e a corrente foi medida utilizando-se um multímetro digital (Minipa - ET2001). Foram marcados no painel do equipamento os pontos correspondentes a 0 Watts (lâmpada desligada), 15 Watts, 30 Watts, 45 Watts e 60 Watts (potência total da lâmpada).

2) Som: Foi montado um circuito oscilador em ponte de Wien para operar na saturação (ganho 4), gerando ondas quadradas com amplitude de aproximadamente 2,4 Volts de pico a pico e frequência controlada entre 400 Hz e 2 kHz, utilizando-se um potenciômetro duplo no painel do equipamento. O sinal de saída do oscilador foi acoplado a uma chave analógica (CD4066), que é utilizada para controlar a duração/taxa de repetição do estímulo via *software*. O estímulo é condicionado utilizando-se um *driver* que foi montado utilizando-se um amplificador operacional LM741 não inversor com um circuito multiplexador/demultiplexador (CD4051) de 8 canais para selecionar, via *software*, o resistor do elo de ganho do circuito. Assim, foi possível obter 7 ganhos discretos utilizando-se resistores fixos ( $G1 = 1,1 \text{ V/V}$ ;  $G2 = 2,2 \text{ V/V}$ ;  $G3 = 4,1 \text{ V/V}$ ;  $G4 = 5,4 \text{ V/V}$ ;  $G5 = 7,6 \text{ V/V}$ ;  $G6 = 10,5 \text{ V/V}$ ;  $G7 = 12,7 \text{ V/V}$ ) e um controlável ( $G8 = 2,4 \text{ V/V}$  a  $26,4 \text{ V/V}$ ), utilizando-se um potenciômetro no painel. Após a amplificação de tensão, o sinal passa por um amplificador de corrente, montado utilizando-se um operacional LM741 na configuração seguidor de tensão com um circuito *push-pull* dentro do elo de realimentação (dois transistores Darlington: TIP120 e TIP125). Os componentes do *driver* foram alimentados utilizando-se uma fonte de tensão simétrica de  $\pm 18 \text{ VDC}$ , o que permite o controle de potência na faixa aproximada de 0,2 Watts a 32 Watts (RMS). O alto-falante utilizado na câmara experimental é de 50 Watts e  $4 \Omega$  de resistência. A calibração da intensidade dos estímulos sonoros foi feita utilizando-se um decibelímetro digital

Radio Shack, faixa de medição de 50 dB a 126 dB, Precisão:  $\pm 2$  dB (114 dB / 1kHz), resolução: 0.1 dB, com capacidade para realizar medidas em dBA (500 Hz a 10 kHz) ou dBC (32 Hz a 10 kHz). O equipamento foi colocado dentro da câmara experimental e foram feitas medidas da intensidade variando-se a duração e a freqüência dos estímulos sonoros. Na figura 5 são apresentadas as curvas de calibração para a freqüência de 1 kHz e 2 kHz. Nota-se que a intensidade do som varia razoavelmente (89 dBA a 110 dBA) para estímulos de curta duração (0,1 s a 0,9 s) e depois fica aproximadamente constante (em torno de 110 dBA) para duração do estímulo a partir de 1 s. Na prática, como a intensidade varia ligeiramente com a freqüência e razoavelmente com a duração do estímulo, foram feitas calibrações aproximadas na freqüência de 1 kHz e duração do estímulo de 1 s (parâmetros mais utilizados para realizar os experimentos), com níveis variando entre 60 dBA e 120 dBA, em intervalos de 10 dBA, em função dos ganhos discretos do sistema de amplificação (G1 a G7). Para o ganho variável G8 é possível controlar continuamente a intensidade do som em uma faixa aproximada entre 70 dBA e 126 dBA. Antes dos experimentos, o decibelímetro é sempre utilizado para verificar a intensidade do som.

3) Choque Elétrico: Para gerar os estímulos elétricos foi utilizado um multivibrador (CD4538) operando na configuração monoestável. A saída não invertida do monoestável foi conectada a um *driver*, composto basicamente por um *buffer* (CD4050) que aciona a porta de um MOSFET (IRF630) na configuração dreno comum. Os circuitos geram pulsos com amplitude de 15 V e largura controlada entre 50 ms e 5 s através de um potenciômetro no painel do equipamento. O sinal elétrico é aplicado ao animal através de um eletrodo implantado na posição intrapúbica. A taxa de repetição do choque elétrico é controlada por *software*. A calibração da duração dos pulsos em relação à posição do potenciômetro no painel foi feita utilizando-se um osciloscópio digital (Tektronix - TDS210) e foram marcados os pontos correspondentes a 50 ms, 700 ms, 1,3 s, 2,3 s, 3 s, 4 s e 5 s de duração. A corrente instantânea máxima do sistema de estímulos elétricos fica em

torno de 188 mA, considerando-se uma resistência de contato de aproximadamente  $80\Omega$ . Como o sistema opera na forma pulsátil, a corrente média depende da taxa de repetição dos estímulos e geralmente fica abaixo de 1 mA durante os experimentos com os animais. Utilizando-se, por exemplo, pulsos com amplitude de 15 V, duração de 50 ms, taxa de repetição de 30 s e considerando a resistência de contato de  $80\Omega$ , a corrente média é de 0,3 mA.

O sistema permite a aplicação de estímulos (luz, som ou choque) de forma independente, simultânea ou combinada.

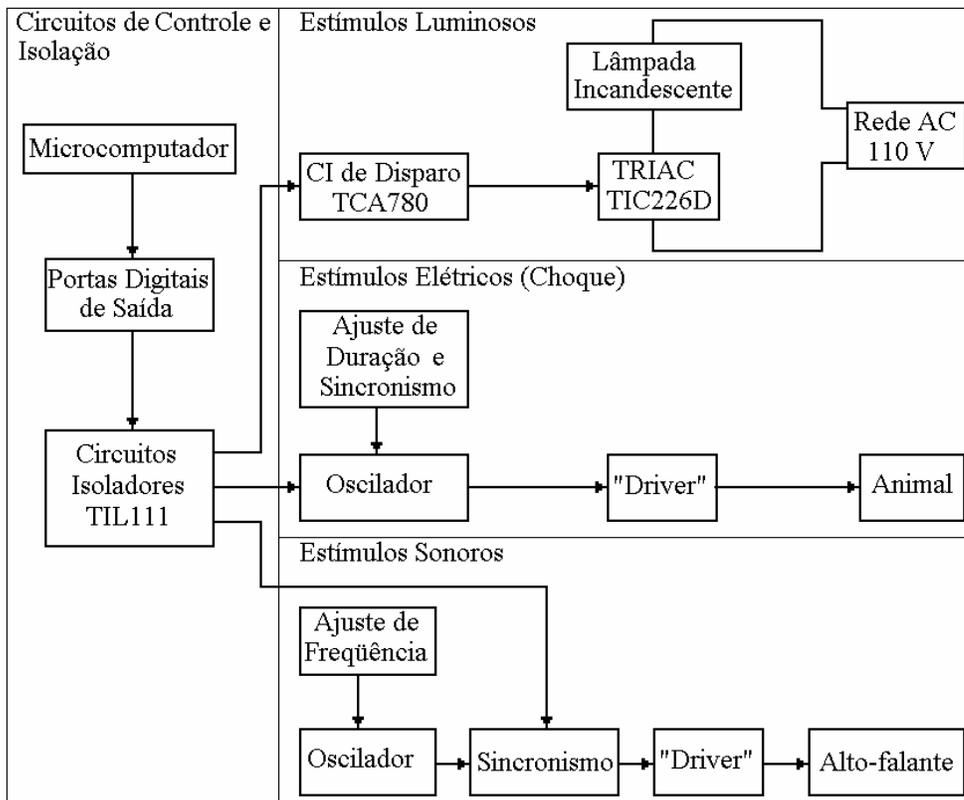


Figura 4. Diagrama em blocos dos circuitos de controle para gerar os estímulos luminosos, elétricos ou sonoros a serem aplicados ao animal confinado na caixa experimental. *Figure 4. Control circuits block diagram to generate light, sound or electric stimuli applied to the animal confined in the experimental chamber.*

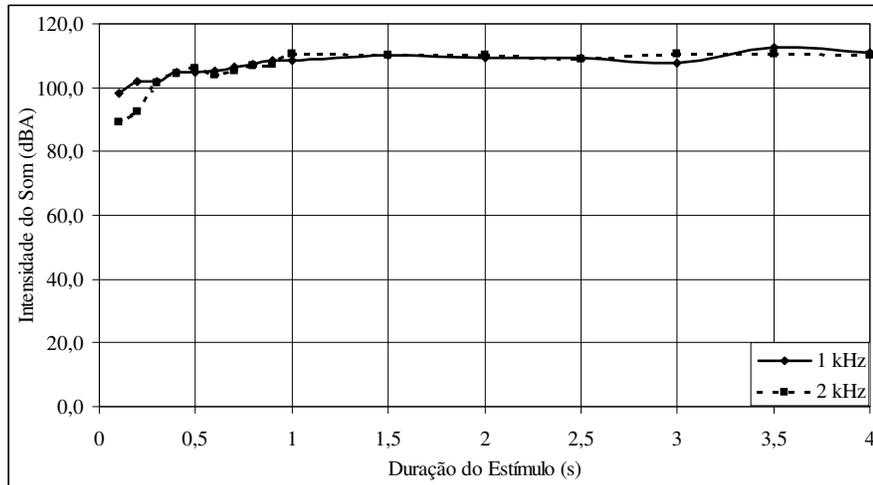


Figura 5. Intensidade do som em função da duração dos estímulos nas freqüências de 1 kHz e 2 kHz. A intensidade do som foi ajustada em 110 dBA para 1 s de duração do estímulo. *Figure 5. Sound intensity as a function of the stimulus duration at 1 kHz and 2 kHz. The intensity of the sound was adjusted in 110 dBA for 1 s of duration of the stimulus.*

### **Software para controle do sistema**

O *software* para controle do sistema foi desenvolvido utilizando-se a linguagem C para operar em plataformas com sistema operacional DOS ou Windows. Foram desenvolvidas rotinas de controle para implementar o protocolo experimental, registrar o peso do animal, armazenamento dos dados no disco para processamento posterior e rotinas gráficas de forma a permitir a visualização das oscilações gráficas indicativas da amplitude da resposta aos estímulos acústicos e para determinar a latência de resposta (medida pelo tempo decorrido entre o início do estímulo e o primeiro pico do registro). Os dados processados são armazenados em arquivos e podem ser analisados estatisticamente utilizando-se outros aplicativos computacionais como o EXCEL (Microsoft Corporation), MATLAB (The Mathworks, EUA), etc.

A Figura 6 mostra um exemplo da tela do programa que é utilizada para entrada do protocolo experimental, onde foram utilizados cinco estímulos com taxa de repetição e duração constantes iguais a 6 s e 1 s, respectivamente.

SISTEMA DE ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE POMBOS  
PARA SAIR TECLÉ ESC OU CTRL Z

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Taxa de Repetição - Constante (C) ou Variável (V): C  
Duração do Estimulo - Constante (C) ou Variável (V): C  
Número de Estímulos = 5

Entre com os Dados

Taxa de Repetição = 6.00 s  
Duração do Estimulo = 1.00 s

Num	Tempo	Duração	Num	Tempo	Duração	Num	Tempo	Duração
1	0.00	1.00	2	6.00	1.00	3	12.00	1.00
4	18.00	1.00	5	24.00	1.00			

Deseja Salvar o Protocolo em Arquivo? (S/N): \_

Figura 6. Tela do programa utilizada para criar um protocolo experimental. Pode-se configurar o número de estímulos a serem aplicados, a taxa de repetição, duração e outros parâmetros para realizar o experimento. *Figure 6. Program window used to create an experimental protocol. The number of stimuli, the repetition rate, duration and other parameters can be configured.*

A Figura 7 mostra um exemplo da tela gráfica que pode ser visualizada durante a realização dos experimentos, sendo apresentados os resultados durante 4 s (divididos em 1024 pontos na tela) após a aplicação de cada um dos estímulos. O número de telas de dados do programa é igual ao número de estímulos aplicados. Como este número pode ser elevado para fazer uma análise manual, o programa realiza o processamento de forma automática e armazena os dados em arquivos.

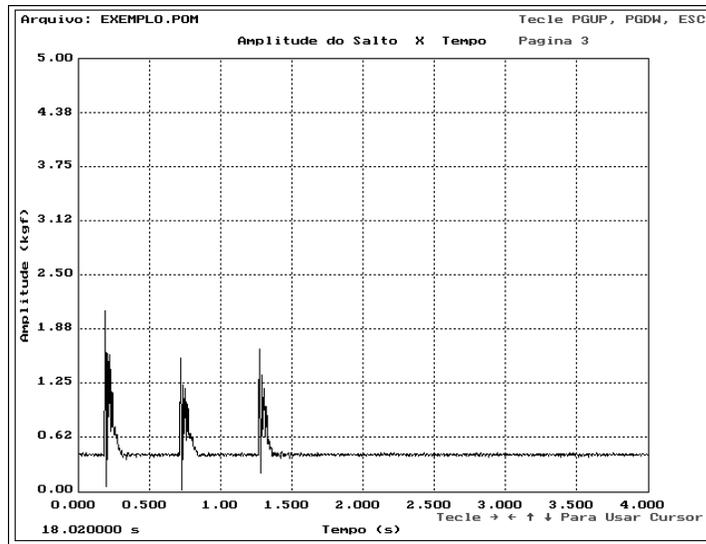


Figura 7. Tela gráfica mostrando a amplitude da resposta com relação ao tempo. São apresentados os dados obtidos durante 4 s após a aplicação do estímulo utilizando-se 1024 pontos. O número de telas depende do número de estímulos. O estímulo é iniciado em 0 s e dura 0,2 s. A amplitude do sobressalto e o período de latência são 2,18 kgf e 0,22 s, respectivamente. *Figure 7. Graphic window showing the startle amplitude response as a function of the time. The data obtained during 4 s after the stimulus are shown using 1024 points. The number of windows depends on the number of stimulus. The stimulus started at 0 s and its duration is 0.2 s. The amplitude of the startle and the latency period are 2.18 kgf and 0.22 s, respectively.*

Os dados adquiridos durante os experimentos são armazenados em um arquivo texto separado em três colunas: a primeira indica o número do ponto, a segunda a amplitude do sinal (medido em kgf) e a terceira o tempo correspondente ao ponto amostrado. O número de linhas do arquivo texto dos dados experimentais é igual ao número de estímulos multiplicado por 1024. A análise automática dos dados amostrados para determinar a amplitude da resposta, peso do animal e o período de latência é feita utilizando-se um aplicativo desenvolvido em C++ Builder que faz a análise dos dados e gera um novo arquivo texto separado em 15 colunas: a primeira representa o instante de aplicação do estímulo ( $t_{\text{inicio}}$ ), a segunda representa o pico da amplitude

do sobressalto no intervalo entre 0 s e 1 s (Amp0\_1) e a terceira coluna representa o tempo onde ocorreu o sobressalto no intervalo entre 0 s e 1 s (t0\_1). As outras colunas representam as análises feitas para os intervalos de tempo entre 0 s e 2s (Amp0\_2 e t0\_2), 0 s e 3s (Amp0\_3 e t0\_3), 0 s e 4 s (Amp0\_4 e t0\_4), 1 s e 2 s (Amp1\_2 e t1\_2), 2 s e 3 s (Amp2\_3 e t2\_3), 3 s e 4 s (Amp3\_4 e t3\_4). O número de linhas do arquivo de análise depende do número de estímulos durante o experimento.

A Figura 8 mostra um exemplo da tela que é utilizada para realizar um processamento posterior nos dados obtidos durante o experimento. O peso do animal é determinado automaticamente e podem ser medidos os períodos de latência e amplitude do sobressalto, a partir dos dados referentes aos 1024 pontos adquiridos durante 4 segundos para cada um dos estímulos, o que corresponde a uma taxa de amostragem de 256 amostras por segundo.

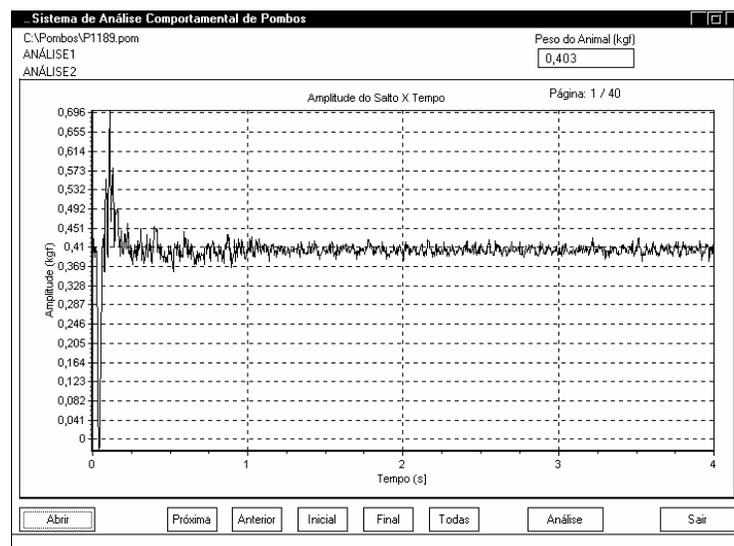


Figura 8. Exemplo de tela do programa para análise posterior dos dados onde se pode determinar o peso do animal, a amplitude da resposta e os períodos de latência após a aplicação dos estímulos. *Figure 8. Program window example for posterior analysis of the data where it is possible to determine the weight of the animal, the startle amplitude response and latency after the stimuli.*

## **Análise Comportamental**

Para a análise do desempenho e padronização do equipamento foram realizados dois testes comportamentais que serão descritos como Experimento 1 e Experimento 2, respectivamente.

### **Experimento 1: Análise do sobressalto acústico em pombos**

Teve como objetivo avaliar o desempenho e eficácia do equipamento para a análise automatizada do comportamento de pombos em situação de estimulação sonora.

Animais: Foram utilizados 24 pombos, machos, adultos, derivação não controlada da espécie *Columba lívia*, adquiridos de um mesmo fornecedor. Os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h, com a luz acendendo às 6:00 h. Esses animais foram distribuídos em dois diferentes grupos: Grupo Experimental (GE, n = 12), com exposições a estímulos sonoros e Grupo Controle (GC, n = 12), com exposição apenas à caixa experimental.

### **Procedimento Experimental**

Adaptação às condições de biotério: Antes de serem instalados no biotério, os pombos receberam banho e aplicação de inseticida (SBP) para eliminar possíveis parasitas. No biotério os animais receberam cuidados profiláticos, incluindo a administração de vermífugo.

Habituação à caixa experimental: Após um período mínimo de 15 dias de adaptação às condições do biotério, os animais passaram por um processo de habituação à caixa experimental por quatro dias consecutivos, durante 50 minutos no período da manhã, entre 9:00 h e 13:00 h.

Exposição aos estímulos sonoros: Na sessão experimental, após 10 minutos de habituação à caixa experimental, os animais GE receberam 20 pulsos sonoros (1000 Hz, 100 dBA, 1 s). Os animais

GC permaneceram 30 minutos na caixa experimental sem que nenhum estímulo sonoro fosse aplicado. O estímulo acústico foi apresentado a cada 30 s para os animais GE, e a latência de resposta foi medida pelo tempo decorrido entre o seu início e o pico do registro. Para os animais controles que não receberam estímulos, mediu-se o tempo, numa janela de 4 s, desde o início de cada intervalo de 30 s e o primeiro pico de registro.

### **Análise estatística**

Foi utilizado ANOVA de uma via para análise das diferenças entre grupos de magnitude dos comportamentos. A ANOVA de duas vias foi usada para as análises dos efeitos de grupo e de blocos de estímulos

### **Experimento 2: Análise do sobressalto acústico em ratos.**

Nesse experimento foram avaliados os registros da amplitude e a latência do sobressalto acústico em ratos comparativamente ao descrito na literatura.

Animais: Para a análise do sobressalto acústico foram usados 10 ratos Wistar machos, adultos pesando em torno de 320 g. Os ratos foram alojados em gaiolas conjuntas, com um número de 5 animais por gaiola, sob ciclo claro-escuro 12:12 h, com as luzes acendendo às 6:00 h. Ração e água foram fornecidas em regime *ad libitum*.

### **Procedimento Experimental**

Adaptação às condições de biotério: Os ratos permaneceram em condições de biotério por um período mínimo de 15 dias.

Habituação à caixa experimental: foi utilizado o mesmo procedimento para os pombos.

Habituação aos estímulos sonoros: foi utilizado o mesmo procedimento para os pombos.

### **Análise estatística**

Foi utilizado ANOVA de uma via para análise das diferenças entre grupos de magnitude dos comportamentos. A ANOVA de duas vias foi usada para as análises dos efeitos de grupo e de blocos de estímulos.

## **Resultados**

### **Experimento 1**

Na Figura 9(a) são apresentadas as curvas da magnitude da resposta acústica em pombos. A amplitude da resposta foi calculada subtraindo-se o peso do animal da amplitude do registro automatizado. Pode-se observar as maiores amplitudes de registro (0,13 kgf) no início da sessão, seguidas por um decréscimo abrupto até valores que permanecem regulares até o final. Os pombos controles apresentaram uma amplitude média de 0,05 kgf no primeiro estímulo, com diminuição gradual e manutenção de valor médio de 0,02 kgf durante o restante da sessão. A ANOVA indicou um efeito de grupo ( $F_{1,21} = 19,18$ ;  $p < 0,001$ ), de estímulos ( $F_{1,14} = 6,54$ ;  $p < 0,001$ ) e uma interação significativa ( $F_{1,14} = 3,01$ ;  $p < 0,001$ ) entre grupo e estímulos. Na Figura 9(b) são apresentadas as curvas de latência da resposta ao estímulo acústico para o GE e para o GC. A latência foi medida entre o instante de aplicação do estímulo e o primeiro pico de registro a cada intervalo de 30 s. A latência média para os animais GE oscila entre 0,20 s e 0,45 s, com alguns registros inferiores a 0,2 s. Os animais GC apresentaram latências médias entre 0,33 s e 0,61 s. O teste com ANOVA indicou um efeito significativo de grupo para os dados de latência ( $F_{1,22} = 15,50$ ;  $p < 0,001$ ).

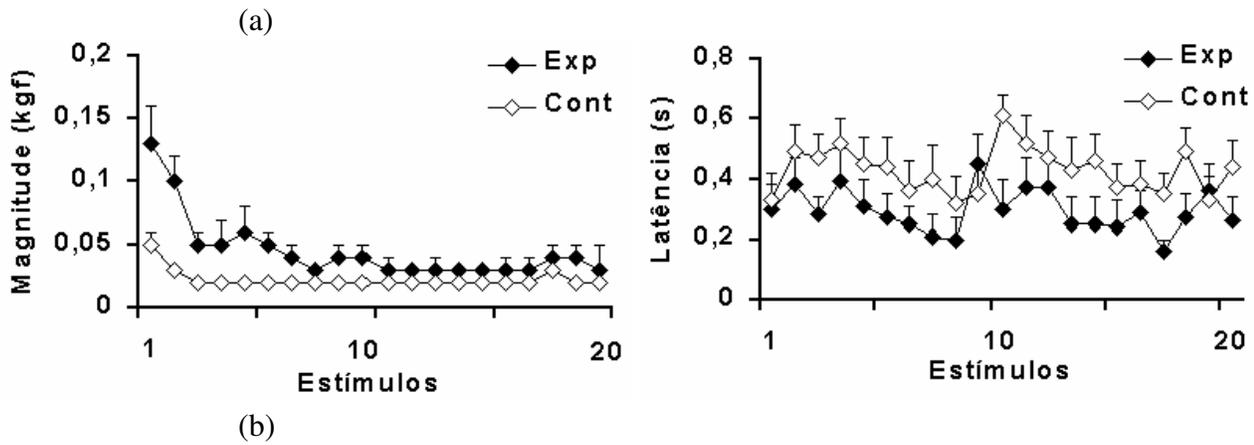


Figura 9. Resposta do sobressalto acústico (kgf) e latência (s) em pombos para o grupo experimental (Exp) e de controle (Cont). a) Magnitude da resposta. b) Latência da resposta. Barras verticais indicam o erro padrão da média. *Figure 9. Startle response to acoustic stimulus (kgf) and latency (s) in pigeons for the experimental (Exp) and control (Cont) groups. a) Magnitude of the response. b) Latency of the response. Vertical bars show the standard deviation of the mean.*

## Experimento 2

Os resultados dos testes de sobressalto acústico em ratos indicaram uma curta latência (200 ms) e uma elevada magnitude em comparação aos pombos, com a magnitude do sobressalto oscilando entre um valor máximo de 0,78 kgf e mínimo de 0,25 kgf. O Grupo Controle não apresentou variação da magnitude da resposta ao longo da sessão, conforme mostrado na Figura 10(a). As análises com ANOVA indicaram um efeito significativo de grupo ( $F_{1,8} = 24,40$ ;  $p < 0,05$ ). A latência média dos ratos do grupo experimental oscilou entre 0,03 s e 0,32 s ao longo da sessão experimental. Os ratos do grupo controle mostraram uma variação média entre 0,18 s e 0,71 s, Figura 10(b). A ANOVA indicou um efeito significativo entre grupo ( $F_{1,8} = 1256,58$ ;  $p < 0,0001$ ).

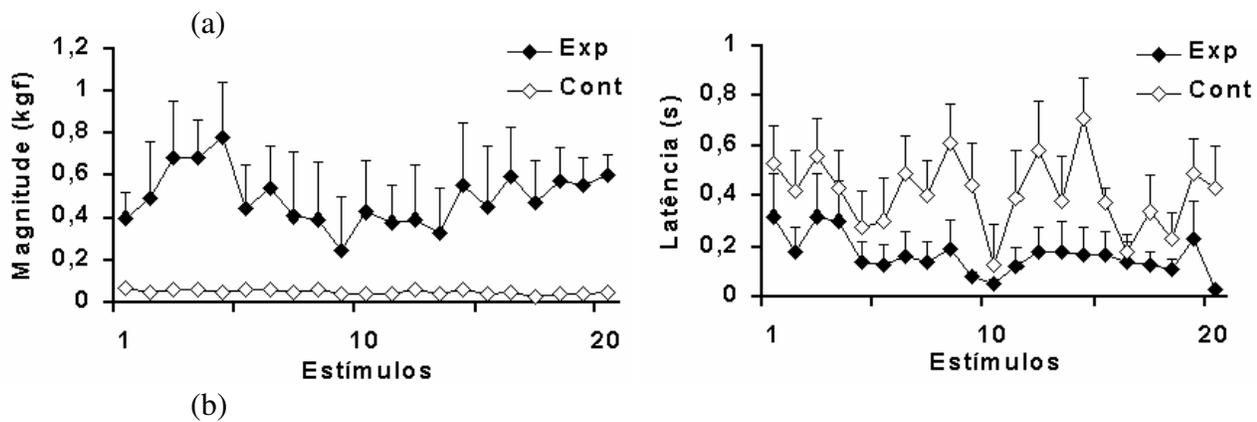


Figura 10. Resposta do sobressalto acústico (kgf) e latência (s) em ratos para o grupo experimental (Exp) e de controle (Cont). a) Magnitude da resposta. b) Latência da resposta. Barras verticais indicam o erro padrão da média. *Figure 10. Startle response to sound stimulus (kgf) and latency (s) in rats for the experimental (Exp) and control (Cont) groups. a) Magnitude of the response. b) Latency of the response. Vertical bars show the standard deviation of the mean.*

## Discussão e conclusões

O presente estudo descreve um conjunto de resultados que indica dois pontos de interesse. Primeiro, o equipamento desenvolvido se mostrou eficiente no registro automático da amplitude e da latência da resposta a estímulos acústicos em pombos e ratos. Desse modo, o sistema de análise automático do comportamento de pombos poderá contribuir para a investigação da plasticidade comportamental e neural das respostas desses animais a estímulos sonoros. Demonstra assim que o objetivo do trabalho foi alcançado. Em segundo lugar, os dados apontam para diferenças comportamentais entre ratos e pombos nas características do sobressalto acústico.

Durante as etapas de calibração do equipamento foram realizados alguns testes com os animais utilizando-se tanto estímulos luminosos quanto elétricos. Os animais adaptam-se rapidamente ao estímulo luminoso, deixando de responder ao mesmo. Quanto ao estímulo

elétrico, os testes iniciais mostraram que os animais apresentam resposta muito mais intensa, mesmo sob baixas correntes médias (estímulos elétricos de 15 Volts de amplitude, 50 ms de duração, taxa de repetição de 30 s e corrente média aproximada de 0,3 mA) e para intensidades maiores (estímulos elétricos de 15 Volts de amplitude, 5 s de duração, taxa de repetição de 30 s e corrente média aproximada de 31,3 mA) o animal entra em *freezing* e não apresenta variações no registro. Todos os experimentos são gravados para que se possa identificar os instantes onde ocorreram registros relativos a comportamentos pré-exploratórios, exploratórios ou reconhecimento do ambiente.

Os resultados relativos aos registros das amplitudes das respostas ao som, tanto dos pombos quanto dos ratos, indicam que o equipamento é sensível à variação comportamental. Essa sensibilidade é demonstrada pela modificação dos valores das magnitudes das respostas ao som, dos animais experimentais ao longo da sessão. Tanto os pombos quanto os ratos controles não apresentaram variação da magnitude da resposta. Isso indica que os animais estavam habituados à caixa experimental e que as variações registradas pelo equipamento foram produzidas somente pelo som. Por outro lado, a análise da latência da resposta dos pombos indicou que no início da sessão houve variações entre 0,2 s e 0,42 s na latência da resposta, evidenciando a ocorrência de respostas reflexas, normalmente referidas como sobressalto acústico.

Os testes realizados tiveram resultados que replicam aqueles já obtidos com ratos em outras situações e com outros equipamentos de registro (Lima and Davis, 1995; Plappert *et al.*, 1999). No presente estudo, o sobressalto acústico em ratos ocorreu com uma latência próxima a 200 ms, demonstrando que o equipamento é capaz de registrar variações da magnitude da resposta ao som com latências curtas, que são características de respostas reflexas. Ao mesmo tempo, a amplitude da resposta se manteve com valores significativamente superiores aos dos controles

corroborando também os dados da literatura que descrevem a resposta de ratos a estímulos acústicos como sobressalto aos estímulos sonoros (Davis, 1982; Lima and Davis, 1995; Plappert *et al.*, 1999; Koch, 1999; Feifel and Reza, 1999; Sandbak *et al.*, 2000). Assim, as análises da magnitude do sobressalto acústico em ratos foram importantes para a verificação de que os registros do equipamento seguem os padrões já descritos na avaliação do sobressalto acústico em ratos após lesões no sistema nervoso central (Leitner *et al.*, 1980), após associações som-choque (Plappert *et al.*, 1999), no estudo da diferença da amplitude do sobressalto entre machos e fêmeas (Lehmann *et al.*, 1999) e na avaliação de efeitos de drogas (Lima and Davis, 1995). Os dados mostram que foi possível detectar e registrar com precisão tanto a variação na amplitude da resposta quanto à sua latência, como também a movimentação livre dos animais, independentemente da apresentação do som, como no caso dos animais controles. Tais fatos fundamentam a consideração de que o equipamento mostrou-se adequado para a detecção e registro das medidas comportamentais.

É interessante notar que os registros das respostas de ratos mostram maiores magnitudes e menores latências, quando comparados com as respostas dos pombos. De fato, a resposta eliciada pela apresentação de pulsos sonoros intensos também é diferente em ratos e pombos. O sobressalto acústico no rato é uma resposta eliciada por uma brusca contração muscular das costas, tórax e membros que resulta em salto e deslocamento vertical sobre a plataforma (Davis *et al.*, 1982). Em pombos, observa-se que o sobressalto é uma contração brusca e generalizada da musculatura do tronco, simultânea à extensão e inclinação do corpo no sentido ântero-posterior, sem haver necessariamente um deslocamento vertical (Ferrari *et al.*, 1999).

Por outro lado, também foi possível a caracterização de um processo de habituação aos estímulos sonoros para os pombos (Valentinuzzi and Ferrari, 1997), embora as variações da

magnitude da resposta dos ratos ao longo da sessão tenham indicado ausência de habituação. Tais diferenças poderiam estar relacionadas a uma sensibilidade diferente das duas espécies animais aos parâmetros do estímulo, de modo que os valores utilizados sejam funcionalmente diferentes para as duas espécies de animais. Desse modo, o equipamento se mostrou adequado para a detecção e o registro de variações da resposta ao longo da sessão evidenciando aspectos comparativos interessantes entre as espécies estudadas.

Finalmente, os circuitos neurais envolvidos no processamento auditivo de aves são comparáveis aos dos mamíferos (Abs, 1983). Conforme descrito por Li *et al.* (1999), o sobressalto ao som em ratos é mediado por um circuito neural, que envolve o núcleo coclear, neurônios motores, o núcleo ventrolateral, o núcleo reticular, e o núcleo reticular pontino caudal (PnC). É interessante observar que esse processamento ocorre num tempo tão curto quanto o sugerido pelos nossos testes e pela literatura. Em aves, os circuitos neurais envolvidos no processamento auditivo têm o neostriato como um alvo final aferente (Necker, 1983). A projeção coclear do núcleo da medula oblonga fornece o primeiro nível do processo auditivo, sendo que o sistema completo inclui os núcleos mesencefálicos MLd (núcleos mesencefálicos laterais dorsais), considerados homólogos ao colículo inferior, e os núcleos talâmicos *Ov (nuclei ovoidalis)*, homólogos ao núcleo geniculado medial, o qual possui projeções que atingem a área auditiva primária, campo L, no telencéfalo (Boord, 1969; Karten, 1967; Fortune & Margoliasch, 1992). Levando em consideração que o pombo é um animal bípede e voa, os circuitos neurais, relacionados à sua postura e locomoção refletiriam as adaptações ocorridas durante a evolução ao ambiente. Isso poderia estar relacionado ao fato de que o pombo responde de forma diferente e com uma latência maior do que o rato, como observado em nosso experimento. A investigação sistemática dessas diferenças poderá contribuir para análises comparativas de processos comportamentais e neurais nas duas espécies.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro de Engenharia Biomédica (CEB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por fornecer parte dos materiais e infra-estrutura necessária para a construção do protótipo e à FAPESP (Processo número 00/09095-4) pelo suporte financeiro.

## Referências

- Abs, M. (1983), *Physiology and behaviour of the pigeon*. New York: Academic Press, 1983.
- Boord, R.L. (1969), "The anatomy of the avian auditory system." *Ann. N. y. Acad. Sci.* v. 167, p. 186-198.
- Davis, M., Gendelman, D.S., Tischler, M.D., and Gendelman, P.M. (1982), "A primary acoustic startle circuit: lesions and stimulations studies." *J. Neurosc.*, v.2, p. 791-805.
- Feifel D., and Reza T.L. (1999), "Effects of neurotensin administered into the ventral tegmental area on prepulse inhibition of startle." *Behav. Brain Res.* v. 106, p. 189-193.
- Fendt M., Koch M., and Schnitzler H.U. (1996), "Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm." *Behav. Brain Res.* v. 74, p. 127-134.
- Ferrari, E.A.M., Faleiros, L., Cerutti, S.M., and Oliveira, A.M. (1999), "The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons." *Behav. Brain Res.* v. 101, p. 93-103.
- Fleshler, M. (1965), "Adequate acoustic stimulus for startle reaction n the rat." *J. Comp. Physiol. Psychol.* v. 60, p. 200-207.
- Fortune, E. and Margoliasch, D. (1992), "Citoarchitetonc organization and morfology of cells of the field L complex in male zebra finches (*Taenopygia grittata*)." *J. Comp. Neurol.* v. 325, p. 388-404.

- Fox, J.E. (1979), "Habituation and prestimulus inhibition of the auditory startle reflex in decerebrate rats." *Physiol. Behav.* v.23, p. 291-297.
- Groves, P.M., and Thompson, R.F. (1970), "Habituation: a dual process theory." *Psychol. Review* v. 77, p. 419-450.
- Karten, H.J. (1967), "The organization of the ascending auditory pathway in the pigeon (*Columba livia*). I. Diencephalic projections of the inferior colliculus (nucleus mesencephalic lateralis, pars dorsalis)." *Brain Res.* v. 11, p. 143-153.
- Koch M. (1999), "The neurobiology of startle." *Progress in Neurobiology*, v. 59, p. 107-128.
- Koch, M., Kling, C., and Becker, C.M. (1996), "Increased startle responses in mice carrying mutations of glycine receptor subunit genes." *Neuroreport* v.7, p. 806-808.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., and Feldon, J. (1999), "Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats." *Behav. Brain Res.* v. 104, n. 1-2, p. 113-117.
- Leitner, D.S., Powers, A.S., Stitt, C.L., and Hoffman, H.S. (1980), "Midbrain reticular formation involvement in the inhibition of acoustic startle." *Physiol. Behav.* v. 26, p. 259-268.
- Li, L., Fulton, J. D., and Yeomans, J. S. (1999), "Effects of bilateral electrical stimulation of the ventral pallidum on acoustic startle." *Brain Res.* v. 836, p. 164-172.
- Lima, T.C.M., and Davis, M. (1995), "Involvement of cyclic AMP at the level of the nucleus reticularis pontis caudalis in the acoustic startle response." *Brain Res.* v.700, p. 59-69.
- Miyazato H, Skinner RD, and Garcia-Rill E. (1999), "Sensory gating of the P13 midlatency evoked potential and the startle response in the rats." *Brain Res.* v. 822, p. 60-71.

- Necker, R. Hearing. In M. ABS (Ed). (1983), *Physiology and Behavior of the Pigeon*, New York: Academic Press. p.193-219.
- Pilz, P.K.D., and Schnitzler, H.U. (1996), "Habituation and Sensitization of the Acoustic Startle Response in Rats: Amplitude, Threshold, and Latency Measures." *Neurobiol. learning and memory*, v.66, p. 67-79.
- Plapert, C.F., Pilz, P.K.D., Becker, K., Becker, C.M., and Schnitzler, H.U. (2001), "Increased sensitization of acoustical startle response in spasmodic mice with mutation of the glycine receptor alpha 1-subunit gene." *Behav. Brain Res.* v.121 p. 57-67.
- Plapert, C.F., Pilz, P.K.D., and Shnitzler, H.U. (1999), "Interaction between acoustic and electric sensitization of the acoustic startle response in rats." *Behav. Brain Res.* 103 (2): 195-201.
- Reis, F., Schenka, A.A., Melo, L.L., and Ferrari, E.A.M. (1991), "Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*)". *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.32, p, 1127-1131.
- Sandbak, T., Rimol, L. M., Jellestad, L.K., and Murison, R. (2000), "Relating acoustic startle reactivity and plasticity to alcohol consumption in male wistar rats." *Physiol. Behav.* v.68, p. 723-733.
- Savage, L.M., Sweetm A.J., Castillo, R., and Langlais, P.J. (1997), "The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rats." *Behav. Brain Res.* v.82, p. 133-147.
- Sousa, C.M.Z. (1999), *Organização Temporal de Processos de Aprendizagem: Variação de Concentrações de Melatonina e Corticosterona, Atividade Geral e Habituação a Som, em Pombos sob condições de Claro-Escuro e Luz Constante*. Tese de Doutorado, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Unicamp. p. 216.

Storozeva Z.I., and Pletnicov M.V. (1994), "Habituation of acoustic startle in rats- a functional ablation study." *Neuroreport*. v.5, 16, p. 2065 – 2068.

Szabo, I, and Hazafi, K. (1965), "Elicitability of the acoustic startle reaction after brainstem lesions." *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* v.27, p. 155-165.

Valentinuzzi, V.S., and Ferrari, E.A.M. (1997), "Habituation to sound during morning and night session in pigeons (*Columba livia*)." *Physiol. Behav.* v.62, n.6, p. 1203-1209.

**TIME-OF-DAY VARIATION IN THE SENSITIZATION OF THE ACOUSTIC RESPONSE IN  
PIGEONS.**

**Siqueira, L.O; Vieira, A. S.; Ferrari, E. A. M.**

Correspondence: Elenice A. de Moraes Ferrari, Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento, Departamento de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. e-mail:[elenice@obelix.unicamp.br](mailto:elenice@obelix.unicamp.br)

## Abstract

The present study was designed to investigate whether the sensitization to acoustic stimulus in pigeons oscillates as a function of the time of day. Both the training and testing were conducted in a single session and the procedure was repeated every 4h with different experimental and control groups of pigeons. A skeleton photoperiod (consisting of two 15-min light pulses to indicate the beginning and the end of the day) was used to offer an illumination schedule which prevents the masking effects of the normal light-dark cycle. The experimental procedure consisted of a baseline exposure to five tone pulses, a sensitization training with two electric shocks (5 min interval) starting 5 min later and a testing using a series of 40 tone pulses (repeated every 30 s), starting 10 min later. The control birds were simply exposed to the chamber. The magnitude of responding to sound was measured by an accelerometer located under the floor of the experimental chamber. Sensitization was analyzed as a comparison of the amplitude of the response after treatment to the baseline level. The amplitude of response of the experimental birds was found to vary as function of the time of day, with significantly greater amplitude of response observed during the subjective night ( $p < 0.05$ ). Control animal data showed no daily variation, however, suggesting that the rhythm in sensitization was due to the circadian modulation of a learning process.

Keywords: sensitization, circadian rhythms, acoustic response, pigeon.

## Introduction

The investigation of circadian modulation of learning and memory has incited interests in recent years and various results have been obtained with different animal species. The circadian

clock regulates many behavioral and physiological processes (Rusak, 1981; Turek, 1985) and certain oscillatory mechanisms suggesting a rhythm in learning and memory have been reported (Raghavan et al., 1999; Kole, et al., 2001; Tapp & Holloway, 1981). However, the effects of circadian modulation of learning and memory are not yet fully understood. Influences of the time of day have been discussed in various studies on human memory (Koulack 1997; Maury & Queinnec 1992; Nesca & Koulack 1994; Testu & Clarisse, 1999) as well as on contextual fear conditioning in mice and pigeons (Chaudhury & Colwell, 2002; Valentinuzzi et al., 2001; Ferrari et al., unpublished data). These data indicate that the mechanisms of learning are related with the context, which includes the circadian time when the training occurred (Ralph et al., 2001). Moreover, Fernandez et al. (2003) reported that it is the time of training rather than that of testing which determines the circadian rhythm of long-term sensitization.

These cross-species results, taken as a whole, suggest that the circadian clock may play a role in the learning capacity and memory. But important questions related to the type of learning and memory modulated by the circadian system and the importance of the phase in which this modulation occurs (diurnal or nocturnal) still remains to be investigated (Fernandez et al., 2003). Moreover, studies with birds, just like mammals, can contribute as interesting models for the comparative analysis of the temporal organization of learning and memory. Pigeons, for example, have proven to be useful for studies of learning and memory whether the level is behavioral, cellular, or molecular (Amaral-Toma & Ferrari, 2004; Lissek & Gunturkun, 2003; Watanabe, 2003). As well, previous studies have indicated that the learning of the habituation of exploratory behavior to acoustic stimuli in pigeons is impaired during the nocturnal tests (Valentinuzzi and Ferrari, 1997; Souza et al., 2001).

The present study was designed to investigate in pigeons whether the sensitization to acoustic stimuli oscillates as function of the time of day. Such sensitization, a non-associative form of learning (Groves and Thompson, 1970; Plappert, *et. al.*, 1999; Richardson, 2000), was analyzed as the increase in the response to acoustic stimuli observed after electric shock stimulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Subjects were adult male *C. livia* pigeons (N=96), weighing 350-400 g, purchased from a commercial supplier. They were housed in individual home cages inside a room (2 m X 2.5m x 2.40 m) with controlled temperature (25°C) under a 12:12h light cycle (lights on at 6:00 a.m. and off at 6 p.m.) for at least 15 days before any experimental manipulation. Food and water were available *ad libitum* in the home cages throughout the experiment. The animals were randomly assigned to six experimental groups (n=8) and six control groups (n=8). Behavioral evaluations were conducted every 4 h throughout the day. The experimental protocol was approved by the Ethic Committee for the Experimentation with Animals (Institute of Biology, UNICAMP, Brazil) and was conducted according to international ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmerman, 1983).

**Apparatus:** The experimental chamber was a transparent plexiglas box (30X30X50), housed within a ventilated, sound-attenuating wooden chamber, located inside a sound-attenuated room. Acoustic stimulation was provided through a loudspeaker located inside the chamber, on the right wall (height of 25 cm). The experimental chamber was connected to a computer with software for the control of stimulus presentation as well as the recording and graphic analysis of the amplitude of the

response. The magnitude of the response to each of the acoustic stimuli was measured by an accelerometer mounted below the floor, which detected and transduced the motion within the chamber into kgf/time unit (ms). The magnitude of the response (M) was thus automatically generated within a temporal window of 4s and was reported as the difference between the maximum amplitude recorded for each trial (A) and the weight of the pigeon (W).

## **Procedure**

### **Habituation to experimental chamber**

After the 15 days of adaptation to the housing conditions, the pigeons were subjected to daily handling and transportation inside a black double-cotton bag to the experimental chamber where they were left for 50 min to become habituated to it. This procedure was repeated for the four days immediately preceding the test.

### ***Skeleton Photoperiod (SPP)***

A skeleton photoperiod (SPP) was used since this controls possible masking effects of the normal light-dark cycle (Aschoff, 1987; Pittendrigh, 1965). The introduction to SPP was gradual. Three days before the beginning of behavioral analysis, the 12 h dark phase was replaced by illumination with dim red light (2 lux); this modification was repeated for two days. In the third day a skeleton photoperiod was installed, with two 15-min pulses of bright white light (80 watts) separated from each other by 11:45 h of dim red light. The matutine bright white light pulse occurred at 6 a.m., circadian time conventionally referred to as zeitgeber time zero (ZT00). The time of tests thus corresponded to ZT02; ZT06; ZT10; ZT14; ZT18; ZT22. All experiments were performed under dim red light.

### ***Sensitization of acoustic response***

A single 47 min experimental session was carried out for each pigeon. After an initial 5 min for habituation to the chamber, responses to five pre-training acoustic stimuli (1000-Hz, 109-dB, 1s), administered with 30 sec between stimuli interval, were measured. This furnished baseline data for comparison with the test. Training then consisted of the presentation of 2 electric shocks (10 mA, 1s), administered at 5 min intervals, starting 5 min after the pre-training. Ten minutes following the second shock, the animals were re-exposed to acoustic stimuli (40 stimuli) at 30 sec intervals to determine the effect of the sensitization training. The control animals rested in the experimental chamber for 45 min without any stimulation and response magnitude measurement was taken every 30 seconds.

**Statistical Analyses:** The data relative to the amplitude of response were analyzed using an ANOVA with group (experimental and control), time (time of tests) and phase of the day (subjective day and subjective night) as factors. Multiple *post hoc* comparisons were carried out using a Tukey-Kramer test.

The differences between the amplitude of response for each experimental animal and the mean value for the respective control group (difference score) were calculated. Such an analysis provides a separation of the learned reactivity to the tone from the control activity level in the experimental chamber (Valentinuzzi *et al*, 2001). The analysis of the difference scores as a function of the phase of day was made using the non-parametric Mann-Whitney test.

## **RESULTS**

The variation of the magnitude of response to the acoustic stimuli as function of different time of day is presented in Figure 1. Each point indicates the difference between test measurement and baseline value (Test minus BL); only the first five stimuli during the test were considered. Amplitude of response of experimental birds varied according to the time of the day, with higher values being observed during the subjective night. An ANOVA indicated a main effect for group ( $F_{1,89}=4.02$ ;  $p<0.05$ ) and phase ( $F_{1,1}=5.11$ ;  $p<0.05$ ), as well as a significant interaction ( $F_{1,1}=5.33$ ;  $p<0.05$ ), which may be related to the observation of greater differences at night.

---

**Insert Figure 1**

---

Figure 2 compares the differences in the response to the acoustic stimuli due to phase (the subjective day: ZT02, ZT06, ZT10 and the subjective night: ZT14, ZT18, ZT22). The data is reported as percent difference scores (the difference between the amplitude of response of each experimental animal and the mean amplitude of the respective control group) relative to baseline. The difference between the sensitization for the subjective day and subjective night data was statistically significant ( $U=632$ ;  $p<0,001$ ).

---

**Insert Figure 2**

---

## **Discussion**

The present study revealed a time of day effect on the sensitization of acoustic stimuli responsiveness in pigeons. The magnitude of acoustic response after training relative to its baseline value was used to measure the memory for sensitization training. Such an analysis revealed increases in magnitude of response after exposure to electric shock which were greater for animals tested during the subjective night. This corroborates the results of previous research indicating the modulation of learning and memory processes by the circadian timing system. The significant differences between the experimental as well as the lack of rhythm effect in the control animals suggest that the effect of daily rhythm in sensitization was due to a modulation of the learning process by the circadian timing system. The present data are related to studies in mammals that have indicated circadian modulation of acoustic responding (Chabot and Taylor, 1992 a, 1992b; Frankland and Ralph, 1995; Horlington, 1970).

The significance of a sensitization of the acoustic stimuli, which occurs predominantly for the subjective night, may be related to some species-specific characteristics. Pigeons are diurnal animals well known for their high visual capacity. In the dark, however, the visual system is unable to function fully, due to the low level of illumination. Under such unfavorable light conditions, the auditory functions may be critical for the perception of information important for safety and survival. So, the exposure to dangerous stimuli, such as the shock, may affect differentially the processing of information during the night.

The circadian oscillation observed for the sensitization of the response to acoustic stimuli may be related to a rhythm in both learning and recall since both training and test were conducted during a single session. However, the results of the present study differ from those of the research indicating that short-term learning is normally modulated neither by the circadian clock nor subject to interruption by changes in the circadian clock. Fernandez et al. (2003), for example, reported a modulation of long-term sensitization, but no circadian clock effect for short-term sensitization in

*Aplysia*. Reijmers et al. (2001) found no disruption in short-term memory by phase shifts in mammals. The results obtained here thus suggest the importance of further research involving the circadian mechanisms of long-term and short-term learning and memory.

The potentiation of the response to the sound after exposure to electric shocks itself requires a better understanding of the subjacent behavioral and neural processes, mainly when the aspects of its circadian modulation are considered. Several rhythmic processes may have to be entrained and interactive to bring about the integration of the various signals of the biological clock, which modulate learning and memory processes. As pointed by Frankland and Ralph (1995), the circadian biology faces the challenge of unravelling the forms of communication between the circadian pacemaker and the organism. Interesting clues about these learning processes and its temporal modulation may come from studies of the circadian organization of learning and memory focusing on the role of the context as well as the time interval between training and sensitization test.

### **Acknowledgments**

This research was supported by grants from FAPESP, CNPq and FAEP/UNICAMP. L.O. Siqueira was the recipient of a fellowship from FAPESP for doctoral studies. The authors would like to acknowledge the assistance of W. L. Gomes in dealing with the animals and the equipment.

### **REFERENCES**

- Amaral-Toma M & Ferrari EAM (2004). Effects of hippocampal lesions in a food location task in pigeons. *Behav Brain Res.* 2004, 148 (1-2): 21-34.
- Aschoff J (1987): Masking and circadian rhythms by *Zeitgebers* as opposed to entrainment. In Hekkens WTJM, Kerhof GH, Rietvelt WJ, eds., *Trends Chronobiol.* NY: Pergamon Press: 149-161.
- Brown JS, Kalisch H, Farber IE (1951): Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus *J Exp Psychol* 41: 317-328.

- Chabot, C. C. & Taylor, D. H. (1992a). Circadian Modulation of the Rat Acoustic Startle Response. *Behav. Neurosc.* 106: 846-852.
- Chabot, C. C. & Taylor, D. H. (1992b). Daily Rhythmicity of the Rat Acoustic Startle Response. *Physiol. & Behav.*, 51: 885-889
- Chaudhury D & Colwell CS (2002): Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res* 133 (1): 95-108.
- Davis M (1989): Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock. *Behav Neurosc* 130: 495-503.
- Fernandez RI, Lyons LC, Levenson J, Khabour O, Eskin A (2003): Circadian modulation of long-term sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci* 100(24): 14415- 14420.
- Frankland PW & Ralph MR (1995): Circadian Modulation in the Rat Acoustic Startle Circuit. *Behav Neurosc* 109: 43-48.
- Groves PM & Thompson RF (1970): Habituation: a dual process theory. *Psychol Rev* 77: 419-450.
- Horlington, M. (1970). Startle response circadian rhythm in rats: lack of correlation with motor activity. *Physiol Behav*, 5, 49-53.
- Koch M (1999): The neurobiology of startle. *Progr Neurobiol* 59: 107-128.
- Kole MH, Koolhaas JM, Luiten PG, Fuchs E (2001): High-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents and the excitability of pyramidal neurons in the hippocampal CA3 subfield in rats depend on corticosterone and time of day. *Neurosci Lett* 307(1):53-56.
- Koulack D (1997): Recognition memory, circadian rhythms, and sleep. *Percept Mot Skills* 85(1):99-104.
- Lissek S, Gunturkun O. (2003): Dissociation of extinction and behavioral disinhibition: the role of NMDA receptors in the pigeon associative forebrain during extinction. *J Neurosci.* 23 (22): 8119-24.

- Maury P & Queinnec Y (1992): Influence of time of 24-hour day on depth of processing in recall memory. *Br J Psychol* 83 ( Pt 2):249-260.
- Nesca M & Koulack D (1994): Recognition memory, sleep and circadian rhythms. *Can J Exp Psychol* 48(3): 359-379.
- Pittendrigh CS (1965): On the mechanism of entrainment of circadian rhythms by light cycles. In *Circadian Clocks*. Amsterdam: North Holland. 277-297.
- Plappert CF, Pilz PKD, Shnitzler HU (1999): Interaction between acoustic and electric sensitization of the acoustic startle response in rats. *Behav Brain Res* 103 (2): 195-201.
- Raghavan AV, Horowitz JM, Fuller CA (1999): Diurnal modulation of long-term potentiation in the hamster hippocampal slice. *Brain Res* 833(2):311-314
- Ralph MR, Ko CH, Antoniadis EA, Seco P, Irani F, Presta C, McDonald RJ (2002): The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behav Brain Res* 136(1):179-184.
- Reijmers LG, Leus IE, Burbach JP, Spruijt BM, van Ree JM (2001): Social memory in the rat: circadian variation and effect of circadian rhythm disruption. *Physiol Behav* 72(3):305-309.
- Richardson R (2000): Shock sensitization of startle: learned or unlearned fear? *Behav Brain Res* 110: 109-117.
- Rusak B (1981): Vertebrate behavior rhythms, In: J. Aschoff *Handbook of behavioral neurobiology – Biol Rhythm* 4 J. New York, Plenum Press, pp 183-213.
- Souza CMZ, Silva AAMR, Caldas MCS, Valentinuzzi VS, Ferrari EAM (2001): Diurnal variation of plasmatic melatonin, corticosterone and variation of general activity in pigeons under light-dark cycle and Constant light. *Biol Rhythm. Res* 32 (2):243-254.
- Tapp WN & Holloway FA (1981): Phase shifting circadian rhythms produces retrograde amnesia. *Science* 211(4486):1056-1058.

Testu F & Clarisse R (1999): Time-of-day and day-of-week effects on mnemonic performance. *Chronobiol Int* 16 (4): 491-503.

Turek FW (1985): Circadian neural rhythms in mammals. *Annual. Rev. Physiol.* 47: 49-64.

Valentinuzzi VS & Ferrari EAM (1997): Habituation to sound during morning and night session in pigeons (*Columba livia*). *Physiol Behav* 62 (6): 1203-1209.

Valentinuzzi VS, Kolker DE, Vitaterna MH, Ferrari EAM (2001): Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. *An Lear Behav* 29 (2): 133-142.

Watanabe S. (2003): Effects of Wulst and ectostriatum lesions on repeated acquisition of spatial discrimination in pigeons. *Brain Res Cogn Brain Res.* 2003 17(2): 286-92.

Zimmerman M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16 (1): 109-110.

## Figure Captions

Figure 1. Mean values of the differences between the amplitude of acoustic responding during Test and Baseline. Calculation of Test versus BL differences (Test minus BL) considered only the first five stimuli during the test. For Control groups response magnitude was measured every 30 seconds. Vertical bars indicate the standard error of the mean (s.e.m).

Figure 2. Percent of the difference scores (Experimental minus Control) during the subjective day (ZT02, ZT06, ZT10) and the subjective night (ZT14, ZT18, ZT22) sessions. Difference scores in each session were calculated as the difference between the amplitude of response of the individual experimental animals and the mean value of the respective control group.

