

Artigo Original

Recebido em 15/09/2004 e aceito em 08/07/2006

Sistema automático de análise comportamental em pombos

*Automatic behavioral analysis system
in pigeons*

Luís Otávio Siqueira

luisiqueira@gmail.com

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
elenice@unicamp.br

Joaquim Miguel Maia*

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - (UTFPR)
CPGEI - Programa de Pós-graduação em Engenharia
Elétrica e Informática Industrial
DAELN - Departamento Acadêmico de Eletrônica
Av. Sete de Setembro, 3165
80230-901 - Curitiba - PR
joaquim@utfpr.edu.br

* Autor para correspondência

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, pombos, ratos, registro automático, 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 runs 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: Acoustic startle response, Automatic recording, Behavioral analysis, Pigeons, Rats.

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 × 30 cm × 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 W. The acoustic stimulus was generated by a 50 W 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 (Figures 7 and 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 am) 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, 10 male adult rats maintained under a light dark cycle (12:12 h; lights on at 6:00 am) 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 50 min sessions) 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 (1,000 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

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 350 ms, 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.

Discussion

We might say that the results 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; Koch, 1999; Miyazato *et al.*, 1999; Szabo e Hazafi, 1965).

A análise comportamental e neurobiológica do sobressalto acústico é utilizada em várias linhas de pesquisas, com diferentes espécies de mamíferos, incluindo roedores, primatas e humanos (Koch, 1999), abordando questões relativas aos circuitos neurais subjacentes (Koch, 1999; Lima e Davis, 1995; Miyazato *et al.*, 1999), efeitos de drogas de ação no sistema nervoso central (Davis *et al.*, 1982; Feifel e Reza, 1999; Sandbak *et al.*, 2000) e de lesões neurais (Fendt *et al.*, 1996; Lima e Davis, 1995; Savage *et al.*, 1997), processos de aprendizagem e memória, dentre as quais se destacam a sensibilização e habituação (Fox, 1979; Groves e Thompson, 1970; Pilz e 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; Koch, 1999; Miyazato *et al.*, 1999; Savage *et al.*, 1997), permitindo uma caracterização de sua latência entre 100 ms e 200 ms (Leitner *et al.*, 1981; Lima e Davis, 1995) e dos circuitos neurais subjacentes (Davis *et al.*, 1982; Koch, 1999; Miyazato *et al.*, 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; Pilz e Schnitzler, 1996; Plappert *et al.*, 1999; Plappert *et al.*, 2001; Storozeva e Pletnicov, 1994).

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 (Ferrari *et al.*, 1999; Valentinuzzi e Ferrari, 1997). 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 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.

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 × 28 cm × 4 mm de espessura), com uma chapa de acrílico de mesmas

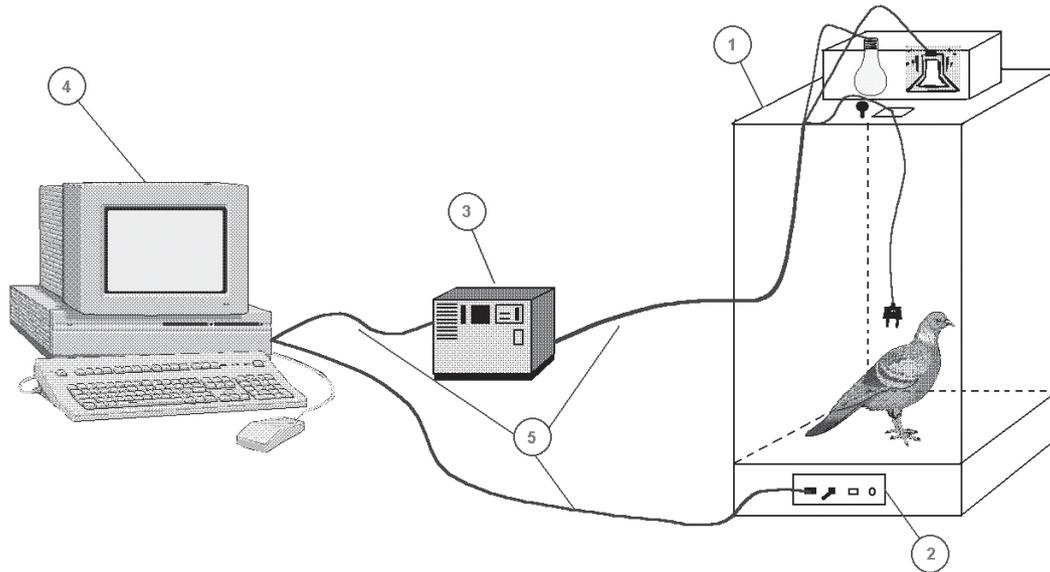


Figura 1. Sistema de Análise Comportamental de Pombos: (1) câmara experimental; (2) circuitos de condicionamento do sinal da célula de carga utilizada para medir a amplitude do sobressalto em resposta aos estímulos; (3) circuitos de controle para gerar estímulos luminosos, sonoros e elétricos (choque); (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.

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 2 nas Figuras 1 e 2).

O alto-falante foi acoplado no lado esquerdo 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.

Microcomputador

Para controle do sistema foi utilizado um microcomputador compatível com IBM-PC, no qual foi instalada uma placa de aquisição de dados (Lynx CAD12/36, São Paulo), 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 ± 5 V, resolução de 2,5 mV/bit e

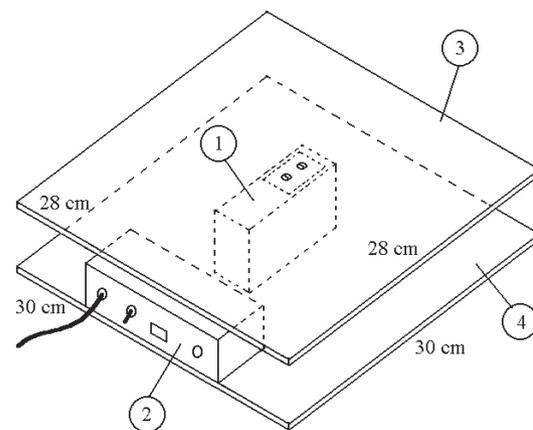


Figura 2. Diagrama esquemático mostrando a conexão da célula de carga ao piso da câmara experimental: (1) célula de carga; (2) caixa com os circuitos de condicionamento do sinal da célula de carga; (3) piso da câmara experimental, fixado apenas à célula de carga através de dois parafusos; (4) base da 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.

taxa de amostragem máxima de 60.000 amostras por segundo (60 ks/s). 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 (Interface Instrumentação Científica e Industrial SP-20, São Paulo). A célula tem capacidade para até 20 kg e seus transdutores são montados internamente em uma configuração de ponte de Wheatstone, sendo necessário apenas acoplar as tensões de alimentação para gerar um sinal diferencial. No sistema foi utilizada uma fonte de alimentação simétrica (± 5 VDC).

O sinal foi condicionado utilizando-se um amplificador de instrumentação (Burr-Brown INA101), com um *trimpot* multivolts de 500 Ω para ajuste do ganho, o que permite um ganho máximo de 81 V/V, e outro *trimpot* de 100 k Ω , com as extremidades conectadas aos pinos 6 e 7, e o cursor central à tensão de alimentação positiva (+ 5 V), para ajuste de zero do sistema. Este ajuste foi feito de forma que a saída do amplificador fosse igual a 0 V quando não havia pesos sobre a plataforma da câmara experimental, compensando desta forma o seu próprio peso. 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, amostrado a uma taxa de 256 Hz e processado diretamente no microcomputador. Optou-se por não utilizar um filtro *anti-aliasing* antes da aquisição do mesmo. A Figura 3 mostra o diagrama em blocos do circuito de condicionamento do sinal da célula de carga.

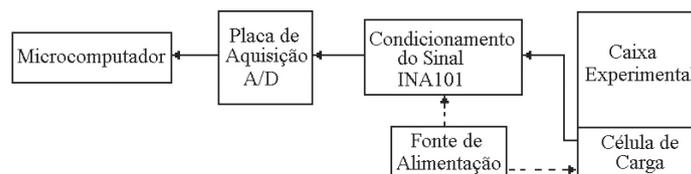


Figura 3. Diagrama em blocos dos circuitos de condicionamento e interfaceamento do sinal da célula de carga ao microcomputador utilizando uma placa de aquisição analógico-digital (A/D). **Figure 3.** Block diagram of the load cell signal conditioning and interface circuits to a microcomputer using an 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 W, com intensidade controlada entre 0 e 60 W por um potenciômetro no painel do equipamento. O potenciômetro foi acoplado ao circuito integrado TCA780 de forma a controlar o ângulo de disparo do triac TIC226D (entre 0 e 90° nos semiciclos positivo e negativo do sinal da rede). 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 W (lâmpada desligada), 15 W, 30 W, 45 W e 60 W (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 Vpp 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 ($G1 = 1,1$ V/V; $G2 = 2,2$ V/V; $G3 = 4,1$ V/V; $G4 = 5,4$ V/V; $G5 = 7,6$ V/V; $G6 = 10,5$ V/V; $G7 = 12,7$ V/V) e um controlável ($G8 = 2,4$ V/V a $26,4$ 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 ± 18 VDC, o que permite o controle de potência na faixa aproximada de $0,2$ W a 32 W *rms*. O alto-falante utilizado na câmara experimental é de 50 W e 4 Ω de impedância. 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, exatidão: ± 2 dB (114 dB / 1 kHz), 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 frequência dos estímulos sonoros. Na figura 5 são apresentadas as curvas de calibração para a frequência 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 frequência e razoavelmente com a duração do estímulo, foram feitas calibrações aproximadas na frequência 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

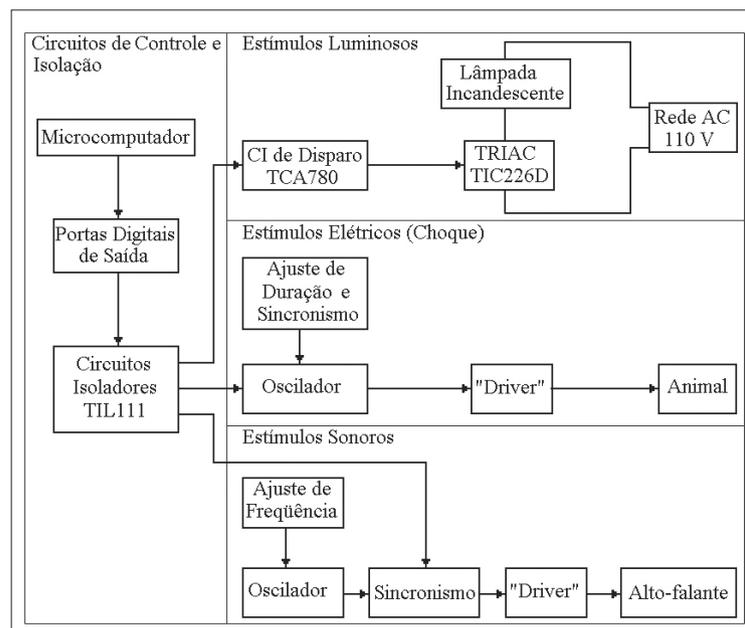


Figura 4. Diagrama em blocos dos circuitos de controle para gerar os estímulos luminosos, elétricos ou sonoros a serem aplicados ao animal confinado na caixa experimental. **Figure 4.** Control circuits block diagram to generate light, sound or electric stimuli applied to the animal confined in the experimental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

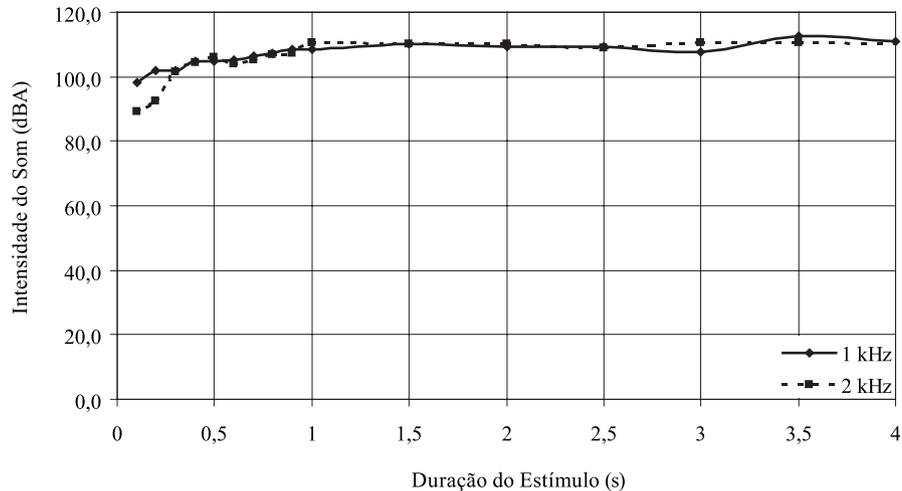


Figura 5. Intensidade do som em função da duração dos estímulos nas frequências de 1 kHz e 2 kHz. A intensidade do som foi ajustada em 110 dBA para 1 s de duração do estímulo. **Figure 5.** Sound intensity as a function of the stimulus duration at 1 kHz and 2 kHz. The intensity of the sound was adjusted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

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 Ω . 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 Ω , 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.

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 MS Excel®, MatLab®, 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.

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 1.024 pontos na tela) após a aplicação de cada um dos estímulos. O número de telas de

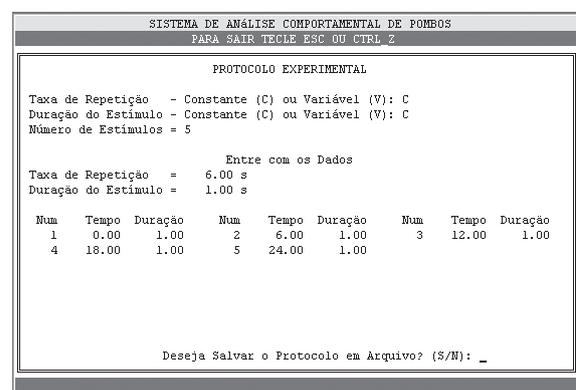


Figura 6. Tela do programa utilizada para criar um protocolo experimental. Pode-se configurar o número de estímulos a serem aplicados, a taxa de repetição, duração e outros parâmetros para realizar o experimento.

Figure 6. Program window used to create an experimental protocol. The number of stimuli, the repetition rate, duration and other parameters can be configured.

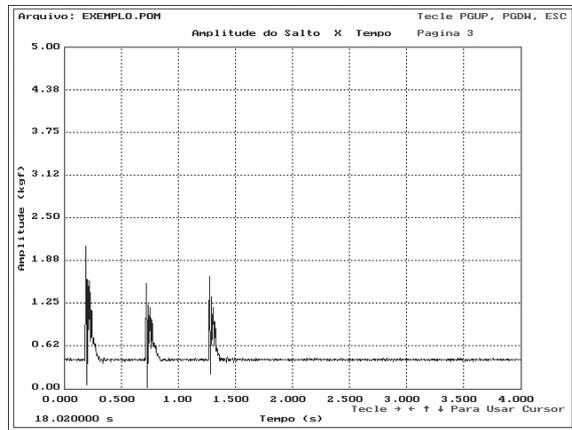


Figura 7. Tela gráfica mostrando a amplitude da resposta com relação ao tempo. São apresentados os dados obtidos durante 4 s após a aplicação do estímulo utilizando-se 1.024 pontos. O número de telas depende do número de estímulos. O estímulo é iniciado em 0 s e dura 0,2 s. A amplitude do sobressalto e o período de latência são 2,18 kgf e 0,22 s, respectivamente. **Figure 7.** Graphical window showing the startle amplitude response as a function of the time. Data obtained during 4 s after the stimulus are shown using 1,024 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.

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.

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 1.024. A análise automática dos dados amostrados para determinar a amplitude da resposta, peso do animal e o período de latência foram feitos 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 ($t_{início}$), 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 instante 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 2 s ($Amp0_2$ e $t0_2$), 0 s e 3 s ($Amp0_3$ 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 1.024 pontos adquiridos durante 4 segundos para cada um dos estímulos, o que corresponde a uma taxa de amostragem de 256 amostras por segundo.

Análise Comportamental

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

Experimento 1

Análise do sobressalto acústico em pombos

O Experimento 1 teve como objetivo avaliar o desempenho e a 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*

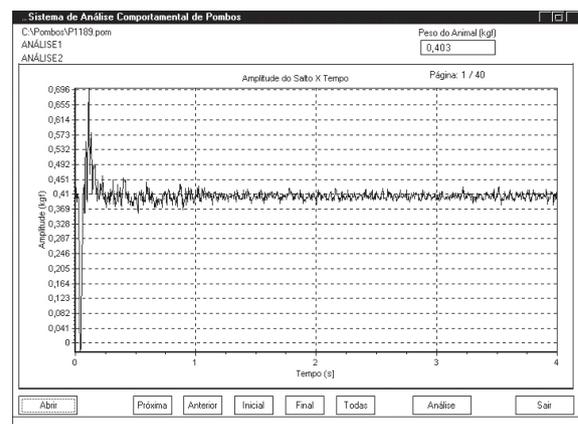


Figura 8. Exemplo de tela do programa para análise posterior dos dados onde se pode determinar o peso do animal, a amplitude da resposta e os períodos de latência após a aplicação dos estímulos. **Figure 8.** Program window example for posterior analysis of the data where it is possible to determine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

livia, adquiridos de um mesmo fornecedor. Os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 hs, com a luz acendendo às 6:00 hs. 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 4 dias consecutivos, durante 50 min. entre 09:00 hs e 13:00 hs.

Exposição aos estímulos sonoros - Na sessão experimental, após 10 min. de habituação à caixa experimental, os animais GE receberam 20 pulsos sonoros (1.000 Hz, 100 dBA, 1 s). Os animais GC permaneceram 30 min. 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, decorrente da movimentação livre do animal na gaiola.

Análise estatística

Foi utilizado o método ANOVA de uma via para análise das diferenças entre grupos de magnitude dos comportamentos. O ANOVA de duas vias foi usado 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 hs, com as luzes acendendo

às 06:00 hs. 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 descrito para os pombos.

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

Análise estatística

Foi utilizado o método ANOVA de uma via para análise das diferenças entre grupos de magnitude dos comportamentos. O ANOVA de duas vias foi usado 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. O 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. No decorrer da sessão, a latência média para os animais GE apresentou oscilações variando 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 ANOVA indicou um efeito significativo de grupo para os dados de latência ($F_{1,22} = 15,50$; $p < 0,001$).

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

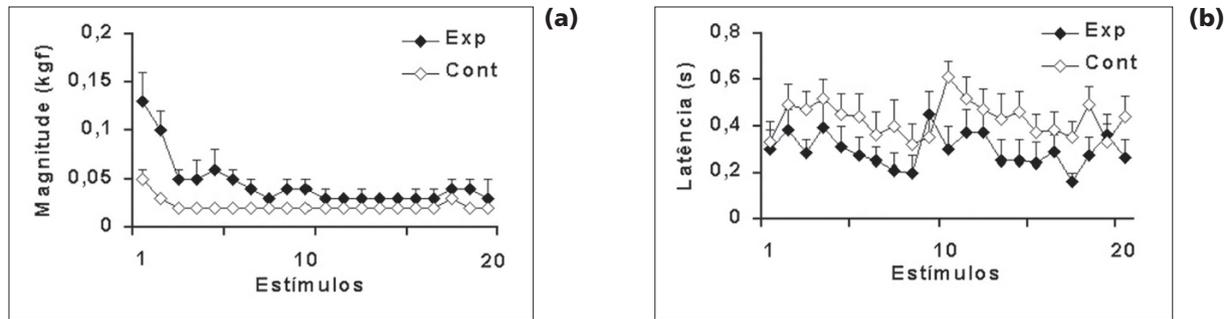


Figura 9. Resposta do sobressalto acústico (kgf) e latência (s) em pombos para o grupo experimental (Exp) e de controle (Cont). (a) Magnitude da resposta. (b) Latência da resposta. Barras verticais indicam o erro padrão da média. **Figure 9.** Startle response to acoustic stimulus (kgf) and latency (s) 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.

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). O ANOVA indicou um efeito significativo entre grupo ($F_{1,8} = 1.256,58$; $p < 0,0001$).

Discussão e conclusões

O presente estudo descreve um conjunto de resultados que indicam que 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, demonstrando assim que o objetivo do trabalho foi alcançado.

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 V 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 V 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 possam identificar os instantes onde ocorreram registros relati-

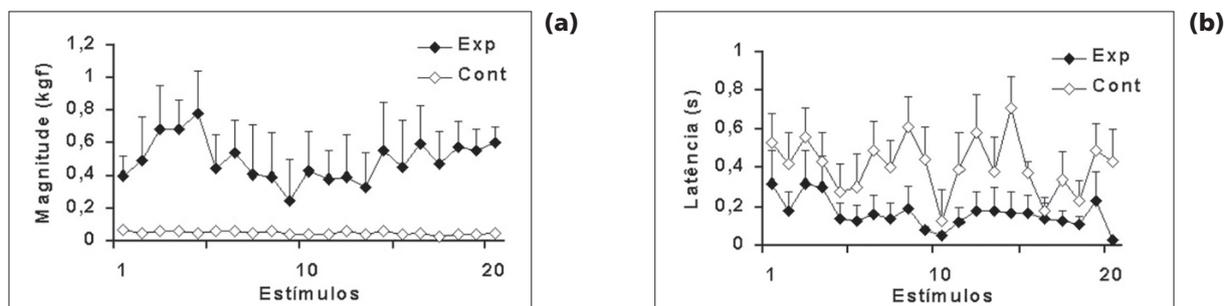


Figura 10. Resposta do sobressalto acústico (kgf) e latência (s) em ratos para o grupo experimental (Exp) e de controle (Cont). (a) Magnitude da resposta. (b) Latência da resposta. Barras verticais indicam o erro padrão da média. **Figure 10.** Startle response to sound stimulus (kgf) and latency (s) 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.

vos 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 e 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; Feifel e Reza, 1999; Koch, 1999; Lima e Davis, 1995; Plappert *et al.*, 1999; Sandbak *et al.*, 2000). Assim, as análises da magnitude do sobressalto acústico em ratos foram importantes para verificar 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.*, 1981), 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 e Davis, 1995). Os dados mostram que foi possível detectar e registrar de forma correta tanto a variação na amplitude da resposta quanto a 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 antero-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 e 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.

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; Fortune e Margoliasch, 1992; Karten, 1967). Levando em consideração que o pombo é um animal bípede e voador, 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 infraestrutura necessária para a construção do protótipo e à FAPESP (Processo número 00/09095-4) pelo suporte financeiro.

Referências

Abs, M. (1983), *Physiology and Behavior of the Pigeon*, New York: Academic Press.

Boord, R.L. (1969), "The anatomy of the avian auditory system", *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 167, p. 186-198.

Davis, M., Gendelman, D.S., Tischler, M.D., Gendelman, P.M. (1982), "A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies", *The Journal of Neuroscience*, v. 2, n. 6, p. 791-805.

Feifel, D., Reza, T.L. (1999), "Effects of neurotensin administered into the ventral tegmental area on prepulse inhibition of startle", *Behavioural Brain Research*, v. 106, n. 1-2, p. 189-193.

Fendt, M., Koch, M., Schnitzler, H.U. (1996), "Lesions of the central gray block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm", *Behavioural Brain Research*, v. 74, n. 1-2, p. 127-134.

Ferrari, E.A.M., Faleiros, L., Cerutti, S.M., Oliveira, A.M. (1999), "The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons", *Behavioural Brain Research*, v. 101, n. 1, p. 93-103.

Fleshler, M. (1965), "Adequate acoustic stimulus for startle reaction in the rat", *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 60, n. 2, p. 200-207.

Fortune, E.S., Margoliash, D. (1992), "Cytoarchitectonic organization and morphology of cells of the field L complex in male zebra finches (*Taenopygia guttata*)", *Journal of Comparative Neurology*, v. 325, n. 3, p. 388-404.

Fox, J.E. (1979), "Habituation and prestimulus inhibition of the auditory startle reflex in decerebrate rats", *Physiology & Behavior*, v. 23, n. 2, p. 291-297.

Groves, P.M., Thompson, R.F. (1970), "Habituation: a dual-process theory", *Psychological Review*, v. 77, n. 5, 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 mesencephali lateralis, pars dorsalis)", *Brain Research*, v. 6, n. 3, p. 409-427.

Koch, M. (1999), "The neurobiology of startle", *Progress in Neurobiology*, v. 59, n. 2, p. 107-128.

Koch, M., Kling, C., Becker, C.M. (1996), "Increased startle responses in mice carrying mutations of glycine receptor

subunit genes", *Neuroreport*, v. 7, n. 3, p. 806-808.

Lehmann, J., Pryce, C.R., Feldon, J. (1999), "Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats", *Behavioural Brain Research*, v. 104, n. 1-2, p. 113-117.

Leitner, D.S., Powers, A.S., Stitt, C.L., Hoffman, H.S. (1981), "Midbrain reticular formation involvement in the inhibition of acoustic startle", *Physiology & Behavior*, v. 26, n. 2, p. 259-268.

Li, L., Fulton, J.D., Yeomans, J.S. (1999), "Effects of bilateral electrical stimulation of the ventral pallidum on acoustic startle", *Brain Research*, v. 836, n. 1-2, p. 164-172.

Lima, T.C.M., Davis, M. (1995), "Involvement of cyclic AMP at the level of the nucleus reticularis pontis caudalis in the acoustic startle response", *Brain Research*, v. 700, n. 1-2, p. 59-69.

Miyazato, H., Skinner, R.D., Garcia-Rill, E. (1999), "Sensory gating of the P13 midlatency auditory evoked potential and the startle response in the rat", *Brain Research*, v. 822, n. 1-2, p. 60-71.

Necker, R. (1983), "Hearing", In: *Physiology and Behavior of the Pigeon*, Ed.: M. Abs, New York: Academic Press, p. 193-219.

Pilz, P.K., Schnitzler, H.U. (1996), "Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures", *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 66, n. 1, p. 67-79.

Plappert, C.F., Pilz, P.K., Schnitzler, H.U. (1999), "Interaction between acoustic and electric sensitization of the acoustic startle response in rats", *Behavioural Brain Research*, v. 103, n. 2, p. 195-201.

Plappert, C.F., Pilz, P.K., Becker, K., Becker, C.M., Schnitzler, H.U. (2001), "Increased sensitization of acoustical startle response in spasmodic mice with a mutation of the glycine receptor alpha1-subunit gene", *Behavioural Brain Research*, v. 121 n. 1-2, p. 57-67.

Reis, F., Schenka, A.A., Melo, L.L., Ferrari, E.A. (1991), "Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*)", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 32, n. 9, p. 1127-1131.

Sandbak, T., Rimol, L.M., Jellestad, F.K., Murison, R. (2000), "Relating acoustic startle reactivity and plasticity to alcohol consumption in male Wistar rats", *Physiology & Behavior*, v. 68, n. 5, p. 723-733.

Savage, L.M., Sweet, A.J., Castillo, R., Langlais, P.J. (1997), "The effects of lesions to thalamic lateral internal medullary lamina and posterior nuclei on learning, memory and habituation in the rat", *Behavioural Brain Research*, v. 82, n. 2, p. 133-147.

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

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

Szabo, I., Hazafi, K. (1965), "Elicitability of the acoustic startle reaction after brainstem lesions", *Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, v. 27, p. 155-165.

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

