

RAFAEL BRUNO NETO

**ANÁLISE ELETROSCIOGRÁFICA DE DISTRITOS  
TELENCEFÁLICOS EM POMBOS (*Columba livia*),  
EM DIFERENTES ESTADOS COMPORTAMENTAIS**

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre.

Curso de Pós-Graduação em  
Neurociências e Comportamento,  
Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal de Santa  
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. José Marino  
Neto

Florianópolis  
1996

**BRUNO-NETO, Rafael Análise eletroscilográfica de distritos telencefálicos em pombos (*Columba livia*), em diferentes estados comportamentais.** Florianópolis. 1996. 126p. Dissertação ( Mestrado em Neurociências e Comportamento ) - Curso de Pós Graduação em Neurociências e Comportamento, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: José Marino Neto

Defesa : 27/09/96

Investigação, dos [padrões eletroscilográficos] do [hipocampo] (HP) e do [hiperestriado acessório] (HA), do [pombo doméstico], em diferentes estados comportamentais. Foram analisados registros de 20 min em períodos de vigília alerta (VA), vigília relaxada (VR), vigília após estímulo sensorial sonoro (SOM) e luminoso (LUZ), sono de ondas lentas (SOL) e sono paradoxal (SP). De cada animal foram selecionados segmentos de 20 s de cada área e para cada estado comportamental que foram submetidos a [análise espectral] e [aperiódica]. A avaliação do [espectrograma hipocampal] indica que existem 3 bandas de atividades (2 Hz; 6 a 10 Hz e 20 a 30 Hz) que são afetadas pelo estado comportamental, sugerindo a existência de 3 padrões eletroscilográficos. Um típico dos estados de VA, LUZ, SOM e SP, outro típico da VR, e um terceiro típico do SOL. Em relação ao HA, a análise do perfil espectrográfico mostra a existência de somente uma banda (20 a 30 Hz) que varia de potência entre os estados comportamentais, aumentando durante os estados de alerta e diminuindo durante os estados de VR e SOL. Esses resultados indicam que existem diferentes padrões eletroscilográficos para os diversos estados nas duas áreas, e que as duas áreas (HP e HA) apresentam características distintas. As características eletroscilográficas do HP apresentam algumas semelhanças com os padrões do eletroscilograma de mamíferos sugerindo que, além de atributos anatômicos e neuroquímicos, alguns mecanismos funcionais podem também ter uma natureza evolucionária conservativa.

**ANÁLISE ELETROSCIOGRÁFICA DE DISTRITOS TELENCEFÁLICOS  
EM POMBOS (*Columba livia*), EM DIFERENTES ESTADOS  
COMPORTAMENTAIS**

**RAFAEL BRUNO NETO**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

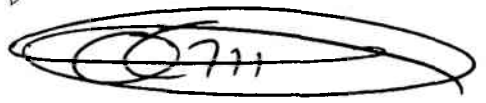
**MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO**

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final  
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento.

Orientador

\_\_\_\_\_  
  
José Marino Neto

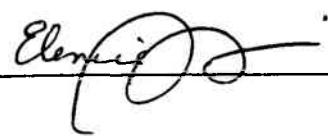
Coordenador do Curso

\_\_\_\_\_  
  
Odival Cezar Gasparotto

Banca Examinadora

\_\_\_\_\_  
  
José Marino Neto (Presidente)

\_\_\_\_\_  
  
Odival Cezar Gasparotto

\_\_\_\_\_  
  
Elenice Aparecida M. Ferrari

BETINHA,

*obrigado por existir*

EDUARDO e LARISSA,

*motivação maior deste trabalho.*

A meus pais, FRANCISCO BRUNO e ESMERALDA GRANADO BRUNO,

*meu carinho e minha eterna gratidão  
por acreditarem.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. JOSÉ MARINO NETO, Orientador,

*pelo paciente trabalho de cinzel em pedra  
bruta.*

Ao amigo MARINO,

*uma idéia, um ponto. Muito obrigado.*

Aos Profs. ODIVAL, CRISTINA e WASHINGTON,

*pela acolhida.*

Aos Profs. MARTA e CÂNDIDO

*pelo apoio logístico.*

Aos técnicos, LUCIANE, CARLINHOS e NIVALDO,

*pela convivência nos laboratórios e pelo auxílio  
na execução dos experimentos.*

Ao amigo KINDER um agradecimento especial,

*pelo constante questionamento, apoio e  
participação no desenvolvimento de todo o  
trabalho, sem o qual esta tarefa seria muito  
mais difícil.*

Aos amigos RICHARD, KLAUS, CHÔLA, GÉRÃO, GERINHO, ELIANE, LÉO,  
SUZANA e CAMELO,

*pelos bons e inestimáveis meses de "clínica"  
em Florianópolis.*

*“Filosoficamente, a dúvida talvez seja a nossa única razão para continuar.”*  
(E. L. Pacheco, [1961, - ], um amigo)

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução .....	1
2. Materiais e Métodos .....	20
2.1. Preparação .....	20
2.2. Ambiente de Registro .....	23
2.3. Protocolo Experimental .....	25
2.4. Análise dos Registros .....	32
3. Resultados .....	41
3.1. Hipocampo .....	41
3.2. Hiperestriado Acessório .....	69
3.3. Comparação entre HP e HA .....	82
4. Discussão .....	90
4.1. O EOsGs do hipocampo .....	90
4.2. O EOsGs do hiperestriado acessório .....	104
4.3. Comparação ente os EOsG do HP e do HA .....	110
5. Referências Bibliográficas .....	115



## RESUMO

Esse trabalho teve por objetivo investigar os padrões eletroscilográficos (EOsG) do hipocampo (HP) e hiperestriado acessório (HA) no pombo doméstico, em diferentes estados comportamentais. A aquisição do registro eletroscilográfico foi feita através de eletrodos bipolares cronicamente implantados sobre a superfície do telencéfalo nas regiões correspondentes ao HP e HA. Foram analisados registros de 20 minutos em períodos de vigília alerta (VA), vigília relaxada (VR), vigília após estímulo sonoro (SOM), vigília após estímulo luminoso (LUZ), sono de ondas lentas (SOL) e sono paradoxal (SP). De cada animal foram selecionados segmentos de 20 s de registro para cada estado comportamental, que foram submetidos à análise espectral e aperiódica. A avaliação estatística das potências relativas do espectrograma do EOsG hipocampal indica que existem 3 bandas de atividades (2 Hz, 6 a 10 Hz e 20 a 30 Hz), cujas contribuições ao espectro são afetadas pelo estado comportamental. As variações no comportamento dessas bandas, sugerem a existência de 3 padrões de EOsG-hp associados aos diferentes estados. Um típico dos estados de VA, LUZ, SOM e SP, caracterizado por potências totais e amplitudes baixas, potência relativa elevada nas bandas de 2 Hz e de 20 a 30 Hz, e atividade na banda de 6 a 10 Hz reduzida. O segundo padrão, típico da VR, apresenta potências totais e amplitudes elevadas, e o espectrograma é caracterizado por alta atividade na banda de 6 a 10 Hz e baixa potência relativa nas bandas de 2 Hz e de 20 a 30 Hz. Um terceiro padrão caracteriza o SOL, com altos valores de potência total e amplitude e borda espectral de 50 % reduzida em relação a todos os outros estados. O espectrograma é caracterizado por alta potência na banda de 2 Hz, baixa atividade na banda de 6 a 10 Hz e pelos menores valores de potência relativa na banda de 20 a 30 Hz. Análises de autocorrelação indicam que na VR existem atividades rítmicas em torno de 5,2 Hz e de 1,3 Hz. Em VA apenas a primeira atividade é aparente. Em relação ao HA, a análise do perfil espectrográfico permite a identificação de somente uma banda de atividade que varia de potência relativa entre os estados comportamentais. Durante os estados de alerta, atividades na banda de 20 a 30 Hz aumentam intensamente. Nos estados mais relaxados (VR e SOL), ocorre um aumento acentuado das potências totais em relação aos estados mais alertas (VA, SOM e LUZ), a borda espectral de 50 % diminui e as amplitudes aumentam. Durante o SOL há sensível redução no número de ondas frente aos outros estados. Análises de autocorrelação do HA sugerem uma atividade rítmica pouco significativa em torno de 3 Hz durante a VR, mas que desaparece durante a VA. Análises de correlação cruzada sugerem que existe uma atividade de cerca de 3 Hz compartilhada de forma sincrônica pelas duas áreas durante a VR, e que desaparece durante a VA. Esses resultados indicam que existem diferentes padrões eletroscilográficos para os diversos estados nas duas áreas, e que as duas áreas (HP e HA) apresentam características distintas. No HP existem 3 bandas de frequências com comportamentos diferenciados nos diferentes estados, enquanto que no HA somente uma banda espectral varia de potência relativa

em função do nível de alerta. Os resultados também indicam que durante a VR as duas áreas são afetadas por uma atividade rítmica em torno de 3 Hz, e a pequena defasagem entre as áreas, sugere que essa atividade deve ser gerada em algum outro distrito e alcançar as duas áreas quase que simultaneamente. As características eletroscilográficas do HP apresentam algumas semelhanças com os padrões do EOsG de mamíferos sugerindo que além de atributos anatômicos e neuroquímicos, alguns mecanismos funcionais podem também ter uma natureza evolucionária conservativa.

## ABSTRACT

This work aimed to investigate the electroscilographic patterns (EOsG) of the hippocampus (HP) and hyperestriatum accessorium (HA) in the homing pigeon, in different behavioral states. Electroscilographic records were obtained by means of bipolar carbon electrodes, chronically implanted over telencephalic surface in the areas corresponding to HP and visual HA. Twenty-minute records were analyzed in periods of alert wakefulness (AW), quiet waking (QW), wakefulness after auditory (S), and visual stimulus (L), slow-wave-sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS). From each animal were chosen segments of twenty-second record for each behavior state, which was submitted to spectral and aperiodic analysis. The statistic evaluation of the relative power of the spectrogram of the hippocampal EOsG indicates that there are 3 bands of activities (2 Hz, 6 to 10 Hz and 20 to 30 Hz), whose contributions to the spectrum are affected by the behavioral state. The variations in the behavior of these bands suggest the existence of 3 patterns of EOsG-hp associated to the different states. A typical pattern for AW, L, S and PS is characterized by low total power and amplitude, high relative power in the bands of 2 Hz and of 20 - 30 Hz, and low activity in the band from 6 to 10 Hz. The second pattern, typical of QW, shows high total power and amplitude, and the spectrogram is characterized by high activity in the band from 6 to 10 Hz, and low relative power in the bands of 2 Hz and from 20 to 30 Hz. A third pattern characterizes the SWS, with high values of total power and amplitude and spectral border of 50 % reduced in relation to all others states. The spectrogram is characterized by high power in the band of 2 Hz, low activity in the band from 6 to 10 Hz, and by the lower values of relative power in the band from 20 to 30 Hz. Autocorrelation analysis indicate that there are rhythmic activities round 5,2 Hz and 1,3 Hz during QW. During AW, only the first rhythmic activity is evident. In relation to HA, the spectrographic profile analysis allows the identification of only one activity band whose relative power oscillates according to the behavior states. During alert states, activities in the band from 20 to 30 Hz increase intensely. In more relaxed states (QW and SWS), there is an intense increase in total power in relation to more alert states (AW, S and L), the 50 % spectral border decreases and the amplitudes increase. During the SWS there is a noticeable reduction in the number of waves in relation to the other states. Autocorrelation analysis of HA suggest a modestly significant rhythmic activity around 3 Hz during the QW, that disappears during the AW. Cross-correlation analysis suggest that there is an activity of nearly 3 Hz shared synchronically by the two areas during the QW, which disappears during the AW. The little delay between the areas suggests that this activity must be engendered in some other district and reach both areas almost simultaneously. These results indicate that there exists different electroscilographic patterns related to each of the several states in both areas, and that both areas show distinctive EOsGraphic characteristics. HP EOsGraphic characters resemble some of mammalian EOsG patterns suggesting that, besides anatomical and neurochemical attributes, some functional mechanisms can also be of a evolutionarily conservative nature.

## I - INTRODUÇÃO

A partir dos estudos de Caton (1875, 1887) em gatos, de Kaufmann (1914) em cães e, principalmente Berger (1929), (apud Cooper Osselton e Shaw, 1974) em humanos, o eletroencefalograma (EEG) vem sendo utilizado para investigar a atividade cerebral. O termo Eletroencefalograma (EEG), tem sido utilizado para denominar os registros de oscilações dos potenciais de agregados neuronais, independentemente da localização de registro. No presente estudo adotaremos o termo **eletroscilograma (EOsG)**, “para denominar as oscilações de potenciais de agregados neuronais de qualquer região do sistema nervoso, incluindo, por conseguinte, electrocorticograma, eletroencefalograma, eletrospinograma etc.”, Valle (1992).

O uso da inspeção eletroscilográfica como instrumento de análise da atividade de agregados neuronais, permitiu identificar a ocorrência de padrões de oscilação da atividade elétrica telencefálica, assim como as variações desses padrões em função da mudança no estado comportamental do indivíduo (e.g., vigília alerta, vigília em repouso, sono de ondas lentas e sono paradoxal).

É sabido que as alterações nas características do EOsG do telencéfalo dos mamíferos geralmente estão relacionadas com o comportamento concorrente (Vanderwolf, 1992; Stewart, Macfabe e Vanderwolf, 1984 e Robertson, Baker e Vanderwolf, 1991). Durante estados de repouso o EOsG é caracterizado por ondas irregulares de grande amplitude com atividade mais intensa na faixa de frequência entre 2 e 4 Hz e menor atividade nas frequências mais altas. Um outro padrão de atividade oscilográfica, denomi-

nado de “padrão de atividade rítmica lenta”, é caracterizado por ondas com frequência de cerca de 6 a 12 Hz, e ocorre durante a vigília imóvel (e.g., nas situações de comportamento defensivo e durante a mastigação de alimentos) (Vanderwolf, 1969).

O eletroscilograma (EOsG), além de auxiliar o estudo dos diferentes estados de consciência e comportamentais, também é utilizado como instrumento auxiliar no diagnóstico e avaliação de estados patológicos, p. ex. doença de Alzheimer (Neufeld *et al.*, 1994; Riekkinen *et al.*, 1991), assim como nos processos de envelhecimento (Hartikainen *et al.*, 1992). Outra aplicação do EOsG tem sido a de auxiliar na classificação e investigação de novas drogas, e avaliação dos seus efeitos (Ruigt *et al.*, 1993; Krizjer, Koopman e Olivier, 1993).

As alterações da atividade eletroscilográfica que ocorrem durante monitoração dos estados comportamentais podem ser demonstradas através da ocorrência de padrões diferentes, tanto na inspeção visual do traçado, como em análises quantitativas do oscilograma. Durante a inspeção visual do traçado podem ser evidenciadas alterações na amplitude geral do traçado e variações na incidência de diferentes formas de ondas (e.g. ondas de grande amplitude e alta frequência tipo ondas em pico). Esse tipo de análise permite traçar um perfil do aspecto geral do traçado eletroscilográfico e permite também correlacionar o traçado com o comportamento do animal. Na análise visual procura-se identificar a presença de artefatos de registro (atividade elétrica não originada no SNC), e selecionar os segmentos de traçado a serem submetidos a análise quantitativa e tratamento estatístico.

Durante a análise quantitativa, as mudanças nas características do traçado oscilográfico podem ser evidenciadas através da variação na distribuição das potências absolu-

tas e relativas nas bandas de frequência obtidas pela análise espectral. A análise espectral é realizada no domínio da frequência pela transformada rápida de Fourier do sinal, calcula o espectro de potência, exprimindo em  $\mu V^2/Hz$  a energia contida numa seqüência de sinais iterativos. Tobler e Borbély (1988), demonstraram através da análise espectral que, em pombos, a densidade de potência era maior no sono não-paradoxal, intermediária na vigília e menor durante o sono paradoxal.

Além da análise espectral, outros métodos são utilizados para a análise quantitativa. A análise aperiódica é um método de tratamento do sinal oscilográfico que permite determinar o número de ondas e a somatória das voltagem dessas ondas em um determinado período, ou segundo a segundo (Geering *et al*, 1993; Depoortere *et al*, 1993; Uchida, Maloney e Feinberg, 1994). Esses tratamentos quantitativos quando associados, contribuem na investigação das relações entre atividade eletroscilográfica e estado comportamental.

Essa abordagem da atividade do sistema nervoso tem sido utilizada em diversas espécies animais, incluindo o homem, mas principalmente ratos e gatos (Tobler, 1988; van Riezen e Glatt, 1993; Uchida, Maloney e Feinberg, 1994; Aeschbach *et al*, 1994). A investigação da atividade elétrica do telencéfalo em vertebrados não mamíferos, não obstante explorada desde os primeiros ensaios eletroscilográficos (e.g. anfíbios, Gerard e Young, 1937 - *apud* Tauber 1974), tem resultado em uma quantidade bem menor de informação que em mamíferos (Campbell e Tobler, 1984).

No primeiro estudo da atividade eletroscilográfica de aves, desenvolvido por Klein, Michel e Jouvet (1964), foram utilizadas várias espécies de aves, entre elas um pombo adulto. Os eletrodos de registro eletroscilográficos telencefálicos foram posicio-

dados sobre o hiperestriado, um distrito telencefálico de aves comparável ao neocórtex de mamíferos (e.g., Karten, 1991; Rehkämper e Zilles, 1991; Veenman, Wild e Reiner, 1995). A análise desses registros mostrou a existência de ondas lentas com frequência de 2 a 3 Hz e amplitude em torno de 100  $\mu$ V, presentes durante o sono de aves, similares às ondas presentes durante o sono de mamíferos.

Em um estudo sobre a atividade elétrica do telencéfalo de aves, Ookawa e Gotoh (1965) registraram o eletroscilograma do telencéfalo de galos e galinhas domésticas, utilizando eletrodos dispostos aos pares bilateralmente nos hemisférios cerebrais. Nesses registros, observaram a existência de alterações na atividade elétrica telencefálica associadas a mudanças do estado comportamental das aves. No animal relaxado e não anestesiado, a atividade oscilográfica na região frontal da cabeça era caracterizada por ondas lentas de 3 - 4 Hz e grande amplitude, ondas lentas de 6 - 12 Hz e de grande amplitude, ondas rápidas de 17 - 24 Hz e de baixa amplitude e ondas muito rápidas de 30 - 60 Hz e baixa amplitude (cerca de 50  $\mu$ V).

Essa descrição do traçado eletroscilográfico de aves é uma constante nos relatos apresentados na literatura. A inspeção visual do eletroscilograma do telencéfalo de aves mostra que ele é composto por uma atividade elétrica irregular, formando um complexo de ondas de grande amplitude e baixa frequência superpostas por atividade oscilográfica de alta frequência e baixa amplitude (Walker e Berger, 1972; Sugihara e Gotoh, 1973). Quando a ave se encontra em vigília alerta, ocorre uma diminuição geral da amplitude do traçado. Neste estado tornam-se realçadas as atividades de mais alta frequência e menor amplitude. Durante os estágios iniciais do sono, as ondas rápidas, irregulares e de baixa amplitude da vigília são substituídas por ondas de grande amplitude, similares às ondas

presentes durante o sono de ondas lentas dos mamíferos (Tradardi, 1966; Monnier, 1980; Campbell e Tobler, 1984; Tobler e Borbély, 1988). As aves também apresentam períodos de sono ativo (sono paradoxal ou sono REM). O sono paradoxal é caracterizado por um traçado oscilográfico de alta frequência e baixa amplitude, semelhante ao traçado da vigília alerta (Campbell e Tobler, 1984; Tobler e Borbély, 1988). No entanto, este período é de curta duração (cerca de 11 segundos em média), ocupando de 1 a 10 % do tempo total do sono na ave (Walker e Berger, 1972; Monnier, 1980; Ayala-Guerrero e Vasconcelos-Dueñas, 1988; Tobler e Borbély, 1988).

Durante o registro da atividade oscilográfica do telencéfalo das aves, além da observação e anotação do comportamento do animal, pode-se fazer uso de registros adicionais de eventos comportamentais ao longo do ciclo sono - vigília. Os movimentos rápidos de piscar, que estão presentes durante a vigília alerta, vão lentificando à medida em que o animal passa para um estado de vigília relaxada. Estes movimentos geralmente desaparecem durante o sono (Dewasmes *et al.*, 1985; Szymezak, 1987). Outro evento importante, que também auxilia na determinação do estado comportamental em aves, são os movimentos oculares. Eles estão presentes intensamente durante a vigília alerta, desaparecem durante o sono de ondas lentas, e podem retornar durante o sono paradoxal (Tobler, 1988; Dewasmes *et al.*, 1985; Szymezak, 1987). A monitoração da atividade elétrica (EMG) da musculatura posterior do pescoço é outra prática usual que auxilia na identificação dos movimentos da cabeça e de variação do tônus muscular que ocorre quando há mudança de estado no ciclo vigília - sono - sono paradoxal (Dewasmes *et al.*, 1985; Ayala-Guerrero e Vasconcelos-Dueñas, 1988; Tobler, 1988).



Dewasmes *et al* (1985) associaram observação comportamental, eletroencefalograma, eletrooculograma, eletrocardiograma, eletromiograma e frequência respiratória para caracterização de quatro estados comportamentais em gansos: alerta, vigília relaxada, sono de ondas lentas e sono paradoxal. Posicionaram os eletrodos bilateralmente sobre a dura mater na região do hiperestriado acessório (HA) obtendo registros bipolares entre os hemisférios cerebrais. Durante a vigília alerta, o eletroscilograma era caracterizado por atividade de baixa voltagem ( $< 50 \mu\text{V}$ ) e alta frequência ( $> 13 \text{ Hz}$ ). Na vigília relaxada, o EOsG passava a apresentar uma atividade mista de alta voltagem e baixa frequência ( $100 - 150 \mu\text{V}$  e  $150 - 300 \mu\text{V}$ ;  $6 - 13 \text{ Hz}$  e  $< 6 \text{ Hz}$  respectivamente), entremeada com atividade elétrica característica do estado comportamental de vigília alerta. Durante o sono de ondas lentas, os animais apresentavam um padrão contínuo de ondas lentas ( $< 6 \text{ Hz}$ ), de alta voltagem ( $150 - 300 \mu\text{V}$ ), sem presença de fusos. Finalmente durante o sono paradoxal, o registro mudava para um padrão de baixa voltagem ( $< 50 \mu\text{V}$ ) e alta frequência ( $> 10 \text{ Hz}$ ) que não era diferenciável da vigília alerta.

Szymbazak (1987) avaliou a distribuição diária (fotoperíodo claro/escuro de 24 horas) dos estados do sono em corvos. Para a análise eletroscilográfica, foram posicionados dois eletrodos para registros monopolares, um profundamente no hipocampo e outro superficialmente na região do hiperestriado acessório. Observou, durante o estado de vigília, um amplo conjunto de comportamentos que incluíam atividade locomotora, atenção à presença de ruídos estranhos no local de registro e comportamentos de conforto (p. ex. espreguiçar-se). O traçado oscilográfico apresentava atividade de baixa voltagem ( $40 - 50 \mu\text{V}$ ) e alta frequência ( $> 10 \text{ Hz}$ ). Durante a vigília relaxada (sem atividade locomotora), o traçado oscilográfico tornava-se polimórfico, com o surgimento de atividade de alta voltagem ( $> 20 \mu\text{V}$ ) e baixa frequência ( $< 4 \text{ Hz}$ ). Com o início do sono, o oscilogra-

ma mudava para um padrão com ondas de 80 - 240  $\mu$ V de amplitude e frequência de 3 - 4 Hz (que foi chamado de sincronizado). Este estado estava associado à diminuição do tônus muscular. Como evidenciado pelo eletromiograma. Durante os episódios de sono paradoxal o traçado oscilográfico era composto de ondas de alta frequência e baixa voltagem (8 - 12 Hz, 40 - 60  $\mu$ V). Embora ocorressem movimentos súbitos de flexão da cabeça, não observaram diferenças substanciais na atividade eletromiográfica entre sono de ondas lentas e sono paradoxal.

A atividade eletroscilográfica da região hiperestriada dorsolateral do telencéfalo de periquitos (*Aratinga canicularis*; Ayala-Guerrero, Pérez e Calderón, 1988), durante a vigília alerta, era caracterizada por ondas de 7 a 24 Hz de baixa amplitude. Quando o animal se encontrava relaxado, ocorria uma mudança do traçado. A amplitude aumentava e havia uma redução na frequência, mesclado com ondas rápidas e lentas. Durante o sono de ondas lentas o oscilograma apresentava ondas de 3 a 6 Hz de alta amplitude. Esta atividade não apresentava os fusos característicos do sono de mamíferos.

Ayala-Guerrero e Vasconcelos-Dueñas (1988) realizaram estudos eletroscilográficos e comportamentais em pombos selvagens (*Zenaidura macroura*) e descreveram cinco estados comportamentais. Na vigília ativa, a atividade elétrica cerebral apresentava ondas de baixa amplitude (< 50  $\mu$ V) e de alta frequência (>5 Hz). O animal estava prontamente reativo a estímulos alertantes do meio e apresentava constantes movimentos corporais e de cabeça; o EMG do pescoço era tonicamente ativo com disparos fásicos associados a movimentos. Na vigília relaxada, o animal apresentava um padrão eletroscilográfico semelhante ao da vigília ativa porém com surgimento esporádico de ondas lentas, e apresentava comportamento motor com menor atividade. Na sonolência (drowsiness),

definido como um estado comportamental tranqüilo, o oscilograma apresentava uma redução progressiva da freqüência da atividade cerebral com períodos curtos de dessincronização correspondentes a períodos de breves despertar. No sono de ondas lentas, o eletroscilograma era caracterizado pela presença constante de ondas lentas com freqüência de 2 a 4 Hz e amplitude de 150  $\mu$ V sem fusos, com duração de alguns segundos a três minutos. O animal apresentava comportamento descrito como tranqüilo, e o eletromiograma (EMG) dos músculos da nuca indicando diminuição de tônus. Finalmente, no sono paradoxal, EOsG era caracterizado por ondas de baixa voltagem ( $< 50 \mu$ V) que não diferiam das ondas presentes durante a vigília alerta. O EMG era caracterizado por manifestações musculares fásicas (quedas bruscas da cabeça), e movimentos rápidos dos olhos.

Van Twyver e Allison (1972) analisaram o EOsG do telencéfalo de pombos (*Columba livia*) de ambos sexos. Os eletrodos eram colocados superficialmente sobre diferentes áreas do hemisfério cerebral, e profundamente no hipocampo (HP), visando identificar a presença de atividade de ondas lentas e de ondas teta hipocampais durante os diferentes estados de alerta. Durante a vigília, o traçado de todas as áreas registradas era composto de ondas de alta freqüência e baixa amplitude. A presença incidental de ondas lentas, dependia da área cerebral onde era obtido o registro. Observaram que a área de maior incidência de ondas lentas era a região posterior medial localizada sobre as estruturas hipocampais. Durante a vigília relaxada, períodos curtos de ondas lentas se alternavam com atividade rápida, que em seguida davam lugar a um padrão de baixa freqüência e grande amplitude, característico do sono de ondas lentas. Esse padrão era encontrado principalmente nos registros obtidos nas regiões mais posteriores do telencéfalo.

Walker e Berger (1972) conseguiram discriminar vigília e dois estados de sono com base na atividade eletrofisiológica e comportamental em pombos (*Columba livia*). A vigília era caracterizada como o estado em que o pombo exibia movimentos constantes e rápidos da cabeça com periódicos bater de asas e comportamento de alimentar-se. O EOsG era caracterizado por atividade de baixa voltagem (menor que 50  $\mu\text{V}$ ) e alta frequência (10 a 12 Hz). O início do sono de ondas lentas era precedido por diminuição da atividade motora, e o EOsG era caracterizado por atividade de alta voltagem (200 a 300  $\mu\text{V}$ ) e de baixa frequência (menor que 6 Hz), que estavam presente quer o animal estivesse de olhos abertos, quer estivesse de olhos fechados. Com o início do sono de ondas lentas os movimentos palpebrais cessavam, com os olhos permanecendo fechados e a atividade tônica do EMG tornava-se diminuída. O sono paradoxal era caracterizado por baixa voltagem (menor que 50  $\mu\text{V}$ ) e atividade de alta frequência (maior que 10 Hz), não distinguível da atividade da vigília. Comportamentalmente, os breves episódios de sono paradoxal (média de 11 segundos) eram distinguidos do sono de onda lentas e da vigília por sucessivas quedas e rotações da cabeça dos pombos.

Outros estudos evidenciam a existência de padrões eletroscilográficos em pombos (*Columba livia*) semelhantes aos acima descritos (Phillips e Berger, 1991; Berger e Phillips, 1994). Neste estudos, a vigília era caracterizada por EOsG de baixa voltagem e frequência mista, movimentos dos olhos ou da membrana nictitante com intervalos menores que 1 segundo e atividade fásica do EMG. O sono de ondas lentas apresentava EOsG de alta voltagem e baixa frequência, com os movimentos dos olhos ou da membrana nictitante separados por um intervalo de tempo maior que 5 segundos e ausência de atividade muscular fásica. Durante o estado de sonolência, o EOsG apresentava um padrão intermediário entre vigília alerta e sono de ondas lentas, com ondas de alta voltagem e baixa frequência.

gem e baixa frequência, movimentos dos olhos ou da membrana nictitante com intervalos maiores que 1 segundo e menores que 5 segundos, e ausência EMG com atividade muscular fásica. O sono paradoxal apresentava EOsG de baixa voltagem e alta frequência, movimentos oculares grandes, manutenção ou diminuição da atividade eletromiográfica em relação ao sono de ondas lentas. Durante o sono paradoxal o eletromiograma apresentava eventos fásicos intermitentes comumente associados a movimentos oculares rápidos. A identificação de sono paradoxal era feita somente se este fosse precedido pela presença de sono de ondas lentas.

Em resumo, podemos observar que há um consenso na literatura, quanto a descrição geral do traçado eletroscilográfico do telencéfalo das aves. Também há consenso de que estes traçados variam nas suas características de frequência e amplitude durante diferentes estados comportamentais. Durante a vigília alerta, o EOsG é marcado por atividade mista com predomínio acentuado das ondas de alta frequência (geralmente acima de 6 Hz) e baixa amplitude (menor que 50  $\mu\text{V}$ ). Este estado, é caracterizado por atividade motora intensa, constante piscar rápido de olhos e tônus elevado da musculatura do pescoço. À medida em que o animal transita para um estado de vigília quieta, ocorre um aumento gradativo da atividade de baixa frequência (menor que 4 Hz) e grande voltagem (acima de 150  $\mu\text{V}$ ), atividade que aparece na forma de disparos entremeando a atividade rápida da vigília alerta. Comportamentalmente o pombo apresenta menor atividade motora, os movimentos oculares vão se lentificando e o tônus muscular vai diminuindo.

O estado de sono de ondas lentas é caracterizado por uma atividade ainda mista, porém com um aumento acentuado na amplitude geral do traçado eletroscilográfico, observado como atividade de grande amplitude (acima de 200  $\mu\text{V}$ ) e de baixa frequência

(menor que 4 Hz), tornando o aspecto geral do traçado mais homogêneo com predomínio da atividade de grande amplitude. Durante este estado, o pombo permanece quieto, em postura típica de sono, com olhos fechados, cabeça fletida para frente e apoiada sobre o pescoço e as penas eriçadas. Durante o sono paradoxal o pombo apresenta um traçado eletroscilográfico semelhante ao traçado da vigília ativa, marcado por predomínio da atividade de baixa amplitude e alta frequência. Este estado pode ser distinguido comportamentalmente da vigília alerta através da postura típica de sono, da diminuição acentuada do tônus da musculatura do pescoço e, que ocasionalmente acarreta movimentos bruscos de ventroflexão.

A maioria dos estudos acima citados fez uso de registros de grandes agregados neuronais. Nestes estudos, as derivações para registros foram dispostos de forma a abarcar áreas extensas do telencéfalo das aves. Nota-se uma predominância no uso de derivações monopolares (e.g., Ookawa e Gotoh, 1965; Sugihara e Gotoh, 1973; Szymezak, 1987), ou de derivações bipolares inter-hemisféricas (e.g., Ookawa e Gotoh, 1965; Dewasmes *et al.*, 1985; Tobler e Borbély, 1988) para a aquisição desses registros. Nas derivações monopolares (também chamadas de derivações referenciais ou derivação de referência comum), a atividade eletroscilográfica captada pelo eletrodo de registro colocado em uma região telencefálica, é comparada a um eletrodo de referência localizado em um ponto distante. Este geralmente é colocado no osso da região anterior da cabeça do animal para minimizar a captação de atividade gerada pelo cérebro (Cooper, Osselton e Shaw, 1974). O EOG registrado com essas derivações representa a diferença entre a atividade gerada no cérebro e o ponto de referência. Nos registros feitos através de derivações bipolares, as pontas do par de eletrodos são posicionadas a espaços muito grandes uma da outra (até 1 centímetro; e.g., Ayala-Guerrero e Vasconcelos-Dueñas, 1988). Nas

derivações bipolares, ambos eletrodos da derivação são considerados ativos e são igualmente afetados por potenciais eletroscilográficos. Não raramente, observamos que em alguns estudos não há a preocupação em referir a derivação utilizada (e.g., van Twyver e Allison, 1972 e Phillips e Berger, 1994), ou de descrever a localização exata dos eletrodos de registro (e.g., Tradardi, 1966; Dewasmes *et al.*, 1985).

As derivações monopolares e as derivações bipolares dispostas na forma descrita acima, registram e comparam a atividade de tecidos potencialmente não homogêneos. Além disso, essas preparações estão mais sujeitas a interferências (ruídos) produzidas pela atividade elétrica de grande magnitude gerada pela atividade elétrica dos músculos que podem mascarar ou reduzir o sinal gerado pela atividade oscilográfica próxima aos eletrodos de registro (Yurek e Randall, 1991). Dessa forma, esses procedimentos não permitem a obtenção de registros em regiões menores, homogêneas, e restritas a uma determinada área cerebral, prejudicando a investigação de padrões eletroscilográficos típicos de regiões anatômica e funcionalmente circunscritas.

Além disso, podemos observar que uma grande parcela desses experimentos foi desenvolvida em um número bastante reduzido de animais. Ayala-Guerrero e Vasconcelos-Dueñas (1988), em um experimento, descrevem as características do EOsG para 5 pombos; em outro, Ayala-Guerrero, Pérez e Calderón (1988) utilizam 5 periquitos. Phillips e Berger (1991) e Berger e Phillips (1994), ao descreverem detalhadamente quatro estados comportamentais e os respectivos traçados oscilográficos utilizaram, respectivamente, 5 e 7 pombos, sendo que no último caso, somente dois pombos tiveram seus eletroscilogramas submetidos a análise espectral.

Numerosas evidências comportamentais, imunohistoquímicas, anatômicas e funcionais, têm demonstrado que o telencéfalo das aves está parcelado em vários distritos com características distintas (Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Karten, 1991; Rehkämper e Zilles, 1991; Medina e Reiner, 1994; Veenman e Reiner, 1994; Veenman, Wild e Reiner, 1995). Como relatamos acima, são escassos os estudos visando a caracterização eletroscilográfica destes diferentes distritos.

O telencéfalo de aves, diferentemente da organização laminar do córtex de mamíferos, é caracterizado por grandes campos de células, alguns grupos nucleares e uma lâmina fina de revestimento (Benowitz, 1980). Contém duas regiões maiores que parecem diretamente comparáveis ao neocórtex de mamíferos: a bainha dorsal ventricular (DRV), e o Wulst (Shimizu e Karten, 1990). O Wulst é uma estrutura que pode ser facilmente evidenciada. Macroscopicamente ele é visível como uma saliência (Wulst em alemão) que se estende do sulco lateral (chamado valécua) até a linha média (Reiner e Karten, 1983). O Wulst de aves é uma porção multilaminada do palio rostral do telencéfalo e consiste de três camadas. As várias subdivisões do Wulst receberam originalmente nomes contendo o sufixo “estriado”, na crença de que eles fizessem parte de uma grande massa equivalente ao complexo estriatal dos mamíferos (Veenman, Wild e Reiner, 1995). A camada mais superficial (externa) é o hiperestriado acessório (HA), composto pelo HA propriamente dito e pelo núcleo intercalado do hiperestriado acessório (IHA). Localizado mais ventralmente ao HA/IHA, encontra-se o hiperestriado intercalado superior (HIS) constituindo a lâmina mais medial. O hiperestriado dorsal (HD), é a estrutura mais interna (profunda) do Wulst (Veenman, Wild e Reiner, 1995).



Atributos embriológicos, citoarquitetônicos, imunohistoquímicos e hodológicos têm indicado que HA, IHA, HIS e HD são estruturas equivalentes a distritos visuais e somatossensoriais do neocortex de mamíferos. Tem sido demonstrado que porções circunscritas e mais rostrais do HA estão envolvidas no processamento de informações somatossensoriais (Benowitz, 1980; Bagnoli e Burkhalter, 1983; Funke, 1989; Veenman, Wild e Reiner 1995). Por outro lado, porções mais caudais do HA recebem aferências visuais do núcleo óptico principal do tálamo (Karten *et al.*, 1973; Veenman, Wild e Reiner, 1995). O IHA é o alvo primário das projeções talâmicas (tanto visuais como somatossensoriais) para o Wulst. Recentemente, Shimizu e Karten (1990) demonstraram que os neurônios do IHA emitem projeções para as demais estruturas do Wulst, incluindo o HA. O HA por sua vez é a única estrutura do Wulst a emitir projeções eferentes descendentes extra telencefálicas. As projeções extratelencefálicas do HA são ordenadas de maneira topográfica e atingem vários grupos celulares pré-motores e visuais do tronco cerebral. (Veenman, Wild e Reiner, 1995).

Os estudos já realizados sugerem que o Wulst de aves está envolvido no controle de padrões de comportamento complexos, particularmente aqueles envolvendo a aprendizagem (Benowitz, 1980). A representação ao nível telencefálico parece ser essencial para os processos associativos envolvendo uma dada modalidade sensorial. Lesões combinadas das vias tectofugais e talamofugais (i.e., para o ectoestriado e para o Wulst) resultam na perda completa do condicionamento visual discriminativo. Lesões isoladas em uma dessas vias permitem a continuidade de função residual. Da mesma forma, a destruição de ambas vias permite a orientação visual na locomoção. Entretanto a formação ou recuperação de qualquer associação comportamental complexa baseada na visão é perdida após a destruição dessas projeções, um efeito semelhante a “cegueira cortical”

(Benowitz, 1980). Entretanto, trabalhos mais recentes mostram que pombos submetidos a lesões amplas do telencéfalo, foram capazes de aprender a discriminação sucessiva de dois componentes, apesar de requerer maior treinamento para a aquisição da resposta adequada (Cerutti, 1991).

Uma outra estrutura do telencéfalo de aves bastante investigada, e também objeto do presente estudo, é o hipocampo. É uma estrutura considerada como sendo equivalente ao hipocampo em mamíferos (Benowitz e Karten, 1976). As estruturas hipocampais têm sido geralmente consideradas parte do sistema límbico para o qual tem sido atribuído funções no comportamento emocional e sexual, na orientação, regulação visceral e memória e aprendizagem (Bingman *et al.*, 1988a e b; Bingman e Mench, 1990; Sherry *et al.*, 1989). De acordo com Schwerdtfeger e Germroth, (1990), a capacidade de memória e aprendizagem presente nas aves está provavelmente relacionada a um alto desenvolvimento do telencéfalo como um todo. Uma visão corrente da função do hipocampo, indica seu possível papel na classificação adequada de informação recém adquirida e comparação com informações armazenadas. O hipocampo pode assim auxiliar o animal a redirecionar sua atenção a estímulos relevantes e reagir a estes de forma apropriada. O hipocampo está equipado com as conexões necessárias para receber informações externas, e.g. visual, auditiva (do neocórtex) e olfatória (do bulbo olfatório), (Schwerdtfeger e Germroth, 1990). Experimentos mostram que quando submetidos a lesões hipocampais, os pombos diminuem a sua capacidade em voar de volta para casa a partir de áreas onde podem identificar referenciais familiares (Bingman e Mench, 1990). Isso demonstra que o hipocampo tem uma participação importante na capacidade de orientação e no reconhecimento espacial de lugares conhecidos (Erichsen *et al.*, 1994).

A formação hipocampal de mamíferos compreende quatro regiões corticais relativamente simples. Estas incluem o giro denteado, o hipocampo propriamente dito (o qual pode ser dividido em três sub-campos, CA3, CA2 e CA1), o complexo subicular (por sua vez pode ser subdividido em três partes: o subículo, pré-subículo e para-subículo) e córtex entorrinal (Amaral e Witter, 1989). As características anatômicas da formação hipocampal de não mamíferos têm sido investigadas por muitos anos, e têm sido identificadas pelo menos algumas características em comum entre os vertebrados (Erichsen *et al*, 1994). Como nos mamíferos, o hipocampo de aves tem uma organização trilaminar, uma relação espacial característica com o ventrículo lateral, uma grande diversidade de tipos celulares e, pelo menos algumas, conexões aferentes e eferentes aparentemente homólogas (Benowitz e Karten, 1976).

Estudos imunohistoquímicos em mamíferos, têm fornecido nova visão a respeito das substâncias neuroativas que são características de certas subdivisões do hipocampo. Análises similares da formação hipocampal de aves têm fornecido a base para a identificação de possíveis subdivisões equivalentes nas aves. De fato, a formação hipocampal de aves contém muitas das mesmas substâncias neuroativas que têm sido encontradas em mamíferos (Erichsen *et al.*, 1994).

Nesta breve revisão das áreas que serão objeto de nossa investigação (HA e HP), procuramos expor e enfatizar algumas evidências, dentro do numeroso acervo existente, indicando que estas estruturas apresentam características morfológicas, hodológicas e funcionais, distintas entre si e análogas às de algumas estruturas telencefálicas de mamíferos (*e. g.* Nauta e Karten, 1970; Tauber, 1974; Karten, 1991; Medina e Reiner, 1994; Veenman, Wild e Reiner, 1995).

A neurologia comparativa é relevante e necessária na compreensão para cada espécie animal, de tudo aquilo que possa ser dito a partir de nosso conhecimento parcial da sua anatomia e fisiologia, extrapolando dos dados clínicos para o homem, o que diz respeito a partes do cérebro envolvidas com sensação, sofrimento, alerta, emoção e repouso (Bullock, 1984). A investigação comparativa, faz uso de três métodos ou estratégias: modelagem, oportunística e filética. Estas estratégias não são mutuamente excludentes, e um mesmo estudo pode envolver mais de um método (Northcutt, 1986). A análise filética é o centro da biologia comparada, cujos princípios estabelecem que a vida é organizada; existem padrões de características, e esses padrões são gerados por processos de evolução. O objetivo da biologia comparada é reconhecer e analisar padrões característicos e propor explicações para os processos que geraram tais padrões (Northcutt, 1986).

A singularidade de diferentes sistemas e espécies somente pode ser apreciada através da comparação com outros sistemas e animais, e que estudos comparativos frequentemente nos levam a princípios gerais da organização neural entre diversas espécies (Shimizu, 1994). O surgimento do cérebro dos amniotas apresenta um ampla variedade de diferenças. Apesar disso, o plano fundamental do sistema nervoso central é bastante similar entre diferentes amniotas, e assim talvez filogeneticamente conservativo através da evolução (Northcutt, 1981; apud Shimizu, 1994). Linhagens dos três grupos de amniotas (répteis, aves e mamíferos) foram separadas há cerca de 300 milhões de anos de um tronco réptil ancestral. Assim, algumas similaridades entre diferentes amniotas poderiam ser traçadas retrogradamente (Shimizu, 1994). Dessa forma, entendemos que o estudo comparado entre cérebro de aves e mamíferos pode fornecer informações cruciais sobre a evolução do sistema nervoso e, possivelmente, sobre os mecanismos básicos de seu funcionamento.

Se, por um lado, é farta a literatura explorando os aspectos morfológicos e comportamentais, é evidente a menor atenção dedicada à investigação da atividade eletrofisiológica do telencéfalo das aves. Além do mais, conforme comentado acima, os trabalhos existentes investigando a atividade eletroscilográfica procuram descrever aspectos gerais da atividade coletiva neuronal do telencéfalo de aves. Entendemos que há a necessidade de se desenvolver um estudo eletroscilográfico que permita uma análise fina do comportamento de agregados neuronais homogêneos. Registros obtidos a partir de eletrodos bipolares podem ser considerados como medidas autênticas de potenciais de campo característicos de uma determinada região. Uma vez que as pontas dos eletrodos estão muito próxima uma da outra, os elementos do par ficam postados num mesmo território ou em um distrito gerador citoarquiteticamente homogêneo (Yurek e Randall, 1991). Isto é, o sinal registrado pelos eletrodos reflete a somação algébrica temporal e espacial dos potenciais sinápticos ocorrendo em torno dos eletrodos de registro. Além disso, ao serem gerados e detectados em tecido homogêneo, os potenciais não estarão sujeitos a distorções provocadas pela sua passagem através de meios heterogêneos (e.g., o osso, Nunez, 1981). As características desse procedimento de registro sugerem que podem ser obtidas medidas precisas da atividade elétrica a partir do tecido adjacente aos eletrodos.

Assim sendo, uma vez identificadas essas atividades oscilográficas, concomitantemente com a observação comportamental e registro de outros parâmetros fisiológicos descritos mais adiante, será possível investigar a existência de correlações entre alteração comportamental e alteração nas características do oscilograma de cada uma dessas áreas nas aves.

Dessa forma, a justificativa do nosso trabalho também se sustenta na necessidade de relacionar padrões de estado comportamental a possíveis padrões eletroscilográficos de regiões telencefálicas circunscritas. A descrição dos padrões dos estados comportamentais das aves é definida por métodos já descritos, uma vez que há um consenso entre os autores quanto a sua definição (Stewart, Macfabe e Vanderwolf, 1984; Campbell e Tobler 1984).

Em nosso trabalho procuramos investigar a existência de padrões de atividade eletroscilográfica em pequenos segmentos de duas áreas telencefálicas de pombos domésticos (*Columba livia*), o hiperestriado acessório (HA) e o hipocampo (PH). Para os registros foram utilizados eletrodos com derivações bipolares pequenas, visando captar a atividade de pequenos grupamentos de estruturas neuronais geradoras em tecidos potencialmente homogêneos (Yurek e Randall, 1991) das áreas propostas.

Neste trabalho nos propusemos: a) a analisar, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, a atividade eletroscilográfica de estruturas localizadas na superfície das duas áreas telencefálicas do pombo doméstico (*Columba livia*) propostas; b) correlacionar os padrões eletroscilográficos dessas áreas em situações de vigília alerta, de vigília relaxada, e no alerta após estimulação sensorial visual e auditiva; c) comparar, entre as duas áreas propostas, os padrões eletroscilográficos dos diferentes estados comportamentais. Finalmente, procuramos investigar possíveis diferenças, e correlações, entre as áreas propostas, no comportamento da atividade eletroscilográfica durante os estados comportamentais propostos.

## II - MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Preparação

#### Animais

Foram utilizados 33 pombos domésticos (*Columba livia*) adultos, de ambos os sexos, pesando entre 300 e 500 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Antes e após a cirurgia, os pombos foram mantidos em gaiolas individuais em uma sala própria para manutenção de aves, com água e ração *ad libitum*. A iluminação foi mantida artificialmente através de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e o período de escuro iniciando-se às 19:00 horas

#### Implantação dos eletrodos

Os pombos foram anestesiados com uma associação de Ketalar (Cloridrato de Ketamina - Parke-Davis, 0,66 ml/Kg de peso corporal) e Rompun (solução aquosa de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6 dihidro-4H-1,3-tiazina - a 2% - Bayer, 0,33 ml/Kg de peso corporal), via intramuscular, em dose única.

Para a implantação dos eletrodos, os pombos foram fixados em aparelho estereotáxico (Kopf Instruments, Inc.) adaptado para aves. Momentos antes da cirurgia, receberam via subcutânea, cerca de 2 ml de Xylestesin (Cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor - Cristália), na região de acesso cirúrgico na cabeça. Em seguida foi feita uma incisão longitudinal na pele da cabeça do pombo, de tal forma a expor a calota craniana e a musculatura do pescoço inserida na região occipital. O periósteo foi remo-

vido, o crânio raspado e secado para garantir a adesão do acrílico. Ato contínuo, foram marcadas as posições para a perfuração e implante dos eletrodos, de acordo com as coordenadas derivadas de um atlas estereotáxico para pombos (Karten e Hodos, 1967).

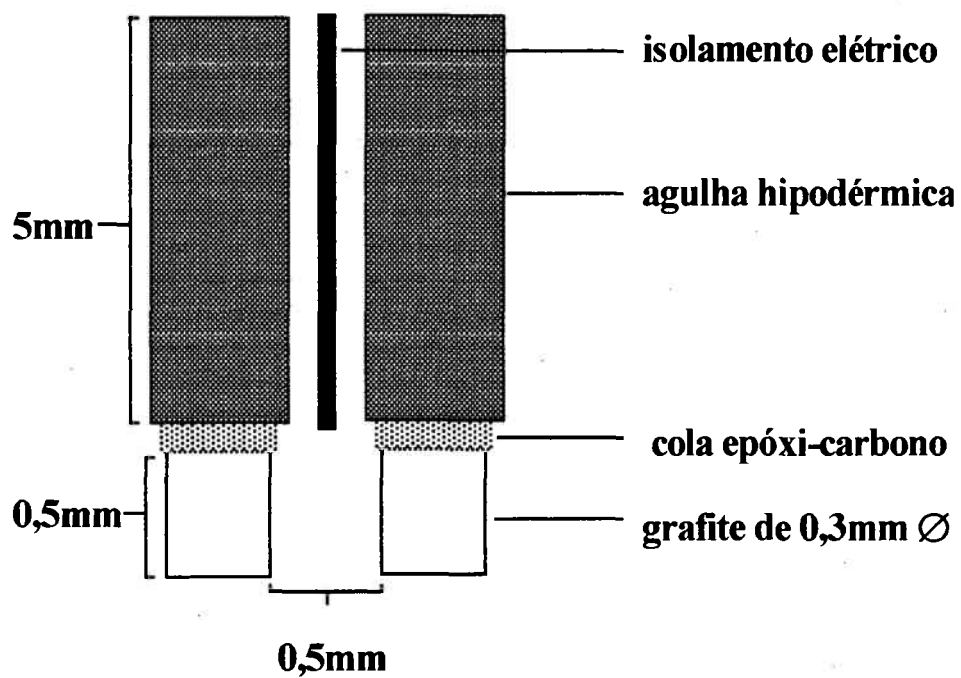
Para a implantação dos eletrodos no telencéfalo, foram feitos orifícios com cerca de 3 milímetros de diâmetro, nas posições previamente determinadas, usando broca esférica de uso odontológico. Os eletrodos foram introduzidos manualmente nos orifícios e os mesmos preenchidos com fibrina (Fibrinol - Baldacci), para prevenir hemorragias e o contato do acrílico com o tecido cerebral.

Os pares de eletrodos foram implantados nas seguintes estruturas: hiperestriado acessório (HA - coordenadas A = 10,0, L = - 1,2); hipocampo (HP - coordenadas A = 4,0, L = -1,0). Foi implantado um terceiro par de eletrodos sobre a área corticóidea dorso lateral (CDL - coordenadas A = 5, L = - 8,5, P = 11,0) ou no hiperestriado ventral (HV - coordenadas A = 8,5, L = -2,7, P = 13,0) (de acordo com Karten e Hodos, 1967). Um quarto par de eletrodos foi implantado na musculatura posterior do pescoço, com o objetivo acompanhar variações do tônus e atividade muscular durante os diferentes estados de atividade do pombo, por meio do EMG.

### Os eletrodos

Os eletrodos bipolares (Figura 1) foram confeccionados em grafite, com diâmetro de 0,3 mm, montados em pares solidários, e colados com epóxi-carbono (World Precision Instrument Inc.) em agulhas com parede fina. As agulhas foram separadas por um segmento isolante de 0,5 mm, composto de acrílico odontológico e cianoacrilato. A outra extremidade (que conecta ao polígrafo), de cada um dos eletrodos foi soldada aos





**Figura 1** - Desenho esquemático representando os eletrodos bipolares para registro da atividade eletroscilográfica cerebral.

pinos de um pente conector de computador cortado para abrigar quatro e cinco conexões.

Para registro do EMG, os eletrodos foram montados em fios de aço inoxidável separados e isolados com verniz. As extremidades distais tiveram o verniz isolante removido. As pontas nuas foram usadas para transfixar a musculatura dorsal do pescoço (fazendo o contato elétrico com o músculo), tomando-se o cuidado para evitar o contato entre as pontas sem isolamento. As extremidades proximais, da mesma forma que os eletrodos para registros do EOsG, também foram soldadas aos pinos do pente conector.

Após a implantação resultaram dois soquetes (Figura 2): um com quatro pinos que estavam conectados a dois pares de eletrodos para registro eletroscilográfico; outro com cinco pinos - dois sendo destinados a um par de eletrodos para registro eletroscilográfico, dois para os eletrodos de registro do EMG, e o quinto pino para o eletrodo de referência. Este último foi fixado com parafuso no osso frontal da cabeça, sob a pele.

Ao fim da implantação os soquetes foram fixados ao crânio com acrílico de polimerização rápida de uso odontológico. Em seguida, a pele da cabeça foi suturada em torno dos soquetes. Finalmente foi injetado, via intramuscular na região do tórax, 0,2 ml de Pentabiótico Veterinário (Penicilina G benzatina, Penicilina G procaína, Penicilina G potássica, Dihidroestreptomicina base [sulfato], Estreptomicina base [sulfato] - Wyeth).

## **2. Ambiente de registro**

A sala de registro é construída em alvenaria, revestida internamente com madeira e com uma camada de isopor entre elas. Isto permite atenuar a interferência de sons



**Figura 2** - Detalhe da preparação com os conectores miniatura fixado ao crânio do animal com cimento acrílico para ligação com o polígrafo

externos, assim como atenuar as variações da temperatura no seu interior. A sala é permanentemente ventilada (e o ar renovado) através de um ventilador posicionado no teto. Dentro da sala de registro encontram-se: três lâmpadas fluorescentes (duas de 9 Watts e uma de 20 Watts) para iluminação da sala; a câmara de faraday com a gaiola do pombo; um gerador de ruído branco, desenvolvido em nosso laboratório, para mascaramento de ruídos externos; uma lâmpada incandescente branca, de 60 Watts, para estimulação sensorial visual; e uma campainha com potência sonora de aproximadamente 90 dB para estimulação sensorial auditiva. Durante os registros de sono, a sala de registros foi iluminada por uma lâmpada incandescente vermelha de 20 Watts. A monitoração visual do comportamento dos pombos foi feita através de uma janela de vidro duplo, com uma das faces espelhada, de forma a permitir que os animais fossem observados sem perceber a presença do observador.

Nos dias de registros, os pombos foram transferidos para a sala e conectados aos cabos pelo menos duas horas antes do início da sessão, para permitir a habituação ao ambiente experimental. Ao longo do período de habituação e de todo registro, os animais foram submetidos a ruído branco de baixa potência (30 dB) para atenuar possíveis estímulos indesejáveis a partir de ruídos provenientes do meio externo.

### **3. Protocolo experimental**

#### Registro

Os registros tinham início, no mínimo, sete dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos, sendo sempre realizados entre 10:00 e 17:00 horas. Registros noturnos (durante o período escuro) foram eventualmente realizados. Estes tinham início sempre

após o início do período de escuro programado para o biotério de origem dos pombos (com o qual eles estavam ambientados), isto é, após as 19:00 horas.

Para a aquisição dos registros, o pombo era transferido, com sua gaiola individual (com água e ração) para uma câmara de Faraday de ferro (1,0 x 0,7 x 0,6 m), localizada dentro do ambiente experimental acima descrito. O plug fêmea do capacete acrílico do pombo era conectado firmemente a um conector macho, adaptado a um conector giratório (swivel). Essa preparação permitia a livre movimentação do pombo dentro da gaiola. O conector por sua vez era conectado aos cabos coaxiais de entrada do equipamento de registro (Figura 3).

Após o período de adaptação, eram iniciados os procedimentos de registro. A aquisição de registros era feita durante um período mínimo de vinte minutos, de forma a incluir períodos de postura alerta e postura relaxada. Após o final dos vinte minutos de registro, e durante um período de postura relaxada (ver definição adiante), o pombo era submetido a estimulação luminosa (luz direta por dez segundos). A lâmpada para a estimulação estava localizada a meia altura da gaiola do pombo e junto à parede posterior. A estimulação luminosa era feita apenas quando o pombo se encontrasse de frente para lâmpada. Continuando o registro, esperava-se por um novo período de postura relaxada para o pombo ser submetido a estimulação sonora (acionamento da campainha por três segundos). Os experimentos desenvolvidos durante a noite visaram a obtenção de registro de sono ondas lentas e sono paradoxal. Estes experimentos tiveram duração média de 20 minutos, e foram repetidos até a obtenção de registros eletroscilográficos de comportamentos compatíveis com sono de ondas lentas e sono paradoxal.



**Figura - 3** - Gaiola de registro com isolamento farádico, evidenciando os fios conectados aos “plugs” na cabeça do pombo e ao “swivel” giratório. Ao fundo e à direita do pombo, aparece o vidro unidirecional para visualização do pombo dentro da sala com isolamento acústico.

### Equipamento de registro

A aquisição do sinal oscilográfico foi feita através de um polígrafo NARCOTRACE® 40 (NARCO Bio Systems Inc.) de quatro canais para registro direto em papel. Cada canal do polígrafo possui ajustes que permitem que o sinal seja amplificado e filtrado a 100 Hz através de um filtro passa-baixa ativo de segunda ordem, com frequência de corte selecionável. A constante de tempo padronizada foi de 0,3 segundos. O sinal de cada um dos quatro canais do polígrafo foi amostrado a 128 Hz e transferido para o disco rígido de um computador clone IBM-PC/AT 80386 (33 MHz com monitor SVGA), através de uma placa conversora analógico-digital (ADAC-12 Digicart, versão 1.0). A placa ADAC-12 contém um conversor analógico digital de 8/12 bits com 8 entradas diferenciais, sendo que fizemos uso de quatro. Os registros foram armazenados como arquivos binários em disco rígido para análise posterior (*off-line*).

A aquisição foi feita através de um programa para aquisição e análise de sinais biológicos (Sistema para aquisição e análise de sinais biológicos - SAASBIO; UFSC-CCB/CFS) desenvolvido em nosso laboratório em colaboração como o Grupo de Pesquisa em Engenharia Biomédica (GPEB-UFSC) (Coimbra, 1994). O programa SAASBIO é composto de 3 módulos principais: módulo de calibração (CAL), módulo de aquisição e armazenamento (REGIS), e o módulo de análise (VIEW). Cada módulo foi desenvolvido como um programa independente.

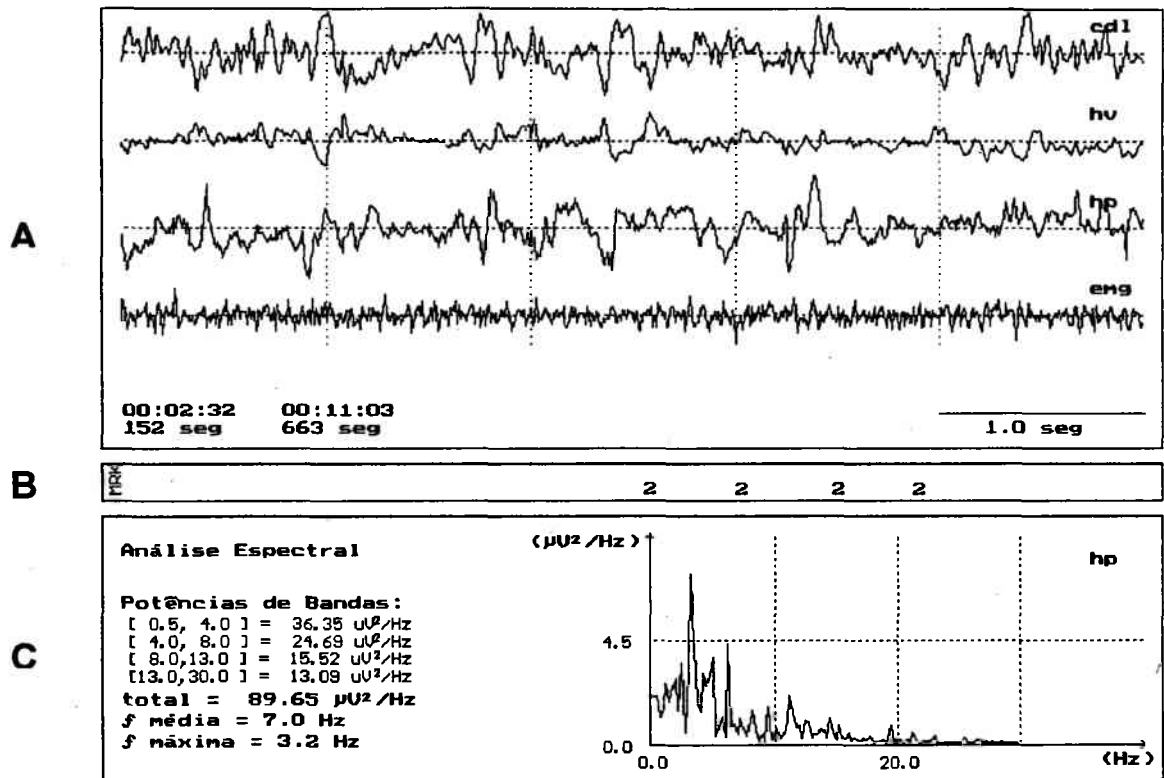
O módulo CAL possibilita a calibração do sinal proveniente do polígrafo. Ele lê os sinais com os pulsos dos 4 canais do NARCOTRACE simultaneamente, identifica os pulsos, conta os níveis de energia de cada pulso, e então estima a quantos  $\mu\text{V}$  corresponde cada nível de quantificação.

Uma vez calibrado o sistema, inicia-se a aquisição do registro através do módulo REGIS. Simultaneamente à aquisição dos sinais eletrográficos, o teclado é lido para a introdução de marcadores dos eventos observados durante a aquisição do sinal (e.g., comportamentos emitidos pelo animal). Uma vez iniciada a aquisição, são abertos simultaneamente dois arquivos: um binário para armazenar as amostras dos sinais e outro ASCII para armazenar as informações digitadas pelo experimentador.

O módulo VIEW permite a análise visual (sem registro em papel) e quantitativa do sinal. Possibilita que se compare em uma mesma tela aspectos visuais do registro oscilográfico e parâmetros quantitativos. Ao se abrir um arquivo através do VIEW, surge uma tela gráfica no monitor composta de 3 janelas dispostas uma sobre a outra (Figura 4). A mais superior (Figura 4A) apresenta os sinais oscilográficos adquiridos pelos 4 canais, mostrados em janelas de tempo ou “épocas” definidas pelo operador. A segunda janela (Figura 4B) mostra as marcas de eventos digitados durante o registro, permitindo associar o aspecto oscilográfico ao comportamento concomitante do animal. A terceira janela (mais inferior, Figura 4C) permite visualizar os resultados das quantificações e transformações dos sinais na época visualizada na tela do monitor. Através desta janela podemos acompanhar visualmente, através de gráficos ou tabelas, as variações dos parâmetros extraídos, ou transformações aplicadas ao sinal original, e compará-las com as atividades ou eventos marcados.

O módulo VIEW permite dois tipos de análise. Uma análise estática, da época apresentada na janela, e outra dinâmica que permite a análise de épocas consecutivas, dado um intervalo de tempo. O conjunto de rotinas disponíveis no módulo VIEW é bastante amplo. As rotinas são aplicadas a um canal por vez, sendo permitido ao experimentador escolher o canal que deseja submeter a tratamento. Entre as rotinas disponí-





**Figura 4** - A - Janela superior apresentando uma época de 5 segundos, mostrando o oscilograma de quatro canais identificados como **cdl**, **hv**, **hp** e **emg**; B - janela para marcação de eventos (2, piscar lento); C - janela inferior apresentando análise espectral da época visualizada.

veis, fizemos uso sistemático da análise espectral, da análise aperiódica, da integração numérica do sinal eletroscilográfico e rotinas de filtros lineares. Estas rotinas são discutidas durante a descrição da análise quantitativa.

### Observação de comportamentos

Simultaneamente aos registros eletrográficos, foi feito o registro comportamental por meio de observação direta e sistemática dos comportamentos emitidos pelo animal. À medida que ocorriam manifestações comportamentais de interesse ou mudanças no estado comportamental do pombo, estas eram imediatamente anotadas através do teclado do computador. Os comportamentos foram digitados na forma de códigos alfanuméricos de acordo com um catálogo de itens comportamentais (Tabela 1). Estes foram armazenados em um arquivo de eventos que, no momento da análise *off-line*, é aberto simultaneamente com o arquivo do sinal oscilográfico. Isso permite que durante a análise posterior do registro seja visualizada na tela do computador, uma janela com uma época apresentando, simultaneamente, o comportamento do pombo, o traçado eletroscilográfico e o traçado eletromiográfico correspondentes no momento da aquisição do registro.

Foi elaborado em nosso laboratório, um catálogo de itens comportamentais descrevendo os comportamentos para permitir a sua identificação durante a análise 'off-line'. Esse catálogo apresenta uma descrição sucinta dos comportamentos mais usuais do pombo na situação de registro (Tabela 1).

#### 4. Análise dos Registros

##### Critérios para caracterização dos estados

**Tabela - 1 : Definições e códigos de registro dos eventos comportamentais .**

CÓDIGO	DESCRIÇÃO	CÓDIGO	DESCRIÇÃO
MOVIMENTOS CORPORAIS			
A	Andar - qualquer deslocamento do pombo dentro da gaiola, ou alternância de sustentação do corpo pelas pernas;	L	Autolimpeza - movimentos de esfregar o bico (ou bicar) nas penas de qualquer parte do corpo;
C	Qualquer movimento da cabeça, exceto os movimentos de 'pescar' que ocorrem durante o sono;	TR	Tremor - tremor muscular emitido por qualquer parte do corpo não caracterizando o espreguiçar;
E	Espreguiçar - movimentos de extensão das asas seguidos de tremor do corpo;	V	Bater asas - movimentos de bater as asas, com o pombo apoiado sobre uma superfície, semelhantes aos movimentos de voar;
R	Arrepiar as penas - movimento característico de arrepiar as penas de todo o corpo;	DW	Pescar - movimento de queda súbita da cabeça, para frente ou para trás, seguida de elevação também rápida da mesma, observado somente durante expressões comportamentais de sono;
COMPORTAMENTOS ALIMENTARES			
G	Ingerir - são os comportamentos de deglutição quando o pombo está ingerindo alimento sólido ou água;	DEG	Deglutir - movimentos rápidos com o bico, semelhantes aos da ingestão, porém não associados à ingestão de água ou alimento;
VO	Vomitir - comportamento de vomitar, indicado pelos movimentos espasmódicos, seguidos ou não de expulsão de conteúdo gástrico;	DEF	Defecar - ato de defecar;
MOVIMENTOS OCULARES			
0	Olhos fechados - identificação da permanência dos olhos fechados por pelo menos dois segundos;	1	olhos abertos - identificação da permanência dos olhos abertos por pelo menos dois segundos;
2	Piscar lentamente - movimentos lentos de piscar, permitindo a observação do fechamento completo dos olhos;	3	Piscar rapidamente - movimentos de piscar rápidos, geralmente não permitindo a observação do fechamento completo dos olhos;
4	Movimentos oculares com olhos fechados - movimentos dos globos oculares com os olhos fechados;	5	Ptose palpebral - fechamento parcial das pálpebras, olhos semicerrados;
POSTURAS			
PR	Postura relaxada - pombo quieto, piscando lentamente, podendo estar associado a movimentos suaves da cabeça;	PA	Postura alerta - pombo permanece imóvel com a cabeça elevada, olhos abertos e fixos, com movimentos de piscar muito rápidos, sem fechar os olhos;
PS	Postura de sono - animal quieto com olhos fechados, cabeça fletida e apoiada sobre o peito, retração do pescoço, penas do peito arrepiadas, eventualmente apoiado sobre apenas uma das pernas ou deitado sobre o piso da gaiola ou no poleiro;		

Para a caracterização dos estados comportamentais, foram levadas em consideração: a) a postura do pombo anotada durante o registro; b) as características gerais do eletroscilograma, e c). as características do traçado do eletromiograma (EMG).

Para caracterizar vigília alerta (VA), o registro de comportamentos deve indicar a presença de PA (ver Tabela 1). O EMG deve apresentar atividade de alta frequência com amplitude elevada, indicando tônus muscular aumentado, podendo estar presente atividade fásica de grande amplitude, indicando movimentos da cabeça. Nessa situação, o EOsG telencefálico caracteriza-se por apresentar um predomínio de ondas de alta frequência e de baixa amplitude (Tobler e Borbély, 1988).

A vigília relaxada (VR) é caracterizada pela postura relaxada (PR, ver Tabela 1), associada a alterações no EMG. A amplitude do EMG diminui em relação a VA, indicando diminuição do tônus muscular do pescoço e também ocorre a diminuição da atividade fásica gerada pela movimentação da cabeça. Nesta situação o EOsG telencefálico geralmente é descrito como sendo constituído por ondas mistas, porém com aumento da atividade de baixa frequência e de grande amplitude (e.g., Tobler, 1988).

A presença de sono de ondas lentas (SOL) é indicada por alterações eletromiográficas e comportamentais semelhantes às da vigília relaxada porém em grau mais acentuado. Cessam os movimentos corporais, com o pombo assumindo postura de sono (PS, ver Tabela 1). O EMG mostra diminuição mais acentuada do tônus e desaparecem as atividades fásicas geradas pela movimentação da cabeça do pombo

O sono paradoxal (SP) é um estado comportamental de curta duração (11 segundos em média), que ocorre durante (ou no fim de) um episódio de SOL. O SP é caracterizado por postura de sono com presença incidental de movimentos semelhantes a deglutição (DEG, Tabela 1). Também podem estar presentes movimentos dos globos oculares com os olhos fechados. Um comportamento característico do SP, usualmente presenciado é o movimento de 'pescar' (DW, ver Tabela 01) caracterizado por queda súbita da cabeça, para frente ou para trás, seguida por reelevação rápida da mesma.

Esse movimento está associado a diminuição acentuada, seguida de elevação, da amplitude do EMG durante o movimento de reposicionamento da cabeça. A identificação das variações de tônus da musculatura, foi grandemente facilitada pela integração do sinal eletromiográfico.

### Análise qualitativa

Os eletroscilogramas do HA e HP, e as manifestações simultâneas do EMG e dos comportamentos, foram submetidos à inspeção visual. Esse exame serviu primeiramente para identificar trechos dos traçados correspondentes à vigília relaxada, à vigília alerta, e ao alerta após estimulação sensorial (luminosa e sonora). Nessa primeira abordagem os trechos foram inspecionados com a finalidade de avaliar a qualidade dos registros, procurando identificar a presença de artefatos, duração dos comportamentos anotados e o aspecto geral do oscilograma quanto aos tipos de ondas presentes e amplitude do traçado. A observação simultânea do aspecto geral do traçado oscilográfico, dos eventos comportamentais e do aspecto do EMG, permitiram determinar o estado comportamental do animal e selecionar os trechos do registro que foram submetidos a uma análise qualitativa e, posteriormente, à análise quantitativa. Os registros noturnos para a observação de sono, tiveram o mesmo tratamento analítico visando selecionar trechos de sono de ondas lentas (SOL) e sono paradoxal (SP).

Após a identificação dos estados comportamentais, os trechos de registros considerados adequados foram submetidos a um novo exame. Neste, foram selecionadas épocas de cada um dos estados comportamentais já mencionados. Estes trechos foram submetidos a uma análise visual, descritiva do traçado. A descrição levou em consideração a forma do traçado observado em épocas de grandes intervalos de tempo (20 segundos ou mais). Esta inspeção permitiu observar as variações do EOsG ao longo do

registro, a estabilidade do sinal e do comportamento do pombo. Os registros também foram analisados em épocas de um segundo cada. Durante esta análise, segundo a segundo, procuramos descrever as características das ondas do traçado quanto a forma, duração, frequência, magnitude (amplitude em  $\mu\text{V}$ ) e recorrência ou incidência em cada época. Desta forma foi possível identificar os tipos de onda presentes no registro oscilográfico segundo a segundo, e ao longo de toda a duração do comportamento.

A inspeção conjunta do eletroscilograma, eletromiograma e o comportamento associado, durante a análise visual, possibilitou uma avaliação preliminar de possíveis correlações entre estado comportamental, aspecto eletromiográfico e características gerais do padrão eletroscilográfico. Ao final da análise visual foram selecionados pelo menos 2 segmentos de 20 segundos de cada estado comportamental, de cada registro de cada pombo. Estes segmentos foram submetidos á análise quantitativa, como descrito a seguir.

#### Análise quantitativa

Para a análise quantitativa dos segmentos selecionados na etapa anterior, utilizamos a análise espectral e análise aperiódica dos eletroscilogramas dos pombos.

A análise espectral é realizada pela transformação do sinal digitalizado no domínio da frequência pela transformada rápida de Fourier (FFT), procedimento introduzido inicialmente por Cooley e Tukey em 1965 (para revisão ver Geering *et al.*, 1993). O algoritmo de FFT, utilizado no presente trabalho, é uma versão de um arquivo colocado a disposição na rede INTERNET via FTP *anonymous* por Steve Sampson, CompuServe, em Dallas TX (sampson@killer.dallas.tx.us) (Coimbra, 1994). O espectro de potência exprime (em  $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$ ) a energia contida em uma seqüência de sinais iterativos e

é calculado pela integral dos quadrados das voltagens dos sinais em certo intervalo de tempo segundo a frequência, permitindo estabelecer a distribuição média da potência de um sinal com relação à frequência. Quando o sinal varia ritmicamente sua potência concentra-se na frequência fundamental e de seus harmônicos, ocorrendo oscilações irregulares nas demais frequências. Se não há ritmicidade, a energia distribui-se por extensa faixa de frequências, sem concentração em faixas específicas (Valle, 1992). A FFT decompõe as ondas do eletroscilograma em múltiplas ondas senoidais, assumindo que as ondas complexas são a superposição de ondas fundamentais periódicas com diferentes frequências, amplitudes e fases (Bührer *et al.*, 1990).

A FFT foi realizada nos segmentos de 20 segundos através da análise de dinâmica (ver descrição de equipamentos), em cada época consecutiva de 1 segundo. Foram computadas a potência absoluta total ( $\mu V^2/Hz$ ) e a borda espectral 50% (Hz), bem como as potências absolutas parciais de 1 em 1 Hz entre 0 - 30 Hz. A partir das potências absolutas total e parciais, foram calculadas as potências relativas a cada Hz (porcentagem da potência de uma dada frequência em relação a potência total).

Como a banda de frequência de interesse no presente trabalho vai de zero a 30 Hz, a taxa de amostragem do sinal adotada (128 Hz) se adequa aos nossos propósitos. O teorema de Nyquist estabelece que se uma banda de sinal limitada é amostrada exatamente acima do dobro da frequência mais alta dessa banda, é possível reconstruir a forma original da onda. Isto significa que existe informação suficiente para recriar a forma da onda para qualquer grau de exatidão (Nilsson, Panizza e Hallett, 1993).

A análise aperiódica é computada inteiramente no domínio do tempo. Ela é determinada pela voltagem entre o zero e o pico do sinal digitalizado de uma dada onda. Assim a porção do sinal cruzando dois zeros consecutivos é definida como meia onda,

ou uma onda monofásica (Geering *et al*, 1993). Outra forma de se implementar a análise aperiódica é através da decomposição da onda complexa do oscilograma em unidades de ondas consecutivas pico-a-pico. Dessa forma pode ser determinado o comprimento de onda correspondente e calculado o número de ondas por segundo e a voltagem por segundo. O algoritmo utilizado em nosso laboratório é uma variação do procedimento descrito por Gregory e Pettus (1986), e permite a identificação de ondas com amplitude a partir de 4  $\mu\text{V}$  (amplitude de corte). Primeiramente o sinal é filtrado pelo filtro passa-baixas de 30 Hz para atenuar distorções de alta frequência que possam prejudicar a identificação das ondas. O sinal filtrado passa por um algoritmo de detecção de extremos relativos. A cada seqüência vale-pico-vale reconhecidos determina-se uma onda. A seguir o sinal é novamente filtrado em 10 Hz e o procedimento de identificação de ondas e medidas é repetido para ondas de 'baixas frequências'. Da mesma forma que para a análise espectral, a análise aperiódica foi feita em 20 épocas consecutivas de um segundo. A cada época de 1 segundo foram computados a amplitude total (em  $\mu\text{V}$ ) e o número de ondas na época (ondas/s).

#### Análise histológica

Após a obtenção de 3 a 4 registros completos validados pela inspeção visual do traçado (análise qualitativa), foi considerado cumprido o protocolo de experimentos com esses animais. Para confirmar o posicionamento dos eletrodos, e validar todo o experimento com cada animal, estes foram submetidos a análise histológica.

Os pombos receberam uma dose letal de Ketalar, foram perfundidos (intracardiaca) com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de perfusão com solução de formol a 10% com ferrocianeto de potássio. Então foram decapitados, e antes de remover (dissecar) o cérebro, receberam uma lesão eletrolítica através de uma corrente de 3



$\mu$  A por 10 segundos, para marcação e identificação da posição dos eletrodos telencefálicos. Após dissecados, os cérebros foram mantidos em formol a 10% por pelo menos uma semana. Após esse período, foram incluídos em ágar-ágar, fatiados em vibrátomo (Campden Instruments Ltd.) em cortes de 100  $\mu$ m, montados em lâminas gelatinizadas, e em seguida corados pela técnica de Nissl. Após a coloração as lâminas foram submetidas a análise histológica para determinarmos as posições dos eletrodos.

### Análise estatística

Para permitir a análise estatística, os dados absolutos da análise aperiódica e da análise espectral, gerados pelo SAASBIO em forma de arquivo binário, foram exportados para uma planilha eletrônica (Excel for Windows versão 5.0 - Microsoft). Neste programa, os valores absolutos das frequências de 1 a 30 Hz, foram transformados em valores percentuais em relação á potência total. Os dados dos EOsGs destinados à análise estatística, para cada segmento de 1 segundo das amostras selecionadas, incluíram: a potência absoluta total (em  $\mu V^2/Hz$ ), a borda espectral de 50% (em Hz), os dados das potências relativas (%) de 1 a 30 Hz (frequência de resolução de 1 Hz) do espectro e os dados absolutos da análise aperiódica (número de ondas/s e amplitude em  $\mu V/Hz$ ). Os dados resultantes das análises espectral e aperiódica, foram submetidos inicialmente a estatística exploratória e descritiva geral. Nesta etapa procuramos descrever o tipo de distribuição dos dados quantitativos, visando determinar os testes estatísticos destinados a comparar os resultados entre os diversos animais, entre os diversos estados comportamentais e entre as áreas telencefálicas. Nesse sentido, também examinamos os espectrogramas dos diversos estados por meio da análise de grupamentos (ou *cluster analysis*). A análise de grupamentos é um método exploratório que procura organizar um determinado conjunto de objetos ou dados em grupamentos ou estruturas significa-

tivas. O método utilizado foi o da “árvore de agrupamento”, (*tree clustering*, Hartigan, 1975). A análise de grupamentos é um algoritmo de agrupamento, que não envolve testes de significância estatística; é uma coleção de diferentes algoritmos que organiza dados em grupos. De fato, a análise de grupamentos procura a solução mais significativa possível. Este método se propõe a agrupar os dados em grupos sucessivamente maiores usando alguma medida de similaridade ou de distância. O método de agrupamento de escolha foi o das distâncias métricas de Chebychev. Numa primeira etapa, cada dado representa seu próprio cluster e a distância entre os elementos dos grupos é definida pelo método medida de distância adotado. Numa segunda etapa há a necessidade de se definir regras para a amalgamação ou ligação de dois ou mais grupamentos. Na presente análise, foi utilizado o método de amalgamação de grupamentos de Ward (1963). A vantagem deste método é que ele usa uma aproximação da análise de variância para avaliar as distâncias entre os grupamentos. Resumidamente, ele tenta minimizar a soma dos quadrados (SQ) de agrupamentos hipotéticos que possam ser formados a cada etapa de agrupamento.

Previamente às análises estatísticas, quando necessário, os dados de potência relativa foram submetidos a uma transformação logarítmica [ $x = \log(x)$ ], visando minimizar os efeitos da distribuição não gaussiana dos dados (Gasser, Bächer e Möcks, 1982). Após a transformação logarítmica, as amostras foram submetidas ao teste de Levene (para avaliar a homogeneidade das variâncias) e ao teste de Shapiro-Wilkis (para investigar estatisticamente a proximidade da distribuição dos dados em relação à normalidade). Estes testes foram utilizados para avaliar se os dados podiam ser submetidos a análises paramétricas de variância.

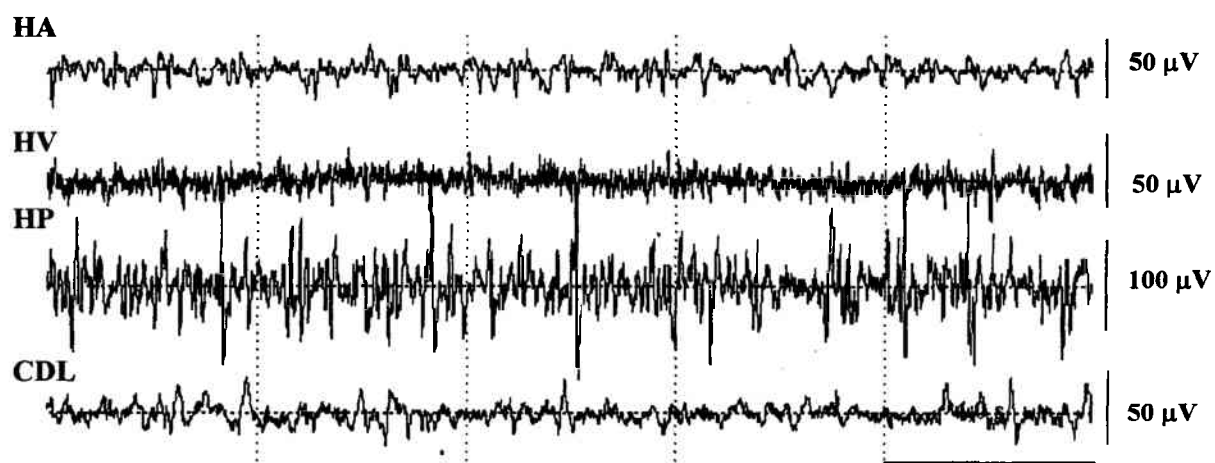
Após esta análise prévia, foi utilizada análise de variância (ANOVA de uma via), seguida, quando apropriado, de análise *post-hoc* de comparação entre médias pelo teste de Tukey (“Tukey honest significant difference test”, HSD). Em todos os testes estatísticos utilizados, o nível de significância adotado foi de  $P < 0.01$ . Para a comparação das diferenças entre as duas áreas (HP e HA) dos valores absolutos de potência total, borda espectral de 50 %, número de ondas e somatório das amplitudes, e das possíveis interações entre as áreas, foi utilizado o método de análise multivariada de duas vias (MANOVA). Esses procedimentos estatísticos foram realizados através de um programa estatístico apropriado (Statistica versão 4.5 - Statsoft Inc.).

### III - RESULTADOS

Para a aquisição e análise inicial dos registros eletroscilográficos, foram utilizados 33 pombos com combinações variadas de localização de eletrodos envolvendo, além do hipocampo (HP) (n = 14) e do hiperestriado acessório (HA) (n = 10) objetos de estudo do presente trabalho, a área corticóidea dorsolateral (CDL, n = 8) e do hiperestriado ventral (HV, n = 12). Dos 33 animais, 8 foram descartados por problemas relacionados a artefatos nos EOsG ou por erro na localização dos eletrodos de registro. Os registros nessas áreas foram feitos ora combinados com registros do hipocampo, ora com registros do hiperestriado acessório (Figura 5). No presente trabalho nos concentraremos na análise do EOsG obtido no hipocampo e no hiperestriado acessório.

#### 1. Hipocampo

A presente análise do eletroscilograma hipocampal (EOsG-hp) está baseada na observação de um total de 22 horas e 40 minutos (1360 minutos) de registros eletroscilográficos, obtidos de 14 pombos, (distribuídos em 68 arquivos de 20 minutos cada). Para cada um dos estados comportamentais a serem analisados, e em cada animal, foi selecionado um segmento de 20 segundos consecutivos, visando a análise quantitativa. Desta forma, foram computadas 280 épocas de um segundo para a análise quantitativa dos EOsG-hp para VA, VR, SOM e LUZ. Para os estudos do SOL, foram analisados 240 minutos de registro eletroscilográficos distribuídos em 12 arquivos de 20 minutos, obtidos de 4 animais. Desses, foram selecionados períodos de 20 segundos de registro de cada animal, resultando em 80 épocas de um segundo para a análise quantitativa. A partir dos registros de sono desses animais, foram selecionados e analisados 10 episódios de SP que totaliza-

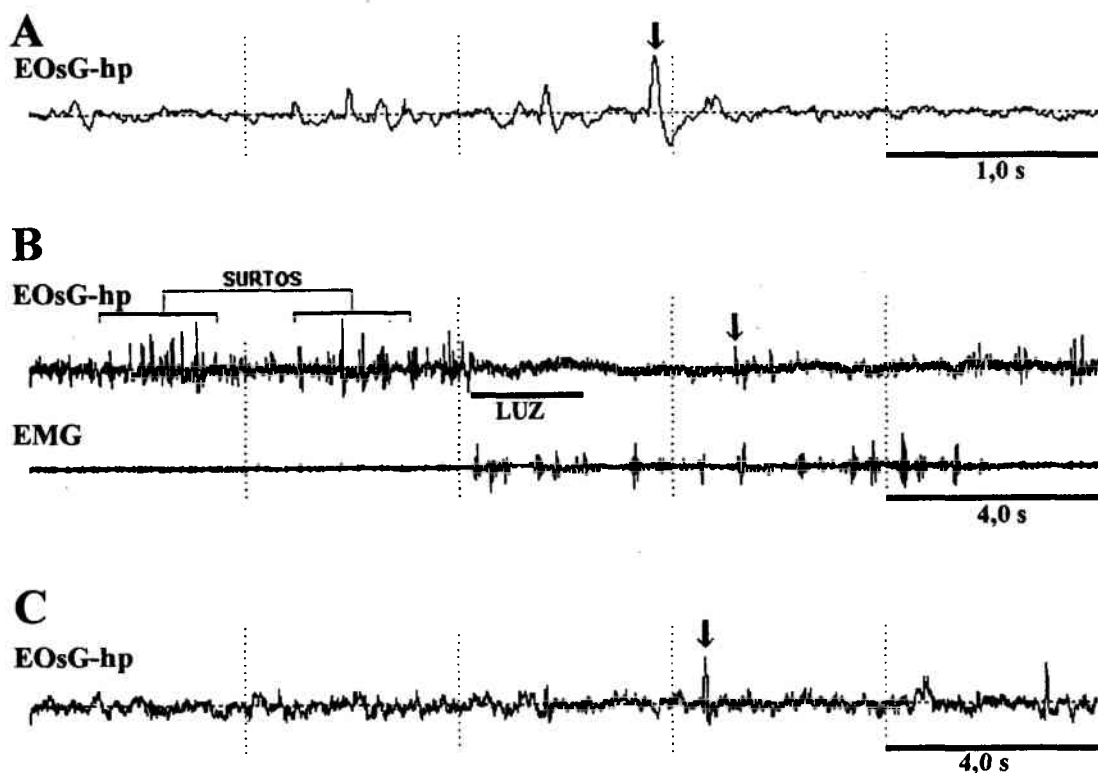


**Figura 5** - Aspecto geral do registro eletroscilográfico (segmento de 20 segundos), durante um período de vigília relaxada, no hiperestriado acessório (HA), no hiperestriado ventral (HV), no hipocampo (HP), e na área corticóideia dorsolateral (CDL).

ram 51 segundos. Como o sono paradoxal em aves é de curta duração, não foi possível fazer a mesma análise de 20 segundos consecutivos. As nossas amostras de SP variaram de 2 a 8 segundos com média de  $5,1 \pm 2,07$  segundos, valores compatíveis com as durações de SP relatadas para o pombo na literatura pertinente.

Durante os estados de alerta (VA, LUZ e SOM), os pombos movimentam-se intensamente por toda a gaiola. O pescoço geralmente se encontra ereto e a cabeça movimenta-se rápida e constantemente em todas as direções. Os olhos estão abertos ou com movimentos de piscar rápido, associados aos movimentos rápidos da cabeça, sugerindo um comportamento exploratório em relação ao ambiente de registro. Ocasionalmente, durante a VA, os pombos interrompem a atividade exploratória, permanecendo imóveis, com a cabeça elevada e olhos continuamente abertos. Tal estado é semelhante ao observado após os estímulos sonoro e luminoso, o que sugere que esteja associado a um alerta intenso. Também é durante a VA que eventualmente os animais manifestam comportamentos de auto limpeza e ingestão de alimentos.

A característica mais notável do EOsG-hp durante a VA, é a baixa amplitude do traçado (quando comparado a estados de VR e sono, ver adiante) (Figura 6C). Ocasionalmente, podem aparecer ondas em ponta, de grande amplitude (até 100  $\mu$ V), e de frequência entre 6 e 10 Hz (Figuras 6 e 8). A amplitude destas ondas se destaca da atividade de fundo do EOsG-hp. Tais ondas são referidas neste trabalho como PGAs (Pontas de Grande Amplitude). Durante a VA, as PGAs podem ocorrer isoladamente ou aos pares (Figura 6B e C), ocorrendo predominantemente como uma atividade bifásica. Entretanto elas desapareciam quando os pombos estavam andando. A incidência de PGAs durante a VA é bastante variável, oscilando de 0 (zero) a 18 ondas por segmento de 20 segundos



**Figura 6** - A - Segmento de 5 s de registro, no hipocampo, de um período de vigília relaxada evidenciando uma PGA (seta); B - Segmentos de 20 segundos do eletroscilograma do hipocampo e eletromiograma (EMG) durante vigília relaxada, apresentando dois surtos de ondas em ponta de grande amplitude (PGAs). Notar que, com a apresentação do estímulo luminoso (barra horizontal) há aumento da atividade motora, com desaparecimento das PGAs. Em seguida, à medida que diminui a atividade motora, as PGAs vão ressurgindo como atividades isoladas (seta) e gradativamente aumentando de amplitude. C - registro de vigília alerta espontânea (VA) com PGA isolada (seta). Barra de calibração = 100  $\mu$ V.

(total de 280 segundos analisados, em 14 animais), resultando em uma média de  $3,42 \pm 1,27$  por 20 s. A incidência média é de aproximadamente uma onda a cada 6 segundos.

Imediatamente após estimulação luminosa ou sonora, as PGAs desaparecem completamente (Figura 6B). Após um intervalo que varia de 5 a 10 segundos, elas começam a reaparecer gradualmente, como atividades isoladas e de pequena amplitude (por vezes menor que  $60 \mu\text{V}$ ), e vão aumentando de amplitude e de incidência ao longo dos 10 a 15 segundos restantes (Figura 6B). Após estimulação luminosa, a frequência de PGAs varia de 2 a 15 ondas por período de 20 segundos (total de 280 segundos) com média de  $5,21 \pm 0,99$ . A média de incidência das PGAs é de aproximadamente uma onda a cada 4 segundos. No alerta induzido pela estimulação sonora, o número de ondas varia de 2 a 8 ondas por período com uma média de  $3,42 \pm 0,58$  ondas PGAs por período de 20 segundos, com uma incidência de aproximadamente uma PGA a cada 6 segundos.

Após a estimulação sonora, os pombos apresentam maior atividade motora do que após estímulo com LUZ. Em que pese a média de PGAs em SOM ser aparentemente menor que em LUZ, não há diferença estatisticamente significativa, nem no intervalo entre o início dos estímulos LUZ e SOM com o surgimento da primeira PGA, nem no número de PGAs após estimulação sensorial [ $F(1,26)=2,40$ ,  $p=0,13$ ]. O aumento no número de PGAs observado a partir de 10 segundos após estímulos LUZ e SOM, é acompanhado de uma gradativa redução na atividade motora com os animais assumindo uma postura compatível com postura relaxada (ver Tabela 1). Vale notar que a incidência de PGAs em SOM, LUZ e VA são estatisticamente semelhantes.



Além das PGAs, o EOsG-hp é composto por uma atividade de fundo mista, com ondas de frequência e amplitude bastante variáveis (Figura 6C). A análise visual do traçados dos períodos de VA, ou após SOM e LUZ, permitiu observar a presença de ondas de baixa frequência (0 a 4 Hz), mesclada com ondas de frequências mais altas. Foi possível também observar que as ondas de frequências mais baixas são também de maiores amplitudes. Quanto mais alta a frequência da onda, menor é a sua amplitude, e mais difícil a sua visualização. As ondas mais lentas (de 0 a 4 Hz), se expressam com amplitudes de até 40  $\mu\text{V}$ . Durante a VA, ocasionalmente, ocorre um aumento acentuado de uma atividade entre 4 e 8 Hz. Essa atividade acontece em surtos que duram de 1 a 4 segundos e cuja amplitude ( $> 40 \mu\text{V}$ ) excede a da atividade de fundo ( $< 40 \mu\text{V}$ ). Elas aparecem como ondas sucessivas mescladas às PGAs e às ondas lentas.

Adicionalmente, ondas de 10 a 20 Hz aparecem mescladas com as ondas lentas, geralmente com amplitudes inferiores a 30  $\mu\text{V}$ . Essas ondas representam uma das atividades de fundo mais comuns do EOsG-hp. Durante as mudanças de estado elas variam de amplitude, aumentando durante a VR e SOL (ver adiante), e diminuindo durante VA, LUZ, SOM, sem desaparecerem do traçado. Finalmente, observamos a existência de uma atividade acima de 20 Hz, com amplitudes abaixo de 10  $\mu\text{V}$ , mesclada às outras atividades já descritas. Embora a avaliação qualitativa do comportamento dessas atividades seja prejudicada face a magnitude de suas voltagens, elas são bastante evidentes durante os estados de VA, LUZ e SOM devido principalmente à redução das atividades PGAs e das ondas lentas.

Em resumo, durante a VA, SOM e LUZ, observa-se um traçado eletroscilográfico geralmente de baixa amplitude (quando comparado com os traçados de estados mais

relaxados), ondas lentas de até 4 Hz que se sobressaem do traçado de fundo. Observa-se ainda atividade de fundo composta por ondas de frequências de 10 a 20 Hz, com amplitudes inferiores a 30  $\mu\text{V}$ , ondas acima de 20 Hz, com baixíssima amplitude ( $< 10 \mu\text{V}$ ), e a presença incidental de PGAs de ocorrência isolada ou aos pares.

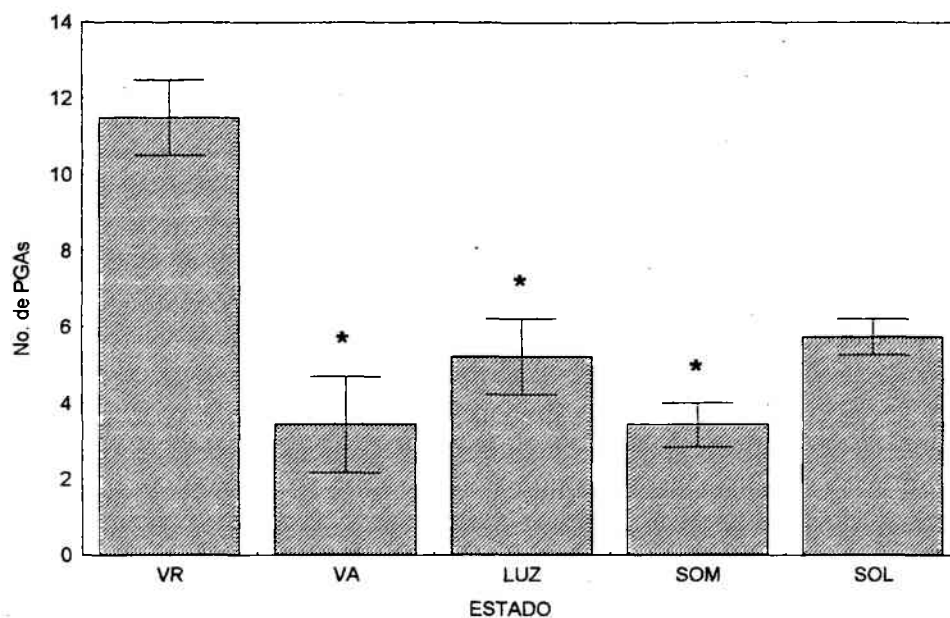
Durante a VR, os animais permanecem quietos sobre o piso em um dos cantos da gaiola e, na maioria das vezes, sobre o poleiro ou sobre o comedouro. A cabeça permanece a maior parte do tempo parada ou movimentando-se lateralmente e lentamente. Os olhos podem estar abertos, semi-abertos ou piscando lentamente. Na maioria das vezes, o piscar ocorre conjugado com os movimentos lentos da cabeça no plano horizontal. Durante os estados de sono (SOL e SP), os pombos assumem postura típica, de acordo com descrição no catálogo de eventos comportamentais (Tabela 1).

A primeira alteração visível no EOsG-hp durante os estados de VR e SOL (quando comparado com estados mais alertas, *e.g.* VA), é um aumento geral da amplitude das ondas do traçado (Figura 5, 6B, 8A). Acompanhando esse aumento, observa-se também um aumento na incidência e na amplitude das PGAs (até 150 $\mu\text{V}$ ). Com o aumento da incidência, as PGAs ocasionalmente ocorrem de forma isolada, mas, com mais frequência, ocorrem em surtos de 3 a 8 PGAs sucessivas (Figura 6 B). Durante tais surtos, os intervalos entre as ondas PGA variam de 0,5 segundos a 1,5 segundos. O conjunto dessas PGAs durante o surto, lembra a forma de um fuso. O surto inicia-se com ondas de baixa amplitude, que são sucedidas por ondas de voltagens progressivamente maiores, e em seguida, por ondas de voltagens progressivamente menores até o final do surto. Apesar do aumento na incidência e amplitude das PGAs, não são observadas alterações nas frequências dessas ondas (permanecendo, como na VA, entre 6 e 10 Hz).

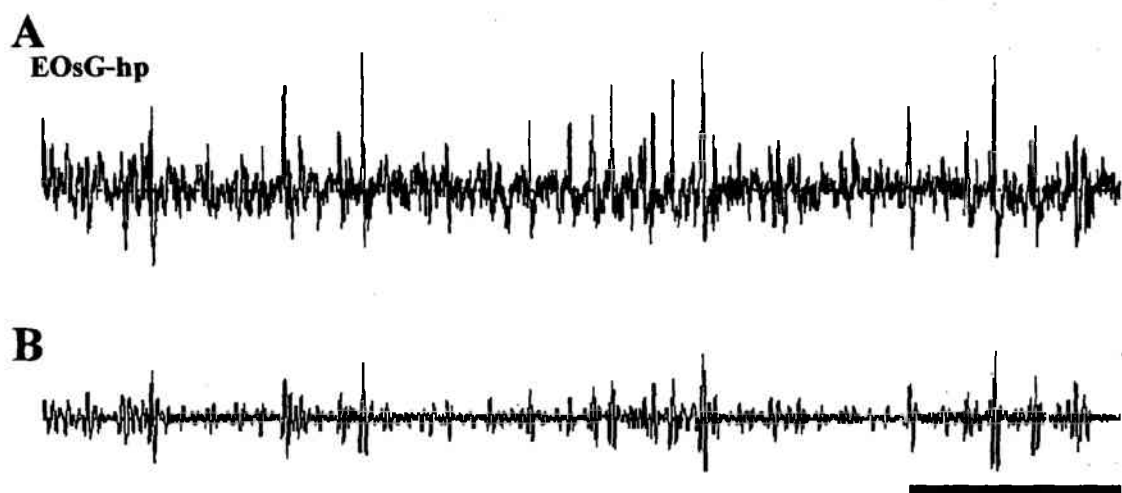
Durante a VR a incidência de PGAs varia de 7 a 18 ondas (média de  $11,50 \pm 0,98$ ) por segmento de 20 segundos. Essa distribuição significa uma incidência média de aproximadamente uma onda a cada 2 segundos ao longo dos 280 segmentos de um segundo analisados. Comparada com os estados de alerta, a incidência das PGAs é significativamente maior em VR que em VA, LUZ ou SOM (Figura 7). Nos registros de SOL ( $n = 4$  pombos), a incidência de PGAs varia de 5 a 7 ondas (média de  $5,75 \pm 0,47$ ) por período de 20 segundos, resultando em uma incidência média de aproximadamente uma onda a cada 4 segundos para os 80 segmentos de um segundo analisados. A média de incidência de PGAs no SOL não é estatisticamente diferente da média dos estados ativos. Por outro lado, ao compararmos médias de PGAs do SOL ( $5,75 \pm 0,47$ ) com a média da VR ( $11,50 \pm 0,98$ ), apesar de aparentemente serem diferentes, essa diferença também não é estatisticamente significante [ $F(4,55)=11,85$ ,  $p=0.051$ ].

Ao final desta etapa da análise, submetemos os segmentos de registros eletroscilográficos hipocampais a um filtro digital de fase linear passa-faixa de 6,5 a 9,0 Hz (disponível no SAASBIO). Ao compararmos o sinal original do EOsG-hp com o sinal filtrado, notamos que as atividades de maior amplitude do sinal filtrado coincidem com as atividades PGAs, e mais intensamente, com os surtos de atividades PGAs (Figuras 8A e B), confirmando a impressão obtida durante a análise visual, a respeito das frequências das PGAs.

Com o objetivo de investigar a possibilidade das PGAs serem originadas por outros tecidos não neuronal, alguns animais foram submetidos a uma preparação cirúrgica especial. Foram implantados: um par de eletrodos bipolares sobre o hipocampo (ver materiais e métodos) para registro do EOsG-hp; um par de eletrodos para registro do eletrooculograma; um par de eletrodos para registro do eletrocardiograma



**Figura 7** - Médias de incidência (média  $\pm$  E.P.M.) de ondas em ponta de grande amplitude (PGAs), em períodos de vigília relaxada (VR), vigília alerta (VA), alerta após estímulo luminoso (LUZ) e sonoro (SOM) e sono de ondas lentas (SOL). (\*) diferenças significantes ( $p < 0,01$ ) em relação a VR. O sono paradoxal não está incluído no gráfico porque não houve ocorrência de PGAs durante esse estado.



**Figura 8 - A)** - Registro de 20 segundos de EOsG-hp durante VR; **B)** - o mesmo sinal processado por um filtro de fase linear passa - faixa de 6,5 a 9,0 Hz. As maiores amplitudes no sinal filtrado coincidem com os grupamentos de PGAs do hipocampo. Barras de calibração: vertical = 100  $\mu$ V; horizontal = 4 s.

(correspondente a derivação D I); e registro do eletromiograma. Adicionalmente foi feito o acompanhamento visual dos movimentos respiratórios. Esses registros permitiram que se eliminasse, com segurança, a possibilidade de que as PGAs pudessem representar algum tipo de artefato provocado por alguma dessas variáveis.

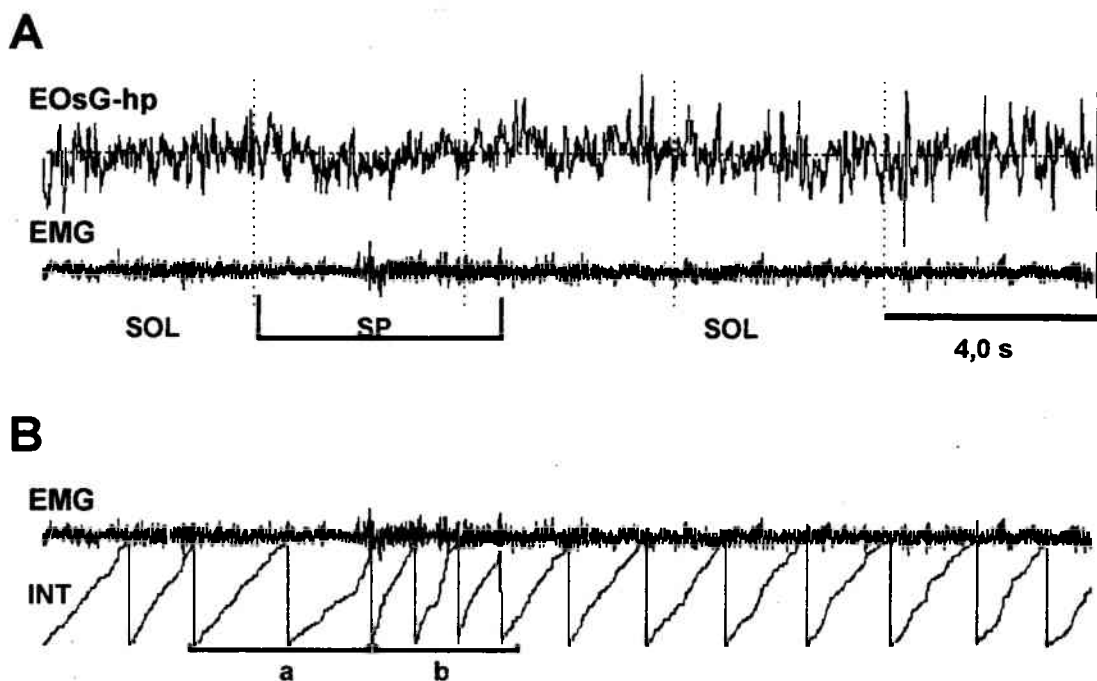
A duração dos episódios de sono paradoxal variou entre 2 e 8 segundos, com média de  $5,1 \pm 2,07$  segundos. Em nenhum dos episódios analisados constatou-se a presença de PGAs (Figura 9). Durante o SP há uma diminuição geral da amplitude do traçado eletroscilográfico, evidenciando as atividades de mais alta frequência. Essas características eletroscilográficas tornam o EOsG hipocampal do SP semelhantes aos dos períodos de VA, SOM e LUZ em que não estão presentes as PGAs.

A análise quantitativa do EOsG-hp confirma e estende as observações feitas com base na análise visual, e evidencia aspectos não identificados através da análise qualitativa (visual). Além disso, a análise quantitativa mostra que ocorrem diferenças notáveis entre os estados comportamentais VA, SOM, LUZ, VR, SOL e SP, nas potências totais absolutas (derivadas da análise espectral) e dos somatários das amplitudes (derivados da análise aperiódica) (Tabela 2).

**Tabela - 2 - EOsG Hipocampal - Resultados da análise espectral (potência total e borda espectral de 50 %), e da análise aperiódica (somatório das amplitudes e número de ondas).**

	POTÊNCIA TOTAL ( $\mu V^2/Hz$ )	BORDA ESPECTRAL DE 50% (Hz)	NÚMERO DE ONDAS (ONDAS/s)	AMPLITUDE ( $\mu V/s$ )
V. A.	$154,64 \pm 7,38*$	$6,62 \pm 0,13$	$12,16 \pm 0,16*$	$170,50 \pm 4,27*$
LUZ	$235,07 \pm 15,54*$	$6,55 \pm 0,13$	$12,09 \pm 0,15*$	$187,97 \pm 5,42*$
SOM	$200,23 \pm 12,08*$	$6,45 \pm 0,12$	$12,38 \pm 0,16*$	$186,77 \pm 5,87*$
V. R.	$478,62 \pm 27,30$	$6,48 \pm 0,12$	$13,27 \pm 0,14$	$285,03 \pm 7,84$
SOL	$514,20 \pm 49,57$	$4,93 \pm 0,19*$	$12,58 \pm 0,23$	$234,66 \pm 7,90 *#$
S. P.	$112,04 \pm 10,11*$	$5,89 \pm 0,23$	$11,76 \pm 0,32*$	$135,97 \pm 4,98*$

(\* ) - Diferenças em relação a VR; (#) - diferenças em relação a VA. Nível de significância,  $p < 0,01$ .



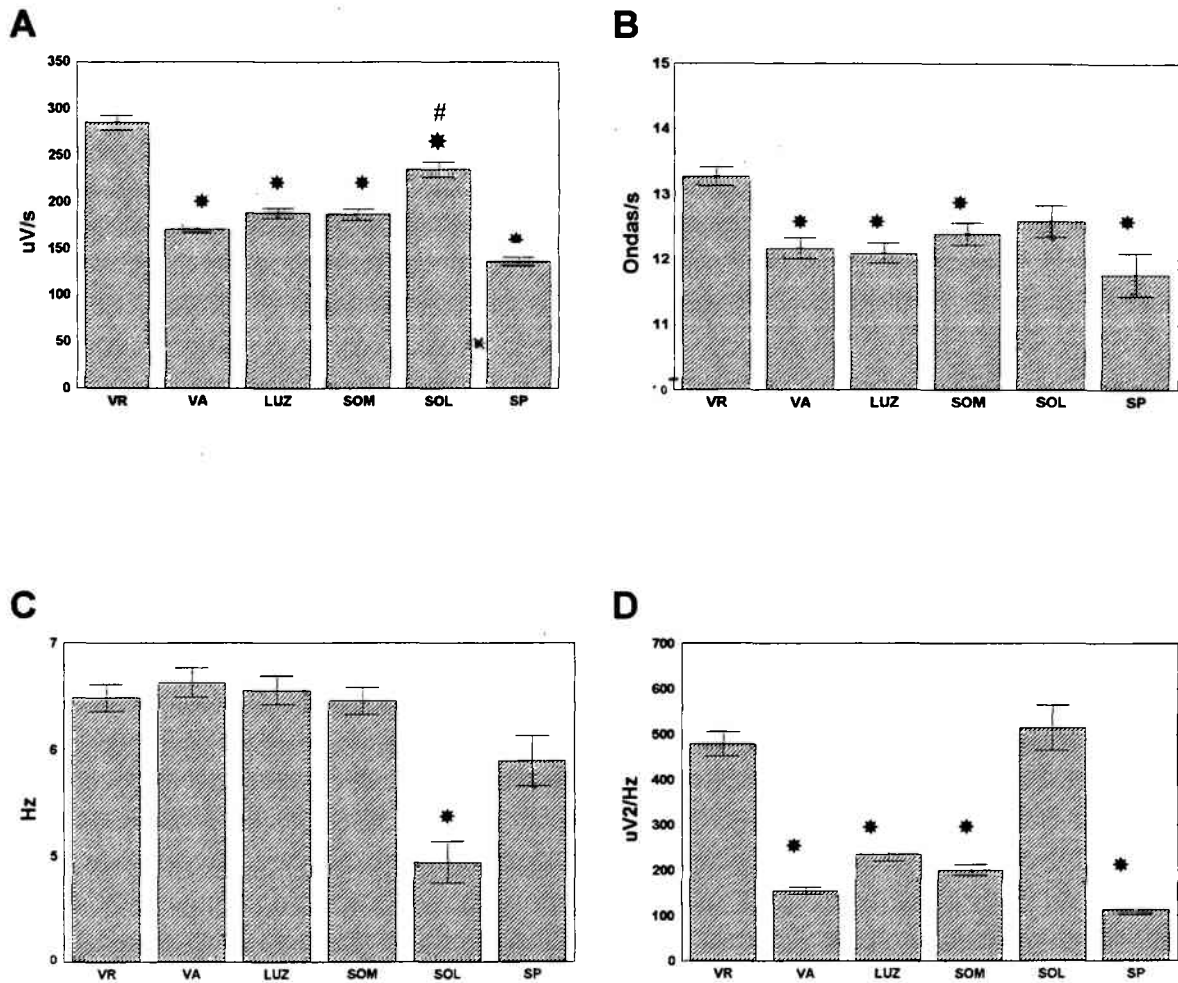
**Figura 9** - Registro eletroscilográfico do hipocampo durante um período de sono. A) - EOsG-hp e EMG durante um período de sono de ondas lentas (SOL), interrompido por um breve período de sono paradoxal (SP). Notar a diminuição na amplitude geral do traçado e desaparecimento das PGAs durante o SP. B) - O sinal eletromiográfico (EMG) simultâneo ao registro em A foi integrado (INT- integral do quadrado do sinal com reset), evidenciando a diminuição do tônus da musculatura do pescoço no início do SP (indicado pela barra horizontal "a"). Logo após há um aumento do tônus durante a reelevação da cabeça, ainda durante o SP (indicado pela barra horizontal "b"). Barra de calibração = 100  $\mu$ V.

Durante a VA os valores médios de potência total são bastante reduzidos. Entretanto estes valores não diferem estatisticamente daqueles observados durante o alerta após estimulação sensorial (SOM e LUZ), e durante o sono paradoxal (Tabela 2 e Figura 10D). Por outro lado, as potências totais médias da VR e do SOL são significativamente maiores do que a média durante os estados de alerta e de SP [ $F(5, 1245) = 54,13, p = 0,00002$ ]. A borda espectral de 50 % (Figura 10C), não varia entre os estados de VA, VR, SOM, LUZ e SP. Somente durante o SOL a borda espectral é significativamente menor do que nos outros estados [ $F(5, 1245) = 8,85, p=0,00002$ ].

Em resumo, a análise estatística indica que a potência total não sofre alterações significativas quando o animal encontra-se em qualquer um dos estados de vigília alerta, ou durante o SP. Também sugere que não há diferenças nas potências totais entre os estados de VR e SOL. Mas nos dois estados, as potências totais são significativamente maiores do que durante os estados mais alertas (VA, SOM e LUZ), e do que durante o sono paradoxal. A borda espectral de 50 % não varia entre os estados exceto durante o SOL, no qual ocorre uma redução significativa. O fato da borda espectral não ter variado de frequência na maioria dos estados analisados, associado às variações significativas no somatório das amplitude do EOsG hipocampal entre os diferentes estados, sugere que não existe alteração significativa na contribuição das potências relativas de cada uma das frequências do espectro na composição da potência total. Entretanto a redução da borda espectral durante o SOL mais o aumento na potência total e amplitude, sugerem que existe um aumento da participação das frequências mais baixas, tanto na composição do espectro, quanto na composição da potência total durante esse estado.

A Tabela 2 mostra que não há diferenças na média do número de ondas do EOsG hipocampal entre a VA e os estados de LUZ, SOM e SP. Durante a VR e SOL ocorre um



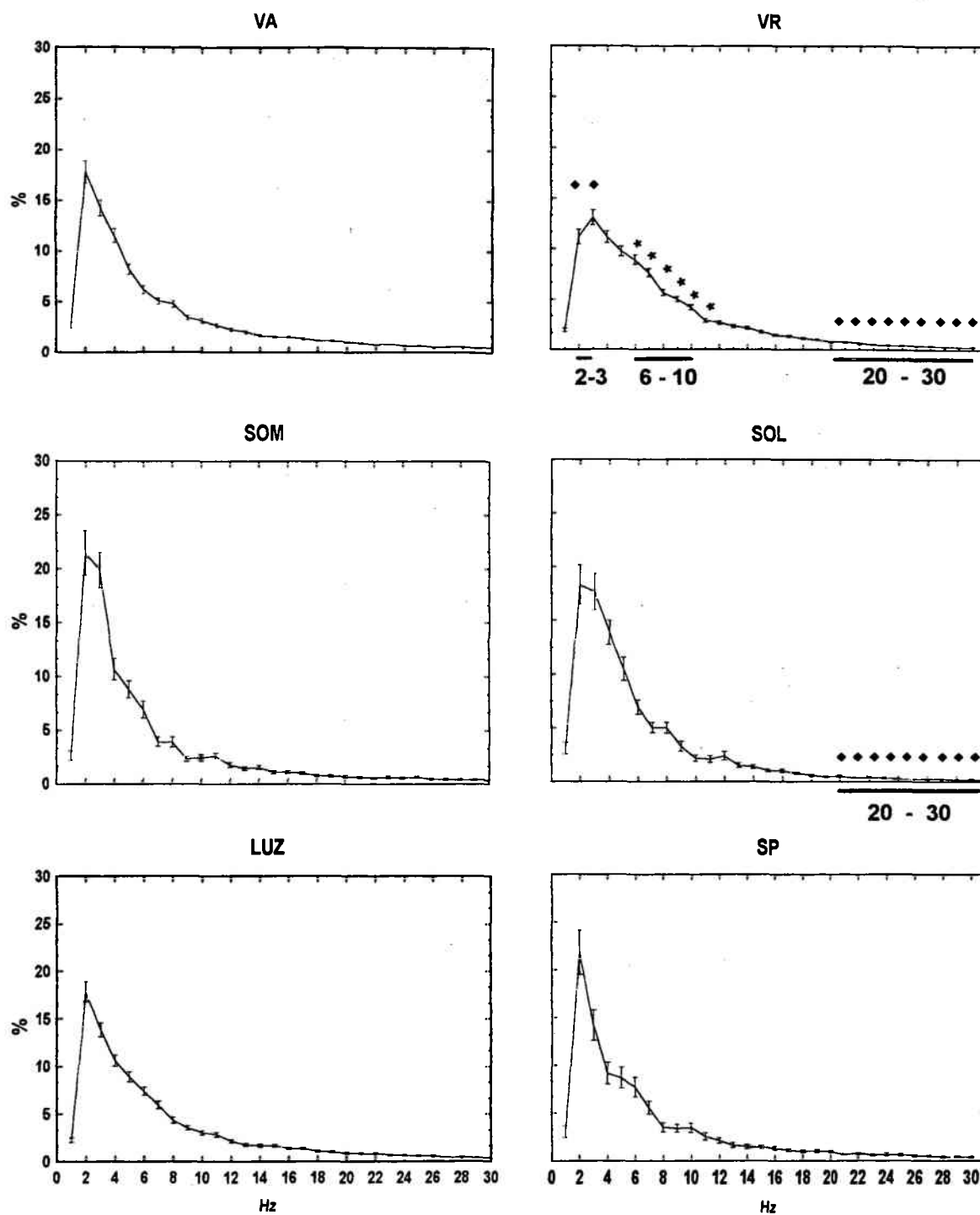


**Figura 10** - Alterações do EOsG hipocampal nos diferentes estados comportamentais (média  $\pm$  E.P.M). **A** - Somatório das amplitudes. **B** - Número de ondas por segundo. **C** - Borda espectral de 50%. **D** - Potências absolutas totais. Ver texto para abreviações. Os sinais (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação a VR ( $p < 0,01$ ). (#) indica diferença em relação a VA.

aumento significativo no número de ondas em relação a todos os outros estados [ $F(5, 1245) = 8,35, p = 0,00002$ ] (Figura 10B). A média do somatório das amplitudes não varia entre a VA, LUZ, SOM e SP (Figura 10A), mas significativamente menor do que durante a VR [ $F(5, 1245) = 55,59, p = 0,00002$ ]. O estado de sono de ondas lentas tem um somatório das amplitudes menor do que a VR, mas significativamente maior do que durante os outros estados ( $p < 0,001$ ).

Resumindo, a presente análise sugere que, em relação ao número de ondas: a) durante a VR e SOL a incidência de ondas é significativamente maior do que nos outros estados; b) não há diferenças entre os estados de vigília alerta, SOM, LUZ e sono paradoxal. Em relação ao somatório das amplitudes observa-se que: a) durante a VR ocorre o maior somatório das amplitudes; b) no SOL o somatório das amplitudes é menor do que no VR, mas é significativamente maior do que nos demais estados; c) não há diferenças significantes entre os estados de VA, SOM, LUZ e SP.

A figura 11 mostra os espectrogramas (potências relativas médias) nas frequências de 0 a 30 Hz do EOsG hipocampal. Algumas características desses espectrogramas são comuns a todos os estados estudados. A frequência de 0 a 1 Hz tem uma potência relativa bastante baixa em todos os estados. Há um aumento acentuado das potências relativas nas frequências entre 1 e 4 Hz, com predomínio na banda de 2 Hz. A partir de 2 Hz, começa a ocorrer um declínio gradativo dessas potências. Entretanto, volta a ocorrer um aumento das potências relativas na faixa de 6 a 10 Hz. Esse aumento provoca uma elevação no traçado espectrográfico, assumindo a forma de um “calombo” que interrompe a redução progressiva e monótona das potências (relativas) das frequências do espectro. Esse calombo é um dos principais determinantes do perfil característico do EOsG hipocampal. Após o calombo, nas frequências mais altas, as potências relativas voltam a



**Figura 11** - Espectrogramas do EOGG-hp (média  $\pm$  E.P.M) de 1 a 30 Hz. Nas abscissas estão representadas as potências relativas (em relação à potência total absoluta). Nas ordenadas estão representadas as frequências em Hertz. Os (◆) indicam porcentagens significativamente menores do que em VA. Os (\*) em VR, nas frequências de 6 a 10 Hz, indicam porcentagens significativamente maiores do que nos demais estados. Em todos os casos,  $p < 0,01$ . Ver abreviações no texto.

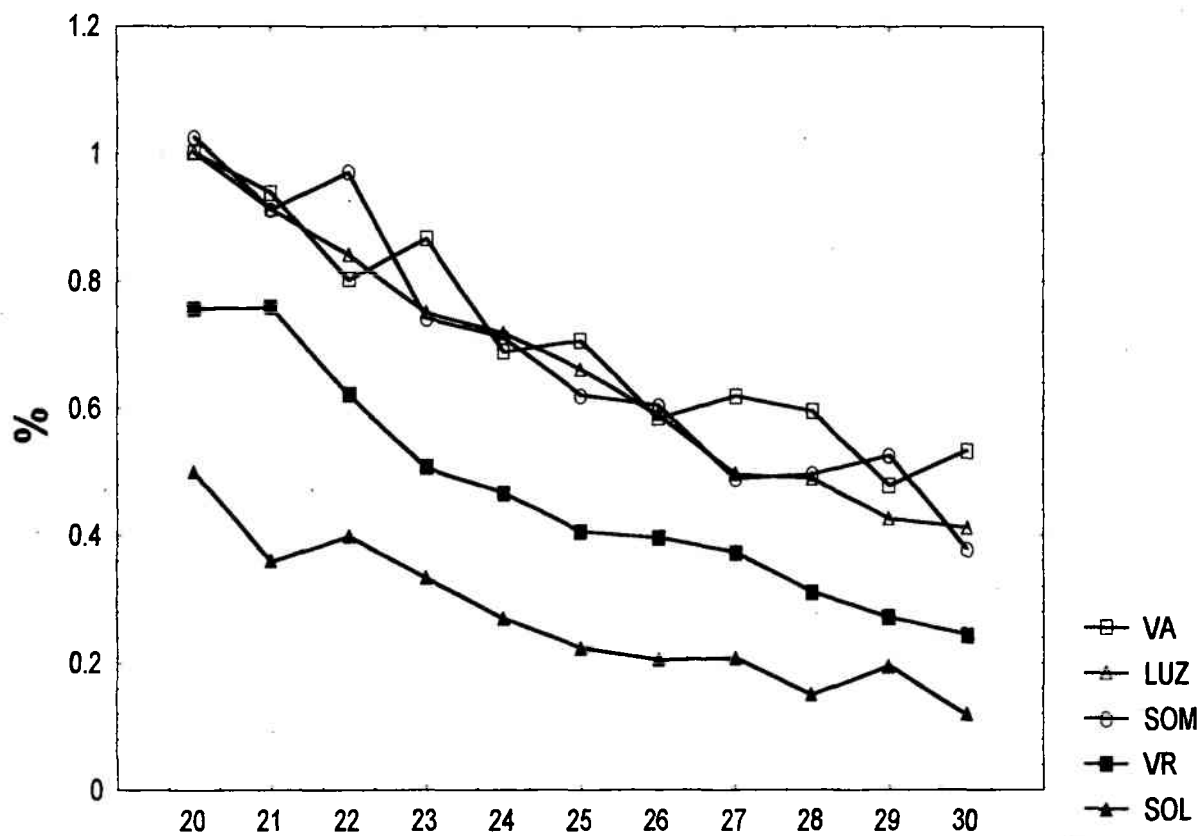
diminuir. A avaliação estatística das diferenças nas potências relativas do espectrograma hipocampal, nos diversos estados, indica que existem pelo menos 3 grupamentos de atividades, cujas contribuições ao espectro são afetadas pelo estado comportamental. O primeiro se encontra em torno de 2 Hz, um segundo grupo de atividade na banda de 6 a 10 Hz e um terceiro grupo envolvendo as atividades de mais alta frequência, acima de 20 Hz (Figura 12).

Durante a VA ocorre uma grande concentração de energia em torno de 2 Hz. A potência média dessa atividade durante a VA é de  $16,9 \pm 0,9$  % da potência total. Esses índices são similares para todos os outros estados comportamentais (LUZ: 16,6 %; SOM: 15,6 %; SOL: 18,3 % e SP: 21,8 %) excetuando-se a VR, na qual a contribuição relativa dessa frequência ( $11,2 \pm 0,7$  %) é significativamente menor que em todos os demais estados [ $F(5, 1245) = 8,37, p = 0,00005$ ]. Assim, potências relativas em 2 Hz significativamente menores que nos demais estados aparentemente caracterizam o espectrograma da VR.

Em nenhum dos estados analisados foram encontradas diferenças significantes na atividade eletroscilográfica na banda de 3 a 5 Hz. Logo acima desta banda, na faixa abrangendo as frequências de 6 a 10 Hz, durante a VR observamos um aumento acentuado nas potências relativas em relação aos demais estados. Enquanto que durante a VA, LUZ, SOM, SOL e SP há uma concentração de 23,5 % em média na banda de 6 a 10 Hz, na VR essa atividade atinge 31,23 % da energia da potência total, porcentagem significativamente maior que a dos demais estados. O aumento significativo da potência relativa na banda de 6 a 10 Hz, é um outro aspecto característico da VR.

Nas frequências de 10 até 19 Hz, as potências relativas médias se mostram estatisticamente semelhantes na comparação entre os estados. As menores potências relativas

**POTÊNCIAS RELATIVAS DE 20 A 30 Hz  
HIPOCAMPO**



**Figura 12** - Espectrogramas relativos médios do EOsG-hp nas frequências de 20 a 30 Hz, em diferentes estados comportamentais. Os valores médios das potências relativas em VA, SOM e LUZ, são significativamente maiores ( $p < 0,01$ ) do que em VR e SOL, para todas as frequências acima indicadas.

do espectrograma hipocampal em todos os estados, ocorrem na faixa de 20 a 30 Hz. Entretanto, nos estados de VA, LUZ, SOM e SP, nota-se um aumento acentuado das potências relativas dessa banda em relação a VR e SOL. Durante a VA há uma concentração de 7,82 % da potência total nessa banda de frequência. Nos demais estados ativados (LUZ e SOM) e SP, as potências relativas distribuem-se de maneira estatisticamente semelhante à da VA. Reduções significantes de atividade nessa faixa de frequência são observadas durante o SOL (2,96 %) e VR (5,11 %). Essas diferenças são visualizadas nos espectrogramas contendo apenas a banda de 20 a 30 Hz (Figura 12).

Em resumo, no hipocampo, as maiores potências totais ocorrem durante o SOL e VR. Entretanto, o SOL apresenta uma maior concentração de potência relativa na banda de 2 Hz (18,3 %) do que durante a VR (11,2 %). Por outro lado, há uma maior concentração da potência relativa na banda de 6 a 10 Hz durante a VR (31,2 %), do que durante o SOL (22,4 %). Durante o SOL há uma sensível redução nas potências relativas na banda de 20 a 30 Hz em relação aos estados de alerta e em relação a VR. Quanto aos surtos de PGAs, embora não existindo diferença significativa entre os dois estados ( $p = 0,051$ ), parece existir uma maior tendência de ocorrência na VR do que no SOL - isto na análise visual. Os estados de alerta espontâneo e provocados por estimulação sensorial, apresentam potências totais reduzidas em relação a VR e SOL. Porém, também expressam alta potência relativa na banda de 2 Hz. Além disso, a atividade na banda de 6 a 10 Hz, e a incidência de PGAs, são sensivelmente menores nesses estados de alerta do que na VR. Finalmente, as maiores potências relativas na banda de 20 a 30 Hz, ocorrem nos estados de VA, LUZ, SOM e SP.

Assim, a presente análise indica que existem diferenças quantitativas acentuadas no EOsG-hp entre os estados comportamentais, que permitem identificar 3 padrões ele-

troscilográficos. Um primeiro padrão, identificado durante os estados de VA, SOM, LUZ e SP, é caracterizado por apresentar os menores valores de potência total e amplitude; apresenta valores significativamente mais altos de potência relativa na banda de 2 Hz e há uma redução na incidência de PGAs em relação aos outros estados. A atividade na banda de 6 a 10 Hz está diminuída e apresenta as mais altas potências relativas na banda de 20 a 30 Hz.

Um segundo padrão, característico da VR, tem potência total e amplitudes altas em relação ao primeiro padrão. É durante a VR que ocorre o maior número de PGAs. O espectrograma da VR é caracterizado por baixa atividade relativa na banda de 2 Hz, alta atividade na banda de 6 a 10 Hz e baixa potência relativa na banda de 20 a 30 Hz.

O terceiro padrão, característico do SOL, assim como o segundo, apresenta altos valores de potência total e amplitude. O número de PGAs é aparentemente menor do que durante a VR. A distribuição das potências relativas no espectrograma é caracterizado por alta potência na banda de 2 Hz, baixa atividade na banda de 6 a 10 Hz, e concentra os menores valores de potência relativa na banda de 20 a 30 Hz.

A análise de grupamento realizada nos espectrogramas relativos, sugere a existência de duas grandes famílias de frequências ou atividades em qualquer estado comportamental. Entretanto, podemos extrair alguns subgrupos (subfamílias) de frequências, que são diferentes entre os estados propostos. Na análise de grupamentos do EOsG-hp da VA, SOM, LUZ e SP, foi possível identificar uma primeira família formada pelas frequências de 1 a 10 Hz, e uma segunda família formada pelas frequências de 11 a 30 Hz (Figura 13). Da primeira família pode ser extraído um grupamento abrangendo as frequências de 2 a 3 Hz, e outro abrangendo as frequências de 4 a 10 Hz. A segunda família

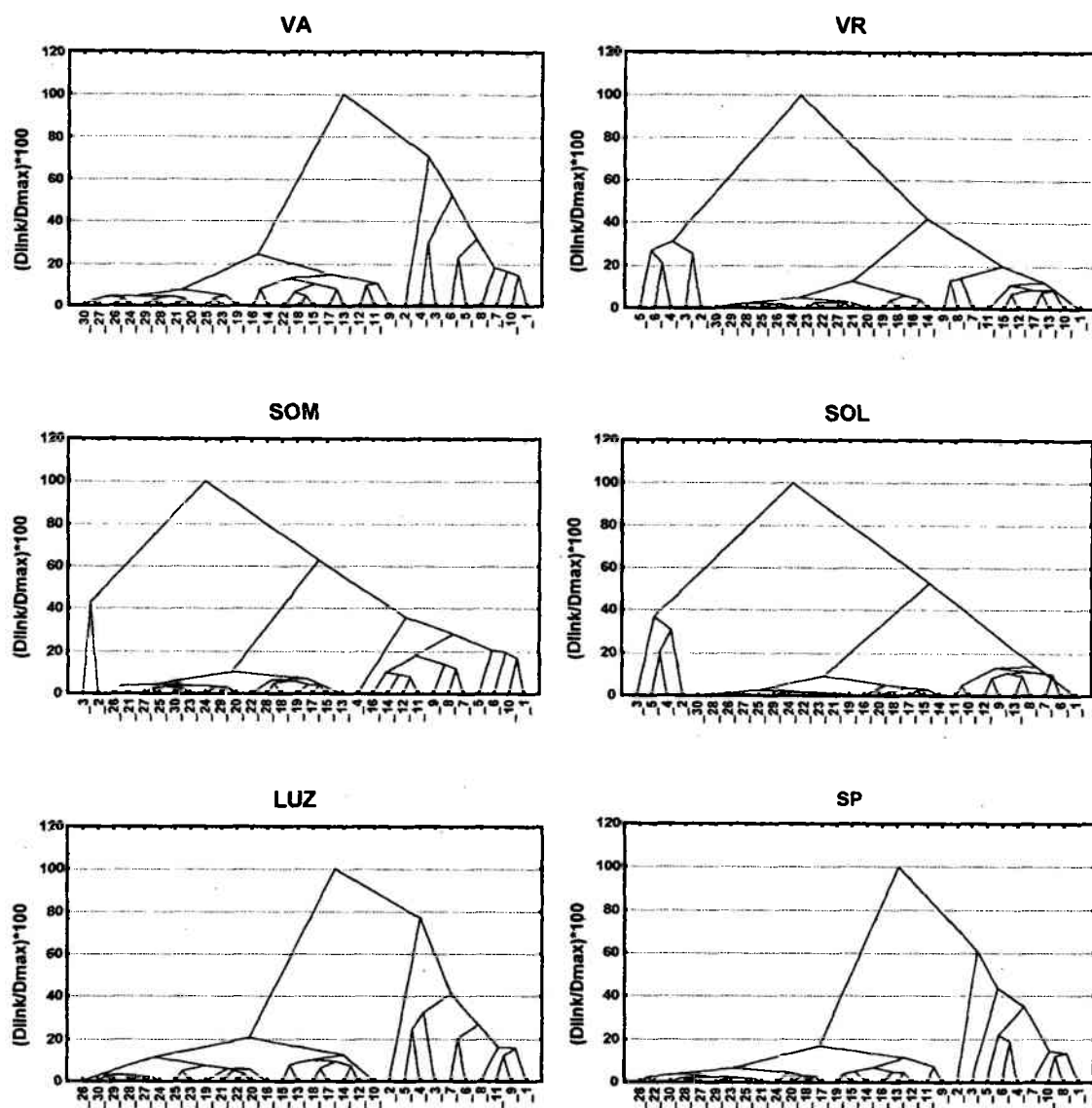
dá origem a um grupamento contendo as frequências de 11 a 19 Hz, e outro envolvendo as frequências de 20 a 30 Hz.

A análise de grupamentos do EOsG-hp da VR e do SOL, indica a existência de uma família de frequências englobando as frequências de 2 a 5 Hz, e outra contendo as frequências de 6 a 30 Hz. A primeira família é bastante homogênea e não é subdividida. A segunda família pode ser dividida em dois subgrupos. Um subgrupo das frequências de 6 a 13 Hz, e outro abrangendo as frequências de 14 a 30 Hz.

Ao avaliarmos os resultados da análise de grupamentos dos espectrogramas relativos do estados de vigília alerta ou vigília provocada por som e luz, podemos notar semelhanças importantes com as demais análises realizadas. O grupamento de 2 a 3 Hz é coincidente com o pico identificado no espectrograma, e coincidente com a atividade diferenciada característica dos estados de alerta, identificada através da análise estatística. O grupamento de 4 a 10 Hz, envolve as frequências do “calombo”, que é pouco diferenciado nestes estados de alerta. O grupo formado pelas frequências de 11 a 19 Hz, envolve a banda de frequências cujas potências relativas não sofrem alterações entre os diferentes estados comportamentais. Enquanto que o grupamento das frequências de 20 a 30 Hz, reproduz a banda identificada na análise estatística, como tendo potências relativas significativamente diferentes entre os estados de diferentes níveis de alerta.

A avaliação da análise de grupamentos dos espectrogramas hipocampais da VR e do SOL, mostra que o grupamento de 2 a 5 Hz corresponde ao platô nítido na VR. O segundo grupamento, de 6 a 13 Hz, envolve as frequências das PGAs e do calombo, característicos da VR. Finalmente o último grupamento (14 a 30 Hz), que envolve as frequências cujas potências relativas não variam entre os estados, e as frequências de 20 a 30 Hz que são pouco expressivas nestes estados de menor alerta.





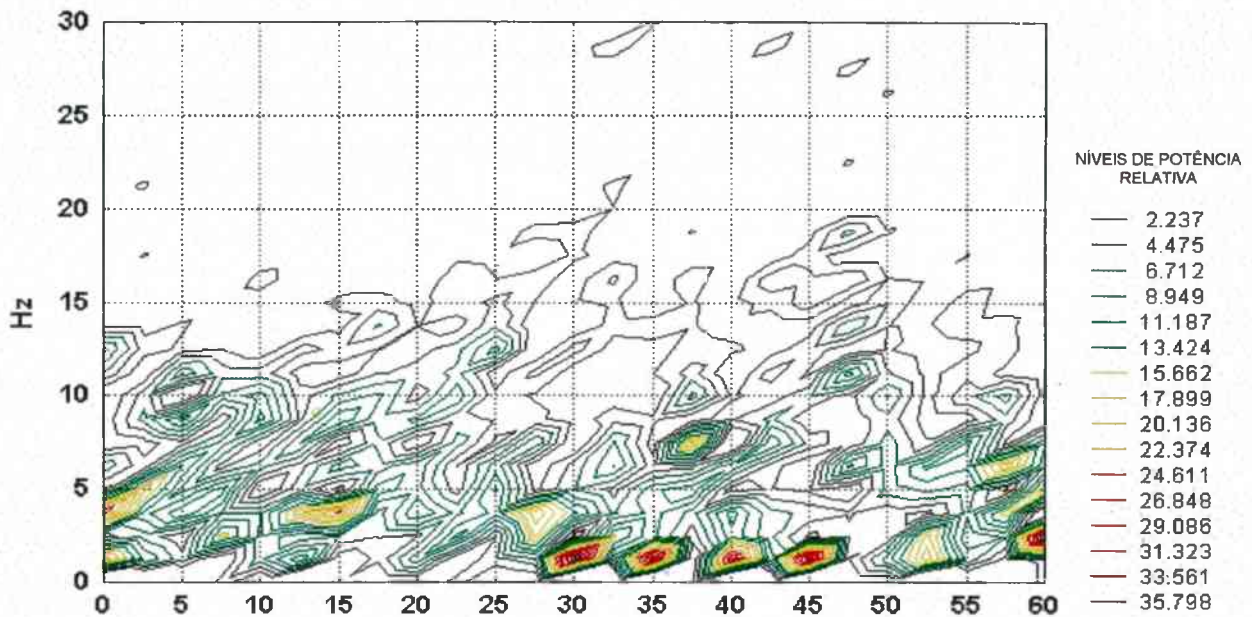
**Figura 13** - Análise de grupamentos (*cluster analysis*) das frequências de 1 a 30 Hz, de acordo com as respectivas potências relativas. Nos eixos das ordenadas estão representadas as distâncias relativas entre os elementos de cada grupamento (frequências), e a distância relativa entre os grupamentos e a distância máxima. Nos eixos das abscissas estão representadas as frequências do espectro do EOsg-hp dos pombos. A distribuição das frequências, ao longo das abscissas, é feita de acordo com os grupamentos identificados pelo método. Comparando-se os gráficos de cada estado comportamental, percebemos dois perfis de grupamentos, tanto na forma dos gráficos quanto nos elementos (frequências) componentes desses grupamentos. Um perfil característico para os estados ativados e SP, e outro característico de VR e SOL. Ver texto para detalhes.

O estudo de espectrogramas de um determinado período de tempo (janela), acima descrito, permite identificar o perfil médio de distribuição das potências relativas das diferentes frequências de um sinal complexo contido nessa janela. Entretanto esse estudo não permite observar as mudanças ao longo do registro. Assim, torna-se importante analisar essa distribuição momento a momento, através de espectrogramas sucessivos, segundo a segundo. Todavia, esse procedimento habitualmente requer um gráfico tridimensional, no qual múltiplos espectrogramas são traçados. Tais representações dificultam a análise de mudanças sutis que possam estar ocorrendo ao longo do tempo nas diversas frequências. Para reduzirmos essa dificuldade, usamos o recurso da projeção em um plano das representações tridimensionais do espectro ao longo do tempo. Nesta projeção plana, os “picos” e os “vales” sucessivos dos diversos espectrogramas são reduzidos a limites topográficos, à semelhança de curvas de nível utilizados em cartas topográficas. As potências relativas (%), são representadas através de diferentes cores delimitadas em áreas (contornos) de acordo com as variações nos valores de potência, para cada frequência do espectro ao longo do tempo.

A figura 14 ilustra a utilização deste procedimento. A figura 14A mostra a projeção plana das potências relativas do EOsG hipocampal, obtida através da análise espectral do traçado original do EOsG-hp mostrado na figura 14B. Os 60 segundos de registro compreendem um segmento inicial de VR, seguido de um período de VA provocada por estimulação luminosa (LUZ) e um período de recuperação. Durante o período de VR inicial, há uma concentração quase total das potências relativas nas frequências entre 2 e 12 Hz. Com o alerta provocado pela estimulação luminosa, as potências se concentram mais em torno de 2 Hz, associado a um aumento da atividade nas frequências acima de 15 Hz. O traçado inferior na figura 14B corresponde ao registro de EMG do pescoço do pombo. Durante a VR a atividade eletromiográfica é baixa, há um aumento com a ativa-

A

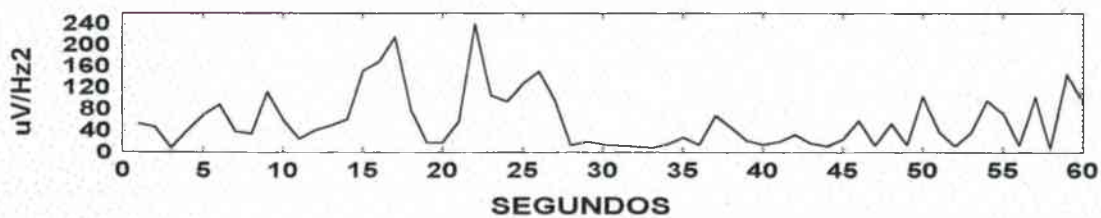
POTÊNCIAS RELATIVAS DE 1 A 30 Hz  
HIPOCAMPO



B



C



**Figura 14** - A) Projeção plana das potências relativas de 0 a 30 Hz, obtidas da análise espectral, de ondas consecutivas de 1 s, do registro de 60 segundos do EOsG-hp de um pombo. Os contornos coloridos delimitam faixas de potências relativas das diversas frequências ao longo do período registrado. B) O traçado superior representa o registro original do EOsG-hp que foi submetido à análise espectral para a extração das potências relativas. O traçado inferior representa o registro eletromiográfico da musculatura posterior do pescoço do animal, obtido simultaneamente ao EOsG-hp. C) Potências absolutas totais do EOsG-hp visto em B. O traçado analisado é constituído de um período de cerca de 25 segundos de VR seguido de estímulo luminoso, e de um período de recuperação. Observar a relação entre redução na potência total (C), e redução da amplitude do EOsG-hp (B) com aumento da potência relativa nas frequências acima de 15 Hz (em A), que ocorre com a apresentação de LUZ. Barra horizontal (B - traçado inferior) igual a 12 segundos.

ção provocada pela LUZ, e novamente uma redução do tônus, concomitante ao aumento das amplitudes do EOsG-hp. A figura 14C representa um gráfico das potências totais segundo a segundo do mesmo período. Os maiores valores nas potências totais coincidem com a ocorrência dos dois surtos de PGAs, seguido por um período de redução intensa da potência total durante e após a estimulação luminosa. Notar que ao mesmo tempo que a atividade motora começa a diminuir, a potência total volta a aumentar.

Na figura 15 estão as projeções planas de espectrogramas de amostras contínuas de 20 segundos do EOsG hipocampal, representativos de dois estados (VA e VR). Estas indicam que a distribuição das potências relativas, na diversas freqüências do espectrograma, muda de acordo com o estado comportamental do animal, e que também varia com o decorrer do tempo num mesmo estado. Assim, durante a VA (Figura 15A) parece existir uma variação cíclica nas potências das freqüências entre 1 e 5 Hz. Os períodos de aumento de potência nessa banda, se repetem a aproximadamente cada 4 a 5 segundos. Nos estados ativados (e.g. VA), a atividade cíclica torna-se mais aparente nas freqüências mais baixas, em torno de 2 Hz. Nas freqüências mais altas (Figura 15C) parece não existir essa variação cíclica de potência.

Na análise de autocorrelação (Figura 16) nota-se que, durante a VR, o hipocampo apresenta coeficientes de autocorrelação significantes nas freqüências em torno de 5,2 Hz e em torno de 2,5 Hz, e uma correlação com um coeficiente mais expressivo, nas freqüências entre 1 e 1,3 Hz (Figura 16D). Estes dados parecem sugerir que, durante a VR, deve existir alguma atividade rítmica em torno de 5 Hz. Entretanto, o maior coeficiente de autocorrelação próximo a 1 Hz durante a VR, sugere que uma outra atividade significante parece estar ocorrendo nessa freqüência.

**Figura 15** - **A)** Projeção plana das potências relativas de 0 a 30 Hz, de um registro de 20 segundos do EOsG-hp de um pombo, durante a VA. **B)** Gráfico igual ao visto em A, obtido durante VR. **C) esquerda** - Projeção plana das potências relativas de 20 a 30 Hz do mesmo registro em A. **direita** - Projeção plana das potências relativas de 20 a 30 Hz do mesmo registro em B. Observar que ao comparar-se as potências relativas, nos gráficos de projeção de 1 a 30 Hz, não é possível identificar diferenças entres os dois estados nas frequências mais altas (20 a 30 Hz). Isso ocorre porque as potências das frequências mais baixas são muito maiores do que as potências das frequências mais altas (ver legenda). Ao comparar-se somente as potências relativas de 20 a 30 Hz, nota-se uma maior concentração de potência nessa faixa durante a VA do que durante a VR.



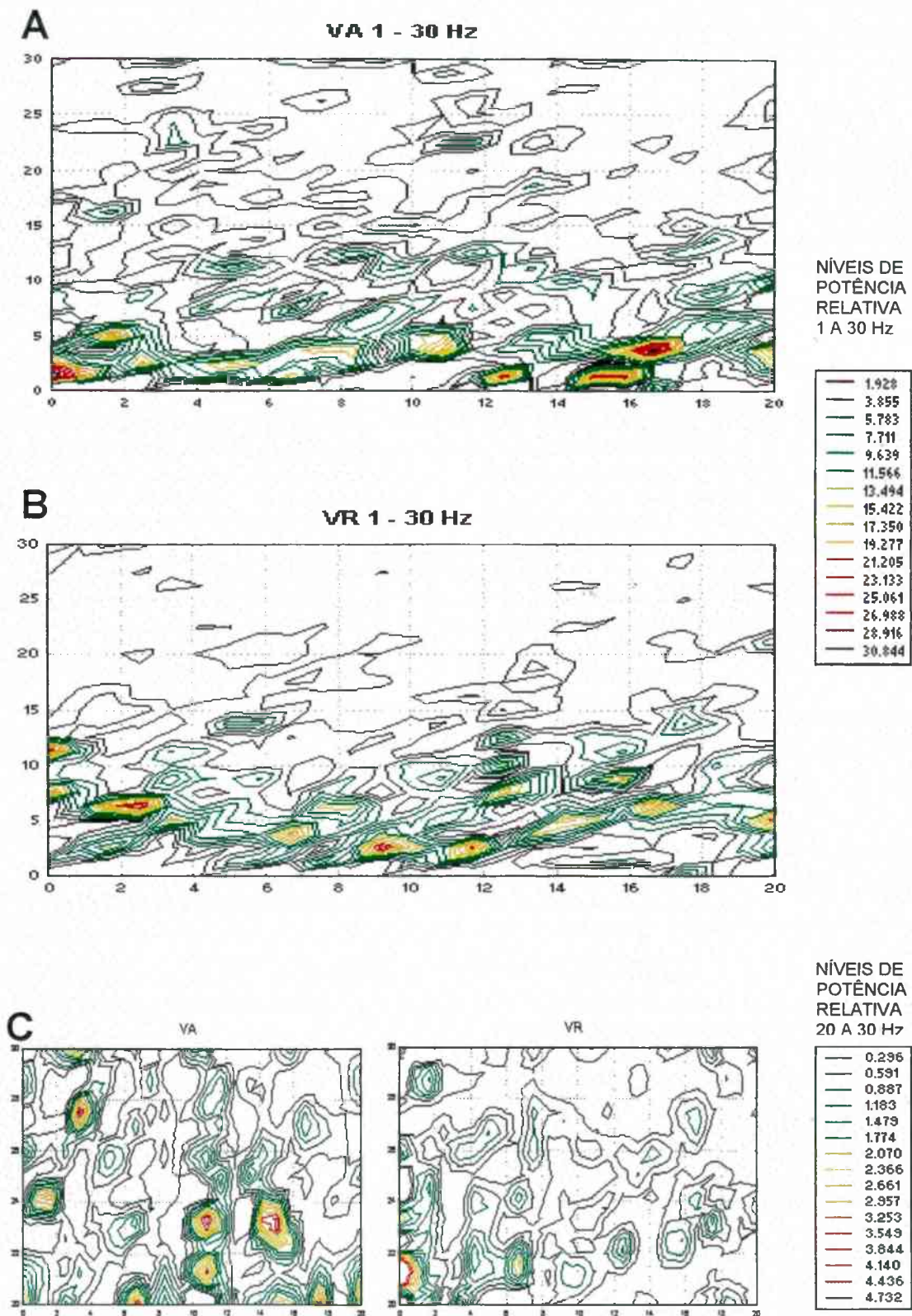
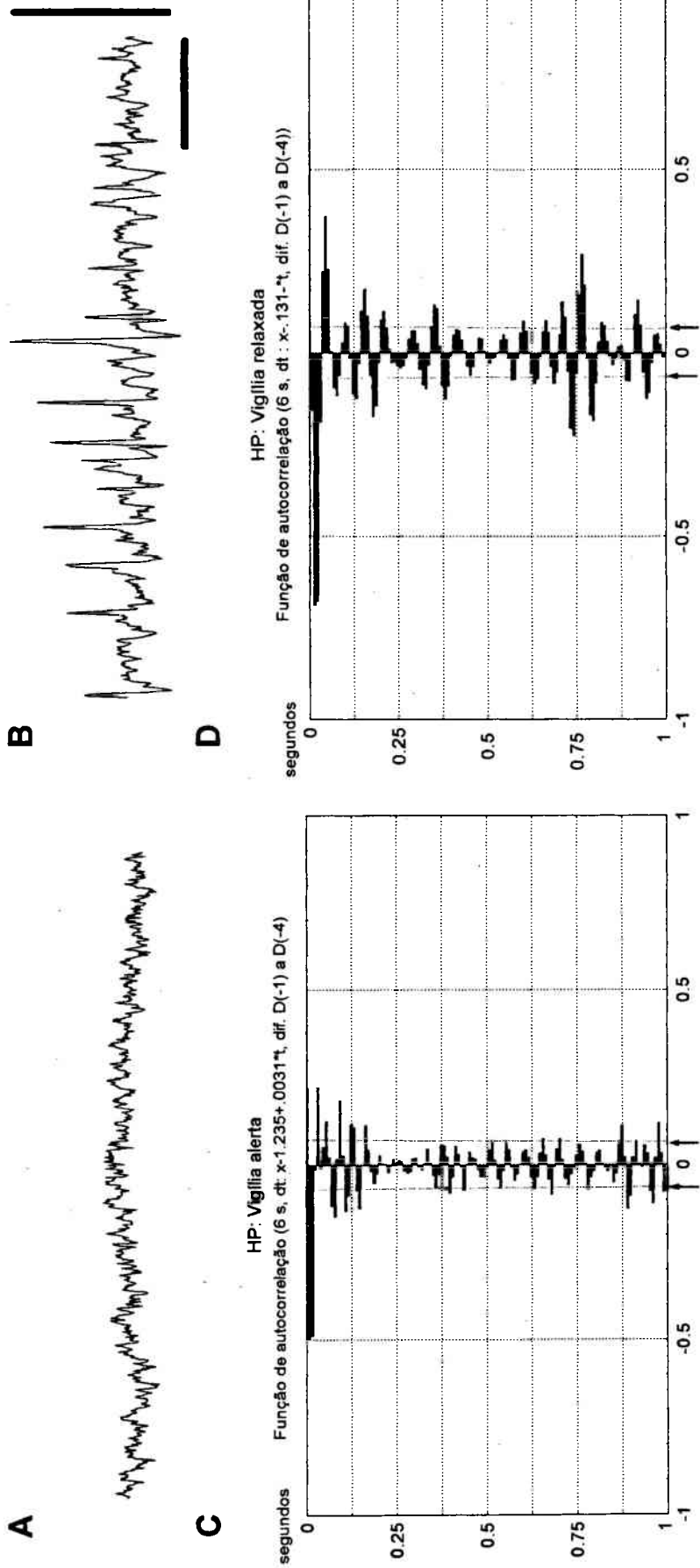


Figura 15 (cont.)



**Figura 16** - Gráficos da análise de autocorrelação do EOsG-hp dos estados de VA e VR. **A** e **B** - Registros eletroscilográficos de 6 segundos obtidos durante VA e VR (respectivamente), representativos dos dados que foram submetidos a análise. **C** - Gráfico da análise de autocorrelação do sinal mostrado em **A**. Notar a fraca autocorrelação que ocorre em torno da frequência de 5 Hz, sugerindo uma atividade rítmica fraca nessa frequência. **D** - Gráfico de autocorrelação do sinal eletroscilográfico mostrado em **B**. Observa-se 3 atividades significativas. Uma com pico de autocorrelação em 5,2 Hz, outra com pico em 2,6 Hz e uma atividade mais intensa com pico em 1,3 Hz. Os sinais brutos foram submetidos a algoritmos de filtragem para eliminação de tendências, e derivações do sinal (D1 a D4) para eliminação das atividades acima de 28 Hz. As setas indicam os limites mínimos de significância de correlação ( $p=0.05$ ). Barras de calibração: 100  $\mu$ V (vertical); 1 s (horizontal).

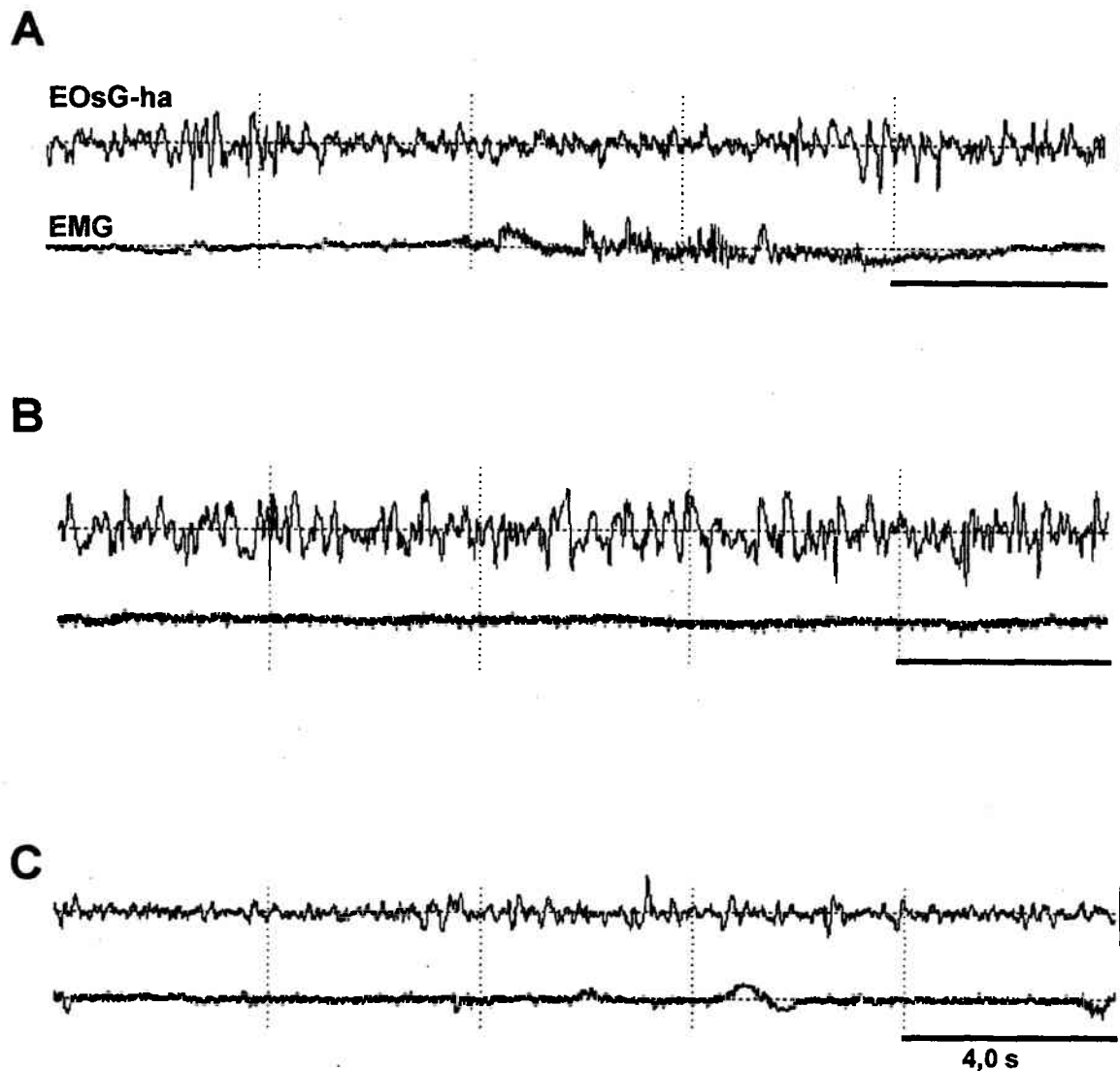
Durante estados de alerta, observou-se que não existe qualquer grau de autocorrelação em torno de 2,5 Hz e de 1,3 Hz (Figura 16C). Permanece somente uma fraca correlação em torno de 5 Hz. Assim, parece que tal atividade mais marcante presente durante a VR, cessa quando o animal se encontra em VA.

## **2. Hiperstriado Acessório**

Para a análise do eletroscilograma do hiperestriado acessório durante os estados de VR, VA, SOM e LUZ, foram utilizados os traçados eletroscilográficos obtidos de 10 pombos. Os registros foram armazenados em 52 arquivos de 20 minutos que resultaram em um total de 1040 minutos de registro (17 horas e vinte minutos). Desses arquivos, foram selecionados segmentos de 20 segundos consecutivos de cada estado comportamental, de cada animal. Assim sendo, a análise quantitativa foi feita através de 200 épocas de um segundo para cada estado. A análise do SOL foi realizada utilizando-se 12 arquivos de 20 minutos (total de 240 minutos) obtidos de 3 animais. De cada animal foi selecionado um período de 20 segundos consecutivos (total de 60 segundos) para a análise quantitativa. Devido ao pequeno número de registros confiáveis, descartamos o sono paradoxal da análise do HA.

Em todos os animais estudados, o hiperestriado acessório (HA) expressa uma atividade eletroscilográfica (EOsG-ha) cuja amplitude é menor do que no hipocampo. Essa característica é observada em todos os estados comportamentais analisados. A análise visual do EOsG-ha, mostra que este é constituído de um traçado eletroscilográfico misto. Não há uma atividade específica que possa ser identificada como característica de um estado, ou dominante em qualquer um dos estados comportamentais (figuras 5 e 17).





**Figura 17** - Períodos de 20 s de eletroscilogramas do hiperestriado acessório (traçados superiores), e do eletromiograma (EMG) concomitante (traçados inferiores). **A** - Segmento de registro de uma transição de um período de VR seguido de VA, com diminuição da amplitude do sinal, e novamente um período de VR. Notar que a VA está acompanhada de aumento da atividade eletromiográfica. **B** - Registro de um período de sono de ondas lentas obtido no mesmo animal que em A. **C** - Período de VA de um animal evidenciando as atividades de ondas lentas (2 a 4 Hz), e rápidas (10 a 15 Hz). (ver texto). Barra de calibração vertical = 50  $\mu$ V.

A VA e os outros estados de alerta estudados, são caracterizados por um EOsG formado por ondas de baixa amplitude ao longo de toda a banda de frequência estudada neste trabalho. A atividade de maior amplitude observada nos eletroscilogramas do hiperestriado acessório ocorre na faixa de 2 a 4 Hz (Figura 17A e C). As ondas nessa banda têm amplitudes que sobressaem do traçado de fundo. Elas ocorrem como ondas isoladas monofásicas ou bifásicas, em grupos de duas ou mais ondas bifásicas consecutivas e sem variar de incidência nos diferentes estados comportamentais.

Também ocorre, durante a VA, atividade eletroscilográfica na faixa de 5 a 10 Hz com a amplitude variando em torno de 10  $\mu$ V (Figura 17A). Com frequência, é possível observar ondas entre 10 e 15 Hz, também com amplitude abaixo de 10  $\mu$ V, entremeadas com as ondas mais lentas. Ao se comparar o EOsG-ha dos diversos estados comportamentais, durante a análise visual, não é possível perceber diferenças nas amplitudes dessas ondas. Durante os estados ativados (VA, SOM e LUZ), as amplitudes sofrem uma redução acentuada, principalmente nas frequências mais baixas, tornando possível uma melhor visualização das ondas de 10 a 15 Hz. Essa mudança nas amplitudes provoca um aumento aparente na atividade dessa banda em relação aos estados mais relaxados. Todavia esse aumento não é confirmado pela análise quantitativa (discutida adiante).

Finalmente, nota-se uma atividade de baixíssima amplitude nas frequências acima de 15 Hz. Essa atividade está presente nos vários estados comportamentais, cavalgando as ondas de frequências mais baixas. A descrição dessas ondas através da identificação visual é bastante difícil, devido a sua magnitude (abaixo de 10  $\mu$ V). Porém, da mesma forma que as atividades de 10 a 15 Hz, durante os estados de VA, SOM e LUZ, a atividade acima de 15 Hz torna-se mais evidente quando as amplitudes das frequências mais baixas estão reduzidas de uma maneira geral.

Resumindo, o eletroscilograma do hiperestriado acessório, durante estados de alerta (VA, SOM e LUZ), é composto por uma atividade mista de baixa amplitude, em todas as frequências do espectro.

Nos estados de VR e SOL, há um aumento acentuado na voltagem de todas as frequências do espectro (Figura 17B). As ondas de 2 a 4 Hz observadas na VA, aparecem na VR e SOL com amplitudes maiores, geralmente acima de 60  $\mu$ V. A incidência (quantidade de ondas por período de 20 s), não sofre alterações ao longo de todos os segmentos analisados. As ondas entre 5 e 10 Hz, nos estados de VR e SOL, da mesma forma que nas demais frequências, aparecem com maiores amplitudes. As ondas de 10 Hz até 30 Hz continuam presentes durante a VR. A sua identificação visual fica prejudicada devido ao mascaramento provocado pelas amplitudes elevadas das frequências mais baixas.

Em resumo, o EOsG-ha dos estados de VR e SOL continua sendo uma atividade mista pouco diferenciada, apresentando as mesmas características gerais dos estados ativados. A única diferença perceptível está no aumento generalizado nas amplitudes das diferentes frequências que compõem o espectro. Assim como na VA, quanto maiores as frequências, menores as amplitudes das ondas dos EOsGs da VR e SOL.

Da mesma forma que no hipocampo, as maiores diferenças no EOsG-ha entre os estados comportamentais, ocorrem na média dos valores absolutos derivados da análise espectral (potência total e borda espectral) e da análise aperiódica (número de ondas e somatório das amplitudes), (Tabela 3). A análise estatística das quatro variáveis absolutas (potência total, borda espectral de 50 %, número de ondas e somatório das amplitudes), indica diferenças entre os estados comportamentais. Os menores valores de potência total ocorrem durante a VA, LUZ e SOM (Tabela 3 e Figura 18A). Durante a VR e

SOL, com o aumento da amplitude geral do EOsG-ha, as potências totais médias aumentam acentuadamente alcançando valores muito superiores aos encontrados durante os estados de VA, SOM e LUZ ( $F(4, 835) = 19,02, p < 0,00002$ ). Apesar da média da potência total do SOL mostrar uma tendência a ser maior do que em VR, não há diferença significativa entre elas ( ver Tabela 03).

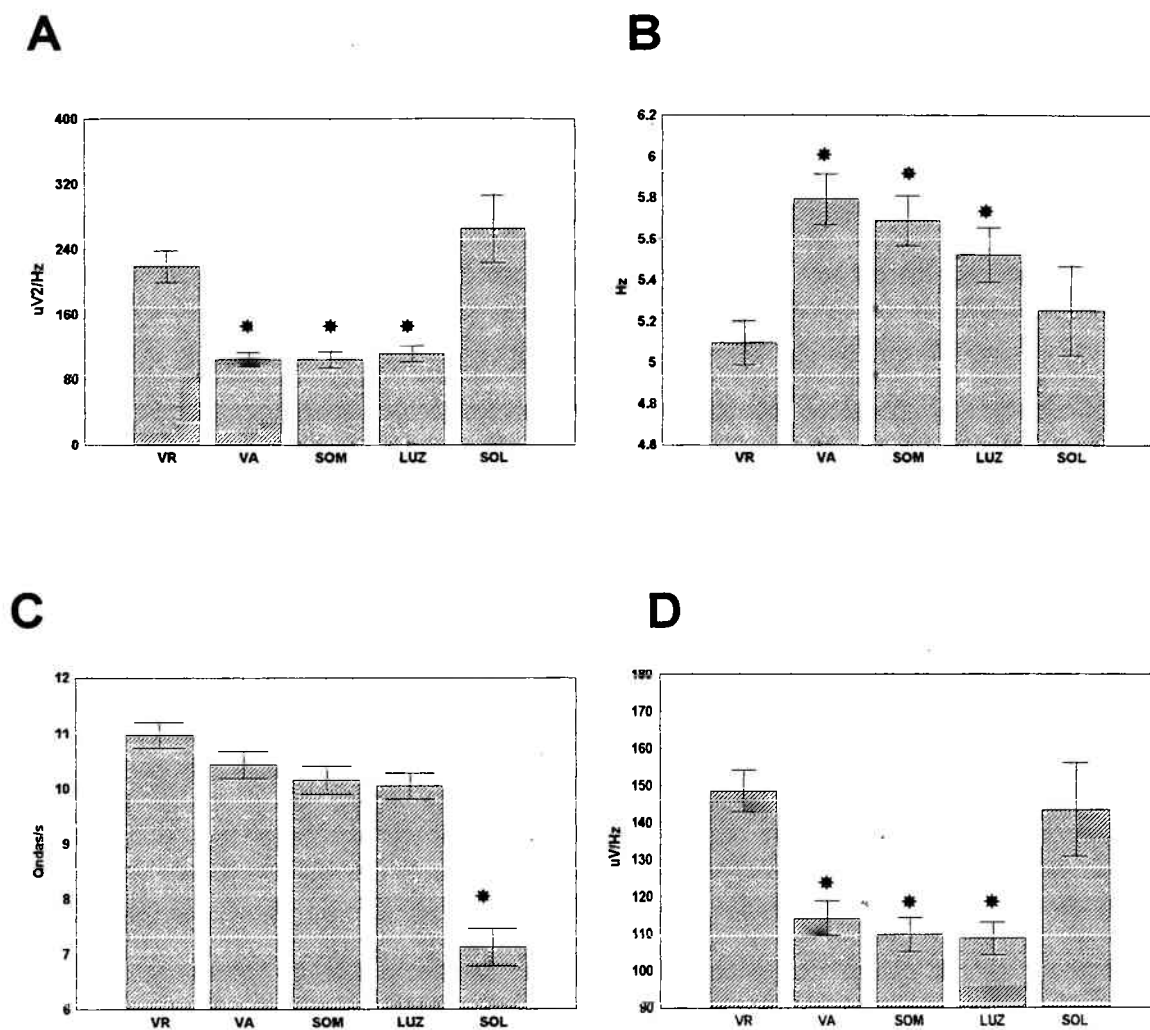
**Tabela 3** - EOsG-ha - Resultado da análise espectral (potência total e borda espectral de 50 %), e da análise aperiódica (somatório das amplitudes e número de ondas).

	POTENCIA TOTAL ( $\mu V^2/Hz$ )	BORDA ESPECTRAL DE 50% (Hz)	NÚMERO DE ONDAS (ONDAS/s)	AMPLITUDE ( $\mu V/s$ )
VA	104,89 $\pm$ 8,51*	5,79 $\pm$ 0,12*	10,42 $\pm$ 0,24	114,08 $\pm$ 4,75*
LUZ	112,24 $\pm$ 10,00*	5,52 $\pm$ 0,13*	10,04 $\pm$ 0,24	108,65 $\pm$ 4,42*
SOM	104,98 $\pm$ 9,47*	5,68 $\pm$ 0,12*	10,15 $\pm$ 0,25	109,73 $\pm$ 4,65*
VR	218,71 $\pm$ 19,03	5,09 $\pm$ 0,10	10,96 $\pm$ 0,23	148,52 $\pm$ 5,62
SOL	264,77 $\pm$ 41,07	5,25 $\pm$ 0,22	7,12 $\pm$ 0,34*	143,33 $\pm$ 12,63

(\*) - diferenças em relação a VR. Nível de significância,  $p < 0,01$ .

A borda espectral de 50 %, é um dos parâmetros que menos variam entre os estados. De acordo com a Tabela 3 e figura 18B, a VA apresenta o maior elevação da P50%, indicando maior atividade em frequências maiores em relação aos outros estados comportamentais ( $F(4, 835) = 11,03, p = 0,000001$ ). Os estados de LUZ e SOM também apresentam P50% elevada, da mesma forma indicando aumento de atividade nas frequências mais altas, em comparação a VR ( $p < 0,01$ ). Embora o SOL tenha apresentado um valor aparentemente mais alto para a borda espectral, não há diferença estatisticamente significativa em relação a VR.

O numero de ondas é outro parâmetro que varia muito pouco entre a maioria dos estados (Figura 18C). Não há diferenças no número de ondas tanto entre os estados ativados, como entre os estados ativados e a VR. Somente durante o SOL ocorre redução



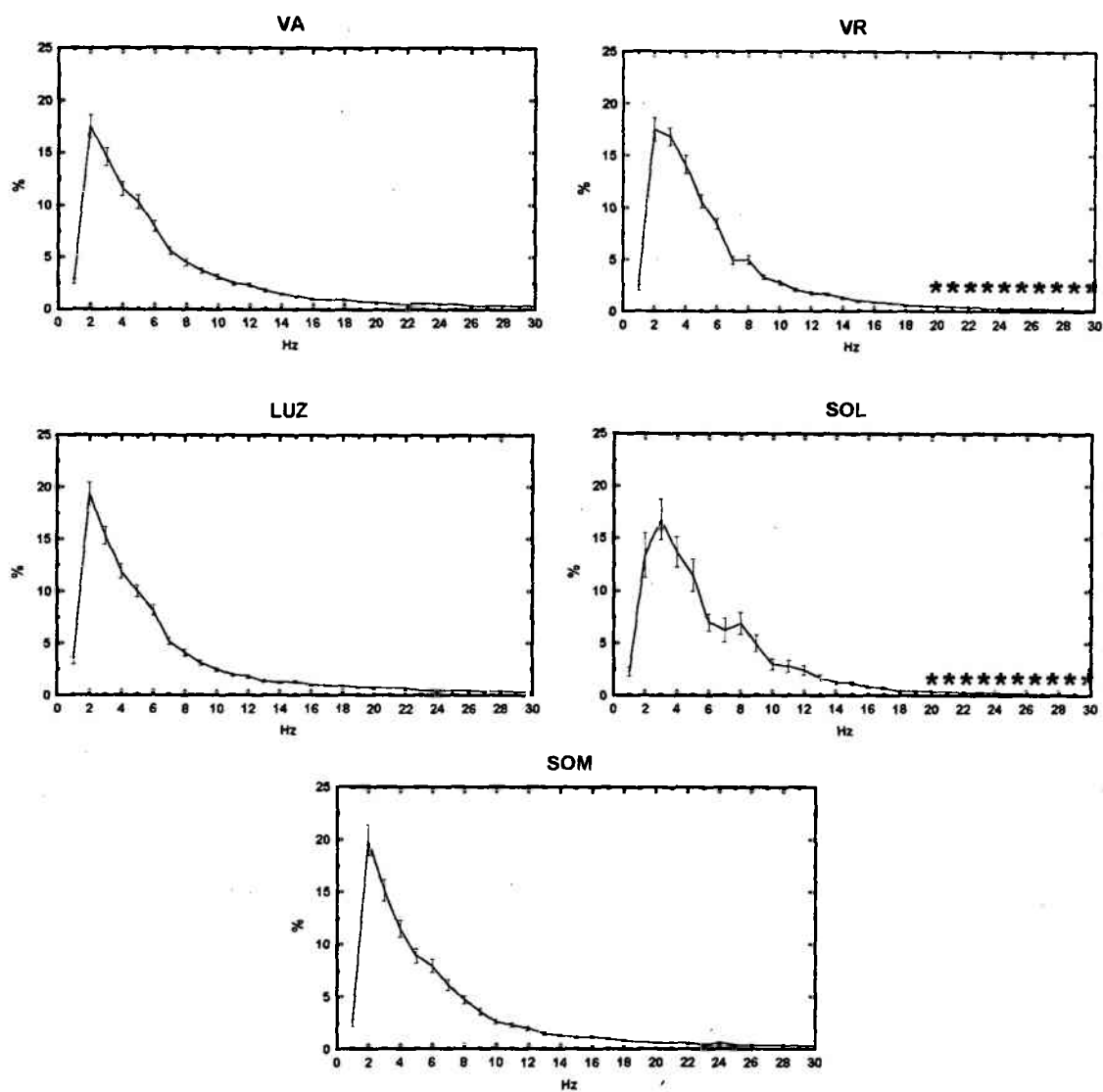
**Figura 18** - Alterações do EOGG do hiperestriado acessório nos diferentes estados comportamentais (média  $\pm$  E.P.M). **A** - Potências absolutas totais. **B** - Borda espectral de 50 %. **C** - Número de ondas por segundo. **D** - Somatório das amplitudes. (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação a VR ( $p < 0,01$ ).

acentuada no número de ondas em relação aos demais estados ( $F(4, 835) = 11,03, p < 0,00002$ ). O somatório das amplitudes varia de uma forma semelhante às potências totais. Na VA, na LUZ e no SOM, as amplitudes são bastante parecidas, pouco variando de um estado para outro e estão bastante reduzidas em relação a VR ( $p < 0,00002$ ). Durante o SOL, o somatório das amplitudes não tem diferença estatisticamente significativa em relação a VR (Figura 18D), conforme observado na inspeção visual do traçado.

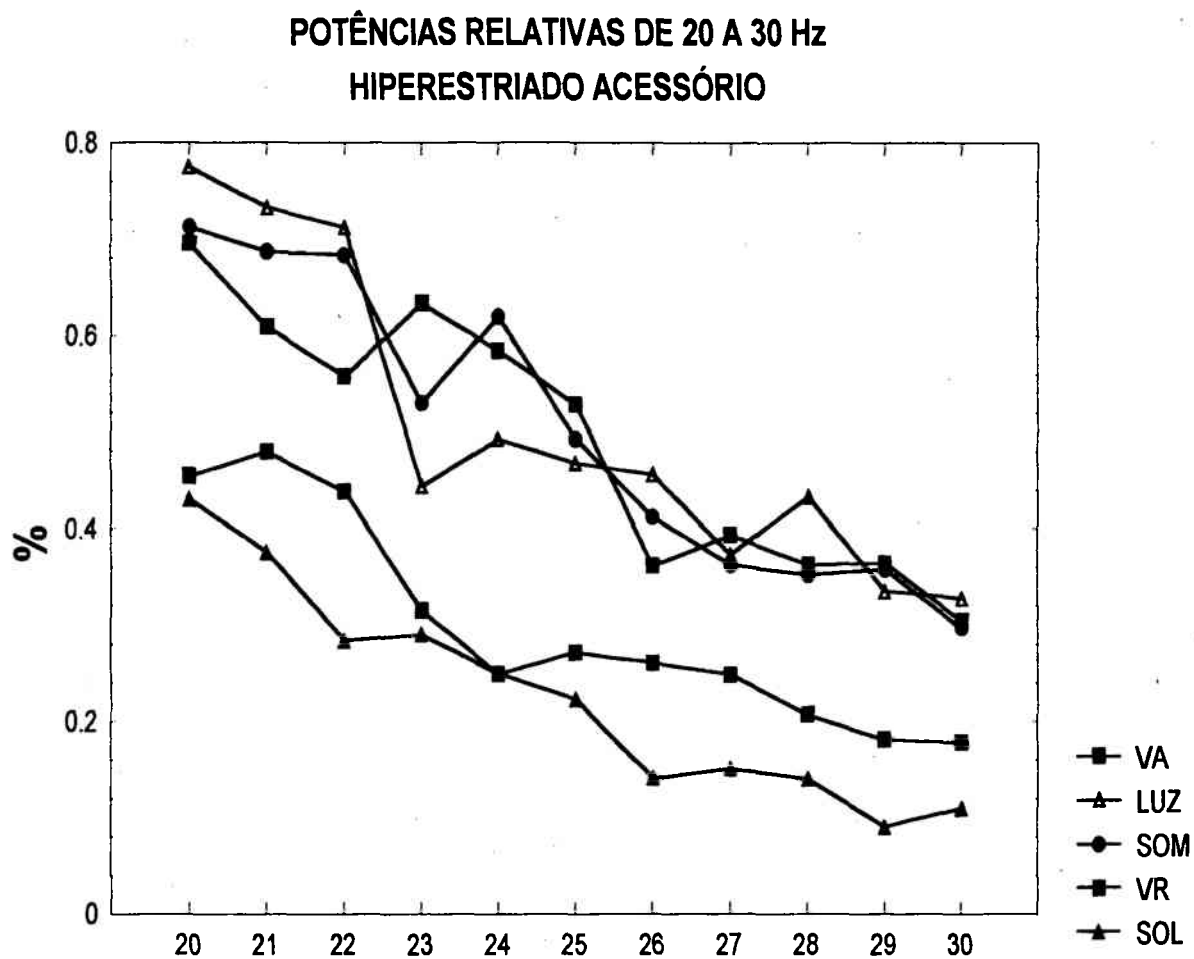
Em resumo, nos estados mais relaxados (VR e SOL), em relação aos estados mais alertas (VA, SOM e LUZ) ocorre: a) um aumento acentuado das potências totais absolutas; b) diminuição da borda espectral de 50 %, sugerindo menor atividade nas frequências mais altas; c) aumento do somatório das amplitudes (compatível com o aumento das potências). Quanto ao número de ondas, somente o SOL foi significativamente menor do que a VR.

A figura 19 mostra o perfil espectrográfico (potências relativas médias) de 1 a 30 Hz do EOG-ha, dos cinco estados analisados. Quando comparado entre os estados comportamentais, não são encontradas diferenças estatisticamente significantes na distribuição das potências relativas em nenhuma das frequências abaixo de 20 Hz. Durante os estados de vigília alerta espontânea e provocada por estimulação sensorial, ocorre um maior aumento das potências relativas nas frequências acima de 20 Hz do que nos estados de VR e SOL ( $F(4, 835) = 4,41, p < 0,001$ ). Como as potências dessas frequências são muito pequenas, essas diferenças podem ser melhor visualizadas na figura 20 que contém somente as potências relativas das atividades acima de 20 Hz. Notar que em todos os estados essas frequências têm potências relativas inferiores a 1 % da potência total.

Em resumo, o hiperestriado acessório apresenta um perfil espectrográfico que se mantém relativamente inalterado nos diferentes estados comportamentais em seu aspecto



**Figura 19** - Espectrogramas do EOsG-ha (média  $\pm$  E.P.M), de 1 a 30 Hz. Nas abscissas estão representadas as potências relativas em relação à potência total absoluta (%). Nas ordenadas estão representadas as frequências em Hz. (\*) indicam diferenças significativas em relação a VA ( $p < 0,01$ ).



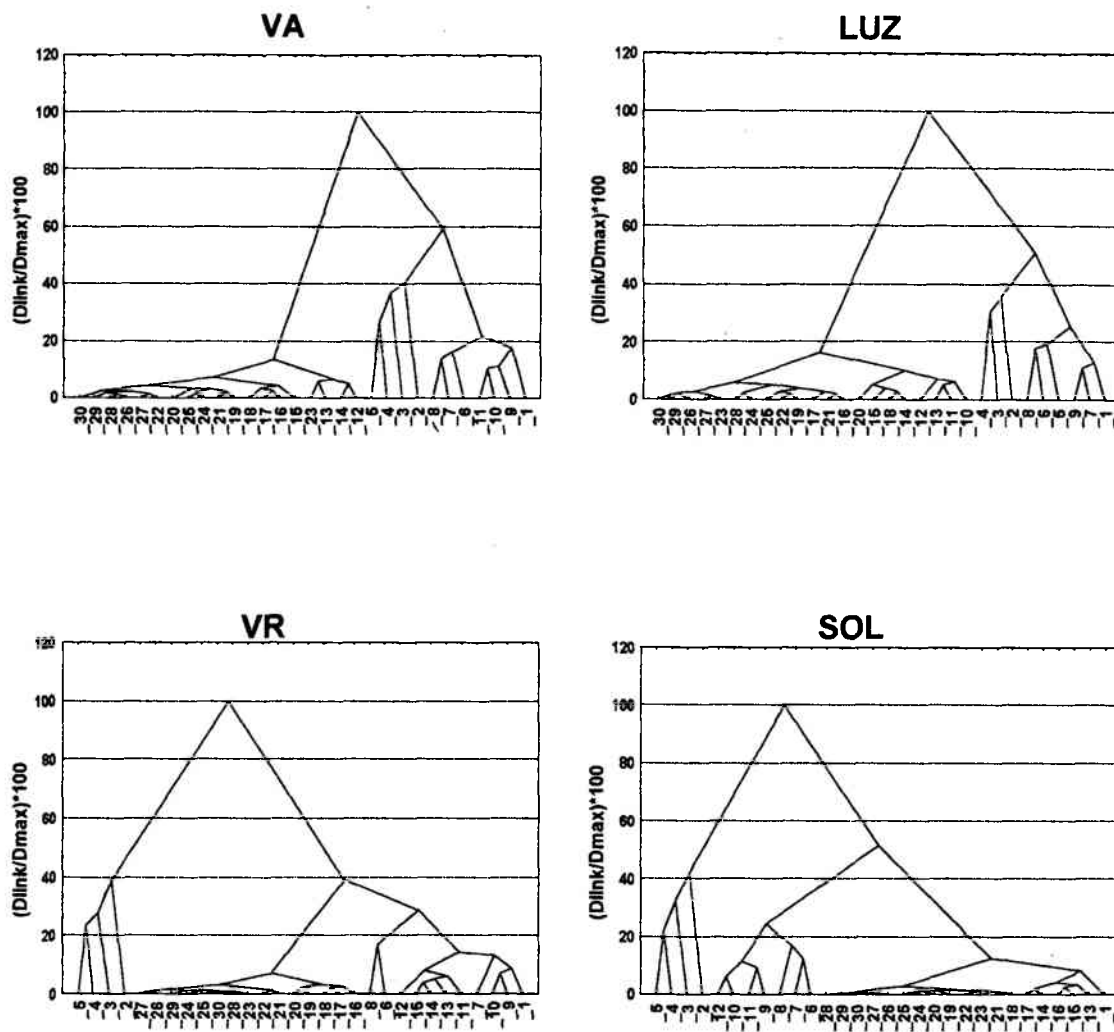
**Figura 20** - Espectrogramas médios do EOsG-ha das frequências de 20 a 30 Hz, em diferentes estados comportamentais. Os valores médios das potências relativas em VR e SOL, são significativamente menores do que nos estados ativados, para todas as frequências dessa banda ( $p < 0,01$ ).



qualitativo. A única variação qualitativa notável é a redução geral das amplitudes que ocorre nos estados ativados. No aspecto quantitativo, as potências relativas das frequências de 1 a 19 Hz não sofrem qualquer variação que permita diferenciar os diversos estados comportamentais. Somente as potências relativas da banda de 20 a 30 Hz aumentam durante os estados de VA, LUZ e SOM em relação aos estados de VR e SOL.

A análise de grupamentos dos espectrogramas do HA (Figura 21), em todos os estados, aponta para a formação de 2 famílias de frequências espectrais (agrupadas de acordo com as distâncias métricas de Chebychev). Nos estados de alerta (VA, SOM e LUZ) podemos identificar uma família de frequências de 1 a 10 Hz, e outra com as frequências de 11 a 30 Hz. A primeira família, por sua vez, pode ser dividida em dois grupos (ou subfamílias); um grupo contendo as frequências de 2 a 5 Hz e outro de 6 a 10 Hz. A segunda família (11 a 30 Hz) não forma subgrupos que possam ser diferenciados entre si. Durante a VR, a primeira família é formada somente pelas frequências de 2 a 5 Hz. Na segunda família encontramos as frequências remanescentes do espectro (6 a 30 Hz). Devido a pequena distância relativa (entre as potências relativas) das frequências desta família, ela não é dividida em subgrupos. Durante o SOL, a análise de grupamentos mostra uma mesma distribuição das frequências na composição das famílias. A primeira é composta pelas frequências de 2 a 5 Hz, e a segunda pelas frequências de 13 a 30 Hz. Entretanto na segunda família, diferentemente da VR e semelhante com os estados de alerta, pode ser feita uma divisão em 2 subgrupos, um abrangendo as frequências de 6 a 12 Hz, e outro de 13 a 30 Hz.

Desta forma, pode-se observar 3 padrões de distribuição dos grupamentos. Durante a VA, SOM e LUZ, existem 3 grupos de atividade: um formado pelas frequências de 2 a 5 Hz; outro pelas frequências de 6 a 10 Hz; e um terceiro formado pelas frequência de



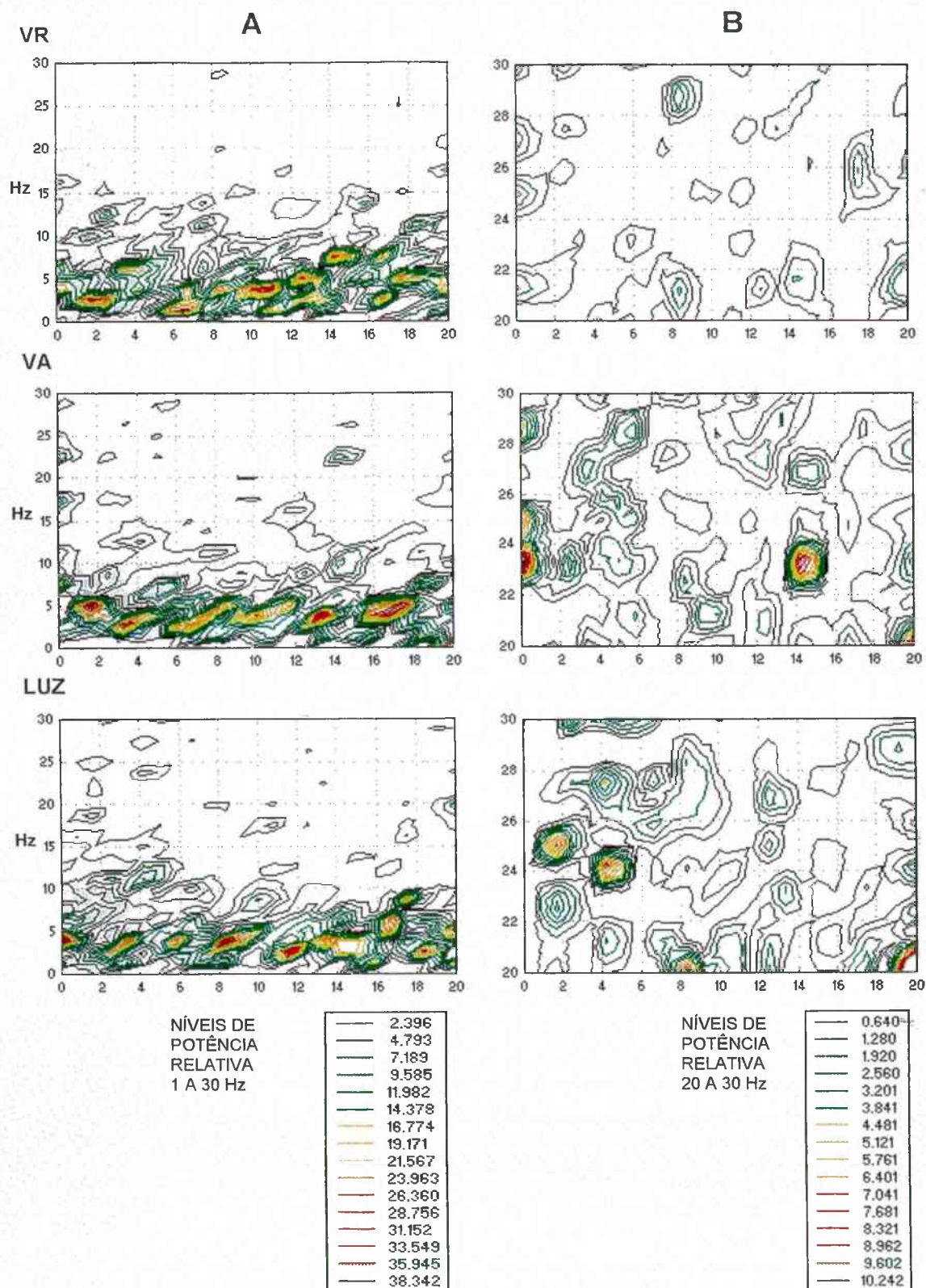
**Figura 21** - Análise de grupamentos das potências relativas da banda de 1 a 30 Hz, do EOG-ha do pombo, dos estados VA, LUZ, VR e SOL. Nos eixos das ordenadas estão representadas as distâncias relativas entre os elementos de cada grupamento (frequências), e entre os grupamentos e a distância máxima (distância métrica de Chebychev). Nos eixos das abscissas estão distribuídas as frequências do espectro. A distribuição ao longo dos eixos é feita de acordo com os grupamentos identificados pelo método (método de Ward). Notar a semelhança na formação dos grupamentos que há entre VR e SOL, e entre VA e LUZ.

11 a 30 Hz. Durante a VR existem somente dois grupamentos: um formado pelas frequências de 1 a 5 Hz, e outro pelas frequências de 6 a 30 Hz. No sono de ondas lentas são identificados três grupos de atividade: um das frequências de 2 a 5 Hz; um segundo das frequências de 6 a 12 Hz; e um terceiro grupamento formado pelas frequências de 13 a 30 hz.

É importante notar que em qualquer um dos estados, no subgrupo composto pelas frequências mais altas (até 30 Hz), pode ser identificado um conjunto de atividades formado pelas frequências de 20 a 30 Hz. Essas frequências foram identificadas na análise estatística precedente como atividades que sofrem um aumento seletivo durante os estados ativados (VA e LUZ), quando comparadas com estados menos ativados (VR e SOL).

Quando compara-se o resultado da análise de grupamentos com a análise visual, notam-se algumas correspondências que reforçam os achados da análise qualitativa. Em qualquer estado que se observar, pode se ver que os clusters são formados por grupamentos menores. Durante a análise visual são identificados alguns grupos de atividades, que eventualmente tornam-se mais evidentes, mas que não caracterizam um ritmo. Por exemplo as atividades de 2 a 4 Hz, 5 a 10 Hz, 10 a 15 Hz e 15 a 30 Hz. Apesar de não caracterizar um padrão de atividades diferenciadas estatisticamente significantes, esses grupos de atividade também são identificados através da análise de grupamentos.

Para uma melhor comparação da distribuição das potências relativas entre os estados, os dados espectrais do EOsG-ha foram submetidos a dois tratamentos. Primeiro foi feita a projeção plana das potências relativas de 1 a 30 Hz de segmentos de 20 segundos consecutivos dos estados de VA, LUZ e VR (Figura 22A). Em seguida foi feita a projeção plana somente da banda de 20 a 30 Hz dos mesmos 20 segundos dos mesmos animais. Quando se observa os gráficos das projeção planas de 1 a 30 Hz (Figura 22A), não



**Figura 22** - Projeção plana das potências relativas de 0 a 30 Hz (A) e de 20 a 30 Hz (B), obtidas de registros de 20 s do EOsg-ha de três estados comportamentais (VR, VA e LUZ) de um mesmo animal. As projeções mostradas em B, são extraídas dos mesmos dados apresentados em A. A projeção plana em B, representa uma magnificação do segmento espectral de 20 a 30 Hz. Esse procedimento permite que diferenças não evidentes nas projeções de 1 a 30 Hz, tornem-se facilmente visualizáveis. Notar maior atividade de 20 a 30 Hz durante a LUZ.

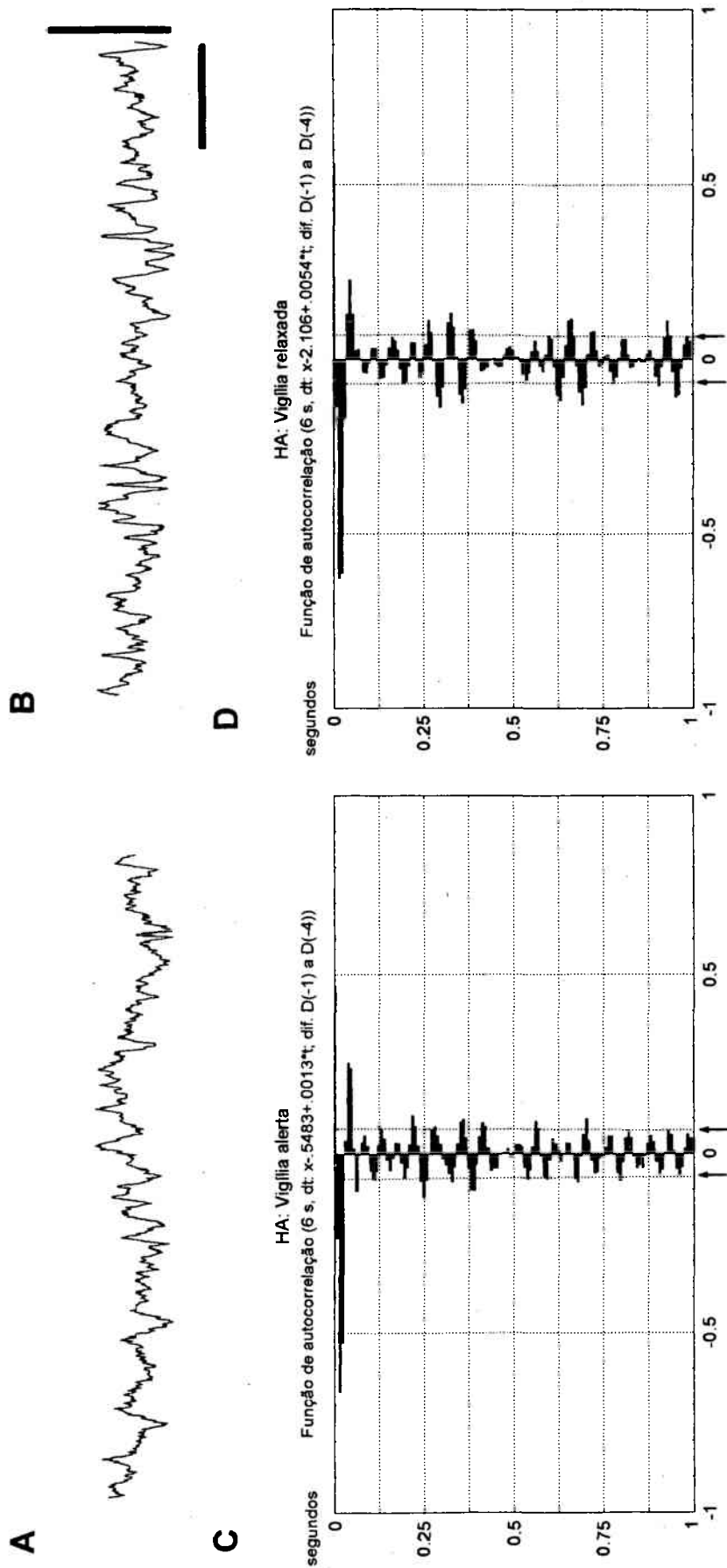
se consegue identificar diferenças na distribuição das potências relativas entre os 3 estados. Entretanto pode ser notado que existe um certo gradiente das potências relativas quando comparamos (entre estados) as 3 projeções planas das bandas de 20 a 30 Hz (Figura 22B). As potências relativas nessa banda são menores durante a VR, ocorre um aumento durante a VA, e a maior concentração das potências relativas durante a LUZ.

As análises de auto correlação do HA, durante a VA e a VR, estão representadas nas figuras 23C e D. Como os outros procedimentos de análise descritos anteriormente sugerem, não parecem existir atividades com grau de autocorrelação significativo, isto é, que possam ser consideradas como indicativas de um ritmo característico de qualquer estado. Na figura 23D vê-se o gráfico de autocorrelação do sinal EOsGráfico do traçado mostrado na figura 23B. Pode se notar somente uma atividade em torno de 3 Hz, com um fraco coeficiente de autocorrelação, que parece se repetir. Durante a VA (Figura 23C), não existe qualquer correlação que diferencie algum ritmo do ruído branco.

### **3. Comparação entre HP e HA**

Os resultados dos experimentos até agora descritos mostram diferenças entre os EOsG do hipocampo e do hiperestriado acessório. À inspeção visual, nota-se que as amplitudes do EOsG-hp são maiores do que do EOsG-ha, para qualquer estado comportamental que se compare (Figura 5). O traçado eletroscilográfico hipocampal, durante todos os estados, mas principalmente VR e SOL, é marcado pela presença de ondas PGAs, isoladamente ou em surtos, atividade essa não encontrada nos traçados do HA.

A análise do espectrograma hipocampal permite identificar 3 grupos de frequências que se comportam de forma diferenciada nos diferentes estados comportamentais (2 Hz, 6 a 10 Hz e 20 a 30 Hz). Diferentemente do hipocampo, a análise do espectrograma

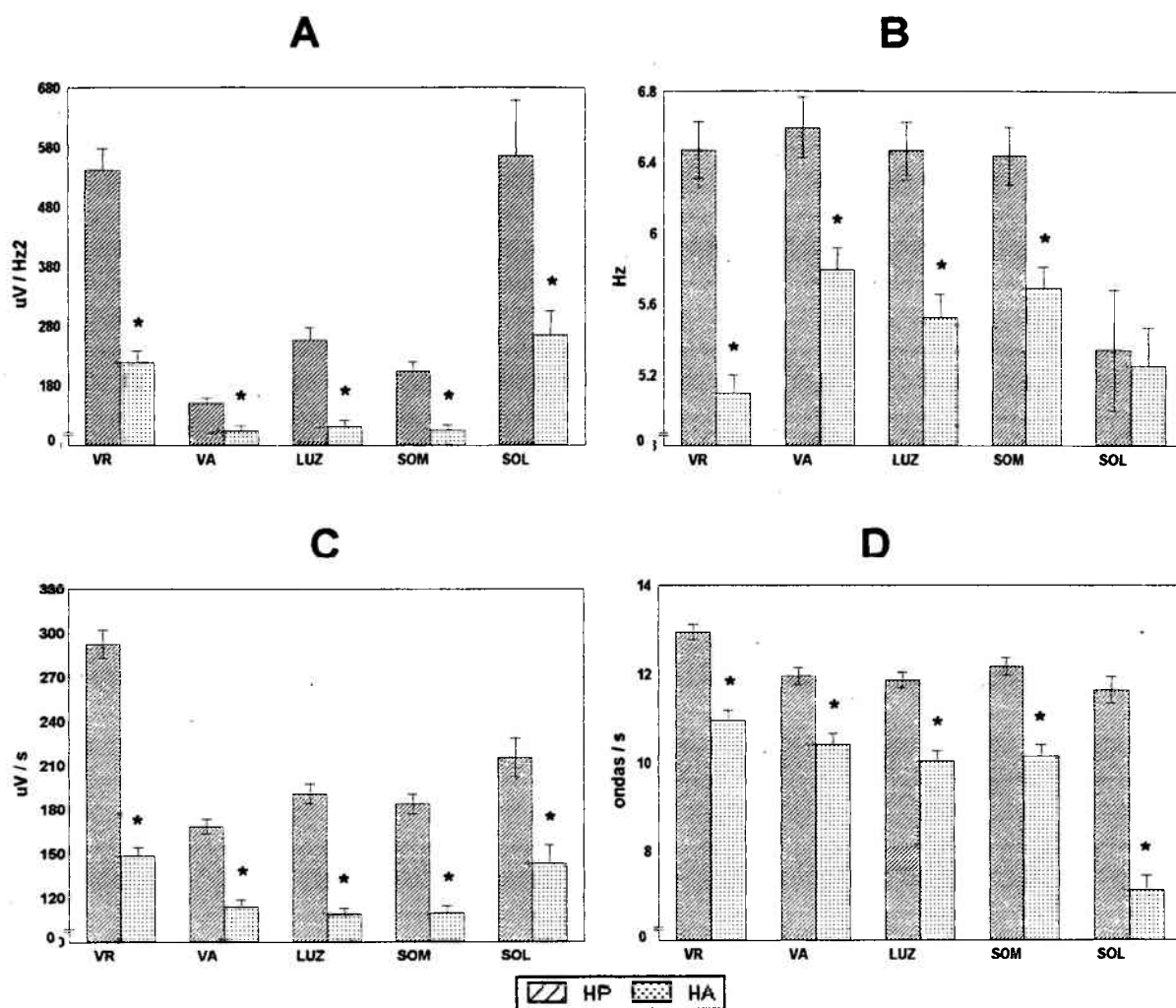


**Figura 23** - Gráficos da análise de autocorrelação do EOsG-*ha* dos estados de VA e VR. **A** e **B** - Registros eletroencefalográficos de 6 segundos obtidos durante VA e VR (respectivamente), representativos dos dados brutos que foram submetidos a análise. **C** - Gráfico da análise de autocorrelação do sinal mostrado em **A**. Não existe qualquer frequência de atividade que diferencie o ruído branco de fundo, que possa indicar a presença de um ritmo. **D** - Gráfico de autocorrelação do sinal eletroencefalográfico mostrado em **B**. Observa-se uma fraca atividade em torno de 3 Hz, e outra em torno de 1,5 Hz. Os sinais brutos foram submetidos a algoritmos de filtragem para eliminação de tendências e derivações do sinal (D1 a D4), para eliminação das atividades acima de 28 Hz. As setas indicam os limites mínimos de significância de correlação ( $p=0,05$ ). Barras de calibração: 50  $\mu$ V (vertical); 1 s (horizontal).

do HA indica que não existem diferenças na distribuição das potências relativas das frequências abaixo de 20 Hz. Somente as frequências acima de 20 Hz têm comportamento diferenciado entre os estados.

A comparação das médias dos valores absolutos extraídos da análise espectral (potência total e borda espectral) e da análise aperiódica (amplitude e número de ondas), através da análise de variância multivariada de duas vias (MANOVA), aponta para diferenças bastante significativas entre hipocampo e hiperestriado acessório (Figura 24). As amplitudes ( $F(1, 1670) = 278,90$ ,  $p = 0,0000001$ ) e as potências totais ( $F(1,1670) = 145,30$ ,  $p = 0,0000001$ ), são sensivelmente maiores HP do que no HA (Figura 24A e C) para todos os estados. O número de ondas (Figura 24D) também é maior no HP do que no HA ( $F(1, 1670) = 202,86$ ,  $p = 0,000001$ ) também em todos os estados. A variação mais notável no número de ondas, é a redução sensivelmente maior que ocorre no HA, em relação ao HP, durante o SOL (Figura 24D). A borda espectral de 50 % também foi maior no HP do que no HA, em praticamente todos os estados ( $F(1, 1670) = 25,81$ ,  $p = 0,000001$ ). A única exceção ocorreu durante o SOL (Figura 24B), onde não existe diferença estatisticamente significativa entre as duas áreas. Durante o SOL a borda espectral do EOsG hipocampal reduz drasticamente, igualando-se à do HA.

Além das diferenças nas variáveis absolutas entre as áreas, a análise multivariada mostra que há uma forte interação entre áreas, indicando que as atividades eletroscilográficas comportam-se de forma diferente numa área em relação à outra, nos diversos estados comportamentais analisados. As variações, entre os diversos estados, das potências totais ( $F(4, 1670) = 16,39$ ,  $p = 0,000001$ ) e das amplitudes ( $F(4,1670) = 14,98$ ,  $p = 0,000001$ ), foram significativamente diferenciadas entre as duas áreas, HP e HA. A borda espectral também mostra um comportamento distinto entre as áreas ( $F(4, 1670) = 2,92$ ,  $p$



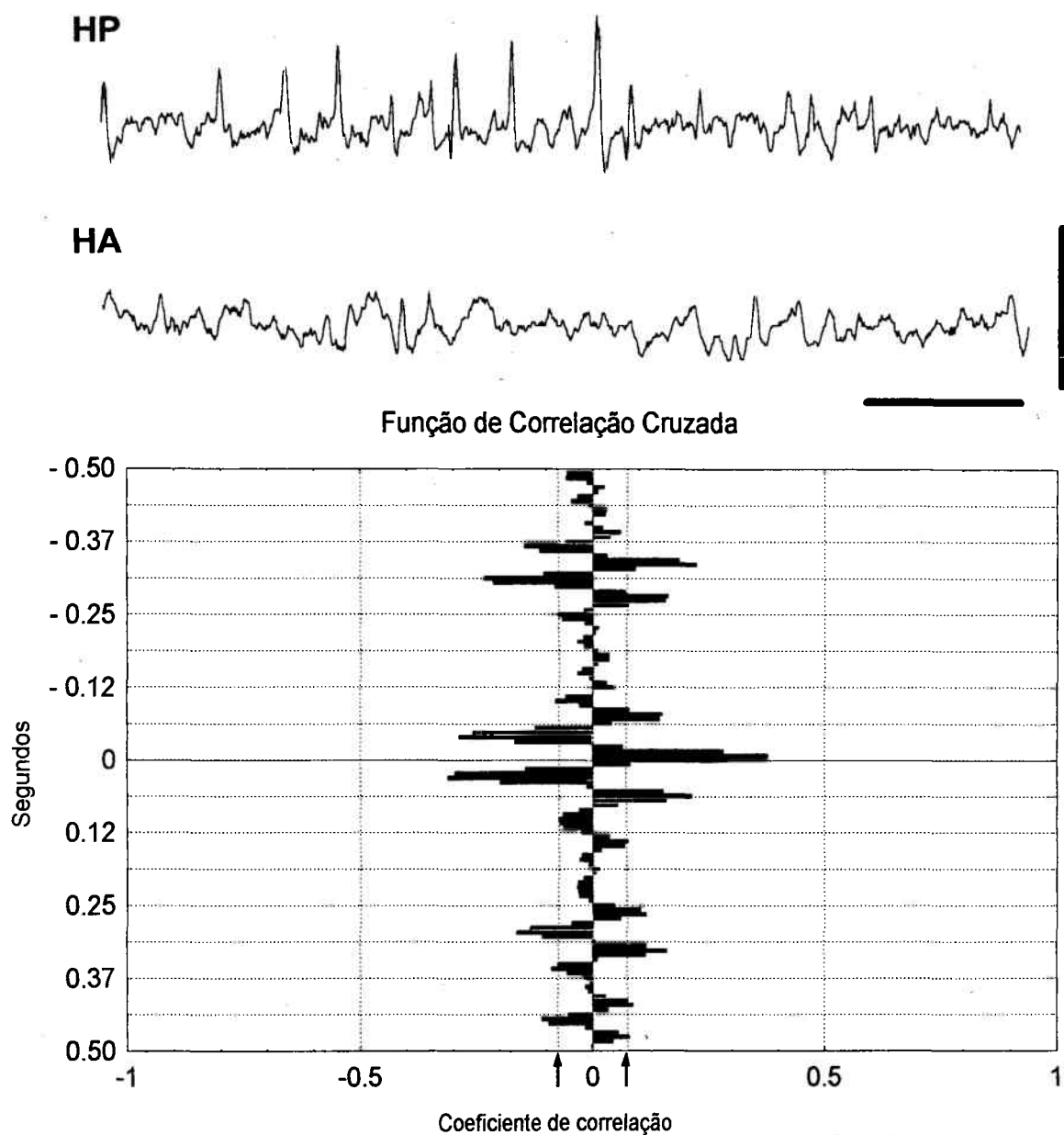
**Figura 24-** Gráficos comparativos entre HP e HA. Valores absolutos médios (média  $\pm$  E.P.M.). **A-** Potência total absoluta. **B-** Borda espectral de 50 %. **C-** Somatório das amplitudes. **D-** Número de ondas. Exceto a borda espectral de 50 % durante o SOL (**B**), todas as demais variáveis foram significativamente menores para o HA (\*) do que para o HP ( $p < 0,01$ ).



= 0,01). A borda espectral do EOsG-hp é alta para todos os estados exceto durante o SOL, quando sofre uma redução acentuada, enquanto que no HA, a borda espectral está reduzida tanto na VR quanto no SOL. O número de ondas é outra variável com comportamento distinto para cada área ( $F(4, 1670) = 5,34, p = 0,002$ ). Ele é significativamente maior durante a VR e o SOL em relação aos outros estados no HP, enquanto que no HA, o número de ondas é significativamente menor durante o SOL do que durante os demais estados.

Em resumo, a análise multivariada indica que a atividade eletroscilográfica do HP tem, em praticamente todos os parâmetros espectrais e aperiódicos, e em quase todos os estados, valores de maior magnitude do que o HA. A única exceção é a borda espectral de 50 % do SOL, onde não há diferença entre as duas áreas. A análise multivariada indica também uma forte interação entre os dados do EOsG das duas áreas e nos diferentes estados. Tal interação reflete uma maior reatividade do HP em relação ao HA. Ou seja, as variações nos valores dos parâmetros espectrais e aperiódicos revelam que os EOsGs do HA e do HP reagem de forma diferente em relação a um mesmo estado. Assim, a queda na potência total entre VR e SOL e VA, SOM e LUZ, é mais intensa no HP que no HA. No HP a borda espectral discrimina o SOL dos demais estados (incluindo a VR), enquanto que no HA ela é similar para VR e SOL. No HA o número de ondas discrimina mais intensamente o SOL dos demais estados, que no HP.

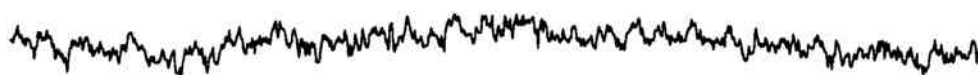
A análise de correlação cruzada entre segmentos simultâneos de HA e HP, indica duas situações diferentes. A figura 25 apresenta o gráfico da análise da função de correlação cruzada entre o HP e HA durante a VR. Na parte superior da figura 25 estão representados os segmentos dos eletroscilogramas das duas áreas, cujos valores absolutos foram submetidos à análise de correlação cruzada, representada na parte inferior da figura.



**Figura 25** - Representação gráfica da função de correlação cruzada entre HP e HA durante a vigília relaxada. Na parte superior da figura (HP e HA) estão representados os sinais originais de 6 segundos de onde foram extraídos dos dados para a análise de correlação cruzada. O gráfico “função de correlação cruzada” mostra um pico com um coeficiente de correlação significativo com um retardo, do HA em relação ao HP, de 0,001s aproximadamente. Ocorrem dois outros picos com defasagem (positiva e negativa) de aproximadamente 0,3 s, porém com um coeficiente menor. Esses dados sugerem uma atividade comum entre as duas áreas com frequência em torno de 3 Hz. A pequena defasagem no primeiro pico, sugere que essa atividade seja produto de um gerador externo às duas áreas analisadas. Setas indicam os limites mínimos de significância de correlação ( $p=0,05$ ). Barras de calibração: 100  $\mu$ V (vertical); 1 s (horizontal).

A análise de correlação cruzada mostra um pico com alto coeficiente de correlação com uma defasagem negativa de aproximadamente 0,001 s. Na análise aparecem também outros dois picos, um com defasagem positiva de aproximadamente 0,3 s, e outro com defasagem negativa também de aproximadamente 0,3 s. A pequena defasagem no primeiro (e maior) pico, sugere que a atividade responsável por esse pico, deve ser gerada em algum outro distrito e alcançar as duas áreas quase que simultaneamente. A ocorrência dos outros dois picos de correlação, com defasagens (positiva e negativa) de aproximadamente 0,3 s e menor coeficiente de correlação, indica que a atividade comum às duas áreas deve ter uma frequência em torno de 3 Hz. Durante a VA, a análise da função de correlação cruzada mostra que não existe qualquer correlação significativa entre as duas áreas (Figura 26). Parece que a atividade comum observada durante a VR, desaparece quando o pombo se encontra em um estado de vigília alerta.

HP

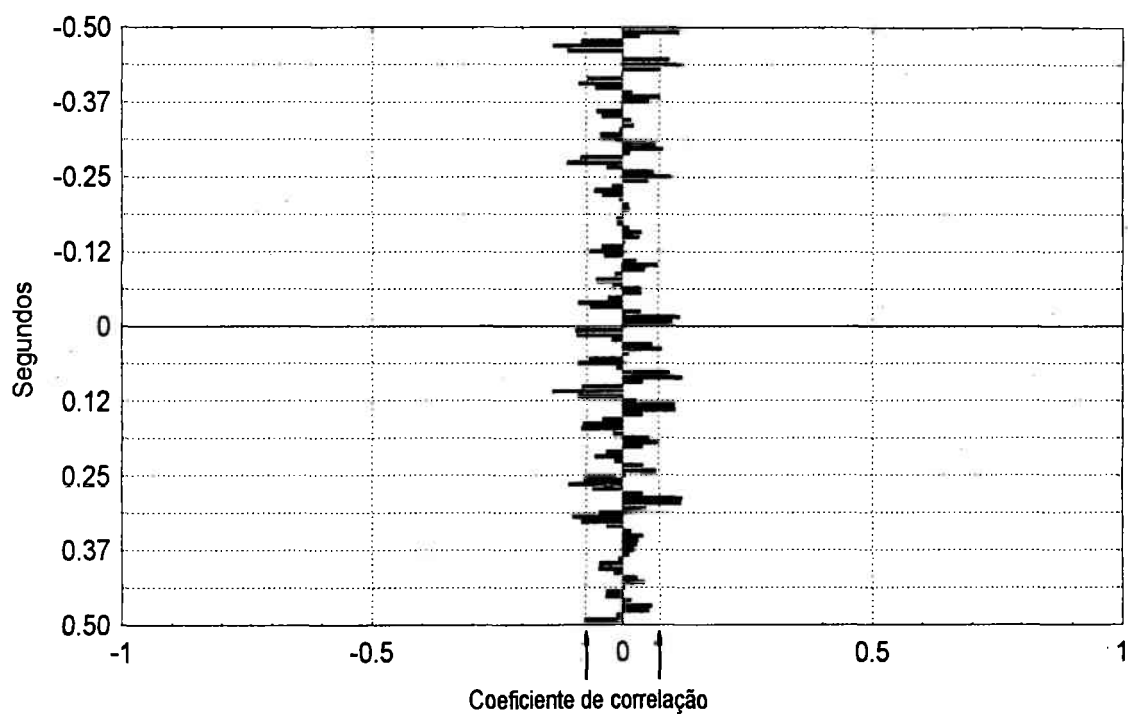


HA



### Função de Correlação Cruzada

Vigília alerta : HP (1) vs. HA (2)



**Figura 26** - Representação gráfica da função de correlação cruzada entre HP e HA durante a vigília alerta. Da mesma forma que na fig. 26, os dois traçados eletroscilográficos na parte superior da figura (HP e HA) representam os sinais originais de 6 segundos de onde foram extraídos os dados para a análise de correlação cruzada. Os limites mínimos de significância de correlação estão indicados pelas setas ( $p=0,05$ ). Barras de calibração:  $50 \mu\text{V}$  (vertical); 1 s (horizontal).

## IV - DISCUSSÃO

### 1. O EOsG do hipocampo

Nossos dados revelam que a variação na amplitude do traçado, entre os diversos estados comportamentais, representa uma característica relevante do EOsG do hipocampo. As mudanças neste atributo diferenciam os estados de menor atividade comportamental (VR e SOL), dos estados de alerta mais intenso e do sono paradoxal. Durante estes últimos (VA, SOM, LUZ e SP), nota-se um traçado irregular de baixa amplitude. Já durante a VR e o SOL, o aspecto visual do traçado mostra aumento acentuado da amplitude do EOsG em comparação com os estados de alerta e SP.

Tais características, observadas na análise visual, refletem-se na análise quantitativa do EOsG-hp. As potências totais são maiores durante a VR e SOL do que durante os estados de VA, SOM, LUZ e SP. A borda espectral de 50 %, embora não varie entre a maioria dos estados, sofre redução acentuada durante o SOL. O número de ondas é maior na VR e no SOL do que durante VA, SOM, LUZ e SP. O somatório das amplitudes é maior na VR do que no SOL, que por sua vez é maior do que nos estados de VA, SOM, LUZ e SP.

O perfil espectrográfico do EOsG-hp de pombos ostenta 3 grupos ou bandas de frequência, que apresentam comportamentos quantitativos diferentes nos diversos estados comportamentais: uma atividade em torno de 2 Hz; uma banda de 6 a 10 Hz; e uma banda de 20 a 30 Hz. As diferenças quantitativas entre os estados permitiram postular 3 padrões espectrais. Um padrão característico dos estados de VA, SOM, LUZ e SP, apre-

senta alta atividade na banda em torno de 2 Hz, baixa atividade na banda de 6 a 10 Hz, e as mais altas potências relativas na banda de 20 a 30 Hz, em relação aos outros estados. Um segundo padrão, característico da VR, apresenta baixa atividade na banda de 2 Hz, a mais alta atividade entre os estados na banda de 6 a 10 Hz, e baixa atividade na banda de 20 a 30 Hz. Um terceiro padrão espectral, característico do SOL, apresenta alta potência relativa na banda de 2 Hz, baixa atividade na banda de 6 a 10 Hz, e as menores potências relativas na banda de 20 a 30 Hz. Observou-se também através da análise de autocorrelação, atividade rítmica de 5 Hz atuando como um pano de fundo, tanto nos estados relaxados quanto nos estados alerta, porém com intensidades diferentes.

Esses resultados parecem sugerir que existe uma separação muito tênue entre o que neste trabalho é classificado como alerta espontâneo (VA) e vigília relaxada (VR), e uma diferença mais marcante entre VR e alerta provocado por estimulação sensorial. Parece que a VA compartilha características com VR e com os alertas provocados, representando um estado de transição entre os outros dois. Entretanto a grande incidência de PGAs, na forma de surtos sucessivos, é o principal discriminador de VR em relação a VA.

Comparativamente à extensa investigação sobre o tema, já realizada em mamíferos, existem poucos trabalhos relatando as características do EOsG-hp em aves. Os primeiros estudos eletroscilográficos descritos em diferentes espécies de aves indicaram a presença, no telencéfalo, de ondas lentas de 2 a 3 Hz e amplitude por volta de 100  $\mu$ V durante o sono (Klein, Michel e Jouvet, 1964). Essas ondas foram consideradas como semelhantes àquelas presentes durante o sono de mamíferos (Tauber, 1974). Uma das primeiras constatações dos diversos pesquisadores, em relação ao EOsG telencefálico de

aves, é que a amplitude das ondas do traçado depende da região onde os eletrodos são posicionados. Tem sido observado que os eletrodos localizados nas regiões mais posteriores do telencéfalo dorsomedial são mais eficazes do que os mais rostrais, em registrar ondas de grande amplitudes (Van Twyver e Allison, 1972; Tobler e Borbély, 1988).

Além disso, os estudos existentes do eletroscilograma do telencéfalo de aves têm como premissa a investigação das características eletroscilográficas diferentes estados comportamentais do ciclo sono-vigília, sem um envolvimento com a avaliação quantitativa do eletroscilograma em si. A maioria desses trabalhos com aves foi desenvolvida em galinhas (Ookawa e Gotoh, 1965; Sugihara e Gotoh, 1973, van Luijtelaar *et al.*, 1987), e pombos (Tradardi, 1966; Van Twyver e Allison, 1972; Walker e Berger 1972; Tobler e Borbély, 1988; Phillips e Berger, 1991; Berger e Phillips, 1994). O padrão de distribuição do ciclo sono-vigília também tem sido estudado em periquitos (Ayala-Guerrero, Péres e Calderón, 1988), gansos (Dewasmes *et al.*, 1985), corvos (Szymezak, 1987) e pombos selvagens (Ayala-Guerrero e Vasconcelos-Dueñas, 1988). Desses trabalhos, somente Ookawa e Gotoh (1965), Van Twyver e Allison (1972) e Szymezak (1987), relatam registros localizados no hipocampo, sendo que somente Van Twyver e Allison (1972) utilizaram pombos domésticos.

Em um experimento minucioso com registros eletroscilográficos monopolares no hipocampo dorsal e ventral (entre outras áreas do telencéfalo de galinhas), Sugihara e Gotoh (1973) relataram que durante a VA o EOsG consistia de ondas de 2 a 3 Hz e amplitude de 20 a 30  $\mu\text{V}$  e ondas de 30 a 40 Hz e amplitude de 10 a 15  $\mu\text{V}$ . Durante o SOL estavam presentes ondas de 2 a 8 Hz e 40 a 50  $\mu\text{V}$  de amplitude e ondas de 30 a 40 Hz e 5 a 10  $\mu\text{V}$  de amplitude. Durante o SP observaram atividade semelhante ao visto durante

a VA. Além disso, compararam a distribuição da densidade espectral durante a VA, o SOL e o SP. Nesse trabalho foi observado que todas as áreas apresentaram maior densidade de ondas rápidas durante a VA e SP do que durante o SOL. Observaram também que no HA e HP dorsal o aumento na atividade de ondas rápidas estava associada a uma diminuição da atividade das ondas lentas, não tendo sido identificadas diferenças entre as duas áreas. Szymezak (1987) e Van Twyver e Allison (1972) obtiveram resultados semelhantes.

Como pode ser observado, existem algumas semelhanças e algumas divergências entre os resultados relatados no presente trabalho e os constantes da literatura. Nenhum dos experimentos relatados indicou variações na distribuição de potência espectral hipocampal, que permitissem diferenciar a VR do SOL. Tobler e Borbély (1988) não encontraram diferenças na potência espectral entre vigília relaxada e SOL, além de afirmar que as diferenças entre os diversos outros estados, apesar de existirem, foram muito pequenas. O nítido aumento de potência na banda de 6 a 10 Hz, e a redução na potência relativa nas frequências em torno de 2 Hz durante a VR, relatados nesse trabalho, não são apontados nos outros experimentos. Em relação às mais altas frequências, os resultados aqui apresentados estão de acordo com o observado por outros autores. Deve ser lembrado também, que neste trabalho foram utilizados eletrodos com 0,3 mm de diâmetro, captando a atividade, através de registros bipolares, de grupos neuronais abrangidos por um intervalo intereletrodos em torno de 0,5 mm. Esses eletrodos cobrem um campo neuronal menor que o utilizado por outros autores em aves. Bullock e Basar (1988), após uma detalhada investigação comparando a atividade elétrica cerebral espontânea entre vertebrados e invertebrados, levanta uma questão intrigante. Porque os registros típicos de atividade elétrica neuronal de invertebrados, mesmo utilizando-se grandes eletrodos,



são caracterizados por grandes picos de atividade, enquanto que o registro do mesmo tipo de atividade no cérebro de vertebrados, só é possível com exploração cuidadosa utilizando-se microeletrodos? Os autores levantam a possibilidade de que existe uma diferença geral na impedância dos tecidos, de tal forma que os componentes de alta frequência dos campos extracelulares, são atenuados pelas capacitâncias em série e paralelo geradas pela maior quantidade de tecido glial no cérebro dos vertebrados. Seguindo esse raciocínio, pode ser dito que o telencéfalo do pombo se encontra em um meio termo aos extremos propostos por Bullock e Basar (1988).

Algumas das características do EOsG hipocampal aqui relatadas merecem um exame mais detalhado. Uma delas é a concentração de atividade em 2 Hz. Tanto durante os estados de VA, LUZ, SOM e SP, quanto durante o SOL, foi observada intensa atividade na banda em torno de 2 Hz. Esse acentuado predomínio dessa atividade pode estar associado ao fato de que durante esses estados ocorre uma redução geral na potência relativa das atividades das frequências entre 6 e 10 Hz, e pode estar também associado à ausência ou diminuição na incidência de PGAs nestes períodos.

Outra característica a ser ressaltada é a atividade eletroscilográfica observada durante o SOM e a LUZ. Esta parece ser governada por mecanismos dessincronizadores, exclusivos ou especiais. O padrão parece ser um padrão transitório, vinculado exclusivamente à intensa reação de alerta. Bastam 5 a 10 segundos após o estímulo e as atividades lentas, incluindo as PGAs esporádicas começam a reaparecer, restabelecendo o padrão típico de VA, e, em seqüência, o de VR. Convém lembrar também que durante a locomoção as PGAs e as ondas lentas também desaparecem, o que indica que a ausência

de PGAs e ondas lentas sinaliza estados comportamentais de extremo alerta ou envolvimento sensório-motor do animal com o ambiente.

Um outro diferenciador importante entre VA e VR é a atividade na banda de 20 a 30 Hz. Durante a VR a potência relativa nessa banda foi significativamente menor do que na VA. Entretanto essa banda não serve para diferenciar VA de LUZ ou SOM, uma vez que não existem diferenças significativas entre tais estados em relação a essa banda de atividade. Tais dados parecem sugerir que o estado de alerta intenso e espontâneo é uma situação muito fugaz, e que o pombo permanece a maioria do tempo em graus variados entre vigília relaxada e de sono de ondas lentas, pelo menos na presente situação experimental.

A análise do espectrograma, isoladamente, não se mostrou eficaz em diferenciar o sono paradoxal dos estados de alerta. Durante o SP, o perfil espectrográfico é muito semelhante ao observado nos estados de alerta. Apresenta-se com grande atividade na banda em torno de 2 Hz, a potência relativa é baixa na banda de 6 a 10 Hz e alta na banda de 20 a 30 Hz. Entretanto, essas características associadas a) a baixíssima potência total e amplitude, b) ao baixo número de ondas, c) a ausência de PGAs, d) às alterações eletromiográficas e e) às alterações comportamentais, permitem uma identificação e diferenciação seguras do SP em relação aos outros estados.

A combinação do aumento de amplitude do traçado oscilográfico, do aumento de potência total do EOGs-hp, da nítida diminuição da borda espectral de 50 % durante o SOL, com a predominância de amplitude e elevada potência nas frequências em torno de 2 Hz, sugerem a possibilidade de que nos estados mais relaxados (VR e SOL) possa estar ocorrendo alguma forma de sincronização do traçado eletroscilográfico hipocampal

dos pombos. Esse aumento na amplitude lembra, a grosso modo, o fenômeno de sincronização que é observado nos EOsGs corticais de mamíferos presentes durante os estados de sono de ondas lentas (*e. g.* Singer, 1993; Coenen, 1995; Contreras e Steriade, 1995), e que será discutido a diante.

Outra característica do traçado eletroscilográfico hipocampal de pombos durante a VR, notável à inspeção visual, é a presença marcante de PGAs, principalmente na forma de surtos de 3 a 8 ondas, com amplitudes nitidamente superiores ao traçado de fundo, associadas às ondas lentas já citadas. Durante o SOL, a incidência e a amplitude das PGAs não foram estatisticamente diferentes da VR, entretanto, visualmente, aparentou uma tendência à diminuição na incidência como ondas isoladas. Além disso, não foram observados os surtos de ondas identificados durante a VR. Durante os episódios de sono paradoxal não foi constatada a presença de PGAs. Nos estados de alerta houve uma redução drástica na ocorrência das PGAs isoladas, na ocorrência dos surtos (principalmente), e na amplitude das PGAs.

As PGAs parecem ser uma atividade característica da VR, principalmente devido ao padrão de ocorrência em surtos. Durante o SOL pode ser observado que, além da tendência na redução no número, as PGAs estão distribuídas de forma mais regular ao longo do EOsG, sem formar os surtos de ondas característicos da VR. O padrão de incidência das PGAs durante os estados de alerta provocado por estimulação sonora e luminosa, e nos segundos que se seguem, é um exemplo valioso da importância da relação presença de PGAs e estado comportamental. Durante esse período os animais apresentaram comportamento característico de alerta intenso, sem a presença de PGAs. À medida em que

assumiam postura típica de postura relaxada, as PGAs reapareciam, inicialmente de forma isolada e depois como surtos com amplitudes progressivamente maiores.

PGAs e ondas lentas são atividades que podem representar a atividade sincrônica de grandes populações celulares. Tem sido demonstrado que os potenciais extracelulares registrados a partir da superfície do cérebro representam a soma espacial de campos de flutuações de potenciais espontâneos e provocados de um grande número de neurônios (e.g. Bullock e Basar, 1988). Assume-se que a principal contribuição para a geração das ondas lentas do EOsG, registrado na superfície do cérebro dos mamíferos, vem de numerosos neurônios localizados nas camadas corticais, e particularmente, dos grandes neurônios piramidais orientados perpendicularmente à superfície cortical, com arborização dendrítica nas camadas superficiais paralelas à superfície do córtex (Coenen, 1995). Sequências de processos excitatórios e inibitórios nessas células piramidais poderiam ser responsáveis pela geração das ondas lentas de grande amplitude nas frequências de 0,5 a 4,0 Hz, conhecida como banda delta, característica do sono de ondas lentas do córtex de mamíferos (Steriade *et al.*, 1990).

É amplamente aceito que sincronização envolve a ocorrência de oscilações de alta amplitude com frequências relativamente lentas, enquanto que a dessincronização envolve a substituição do ritmo sincronizado por ondas relativamente rápidas e de baixa amplitude (Steriade *et al.*, 1990). Sincronização é um estado no qual dois ou mais osciladores apresentam a mesma frequência devido a alguma forma de interação. A ritmicidade das oscilações pode surgir como resultado da atividade de células marcapasso, dotadas com atividade oscilatória intrínseca, conectadas a uma população de células com uma característica ressonante em particular. Alternativamente, a ritmicidade pode emer-

gir de interações celulares dentro de uma rede de células, mesmo na ausência de algum elemento com auto-ritmicidade (Singer, 1993; Steriade, 1995).

A atividade lenta de grande amplitude nos traçados eletroscilográficos hipocámpais durante VR e SOL em pombos mostrados no presente trabalho, permite levantar algumas questões. Os equivalentes corticais do telencéfalo de aves não apresentam a organização multilaminada e colunar envolvendo as células piramidais vistas em mamíferos, e que são necessárias para a atividade sincronizada tal como ela aparece nessa classe (*e. g.* Coenen, 1995). Ao contrário, o telencéfalo de aves é caracterizado por largos campos de células, alguns grupos de núcleos e por um fino revestimento laminado (Benowitz, 1980), isento de células piramidais características do neocórtex de mamíferos (Ariëns Kappers, 1936). Dessa forma, uma possível explicação para as grandes amplitudes vistas durante os estados mais relaxados, é que poderia haver, durante esses estados, alguma forma de cooperação celular que resultasse em uma atividade elétrica orientada das células subjacentes aos eletrodos de registro, permitindo o surgimento de pequenos surtos de sincronização. Esses surtos seriam os responsáveis pelas repetidas elevações (sincronização) e reduções de amplitude nas ondas em torno de 2 Hz, entremeadas com atividade irregular de maior frequência e menor amplitude (dessincronização), e responsáveis pela presença de PGAs, ambas características da VR e SOL das aves.

Atividade tipo ondas em ponta de grande amplitude, semelhantes às PGAs descritas neste trabalho, também são relatadas no córtex dorsomedial em outras classes de animais. Ondas de grande amplitude, parecidas a artefatos de movimentos, geralmente bifásicas, com amplitude variando entre 100 e 300  $\mu$ V e duração de 0,25 - 0,75 s (muito semelhantes às PGAs), são encontradas no EOsG do córtex medial de tartarugas

(*Pseudemys scripta elegans*; Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock, 1991). Os autores observaram que essa atividade, presente durante os estados mais relaxados, desaparece com o alerta provocado por estimulação sensorial. Atividade semelhante também é relatada no EOsG do telencéfalo do iguana do deserto (*Dipsosaurus dorsalis*), mais intensamente presente durante o despertar e sono paradoxal, e reduzido durante os estados não ativos (Huntley, 1986). Outros registros eletroscilográficos feitos em tartaruga (*Kinosternon sp.*), durante os diferentes estados comportamentais do ciclo vigila-sono, mostram a presença de atividade intermitente em pico, de grande amplitude (Ayala-Guerrero, 1987), com maior incidência durante o sono comportamental.

Uma característica do EOsG hipocampal de ratos (Gottesmann, 1992), e de outros mamíferos (gatos: Demiralp *et al.*, 1994; Poe *et al.*, 1996; coelhos: Harper, 1971; gerbilo: Ambrosini *et al.*, 1994), é a ocorrência de um ritmo na faixa de 4 a 10 Hz, chamado de ritmo teta, proeminente durante os estados de VA e de SP (Gaztelu *et al.*, 1994). Existem evidências de que a atividade teta hipocampal está relacionada com a atividade motora concorrente, derivadas a partir de experimentos em que a atividade coletiva hipocampal de ratos foi registrada simultaneamente aos registros dos comportamentos espontâneos (Vanderwolf, 1969). Nesses experimentos observou-se a existência de dois grupos de comportamentos associados a dois padrões de atividade eletroscilográfica hipocampal. O comportamento tipo 1 consiste principalmente de movimentos exploratórios tipo movimentos da cabeça, mudanças posturais, movimentos manipulatórios e todos os tipos de comportamentos locomotores. Esses comportamentos são acompanhados de atividade eletroscilográfica composta por ondas teta rítmicas lentas (RSA) no hipocampo. De particular interesse para o presente trabalho, um outro grupo de comportamentos, denominado tipo 2 e também referido como comportamento automático, consiste principalmen-

te de imobilidade alerta, tremor e comportamentos de autolimpeza (Vanderwolf, 1969, 1983 e 1992; Robertson, Baker e Vanderwolf, 1991; Stewart, Macfabe e Vanderwolf, 1984 e Inglis e Fibiger, 1995), e está associado a um padrão de atividade teta lenta irregular (LIA; Vanderwolf, 1992), também denominado padrão de repouso.

Essa atividade parece ser muito semelhante à atividade lenta irregular, associada às PGAs, observada no EOsGs-hp dos pombos durante os estados de VR (principalmente) e SOL. De acordo com Vanderwolf (1992), durante estados de repouso, o hipocampo e o giro denteado de mamíferos, exibem um padrão de atividade lenta irregular (LIA) com pico espectral entre 2 e 4 Hz, com potências gradualmente menores nas frequências mais altas. Essa atividade é acompanhada de picos isolados ou conjuntos densos de 2 a 7 picos com amplitudes progressivamente menores, e uma incidência geralmente bem inferior a 10 picos por segundo (Vanderwolf, 1992).

O hipocampo de mamíferos apresenta ondas em ponta ou em pico, que podem ser pelo menos análogas a essas ondas observadas em répteis (Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock, 1991). As LIA são observadas durante estados não acompanhados por ritmo teta, tais como sono de ondas lentas e imobilidade alerta, e são substituídas por RSA durante o andar e sono paradoxal. Durante esses estados são encontradas ondas de grande amplitude com duração de cerca de 0,1 s, que ocorrem isoladamente ou em surtos de 2 a 7 ondas com amplitude progressivamente decrescente. As características dessas ondas, o padrão de ocorrência em surtos com amplitudes progressivamente menores, e a incidência durante estados de repouso, parece ser comparável ao perfil das ondas PGAs visto em pombos neste trabalho.

O telencéfalo dorsomedial de aves, (hipocampo + área parahipocampal), tem sido caracterizado como equivalente ao hipocampo de mamíferos, ambos sendo possivelmente derivados do córtex dorsomedial do mesmo réptil ancestral (Casini, Bingman e Bagnoli, 1986). Essas afirmações têm base em achados anatômicos experimentais (Krayniak e Siegel, 1978; Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Bingman *et al.* 1994), imuno-histoquímicos (Krebs, Erichsen e Bingman, 1987) e comportamentais (Bingman *et al.*, 1988a e b; Sherry *et al.*, 1989; Krebs, 1990). Evidências adicionais como organização topológica com relação ao ventrículo lateral, a organização trilaminar e diversidade de tipos celulares, a origem de aferências e eferências (Benowitz e Karten, 1976; Marino-Neto, 1988; Krebs, Erichsen e Bingman, 1991), vêm reforçar a idéia de similaridade. Tomados juntos, os trabalhos feitos até o momento, oferecem evidências, hodológicas e neuroquímicas, apoiando a hipótese de que o telencéfalo dorsomedial de aves é homólogo ao córtex dorsomedial de répteis e ao hipocampo de mamíferos (Schwerdtfeger e Germroth, 1990; Casini, Bingman e Bagnoli, 1986). Nesse sentido, os dados enfatizam a natureza conservativa das conexões dessas estruturas durante o curso da evolução, apesar de topologicamente variável. Dessa forma, a aparente similaridade das aves e répteis com mamíferos, indica que a organização básica das conexões hipocâmpais já exista talvez há 300 milhões de anos (Casini, Bingman e Bagnoli, 1986). Algumas dessas conexões podem vir a ser importantes para uma discussão da origem das atividades lentas e das PGAs.

Adicionalmente, reforçando a possibilidade da existência da mesma atividade lenta irregular no hipocampo de pombos, supõe-se que durante a ocorrência da atividade lenta irregular (LIA) em mamíferos, ambas vias modulatórias (RPO e PPT) (Vertes *et al.*, 1993) de projeções ascendentes estejam inativas (Vanderwolf, 1992).



Estudos utilizando técnicas de rastreamento axonal pelo transporte anterógrado e retrógrado da WGA-HRP em pombos, demonstraram que o hipocampo recebe conexões do prosencéfalo basal (incluindo área septal, distritos pré ópticos), da formação reticular pontina e mesencefálica, e do núcleo tegmental pedúnculo pontino (*e. g.* Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Marino-Neto, 1988). Dessa forma, embora não existindo evidências diretas de mecanismos sincronizadores, ou geradores das ondas lentas presentes em aves, parece possível que no pombo exista pelo menos o substrato anatômico básico, análogo ao dos mamíferos, para a regulação de tais fenômenos.

A atividade telencefálica dessincronizada em mamíferos é instalada e mantida por grandes sistemas de fibras ascendentes ao córtex. Estes sistemas incluem 1) aferentes originados em neurônios colinérgicos provenientes do prosencéfalo basal para o córtex, e 2) em neurônios colinérgicos pontomesencefálicos para o tálamo. Tal sistema ascendente inclui ainda projeções de grupos noradrenérgicos, com origem principalmente no locus ceruleus, e serotonérgicos, originados nos núcleos mais rostrais da rafe (*e. g.* Steriade, *et al.*, 1990).

À semelhança do observado em mamíferos, muitos desses atributos anatômicos e funcionais poderiam estar presentes em aves.

Evidências funcionais nesse sentido foram relatadas pelo grupo de G. Moruzzi (Brunelli, Magni, Moruzzi e Musumeci, 1972). Em uma série de experimentos em pombos intactos e talâmicos agudos e crônicos esses autores observaram alterações profundas e seletivas dos padrões comportamentais típicos do sono após estimulação elétrica da formação reticular pontina e mesencefálica. As projeções ascendentes do tronco cerebral e prosencéfalo basal para o telencéfalo em aves, foram posteriormente investigadas por

inúmeros pesquisadores (e.g. Benovitz e Karten, 1975; Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Marino-Neto, 1988; Krebs, Erichsen e Bingman, 1991).

Dessa forma, a análise dos resultados até aqui expostos, à luz das características morfológicas e funcionais do hipocampo do pombo, e das comparações com aspectos relevantes do EOsG de répteis e mamíferos, permite levantar duas possibilidades. A lentificação do EOsGs-hp durante os estados de VR e SOL poderia ser resultado de um processo transitório de sincronização, dada a presença de elementos análogos às estruturas necessárias para a geração de sincronização encontradas em mamíferos (e. g. Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Marino-Neto, 1988) e discutidas acima. A segunda possibilidade diz respeito à atividade PGA, observada predominantemente nos estados comportamentais mais relaxados. É possível que as PGAs representem um equivalente eletrosciolográfico das atividades em ponta observada durante os eventos de LIA em mamíferos (Vanderwolf, 1992). Nestes últimos, tais atividades ocorreriam durante períodos de supressão da atividade modulatória colinérgica (provenientes do RPO e PPT), resultando na geração da atividade teta no hipocampo. A presença de atividade em ponta de grande amplitude vista em répteis (e. g. Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock, 1991), e aves (descritas neste trabalho), a presença do substrato anatômico em aves para a geração dessa atividade, permitem conjecturar se, nas aves, o conjunto de estruturas formado por hipocampo, área septal, núcleo da banda diagonal, RPO e PPT, teria um comportamento semelhante ao que é proposto para a geração da atividade LIA em mamíferos.

## 2. O EOsG do hiperestriado acessório

Os resultados da inspeção visual do EOsG-ha, assim como no hipocampo, mostram que a diferença eletroscilográfica mais evidente entre os diversos estados comportamentais ocorre na amplitude do traçado. Em qualquer estado que se considere, o traçado eletroscilográfico é irregular e mesclado de atividades de ondas lentas e rápidas. Os estados de alerta mais intenso apresentam as menores amplitudes, enquanto que a VR e o SOL apresentam as maiores amplitudes. Entretanto, existem algumas diferenças significantes entre as duas áreas estudadas. A amplitude do EOsGs-ha é sempre menor que no HP para qualquer estado que se considere. A análise visual do EOsGs-ha não identificou a presença de atividade PGA em nenhum dos estados comportamentais analisados.

Durante a VA, SOM e LUZ, o EOsGs-ha é formado por ondas esparsas de 2 a 4 Hz, com as maiores amplitudes. Essas estão associadas a atividades entre 5 e 10 Hz e amplitude em torno de 10  $\mu$ V, ondas entre 10 e 15 Hz com amplitudes abaixo de 10  $\mu$ V, e ondas com frequências acima de 15 Hz, de muito baixa amplitude. Durante o alerta provocado por SOM e LUZ, a amplitude do traçado eletroscilográfico parece reduzir drasticamente, sugerindo uma sensibilidade grande do HA à estimulação sensorial.

Durante os estados de VR e SOL, ocorre aumento acentuado de todas as frequências do espectro no EOsGs-ha. Entretanto as ondas de menor frequência (2 a 4 Hz) persistem mescladas com frequências mais altas, mais evidentes durante esses estados. Dessa forma, não foi possível identificar ao exame visual um tipo de atividade ou frequência que pudesse ser rotulada como característica ou típica de um determinado estado. A discriminação de estados através da inspeção visual do EOsGs-ha, só é possível

mediante a visualização simultânea a outros descritores, tais como eventos comportamentais e eletromiograma.

No HA também são encontradas diferenças entre estados nos parâmetros espectrais (potência total e borda espectral), e aperiódicos (somatório das amplitudes e número de ondas). Durante a VR e o SOL há um aumento das potências totais em relação aos estados de VA, SOM e LUZ. A borda espectral de 50 % é menor nos estados de VR e SOL do que nos estados de alerta mais intenso. O número de ondas sofreu uma redução acentuada durante o SOL em relação aos outros estados. O somatório das amplitudes é maior durante VR e SOL (sem diferenças entre esses estados), e bem menor durante os estados de VA, SOM e LUZ. A análise espectral do EOGs-ha evidencia uma baixa potência na banda de até 1 Hz, seguida de elevação acentuada da potência relativa na banda de 2 Hz, para então ir paulatinamente reduzindo a potência nas bandas mais altas. A análise espectral mostra ainda que, no HA, não há diferenças nas potências relativas em nenhuma frequência até 19 Hz, em qualquer estado comportamental que se considere. As potências relativas aumentam durante os estados mais relaxados e diminuem durante os estados mais alertas em igual proporção. Apenas a banda de frequência de 20 a 30 Hz aumenta de potência relativa nos estados de VA, LUZ e SOM, em relação aos estados de VR e SOL, e pode ser utilizada para discriminar quantitativamente os estados de repouso dos demais estados.

As considerações levantadas na inspeção visual e quantitativa do EOGs-ha encontram respaldo na análise de autocorrelação dos traçados, que indica a presença de atividade rítmica apenas durante a VR. Tal atividade aparece apenas na frequência em torno de 3 Hz, e ainda assim com um discreto coeficiente de autocorrelação. Nenhuma

atividade rítmica foi identificada nos estados de alerta mais intensos. O baixo coeficiente de autocorrelação observado na frequência de cerca de 3 Hz durante a VR, revela que a atividade oscilográfica do HA está muito perto de ser considerada um ruído branco, resultado de processos randômicos neuronais sem qualquer ritmicidade (Anderson, 1976), principalmente durante os estados de alerta.

Esses resultados indicam que o comportamento do espectrograma do HA varia muito pouco de um estado comportamental para outro. Parece não existir uma banda de frequência ou ritmo que esteja predominando durante um determinado estado comportamental, e dessa forma servir como referencial para discriminar um estado de outro. É possível somente uma grosseira discriminação entre os espectrogramas dos estado alerta e relaxado, através da distribuição das potências relativas nas frequências acima de 20 Hz. Por ser uma área reconhecidamente envolvida em processamento visual, poderia se esperar uma maior reatividade do HA à presença de estímulo visual, que, entretanto, não se configurou em diferença estatisticamente significante. A análise visual das projeções planas das potências relativas das frequências de 20 a 30 Hz, mostram uma aparente tendência de maior atividade durante a LUZ do que nos outros estados estudados. Já durante o SOL, as potências em todas as frequências na banda de 20 a 30 Hz, mostraram tendência a serem menores do que durante a VR, mas novamente sem diferenças estatísticas significantes.

Dessa forma a análise visual, somada à análise quantitativa e aos recursos de representação gráfica do espectrograma, mostram dois perfis diferentes do espectrograma do HA: um característico dos estados de VR e SOL, com alta amplitude e baixa atividade nas frequências acima de 20 Hz; e outro característico dos estado de VA, SOM e LUZ, com baixa amplitude e com maior potência relativa entre 20 e 30 Hz. Os resultados sugere-

rem também que parece existir uma responsividade discretamente maior do HA à dessincronização obtida após estímulos luminosos do que após estímulos sonoros.

Estudos realizados por Ookawa e Gotoh (1965) em galinhas domésticas, revelaram nas regiões correspondentes ao HA, durante vigília relaxada, atividades em ondas de 3 a 4 Hz e de 6 a 12 Hz com grande amplitude, e em ondas de 17 a 24 Hz e de 30 a 60 Hz de baixa amplitude. Durante o sono de ondas lentas, as frequências variaram entre 3 e 12 Hz, de acordo com o estágio, e amplitudes de até 300  $\mu\text{V}$ . Durante a VA, havia predomínio de ondas acima de 17 Hz, e amplitudes em torno de 50  $\mu\text{V}$ . Registros tripolares do HA de galinhas mostraram durante a vigília a presença de ondas rápidas e amplitude menor que 80  $\mu\text{V}$ , durante o SOL surgiam ondas de 5 Hz ou menos e amplitude superior a 80  $\mu\text{V}$  (van Luijtelaaar *et al.*, 1987). Registros bipolares interhemisféricos do HA de gansos (Dewasmes *et al.*, 1985), mostram ondas superiores a 13 Hz e amplitudes menores que 50  $\mu\text{V}$  durante a VA. Durante a VR (*drowsiness*) os registros se tornam polimórficos com ondas de 6 a 13 Hz e 100 a 150  $\mu\text{V}$ , e ondas menores que 6 Hz e amplitude de 150 a 300  $\mu\text{V}$ . Durante o SOL as ondas acima de 6 Hz desaparecem.

Como pode ser notado, apesar de algumas variações entre espécies e entre autores, de uma maneira geral não existe grande diferença entre os dados constantes da literatura pertinente e os resultados extraídos da análise visual neste trabalho com pombos. Entretanto, as descrições e análises do EOSG de aves em sua maioria são fundamentadas essencialmente no exame visual do traçado. Os métodos complementares de análise quantitativa do EOSG (análise espectral e a análise aperiódica), utilizados neste trabalho, foram escassamente utilizados para o estudo do EOSG de aves (*e.g.*, Tobler e Borbély,

1988). Mais ainda, nenhum dos trabalhos acima citados, submeteu registros de HA a análise quantitativa nos termos aqui propostos.

Em resumo, existe certo consenso entre os autores ao descreverem as características do EOG-ha em aves, que não difere, no seu aspecto geral, do relatado no presente trabalho. Durante vigília alerta, ocorre uma diminuição geral da amplitude do traçado eletroscilográfico, e salientam-se as atividades de alta frequência. Nos períodos de transição da vigília relaxada para os estágios iniciais do sono, as ondas de pequena amplitude são gradativamente substituídas por ondas de grande amplitude, que lembram aquelas encontradas durante o sono de ondas lentas (sono sincronizado) dos mamíferos (e. g. Tobler e Borbély, 1988; van Luijtelaaar *et al.*, 1987).

O aumento de amplitude, principalmente das ondas entre 2 e 4 Hz, o aumento da potência total observados durante a VR e o SOL, mais a redução na borda espectral, também permitem sugerir a existência no traçado eletroscilográfico do HA de um processo que lembra surtos de sincronização, reminescentes (em termos de variações de amplitude) da sincronização relatada em mamíferos durante o sono de ondas lentas (e. g. Contreras e Steriade, 1995).

Além disso, o Wulst, do qual o HA é parte, tem uma organização que, em algumas características, se assemelha ao observado no córtex visual de mamíferos, e dessa forma reforçam a possibilidade. A porção visual do Wulst contém pelo menos quatro constituintes principais, a partir da superfície dorsal para dentro do telencéfalo: o hiperestriado acessório; o núcleo intercalado do hiperestriado acessório; o hiperestriado intercalado superior; e o hiperestriado dorsal (Karten *et al.*, 1973; Reiner e Karten, 1983; Bagnoli e Burkhalter, 1983; Shimizu e Karten, 1990; Veenman, Wild e Reiner, 1995;

Shimizu, Cox e Karten, 1995). A porção visual do Wulst tem sido considerada comparável ao córtex estriado dos mamíferos com base no número de características compartilhadas pelas duas estruturas (e. g. Karten *et al*, 1973). Ambas estruturas são caracterizadas por uma configuração citoarquitetônica laminar, e por uma organização retinotópica dos campos receptivos. De forma comparável ao observado no córtex estriado de mamíferos, o Wulst de aves recebe impulsos visuais diretamente do tálamo dorsal, e tem organização laminar (embora composta apenas por 3 camadas) das camadas de células. Além disso, ocorre intensa interconexão entre as células das diferentes camadas, sugerem uma organização colunar dos campos receptivos visuais através das camadas superficiais para as mais profundas do Wulst (Shimizu, Cox e Karten, 1995; Veenman, Wild e Reiner, 1995). Deve ser lembrado que a organização celular, perpendicular à superfície (colunar), é uma das condições para a ocorrência de atividade organizada de forma sincronizada (e. g. Coenen, 1995). Todas essas evidências em favor da hipótese de homologia entre Wulst visual de aves e córtex visual de mamíferos (Butler, 1993), mais as evidências de conexões ascendentes entre as células das lâminas mais internas com as mais superficiais (Shimizu, 1990), abrem espaço para se postular a possibilidade de geração, nas estruturas do Wulst, de atividade com algum grau de sincronização.

Entretanto, apesar das inúmeras evidências de que o Wulst exerce algumas funções semelhantes às atribuídas a porções do córtex visual de mamíferos, e dos inúmeros relatos de similaridades hodológicas, citoarquitetônicas e imunohistoquímicas entre aves e mamíferos, em relação a este território, a presente análise eletroscilográfica indica que, aparentemente, o “*modus operandi*” do comportamento elétrico coletivo das células do HA, e possivelmente das estruturas subjacentes deve ser bastante diferente do observado no córtex estriado de mamíferos. Neste último, por exemplo, é marcante a presença de



atividades rítmicas sincronizadas de baixa frequência (8 a 13 Hz) conhecidas como padrão alfa (*e. g.* Cooper, Osselton e Shaw, 1974) durante estados de vigília relaxada.

### **3. Comparação entre os EOsG do HP e do HA**

Na comparação visual entre as duas áreas estudadas, facilmente percebe-se que a amplitude do EOsG é sensivelmente maior no HP do que no HA em qualquer um dos estados analisados. Por si só, esse aspecto visual já é um critério seguro que pode ser usado como diferenciador entre estas duas áreas. Outra diferença visual entre as duas áreas é que no HA não foi possível identificar a presença das PGAs em nenhum dos estados comportamentais analisados.

As variáveis espectrais e aperiódicas absolutas refletem as características e diferenças observadas durante a análise visual. Todas são sensivelmente maiores no HP do que no HA em praticamente todos os estados, exceto a borda espectral de 50 % que não há diferença entre as duas áreas durante o SOL. Entretanto, no HA a borda espectral sofre uma sensível redução durante a VR, fenômeno não observado no HP. As potências totais e as amplitudes são maiores no HP do que no HA em todos os estados. Finalmente o número de ondas é sensivelmente menor durante o SOL no HA, enquanto que no HP essa redução é bem menos acentuada. Além das diferenças quantitativas nos parâmetros absolutos, também foi observado diferenças entre as áreas na intensidade dessas variações entre estados, evidenciadas pelo alto índice de significância de interação obtido pela MANOVA.

Os dados do presente trabalho também mostraram uma grande diferença entre as duas áreas no comportamento do perfil espectrográfico entre os diversos estados. Enquanto que pode-se extrair 3 grupos de frequências do EOsG-hp, com participações diferenciadas entre os diferentes estados comportamentais, no EOsG-ha somente uma banda de frequência se mostrou sensível às mudanças de estado. A única característica que é comum às duas áreas é a variação na banda de 20 a 30 Hz. Em ambas áreas ocorre um aumento na atividade nessa banda durante os estados de VA, LUZ e SOM. Dessa forma a análise espectrográfica do HA permite somente diferenciar estados ativados (VA, LUZ e SOM), de não ativados (VR e SOL). Os estados ativados são caracterizados por maior atividade na banda de 20 a 30 Hz do que nos outros estados. Por outro lado, a análise espectrográfica do HP revela um padrão típico de VR, com grande potência na banda de 6 a 10 Hz, um padrão típico de SOL, com grande potência relativa na banda de 2 Hz, e um padrão típico de VA, LUZ, SOM e SP, com alta potência nas banda de 2 Hz e de 20 a 30 Hz.

A análise de correlação cruzada entre sinais simultâneos de HP e HA, indica que durante a VR existe uma atividade de cerca de 3 Hz comum às duas áreas (provavelmente gerada em um terceiro distrito não identificado) e que desaparece durante os estados mais ativados. Durante a análise de autocorrelação do EOsG do hipocampo, não se observou atividade rítmica nessa frequência de 3 Hz em nenhum dos estados analisados. Entretanto é interessante notar que a análise de autocorrelação dos eletroscilogramas do HA, mostrou alguma atividade nessa frequência durante a VR. A ocorrência quase que simultânea dessa atividade nas duas áreas, sugere que deve existir algum distrito que durante a VR mantém uma atividade rítmica, sincronizando essa atividade nas duas áreas estudadas. Existem vários distritos que poderiam candidatar-se a geradores

dessa atividade, em função das conexões compartilhadas (por exemplo área septal e hiperestriado ventral), que mantêm conexões importantes tanto com o hipocampo quanto com o hiperestriado acessório (e.g. Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Karten *et al.*, 1973; Shimizu e Karten, 1990; Bagnoli e Burkhalter 1983).

Concluindo, a análise dos resultados relatados neste trabalho sugere que as diferenças entre estados e entre áreas poderiam ser consequência das diferenças morfológicas e funcionais entre hipocampo e hiperestriado acessório. A aparente desordem do traçado sugere, à primeira vista, que o EOsG das aves é uma atividade inespecífica comum a todo o telencéfalo. A maior ou menor amplitude do traçado registrado em diferentes áreas, observada pelos inúmeros pesquisadores da área, tem sido encarada como um atributo quantitativo servindo de referencial na investigação principalmente do ciclo sono-vigília. Entretanto, o eletroscilograma do hipocampo de pombos mostra a presença de atividades reminescentes, em parte, de atividades observadas no hipocampo de mamíferos em algumas situações comportamentais específicas, o que não foi observado no HA.

Essas semelhanças podem ser uma consequência na atividade elétrica coletiva do HP, da natureza conservativa da evolução hipocampal, isto é, da relativamente intensa semelhança entre córtex dorsomedial de répteis e o hipocampo de aves e mamíferos. Dessa forma, o eletroscilograma poderia ser mais um indicador em favor de que a organização básica dessas estruturas mais antigas talvez já exista há 300 milhões de anos (Casini, Bingman e Bagnoli, 1986)

O fato de não ter sido possível identificar qualquer semelhança nos registros oscilográficos do HA com os eletroscilogramas obtidos do córtex visual de mamíferos,

talvez também possa ser reflexo da filogenia diferenciada destes distritos. Inúmeros autores têm postulado que o Wulst de aves representa uma estrutura homóloga ao neocórtex de mamíferos, mais especificamente ao córtex estriado (*e. g.* Reiner e Karten, 1983; Benovitz, 1980; Rehkämper e Zilles, 1990). Entretanto o desenvolvimento dessas estruturas levou a formas distintas de organização celular. Ao contrário da organização hexalaminar do manto cortical de mamíferos, o telencéfalo de aves é caracterizado por grupos esparsos de células (Benovitz, 1980). Acredita-se que a evolução do neocórtex se deu em duas etapas: primeiro a origem da população neuronal com suas principais conexões e seus neurotransmissores; e um evento evolutivo independente levando a uma organização laminar desses neurônios. Isto é, a disposição laminar das populações neuronais, seria uma característica que teria aparecido como um evento separado e mais tardiamente na evolução do telencéfalo (Karten, 1991). Essa divergência na organização entre o HA de aves e o córtex estriado de mamíferos, poderia fazer parte da explicação para as diferenças observadas no EOsG. A organização e densidade dos agregados neuronais, também poderiam ser a explicação para a atividade eletroscilográfica irregular pouco diferenciada entre os estados comportamentais observados no HA.

Assim, o EOsG hipocampal das aves, complexo e diferenciado como o dos mamíferos, reflete o acúmulo de atributos provavelmente plesiomórficos destas estruturas nestas classes. Já o EOsG do HA, relativamente mais simples e dissimilar ao da estrutura análoga em mamíferos, ilustra a concentração de caracteres apomórficos, e especializados destas estruturas nos vertebrados amniotas.

Em resumo, a análise quantitativa mostrou que no hipocampo podem ser identificados 3 perfis oscilográficos que permitem caracterizar 3 grupos de estado comporta-

mental: um perfil característico da VR; um perfil característico dos estados alerta e do sono paradoxal; e um perfil característico do SOL. Por outro lado no HA, a análise quantitativa conseguiu extrair somente dois perfis eletroscilográficos, ambos diferentes do observado no HP. Dessa forma pode se afirmar que em cada uma das áreas investigadas neste trabalho, podem ser identificados padrões eletroscilográficos diferentes para diferentes estados comportamentais, e que existe evidências consistentes de que esses padrões são diferentes entre as duas áreas.

## V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHBACH, D.; CAJOCHEN, C.; TOBLER, I.; DIJK, D-J. e BORBÉLY, A. A. Sleep in a sitting position: effect of triazolam on sleep stages and EEG power spectra. **Psychopharmacol.**, 114 : 209-214, 1994.
- AMARAL, D. G. e WITTER, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neurosci.**, 31 : 571-591, 1989.
- AMBROSINI, M. V.; GAMBELUNGHE, C.; MARIUCCI, G.; BRUSCHELLI, G.; ADAMI, M. e GIUDITTA, A. Sleep-wake variables and EEG power spectra in Mongolian gerbils and wistar rats. **Physiol. Behav.**, 56 : 963-968, 1994.
- ANDERSON, O. D. **Time series analysis and forecasting**. London: Butterworths, 1976.
- ARIËNS KAPPERS, C. U.; HUBER, G. C. e CROSBY, E. C. **The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man**. (2nd ed., 1960), New York: Hafner, 1358-1399, 1936.
- AYALA-GUERRERO, F. e VASCONCELOS-DUENAS, I. Sleep in the dove *Zenaida asiatica*. **Behav. Neural Biol.**, 49 : 133-138, 1988.
- AYALA-GUERRERO, F. Sleep in the tortoise *Kinosternon sp.* **Experientia**, 43 : 296-298, 1987.
- AYALA-GUERRERO, F.; PÉREZ, M. C. e CALDERÓN, A. Sleep patterns in the bird *Aratinga canicularis*. **Physiol. Behav.**, 43 : 585-589, 1988.
- BAGNOLI, P. e BURKHALTER, A. Organization of the afferent projections to the wulst in the pigeon. **J. Comp. Neurol.**, 214 : 103-113, 1983.

- BENOWITZ, L. Functional organization of the avian telencephalon. in: EBBESSON S.O.E. (ED) **Comparative Neurology of the Telencephalon**. N.Y, Plenum, 1980, p. 389-421.
- BENOWITZ, L. I. e KARTEN, H. J. The tractus infundibuli and other afferents to the parahippocampal region of the pigeon. **Brain Res.**, 102 : 174-180, 1976.
- BERGER, R. J. e PHILLIPS, N. H. Constant light suppresses sleep and circadian rhythms in pigeons without consequent sleep rebound in darkness. **Am. J. Physiol.**, 267 (36) : R945-R952, 1994.
- BINGMAN, V. P. e MENCH, J. A. Homing behavior of hippocampus and parahippocampus lesioned pigeons following short-distance releases. **Behav. Brain Res.**, 40 : 227-238, 1990.
- BINGMAN, V. P.; CASINI, G.; NOCJAR, C. e JONES, T. Connections of the piriform cortex in homing pigeons (*Columba livia*) studied with fast blue and WGA-HRP. **Brain Behav. Evol.**, 43 : 206-218, 1994.
- BINGMAN, V. P.; IOALÉ, P.; CASINI, G. e BAGNOLI, P. Hippocampal ablated homing pigeons show a persistent impairment in the time taken to return home. **J. Comp. Physiol. A.**, 163 : 559-563, 1988b.
- BINGMAN, V. P.; IOALÉ, P.; CASINI, G. e BAGNOLI, P. Unimpaired acquisition of spatial reference memory, but impaired homing performance in hippocampal-ablated pigeons. **Behav. Brain Res.**, 27 : 179-187, 1988a.
- BRINGMANN, A. Topographic mapping of the cortical EEG power in the unrestrained rat: peripheral effects of neuroactive drugs. **Arch. Ital. Biol.**, 133 : 1-16, 1995.
- BRUNELLI, M.; MAGNI, F.; MORUZZI, G. e MUSUMECI, D. Brain stem influences on waking and sleep behaviors in the pigeon. **Arch. Ital. Biol.**, 110 : 285-321, 1972.

- BÜHRER, M.; MAITRE, P. O.; HUNG, O. e STANSKI, D. R. Electroencephalographic effects of benzodiazepines. I. Choosing an electroencephalographic parameter to measure the effect of midazolam on the central nervous system. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 48 : 544-554, 1990.
- BULLOCK, T. H. e BASAR, E. Comparison of ongoing compound field potentials in the brains of invertebrates and vertebrates. **Brain Res. Rev.**, 13 : 57-75, 1988.
- BULLOCK, T. H. The future of comparative neurology. **Amer. Zool.**, 24 : 693-700, 1984.
- BUTLER, A. B. The evolution of the dorsal pallium in the telencephalon of amniotes: cladistic analysis and a new hypothesis. **Brain Res. Rev.**, 19 : 66-101, 1994.
- CAMPBELL, S. S. e TOBLER, I. Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 8 : 269-300, 1984.
- CASINI, G.; BINGMAN, V. P. e BAGNOLI, P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and <sup>3</sup>H-Proline. **J. Comp. Neurol.**, 245 : 454-470, 1986.
- CERUTTI, M. A. **Efeitos de lesões do telencéfalo na aprendizagem de discriminação visual em pombos (*Columba livia*)**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre, 1991.
- COENEN, A. M. L. Neuronal activities underlying the electroencephalogram and evoked potentials of sleeping and waking: implications for information processing. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 19 (3) : 477-463, 1995.
- COIMBRA, A. J. F. **Análise computadorizada de sinais bioelétricos**. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de Mestre, 1994.



- CONTRERAS, D. e STERIADE, M. Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships. **J. Neurosci.**, 15(1) : 604-622, 1995.
- COOPER, R.; OSSELTON, J. W. e SHAW, J. C. "EEG Technology". London: Butterworths & Co. G.B, 1974.
- DEMIRALP, T.; BASAR-EROGLU, C.; RAHN, E. e BASAR, E. Event-related theta rhythms in cat hippocampus and prefrontal cortex during an omitted stimulus paradigm. **Int. J. Psychophysiol.**, 18 : 35-48, 1994.
- DEPOORTERE, H.; FRANCON, D.; GRANGER, P. e TERZANO, M. G. Evaluation of the stability and quality of sleep using Hjorth's descriptors. **Physiol. Behav.**, 54 : 785-793, 1993.
- DEWASMES, G. F.; COHEN-ADAD, F.; KOUBI, H. e LE MAHO, Y. Polygraphic and behavioral study of sleep in geese: existence of nuchal atonia during paradoxical sleep. **Physiol. Behav.**, 35 : 67-73, 1985.
- ENGELAGE, J. e BISCHOF, H-J. Visual wulst influences on flash evoked responses in the ectostriatum of the zebra finch. **Brain Res.**, 652 : 17-27, 1994.
- ERICHSEN, J. T.; CIOCCHETTI, A.; FONTANESI, G. e BAGNOLI P. Neuroactive substances in the developing dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): differential distribution and time course of maturation. **J. Comp. Neurol.**, 345 : 537-561, 1994.
- FUNKE, K. Somatosensory areas in the telencephalon of pigeon II. Spinal pathways and afferent connections. **Exp. Brain Res.**, 76 : 620-638, 1989.
- GASSER, T.; BÄCHER, P. e MÖCKS, J. Transformations towards the normal distribution of broad band spectral parameters of the EEG. **Electroencephal. Clin. Neurophysiol.**, 53 : 119-124, 1982.

- GAZTELU, J. M.; GARCIA-AUSTT, E. e BULLOCK, T. H. Electrocorticograms of hippocampal and dorsal cortex of two reptiles: comparison with possible mammalian homologs. **Brain Behav. Evol.**, 37 : 144-160, 1991.
- GAZTELU, J. M.; ROMERO-VIVES, M.; ABRAIRA, V. e GARCIA-AUSTT, E. Hippocampal EEG theta power density is similar during slow-wave sleep and paradoxical sleep. A long term study in rats. **Neurosci. Letters**, 172 : 31-34, 1994.
- GEERING, B. A.; ACHERMANN, P.; EGGIMANN, F. e BORBÉLY, A. A. Period-amplitude analysis and power spectral analysis: a comparison based on all-night sleep EEG recordings. **J. Sleep. Res.**, 2 : 121-129, 1993.
- GOTTESMANN, C. Detection of seven sleep-waking stages in the rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 16 : 31-38, 1992.
- GREGORY, T. K.; e PETTUS, D. C. An electroencephalographic processing algorithm specifically intended for analysis of cerebral activity. **J. Clin. Monit.**, 2 : 190-197, 1986.
- HARPER, R. M. Frequency changes in hippocampal electrical activity during movement and tonic immobility. **Physiol. Behav.**, 7 : 55-58, 1971.
- HARTIGAN, J. A. **Clustering Algorithms**. New York: Wiley, 1975.
- HARTIKAINEN, P.; SOININEN, H.; PARTANEN, J. HELKALA, E. L. e RIEKKINEN, P. Agin and spectral analysis of EEG in normal subjects: a link to memory and CFS AChE. **Acta Neurol. Scand.**, 86 : 148-155, 1992.
- HUNTLEY, A. C. Electrophysiological and behavioral correlates of sleep in the desert iguana, *Dipsosaurus dorsalis* hallowell. **Comp. Biochem. Physiol.** 86A : 325-330, 1987.

- INGLIS, F. M. e FIBIBER, H. C. Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. **Neurosci.**, 66 : 81-86, 1995.
- KARTEN, H. J. e HODOS, W. **A Stereotaxic Atlas of the Brain of the pigeon (*Columba livia*)**. Baltimore : Johns Hopkins Press, 1967.
- KARTEN, H. J. Homology and evolutionary origins of the 'neocortex'. **Brain Behav. Evol.**, 38 : 264-272, 1991.
- KARTEN, H. J.; HODOS, W.; NAUTA, W. J. H. e REVZIN, A. M. Neural connections of the "visual Wulst" of the avian telencephalon. Experimental studies in the pigeon (*Columba livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). **J. Comp. Neurol.**, 150 (3) : 253-277, 1973.
- KLEIN, M., MICHEL, F. e JOUVET, M. Etude polygraphique du sommeil chez les oiseaux. **C. R. Soc. Biol.** 158: 99-103, 1964.
- KRAYNIAK, P. F. e SIEGEL, A. Efferent connections of the hippocampus and adjacent regions in the pigeon. **Brain Behav. Evol.**, 15 : 372-388, 1978.
- KREBS, J. R. Food-storing birds: adaptive specialization in brain and behaviour? **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, 329 : 153-160, 1990.
- KREBS, J. R.; ERICHSEN, J. T. e BINGMAN, V. P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). **J. Comp. Neurol.**, 314 : 467-477, 1991.
- KREBS, J. R.; ERICHSEN, J. T. e BINGMAN, V. P. The immunohistochemistry and cytoarchitecture of the avian hippocampus. **Soc., Neurosci. Abstr.**, 13 : 1125, 1987.

- KRIJZER, F.; KOOPMAN, P. e OLIVIER, B. Classification of psychotropic drugs based on pharmaco-electrocorticographic studies in vigilance-controlled rats. **Neuropsychobiol.**, 28 : 122-137, 1993.
- LANCEL, M. Cortical and subcortical EEG in relation to sleep-wake behavior in mammalian species. **Neuropsychobiol.**, 28 : 154-159, 1993.
- MARINO-NETO, J. **Conexões aferentes e eferentes do núcleo reticularis pontis oralis no pombo (*Columba livia*)**. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutor em Ciências, 1988.
- MEDINA, L. e REINER, A. Distribution of choline acetyltransferase innunoreactivity in the pigeon brain. **J. Comp. Neurol.**, 342 : 497-537, 1994.
- MONNIER, M. Comparative electrophysiology of sleep in some vertebrates. **Experientia**, 36 : 16-19, 1980.
- NAUTA, W. J. H. e KARTEN, H. J. A general profile of the vertebrate brain with sidelights on the ancestry of cerebral cortex. In: SCHMIDT, F. D., ED. **The neurosciences. Second study program**. The Rockefeller Univ.: N.York, 7-25, 1970.
- NEUFELD, M. Y.; RABEY, M. J.; PARMET, Y.; SIFRIS, P.; TREVES, T. A. e KORCZYN, A. D. Effects of a single intravenous dose of scopolamine on the quantitative EEG in Alzheimer's disease patients and age-matched controls. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, 91 : 407-412, 1994.
- NILSSON, J.; PANIZZA, M. e HALLETT, M. Principles of digital sampling of a physiologic signal. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, 89 : 349-358, 1993.
- NORTHCUTT, R.G. Strategies of comparison: how do we study brain evolution? **Verh. Dtsch. Zool. Ges.**, 79 : 91-103, 1986.

- NUNEZ, P. L. **Electric fields of the brain**. Oxford Univ. Press: N. York, 1981.
- OOKAWA, T. e GOTOH, J. Electroencephalogram of the chicken recorded from the skull under various conditions. **J. Comp. Neurol.**, 124 : 1-14, 1965.
- PHILLIPS, N. H. e BERGER, R. J. Regulation of body temperature, metabolic rate, and sleep in fasting pigeons diurnally infused with glucose or saline. **J. Comp. Physiol.**, 161 : 311-318, 1991.
- POE, G. R.; KRISTENSEN, M. P.; RECTOR, D. M. e HARPER, R. M. Hippocampal activity during transient respiratory events in the freely behaving cat. **Neurosci.**, 72 (1) : 39-48, 1996.
- REHKAMPER, G. e ZILLES, K. Parallel evolution in mammalian and avian brain: comparative cytoarchitectonic and cytochemical analysis. **Cell Tissue Res.**, 263 : 3-28, 1991.
- REINER, A. e KARTEN, H. J. The laminar source of efferent projections from the avian wulst. **Brain Res.**, 275 : 349-354, 1983.
- RIEKKINEN, P.; BUZSAKI, G.; RIEKKINEN, P. Jr.; SOININEN, H. e PARTANEN, J. The cholinergic system and EEG slow waves. **Electroenceph. Clin. Neurophysiol.**, 78 : 89-96, 1991.
- ROBERTSON, B.; BAKER, G. B. e VANDERWOLF, C. H. The effects of serotonergic stimulation on hippocampal and neocortical slow waves and behavior. **Brain Res.**, 555 : 265-275, 1991.
- RUIGT, G. S. F.; ENGELEN, S.; GERRITS, A. e VERBON, F. Computer-based prediction of psychotropic drug classes based on a discriminant analysis of drug effects on rat sleep. **Neuropsychobiol.**, 28 : 138-153, 1993.

- SCHWERDTFEGER, W. K. e GERMROTH, P. Archicortical and periarchicortical areas in the vertebrate forebrain. **Exp. Brain Res.**, 19 : 197-212, 1990.
- SHERRY, D. F.; VACCARINO, A. L.; BUCKENHAM, K. e HERZ, R. S. The hippocampal complex of food-storing birds. **Brain Behav. Evol.**, 34 : 308-317, 1989.
- SHIMIZU, T. e KARTEN, H. Immunohistochemical analysis of the visual wulst of the pigeon (*Columba livia*). **J. Comp. Neurol.**, 300 : 346-369, 1990.
- SHIMIZU, T. Significance of studies of the avian brain from three perspectives. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 27 : 1479-1489, 1994.
- SHIMIZU, T.; COX, K. e KARTEN, H. J. Intratelencephalic projections of the visual Wulst in pigeons (*Columba livia*). **J. Comparative Neurol.**, 359 : 551-572, 1995.
- SINGER, W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. **Ann. Rev. Physiol.**, 55 : 349-374, 1993.
- STERIADE, M. Neuromodulatory systems of thalamus and neocortex. **Neurosci.**, 7 : 361-370, 1995.
- STERIADE, M.; GLOOR, P.; LLINÁS, R. R.; LOPES DA SILVA, F. H. e MESULAM, M. -M. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. **Electroencephal. Clin. Neurophysiol.**, 76 : 481-508, 1990.
- STEWART, D. J.; MACFABE, D. F. e VANDERWOLF, C. H. Cholinergic activation of the electrocorticogram: role of the substantia innominata and effects of atropine and quinuclidinyl benzilate. **Brain Res.**, 322 : 219-232, 1984.
- SUGIHARA, K. e GOTOH, J. Depth-electroencephalograms of chickens in wakefulness and sleep. **Japan. J. Physiol.**, 23 : 371-379, 1973.

- SZYMEZAK, J. T. Daily distribution of sleep states in the rook *Corvus frugilegus*. **J. Comp. Physiol.**, 161 : 321-327, 1987.
- TAUBER, E. S. Phylogeny of sleep In: WEITZMAN, E.D. (ED) **Adv. Sleep Res.** New York: Spectrum, 1974. p 133-172.
- TOBLER, I. e BORBÉLY, A. A. Sleep and EEG spectra in the pigeon (*Columba livia*) under baseline conditions and after sleep deprivation. **J. Comp. Physiol.**, 163 : 729-738, 1988.
- TOBLER, I. Evolution and comparative physiology of sleep in animals. **Clin. Physiol. Sleep.**, in press pp 21-29, 1988.
- TRADARDI, V. Sleep in the pigeon. **Arch. Ital. Biol.**, 104 : 516-521, 1966.
- TROMP, J.; LAHAJE, M. e NIJSSEN, A. Sleep postures and power spectrum analysis of the EEG of the rat. **Behav. Proc.**, 22 : 151-155, 1990.
- UCHIDA, S.; MALONEY, T. e FEINBERG, I. Sigma (12 - 16 Hz) and beta (20 - 28 Hz) EEG discriminate NREM and REM sleep. **Brain Res.**, 659 : 243-248, 1994.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de trabalhos**. 4.ed. Curitiba : Editora UFPR, 1994, v.2, 6 e 8.
- VALLE, A. C. **Estudo comparativo de algumas manifestações equivalentes do alerta vigil e do sono dessincronizado do rato**. Dissertação apresentada à Escola Paulista de Medicina, para obtenção do grau de mestre, 1992.
- VALLE, A. C.; TIMO-IARIA, C.; FRAGA, J. L.; SAMESHIMA, K.; e YAMASHITA, R. Theta waves and behavioral manifestations of alertness and dreaming activity in the rat. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 25 : 745-749, 1992.

- VAN LUIJTELAAR, E. L. J. M.; van der GRINTEN, C. P. M.; BLOKHUIS, H. J. e COENEN, A. M. L. Sleep in the domestic hen (*Gallus domesticus*). **Physiol. Behav.**, 41 : 409-414, 1987.
- VAN RIEZEN, H. e GLATT, A. F. Introduction and history of the use of electroencephalography in animal drug studies. **Neuropsychobiol.**, 28 : 118-121, 1993.
- VAN TWYVER, H. e ALLISON, T. A polygraphic and behavioral study of sleep in the pigeon (*Columba livia*). **Exp. Neurol.**, 35 : 138-153, 1972.
- VANDERWOLF, C. H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. **Electroencephal. Clin. Neurophysiol.**, 26 : 407-418, 1969.
- VANDERWOLF, C. H. The electrocorticogram in relation to physiology and behavior: a new analysis. **Electroencephal. Clin. Neurophysiol.**, 82 : 165-175, 1992.
- VANDERWOLF, C. H. The role of the cerebral cortex and ascending activating systems in the control of behavior. In: SATINOFF, E. e TEITELBAUM, P. **Handbook of Behavioral Neurobiology**. N. York : Plenum, 1983. 67-104.
- VEENMAN, C. L. e REINER, A. The distribution of GABA-containing perikarya, fibers, and terminals in the forebrain and midbrain of pigeons, with particular reference to the basal ganglia and its projection targets. **J. Comp. Neurol.**, 339 : 209-250, 1994.
- VEENMAN, C. L.; WILD, J. M. e REINER, A. Organization of the avian "corticostriatal" projection system: a retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons. **J. Comp. Neurol.**, 354 : 87-126, 1995.
- VERTES, R. P.; COLOM, L. V.; FORTIN, W. J. e BLAND, B. H. Brainstem sites for the carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. **Exp. Brain Res.**, 96 : 419-429, 1993.



WALKER, J. M. e BERGER, R. J. Sleep in the domestic pigeon. **Behav. Biol.**, 7:195-203, 1972.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function. **J. Am. Stat. Assoc.**, 58 : 236, 1963.

YUREK, D. M. e RANDALL P. K. Striatal depth EEG reveals postsynaptic activity of striatal neurons following dopamine receptor stimulation and blockade. **J. Neurosci. Meth.**, 37 : 81-91, 1991.