

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS E COMPORTAMENTO

EDISON SANFELICE ANDRÉ

**EFEITOS DA ESCOPOLAMINA, MECAMILAMINA
E ESERINA SOBRE O ELETROSCILOGRAMA
HIPOCAMPAL DE POMBOS (*Columba livia*)**

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto.

Florianópolis
1997

EDISON SANFELICE ANDRÉ

**EFEITOS DA ESCOPOLAMINA, MECAMILAMINA
E ESERINA SOBRE O ELETROSCILOGRAMA
HIPOCAMPAL DE POMBOS (*Columba livia*)**

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
1997

“EFEITOS DA ESCOPOLAMINA, MECAMILAMINA E ESERINA SOBRE ELETROSCIOGRAMA HIPOCAMPAL DE POMBOS (*Columba livia*)”.

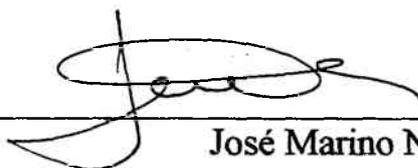
EDISON SANFELICE ANDRÉ

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



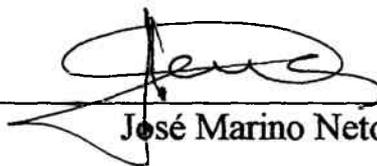
José Marino Neto

Coordenador do Curso



Nelson Horácio Gabilan

Banca Examinadora



José Marino Neto (Presidente)



Anette Hoffmann



Mauro Nicolau

*Dedico esse trabalho à
Maria Teresa, Mariana e Vítor
que com genialidade, maestria
e paciência, souberam enfrentar
os momentos de minha ausência.*

AGRADECIMENTOS

-Ao Professor Dr. José Marino Neto ... *por ter se mostrado um mestre habilidoso, paciente e apoiador ... Incessantemente.*

-Ao Amigo Marino ... *pela amizade cultivada e pela convivência extremamente agradável.*

-Aos Professores Ricardo Tramonte, Geraldo Morgado e Odival Gasparotto ... *por terem acreditado desde o começo.*

-Aos Professores Cândido Freitas e Marta Paschoalini ... *pelo apoio dedicado na realização desse trabalho.*

-Aos técnicos Luciane, Carlinhos, Nivaldo, Nivaldinho e Vilma ... *pela convivência aprazível e pelo auxílio na execução dos experimentos ... e pelos excelentes cafézinhos para espantar o cansaço.*

-Aos Profs. Nelson Nemes e Petrônio Guimbala ... *por terem apoiado meu crescimento profissional.*

-Ao GRANDE Amigo "véio" Rafael Bruno ... *cuja presença de espírito, participação e habilidade mental, ajudaram a despertar minha curiosidade para esse campo da ciência e auxiliaram na execução do presente trabalho.*

-Aos Amigos de república ... Márcio - chola, Richard - gordo, Rogério - gerão, Klaus - alemão, Rogério - mato-grosso, Alessandro - camelo ... *pelos momentos prazerosos e de descontração durante as "pilotagens" de fogão e expedições etílicas.*

-Muito Especiais aos meus pais Raphael e Maria Aparecida ... *por terem me apoiado e acreditado ... SEMPRE ...*

*“Não te doa jamais pensar em falha tua.
Na rosa espinhos há, turva-se a fonte clara;
vela a nuvem e o eclipse a luz do sol, da lua,
e o ascoso pulgão vive até na flor mais rara.*

Todo homem erra sempre.”

-W. Shakespeare.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
1.1. O Eletroscilograma	1
1.2. Os Sistemas Colinérgicos Centrais em aves e mamíferos	7
1.3. O Hipocampo	18
2. Materiais e Métodos	27
2.1. Animais	27
2.2. Eletrodos	27
2.3. Cirurgia	29
2.4. Ambiente de Registro	31
2.5. Protocolo de Registro	32
2.6. Drogas	33
2.7. Registros Comportamentais	36
2.8. Aquisição do Sinal	36
2.9. Histologia	39
2.10. Análise dos Registros	40
2.11. Estatística	44
3. Resultados	46
3.1. Efeitos Comportamentais da Escopolamina	47
3.2. Efeitos Comportamentais da Mecamilamina	53
3.3. Efeitos Comportamentais da Eserina	54
3.4. O Eletroscilograma Hipocampal	54
3.4.1. Análise Qualitativa	56
3.4.2. Análise Quantitativa	58
3.4.2.1. Efeitos da Escopolamina sobre o EOsG Hipocampal	60
3.4.2.2. Efeitos da Mecamilamina sobre o EOsG Hipocampal	68
3.4.2.3. Efeitos da Eserina sobre o EOsG Hipocampal	72
4. Discussão	76
5. Referências Bibliográficas	102

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi examinar os efeitos da administração de escopolamina (ESC), mecamilamina (MEC) e eserina (ESE) sobre o eletroscilograma hipocampal (EOsG-hp) e o comportamento de pombos domésticos não restritos. Foram utilizados 23 pombos (*Columba livia*) adultos implantados cronicamente com eletrodos bipolares localizados no hipocampo e na musculatura nugal. Os registros eletrográficos foram adquiridos e armazenados em um sistema digital, para análises visuais e quantitativas (análises espectral de potência e de período-amplitude) do traçado. Simultaneamente aos registros eletrográficos, foram realizados registros comportamentais. Os registros foram realizados 20 min antes e durante 30 min após injeção i.p. de ESC (2,7 mg/Kg), metilescopolamina (M-ESC, 3,18 mg/Kg), MEC (1,6 mg/Kg), ESE (100 µg/Kg) ou de veículo (NaCl, 0,9 %, 1 ml). Para as análises do EOsG-hp foram selecionadas épocas de 10 segundos de cada animal referentes aos estados de vigília relaxada (VR), vigília alerta (VA) e vigília provocada por estimulação sonora (SOM). A ESC provocou aumento no comportamento de vômito, diminuição na postura relaxada e na postura alerta, e também o surgimento do congelamento espontâneo (FZ), caracterizado por comportamento de alerta, porém acompanhado de EOsG-hp e eletromiograma (EMG) comparável aos estados relaxados. A injeção de ESC produziu diminuição no número de ondas, na amplitude e na potência total durante a VR, não provocando modificações no EOsG durante a VA. O EOsG-hp referente aos períodos de FZ apresentou diminuição no número de ondas e na amplitude em relação à VR. Comparado com a VA, o FZ apresentou aumento na incidência das ondas em ponta de grande amplitude (PGA), na voltagem das PGAs, no número de ondas, na amplitude, na potência total, e na potência relativa da atividade de 6 Hz, e diminuição nas potências relativas de 2 Hz e acima de 20 Hz. Nenhum efeito comportamental ou eletrográfico pôde ser observado após injeção de M-ESC. A MEC produziu diminuição no

número de ondas e na amplitude durante a VR, enquanto que durante a VA produziu diminuição na amplitude e na potência total, aumento na borda espectral de 50% e nas freqüências relativas entre 9 e 30 Hz. Após SOM, a MEC produziu aumento nas freqüências relativas entre 10 e 20 Hz. A injeção de ESE não provocou efeitos comportamentais ou eletrográficos consistentes. Tais dados sugerem que a acetilcolina participa tônica e discretamente da regulação do EOsG-hp. Não foi possível observar qualquer atividade rítmica que fosse comparável à atividade teta-hipocampal encontrada em mamíferos. Entretanto, o EOsG-hp referente à VR se assemelha aos registros que acompanham o mesmo estado nos répteis, nos anfíbios e nos mamíferos.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to examine the effects of the administration of scopolamine (ESC), mecamylamine (MEC) and eserine on the hippocampal electroscilogram (EOsG-hp) and on the spontaneous behavior of non-restrict domestic pigeons. Twenty-three adult pigeons (*Columba livia*) were chronically implanted with bipolar electrodes located at the hippocampus and on the neck musculature. The electrographic records were acquired and stored with a digital system, for qualitative and quantitative analysis (power spectral analysis of power and of period-amplitude analysis) of the EOsG-hp. Simultaneously to the electrographic records, behavior records were also done. The records were realized 20 min. before and 30 min. after the injection i.p. of ESC (2,7 mg/Kg), methylscopolamine (M-ESC, 3,18 mg/Kg), MEC (1,6 mg/Kg), ESE (100 µg/Kg), or of vehicle (NaCl, 1 ml). For the analysis of the EOsG-hp, 10 s periods of each animal were selected regarding the states of quiet waking (QW), alert wakefulness (AW) and wakefulness after sound stimulation (SS). The ESC induced an increased vomiting, a reduction in both the relaxed and the alert posture, as well as the appearance of spontaneous freezing (SF), characterized by behavioral alert posture, accompanied by EOsG-hp and EMG comparable to the relaxed states. The injection of ESC produced a reduction in wave number, in the amplitude and in the total power during the AW, but not in the EOsG during the QW. The EOsG-hp regarding the periods of SF presented a reduction in the number of waves and in the amplitude in relation to the QW. Compared to the AW, the SF show an increase of sharp waves of great amplitude (SGA) incidence and voltage, in the number of waves, in the total amplitude, in the total power and in the relative power of the activity of 6 Hz, and a reduction in the relative power of 2 Hz and above 20 Hz. No behavioral or electrographic effects could be observed after the injection of M-ESC. MEC induced a reduction in the number of waves during the QW, while during the AW it in-

duced a reduction in the total amplitude and in the total power, an increase of 50% in the spectral border and in the relative frequencies between 9 and 30 Hz. After the SS, the MEC produced an increase in the relative frequencies between 9 and 30 Hz. ESE did not produce consistent behavioral or electrographic effects. Such data can suggest that the acetylcholine have both tonic and discrete participation in the regulation of the EOsG-hp. No rhythmical activity theta-like (theta rhythm of mammals) was found in the present study. However, the EOsG-hp of QW is comparable to the EOsG-hp of QW or slow wave sleep in other vertebrates (anfibians, reptilians and mammals).

INTRODUÇÃO

1.1. O Eletroscilograma

A atividade elétrica coletiva das células corticais cerebrais pode ser representada graficamente através do eletroencefalograma (EEG), um registro contínuo das diferenças entre potenciais elétricos dinâmicos originados nestas células. Para o presente trabalho será adotado o termo **eletroscilograma (EOsG)**, utilizado para denominar os registros das oscilações elétricas originadas em agregados neuronais (*e.g.*, Valle, 1992). Este registro representa um importante indicador dos estados do funcionamento cerebral. As oscilações de potencial elétrico vistas no EOsG surgem em função principalmente do somatório dos potenciais sinápticos inibitórios e excitatórios da região abrangida por eletrodos de registro. Esses eletrodos podem ser posicionados sobre o escalpo (eletrodos de superfície), ou diretamente sobre o tecido cerebral, registrando a atividade elétrica circunscrita a uma certa massa de tecido neural subjacente.

De forma simplificada, pode-se destacar 2 tipos de atividades celulares de fundo em mamíferos: 1) atividades de alta frequência e baixa amplitude (EOsG ativado ou dessincronizado) que surgem concomitantemente aos estados comportamentais de vigília alerta (VA) e de sono paradoxal (SP) e 2) atividades de baixa frequência e grande amplitude (EOsG sincronizado ou não ativado) que são concorrentes a estados

comportamentais de vigília relaxada (VR) e sono de ondas lentas (SOL). A ativação do EOsG está associada a um estado de prontidão celular cerebral que permite os neurônios responderem de forma eficaz e rápida tanto aos estímulos externos quanto àqueles gerados internamente. A ativação do EOsG encontrada durante a vigília alerta apresenta íntima relação com processamento sensorial, processos de atenção, de memória e aprendizado (McCarley, 1995; McCarley *et al.*, 1995; Reiner, 1995; Steriade *et al.*, 1988; Steriade, 1995).

Diferenças também podem ser encontradas nos registros eletrosciolográficos dependendo da área telencefálica abrangida pelos eletrodos. De particular importância para o presente trabalho é o padrão eletrosciolográfico da formação hipocampal (EOsG-hp) de mamíferos (ratos). O EOsG-hp é caracterizado por dois tipos básicos de atividade, que apresentam estreita relação com estados comportamentais específicos. Um tipo é caracterizado por atividade irregular lenta de grande amplitude com predominância na faixa de frequência entre 2 e 4 Hz, entremeada por ondas em pontas isoladas ou em salvas. Este padrão de atividade é concorrente com comportamentos automáticos, estereotipados, como os movimentos de autolimpeza ou de vocalização, e com estado comportamental de vigília relaxada (comportamentos tipo I). Esse tipo de atividade parece ser dependente da atividade de aferências hipocampais colinérgicas com origem no prosencéfalo basal e serotonérgicas do tronco encefálico (Vanderwolf, 1992). O outro tipo de atividade hipocampal é

caracterizada por ondas rítmicas senoidais com frequência entre 6 e 12 Hz (ondas θ - teta), associada a comportamentos voluntários, como mudanças de postura, manipulação de objetos, e ao estado comportamental de vigília alerta (comportamentos tipo II), bem como pode ser produzida por estimulação periférica sem movimentação voluntária do animal (Gaztelu *et al.*, 1994; Vanderwolf, 1992). Esse último tipo de atividade hipocampal é dependente exclusivamente de aferências colinérgicas, por ser sensível à drogas antimuscarínicas como a atropina (Vanderwolf, 1992). Por outro lado, dados obtidos após lesão seletiva de células colinérgicas do prosencéfalo basal, indicam que a atividade θ -hipocampal não depende exclusivamente de aferências colinérgicas (Bassant *et al.*, 1995). A atividade θ - hipocampal pode ser mediada por geradores de origem septal (Golebiewski, Eckersdorf e Konopacki, 1993; Gottesmann, 1992), e é possível que este marcapasso septal esteja sob influência de estruturas do tronco encefálico (Vertes, 1981).

Estudos eletroscilográficos também foram conduzidos em diferentes espécies de aves, embora em menor quantidade e não tão ricos em informações se comparados aos estudos realizados em mamíferos.

Investigações eletroscilográficas em galinhas indicaram a presença, no telencéfalo, de ondas lentas de 2 a 3 Hz e amplitude por volta de 100 μ V durante o sono. Essas ondas foram consideradas como semelhantes àquelas presentes durante o sono de mamíferos (Tauber, 1974). Estudos realizados por Ookawa e Gotoh (1965) em galinhas domésticas,

revelaram na região frontal do crânio desses animais 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.

Em pombos, 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 paulatinamente substituídas por ondas de grande amplitude, que lembram aquelas encontradas durante o sono de ondas lentas dos mamíferos (Monnier, 1980; Tobler, 1984; Tobler e Borbély, 1988; Tradardi, 1966).

Um outro evento eletroscilográfico de interesse está relacionado ao sono paradoxal. Na maioria dos mamíferos, o EOsG associado a este comportamento é caracterizado por atividades elétricas de alta frequência e pequena amplitude, assemelhando-se ao traçado encontrado no animal atentamente desperto. Nas aves, este período de sono paradoxal também pode ser encontrado, embora com duração extremamente curta (Campbell e Tobler, 1984; Tobler, 1988; Tobler e Borbély, 1988). Em gansos, o EOsG telencefálico, durante a vigília alerta, é caracterizado por atividades de EOsG por volta de 50 μ V com frequências em torno de 13 Hz. Na vigília relaxada dessa ave, o EOsG era caracterizado por um mosaico de ondas de grande voltagem desde 100 até 300 μ V com frequências de 6 a 13 Hz. No sono de ondas lentas, encontrou-se um pa-

drão contínuo de ondas lentas em torno de 6 Hz e voltagem variando de 150 a 300 μ V. Durante o sono paradoxal, a característica geral do traçado tomava a forma de ondas menores que 50 μ V e frequência acima de 10 Hz não diferenciável daquelas encontradas na vigília alerta (Dewasmes *et al.*, 1985). Outros estudos eletroscilográficos em pombos (Phillips e Berger, 1991; VanTwyver e Allison, 1972; Walker e Berger, 1972) sugerem as mesmas associações entre atividade eletroscilográfica telencefálica e os diferentes estados comportamentais associados.

As descrições e análises do EOsG de aves geralmente são fundamentadas na apreciação visual do traçado, e relatam a presença de atividades irregulares, mistas e compostas de ondas lentas de grande amplitude, sobrepostas por atividades rápidas de baixa amplitude (Sugihara e Gotoh, 1973; Walker e Berger, 1972). Métodos complementares de análise do EOsG (*e.g.*, a análise espectral e a análise aperiódica) podem ser utilizados para um escrutínio mais detalhado dos diferentes componentes do traçado eletroscilográfico (*e.g.*, Cooper *et al.*, 1974), mas foram escassamente utilizados para o estudo do EOsG de aves (*e.g.*, Tobler e Borbély, 1988).

Uma lacuna adicional na literatura sobre o EOsG de aves é representada pela carência de informações sobre padrões de atividade elétrica circunscrita às áreas telencefálicas específicas. Os experimentos acima mencionados, foram realizados com eletrodos unipolares, visando melhorar a magnificação dos registros. Além disso, tais registros foram

realizados por meio de derivações em regiões distantes entre si, não assegurando uma leitura da atividade eletroscilográfica circunscrita a uma região anatomicamente homogênea. A utilização de eletrodos bipolares pode refletir, de forma autêntica, a atividade elétrica característica da região subjacente, uma vez que as pontas desses eletrodos estão próximas entre si e posicionadas num mesmo território, além de permitir uma redução de ruídos bioelétricos (Yurek e Randall, 1991).

Estudos realizados neste laboratório têm demonstrado que a formação hipocampal de pombos apresenta uma atividade eletroscilográfica característica e conspícua se comparada a regiões próximas na superfície telencefálica, quando registrada através da implantação crônica de eletrodos bipolares (Bruno-Neto *et al.*, 1996). Durante períodos de vigília relaxada (VR), esta atividade foi caracterizada como contendo grupos de ondas de até 4 Hz com amplitudes chegando a 100 μ V, grupos de ondas entre 10 e 20 Hz com amplitude abaixo de 40 μ V e grupos de ondas entre 20 e 30 Hz com amplitudes por volta de 10 μ V. Junto a essas atividades, destacam-se ondas em ponta de grande amplitude (PGA), com freqüências entre 6 a 10 Hz e amplitudes que atingem até 150 μ V. Neste estado comportamental, elas surgem em surtos de até 8 ondas, com intervalos entre ondas variando entre 0,5 e 1,5 s. Durante o alerta espontâneo, as atividades com freqüência até 4 Hz apresentam amplitudes por volta de 40 μ V, as ondas de 10 a 20 Hz atingem até 30 μ V de amplitude, e as ondas de 20 a 30 Hz chegam até 10 μ V de ampli-

tude. As PGAs, nesta situação de alerta são mais raras, surgindo isoladamente ou aos pares, com amplitudes chegando a atingir 100 μV e incidência média de 3,5 ondas a cada 20 s. Durante a vigília alerta (VA) provocada por estimulação sensorial (luminosa ou sonora) as PGAs desaparecem, as ondas de até 4 Hz apresentam amplitudes que atingem 40 μV , as ondas de 10 a 20 Hz apresentam amplitudes que chegam a 30 μV e as ondas de 20 a 30 Hz se apresentam com amplitudes abaixo de 10 μV . Com o retorno do animal a estados comportamentais mais relaxados, paulatinamente as PGAs retomam seu aspecto característico. Durante os estados de sono de ondas lentas (SOL) e sono paradoxal (SP), o EOsG apresenta-se semelhante aos estados de VR e VA respectivamente, embora durante o SP as PGAs desapareçam por completo (Bruno-Neto *et al.*, 1996; Bruno-Neto, 1996). Tais atributos não puderam ser descritos no hiperestriado acessório, uma área telencefálica funcional e hodologicamente distinta do hipocampo, mas localizada imediatamente adjacente a este na superfície telencefálica do pombo (Bruno-Neto, 1996).

1.2. Os sistemas colinérgicos centrais em aves e mamíferos

Numerosas estruturas centrais fazem parte de mecanismos que regulam a atividade elétrica celular cerebral de fundo. Entre estas, destaca-se a formação reticular (FR). Esse aglomerado de fibras nervosas e núcleos celulares, estendendo-se desde níveis cervicais iniciais até o

prosencefalo basal, apresenta fronteiras anatômicas geralmente mal delimitadas, e muitas de suas funções estão ainda por serem esclarecidas (Steriade e McCarley, 1990). A FR não chamou a atenção de neuroanatomistas e neurofisiologistas, até os estudos agora clássicos de Moruzzi e Magoun (1949). Estes estudos ajudaram a estabelecer que a atividade da FR do tronco encefálico era capaz de produzir uma ativação ampla do córtex cerebral, uma influência que subsequente mostrou-se crítica para a iniciação e manutenção da vigília e do sono paradoxal (Bassant *et al.*, 1995; Jones e Cuello, 1989; Reiner, 1995). Atualmente, acredita-se que a FR tenha participação em uma ampla variedade de atividades, como a nocicepção, a habituação, o processamento sensorial multimodal, entre outras (Dement, 1994; McGinty e Szymusiak, 1988; Szymusiak, 1995). Dentro da FR, encontramos territórios que concentram neurônios que secretam diferentes neurotransmissores como serotonina (5-HT, nos núcleos da rafe), noradrenalina (NA, no locus coeruleus), dopamina (DA, na área tegmental ventral de Tsai) e acetilcolina (ACh, ver adiante). Estas estruturas e suas conexões têm papel importante nos estados sincronizados e ativados de EOsG, produzindo efeitos diversos sobre a atividade celular cerebral (Jones, 1994).

De particular interesse para o presente trabalho, são os distritos da FR onde são encontrados neurônios que sintetizam e usam a acetilcolina como neurotransmissor. O reconhecimento da existência destes núcleos colinérgicos teve início após os estudos pioneiros de Shute e

Lewis (1960), que identificaram grupos de células reativas à histoquímica para a acetilcolinesterase na FR, que presumivelmente enviariam projeções em direção ao telencéfalo secretando acetilcolina em seus terminais sinápticos. Investigações hodológicas, imunocitoquímicas (para a colinoacetil-transferase), e de localização de receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos realizadas nas décadas subsequentes, vieram a confirmar e ampliar tais conclusões (Karczmar, 1993; Nieuwenhuys, 1985; Reiner, 1995; Samson *et al.*, 1991). Com o avanço das técnicas neuroanatômicas, pôde-se concluir que estas estruturas do sistema nervoso central compreendem um “sistema reticular ascendente colinérgico” (Jones e Cuello, 1989). Em mamíferos, estes agregados de neurônios colinérgicos foram parcelados em grupos que seguem a seguinte nomenclatura: Ch1 (núcleo septal medial, SM); Ch2 (núcleo vertical da banda diagonal de Broca, DBv); Ch3 (braço horizontal do núcleo da banda diagonal de Broca, DBh); Ch4 (núcleo basalis de Meynert, NBM); Ch5 (núcleo pedunculopontino, PPN); Ch6 (núcleo tegmental laterodorsal, LDT). Posteriormente foram incluídos os grupos Ch7 (núcleo habenular medial, HM) e Ch8 (núcleo parabigeminal, PBG), descritos no rato por Mufson (1986). Apesar de estarem localizados no telencéfalo, os grupos Ch1, Ch2, Ch3 e Ch4 são considerados como uma extensão mais rostral da FR (Mesulam, 1995a, 1995b; Steriade e McCarley, 1990).

Alguns destes núcleos e suas respectivas projeções se destacam em função de suas influências sobre a atividade elétrica telencefálica, como veremos adiante. Os grupos Ch1 e Ch2 aferentam o complexo hipocampal (Samson *et al.*, 1991). O grupo celular Ch5, localizado no tegmento pedunculopontino, aferenta principalmente o tálamo, o tecto, a substância negra, o prosencéfalo basal, os gânglios da base, inervando virtualmente todas as regiões cerebrais subcorticais (Saper, 1990; Woolf, 1991). As projeções eferentes do grupo Ch6 são similares às do grupo Ch5 e àquelas projeções oriundas do complexo colinérgico do prosencéfalo basal (Ch3-Ch4), que se espriam por todo o córtex cerebral (Semba e Fibiger, 1989; Woolf, 1991).

O reconhecimento da importância funcional dos sistemas colinérgicos centrais na regulação dos estados de EOsG teve início nos trabalhos pioneiros de Jasper (1966) seguindo o conceito introduzido por Jouvet (1960), que sugeriu que os estados de vigília e sono podem ser gerados pela ação de diferentes neurotransmissores contidos em diferentes sistemas, com projeções espriadas por todo o cérebro (Jones, 1994; Reiner, 1995). As vias colinérgicas ocupam uma posição crucial dentro dos sistemas reticulares ativadores ascendentes e têm importante papel na modulação do EOsG cortical bem como nos comportamentos associados ao despertar e à atenção (Steriade *et al.*, 1990).

Acredita-se atualmente que a ACh participe da inibição de ritmos oscilatórios em ondas lentas e em fusos que são impostos ao córtex ce-

rebral por vias tálamo-corticais particulares, com conseqüente dessincronização do EOsG. Tal inibição faz parte dos mecanismos de iniciação e manutenção da vigília e do sono paradoxal (Dringenberg e Vanderwolf, 1996; Imeri *et al.*, 1992; Inglis e Fibiger, 1995; Jones, 1994; McCormick, 1992; Müller, 1987; Paré *et al.*, 1989; Radek, 1993; Ray e Jackson, 1991; Riekkinen *et al.*, 1991; Riekkinen-Jr *et al.*, 1992a, 1992b; Santucci *et al.*, 1981; Steriade, 1991; Steriade *et al.*, 1990; Steriade e McCarley, 1990; Stewart, MacFabe e Vanderwolf, 1984). Mensurações por microdiálise de ACh na superfície cortical demonstram um aumento na concentração desse neurotransmissor durante estados de EOsG ativado, em relação às observadas durante estado de sono de ondas lentas. Estimulação elétrica dos grupos Ch5-Ch6 (Szymusiak, 1995) e de células colinérgicas do prosencéfalo basal (Dringenberg e Vanderwolf, 1996), provoca ativação do EOsG bem como um aumento na concentração de ACh cortical. A aplicação iontoforética direta de ACh ou de agonistas colinérgicos sobre o córtex cerebral ou sobre o hipocampo, produz aumento nos disparos celulares destas regiões, enquanto que após a administração de antagonistas colinérgicos, este aumento de atividade celular é evitado (Inglis e Fibiger, 1995). Por outro lado, lesões excitotóxicas de Ch3-Ch4 produzem um aumento na atividade de ondas lentas durante estados de vigília e sono paradoxal (Inglis e Fibiger, 1995).

Estes efeitos podem ser verificados também após administração sistêmica de antagonistas muscarínicos (Dringenberg e Vanderwolf,

1996; Stewart, MacFabe e Vanderwolf, 1984; Szymusiak, 1995). Estudos farmacológicos têm revelado que drogas anticolinérgicas causam uma lentificação do EOsG, bloqueando ou atenuando a ativação cortical induzida por agonistas colinérgicos, por estimulação sensorial ou pela estimulação de determinadas estruturas do tronco encefálico (Inglis e Fibiger, 1995; Ray e Jackson, 1991).

Outras evidências indicam que este sistema exerce mais do que uma influência ativadora tônica. Os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal aumentam sua frequência de disparos de forma fásica durante estados de vigília e de sono paradoxal. Durante a vigília, os neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal parecem participar na regulação de funções de atenção, processamento sensorial e cognição atribuídas ao neocórtex e ao sistema límbico (Karczmar, 1995; Szymusiak, 1995). Estudos recentes utilizando microdiálise, têm demonstrado um aumento na liberação de ACh no córtex frontal e formação hipocampal de ratos, quando estes são expostos a estimulação sensorial inédita, sugerindo um envolvimento colinérgico nos processos de atenção, que estão diretamente vinculados ao nível de ativação cortical (Inglis e Fibiger, 1995).

Além de desempenhar este papel ativador sobre o EOsG, os sistemas colinérgicos centrais se tornaram alvo de pesquisas intensas pelo fato de existirem fortes evidências do seu envolvimento com processos patológicos da demência senil tipo Alzheimer em humanos. A doença de

Alzheimer é caracterizada por um estado de demência resultante de uma perda progressiva das habilidades mentais, apresentando como características constantes a perda de memória e a lentificação do traçado de EOsG. Este déficit de memória pode estar relacionado a perdas neuronais no hipocampo bem como uma redução no número de neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, acompanhadas de uma lentificação do traçado eletroscilográfico (Marin e Davis, 1995; Ray e Jackson, 1991; Riekkinen *et al.*, 1991; Riekkinen-Jr *et al.*, 1991; Rodnitzky, 1995; Stewart, MacFabe e Vanderwolf, 1984; Sunderland, Molchan e Zubenko, 1995).

Os sistemas colinérgicos podem ainda estar envolvidos com o processamento somato-sensorial (Inglis e Fibiger, 1995; Leanza *et al.*, 1995; Levin, 1992; Muir, *et al.*, 1992; Steriade, 1994; Turchi *et al.*, 1995), distúrbios do humor (Janowski e Overstreet, 1995), comportamento motor (O'Neill *et al.*, 1994; Sanberg, 1983; Thompson, 1977; Zolman, Mattingly e Sahley, 1978), na supressão da atividade motora durante estados de EOsG e comportamentais do sono paradoxal (Chase e Morales, 1994; Holmes e Jones, 1994), na regulação do fluxo sanguíneo cerebral local (Sato e Sato, 1989; 1992; Sunderland *et al.*, 1995; Vaucher e Hamel, 1995), na regulação respiratória durante estados de sono (*e.g.*, Lydic e Baghdoyan, 1992).

Estas constatações foram obtidas através de lesões experimentais, estimulação elétrica e registros locais e também por manipulações far-

macológicas dos sistemas colinérgicos, utilizando drogas colinomiméticas ou através do bloqueio de seus receptores sinápticos. Estes receptores celulares foram classificados em dois tipos por Dale (1914, cit. por Nieuwenhuys, 1985), correspondendo a um grupo de receptores conhecidos como nicotínicos, e outro grupo de receptores conhecidos como muscarínicos. Esta classificação é baseada na habilidade de alcalóides naturais, a nicotina e a muscarina, de mimetizarem os efeitos da ACh como um neurotransmissor no sistema nervoso (Arneric, Sullivan e Williams, 1995; Eglen, Reddy e Watson, 1994; Le Novère e Changeux, 1995). A grande diversidade de respostas provocadas por drogas nicotínicas ou muscarínicas determinaram a subdivisão dos dois grupos de receptores colinérgicos. Os receptores nicotínicos são divididos em dois subtipos compreendendo os receptores nicotínicos musculares e nicotínicos neuronais. No sistema nervoso central, os receptores nicotínicos receberam denominações diferentes em função da afinidade destes receptores à toxinas específicas (α -bungarotoxina e κ -bungarotoxina). Os receptores nicotínicos são incluídos no grupo dos receptores ionotrópicos (receptores-canais iônicos) (Le Novère e Changeux, 1995) produzindo reações excitatórias celulares rápidas e influenciando na liberação de substâncias transmissoras (Arneric, Sullivan e Williams, 1995; Ribeiro, Bettiker, Bogdanov e Wurtman, 1993).

Por sua vez, os receptores muscarínicos são classificados em 5 subtipos farmacológicos distintos (M1 - M5), codificados por genes dis-

tintos mas relacionados (Ehlert, Roeske e Yamamura, 1995; Eglen, Reddy e Watson, 1995). Os receptores muscarínicos são incluídos no grupo dos receptores metabotrópicos (acoplados à proteína transdutora G), em geral produzindo como resposta celular a inibição da adenilato-ciclase (M2), estimulação da fosfolipase C (M1) e/ou regulando a atividade de canais iônicos (canais de potássio e cálcio) (Ehlert, Roeske e Yamamura, 1995; Schwartz e Kandel, 1991; Taylor e Brown, 1994).

Como já mencionado, vários estudos têm demonstrado que a administração local ou sistêmica de agonistas nicotínicos ou muscarínicos suprimem a atividade oscilatória em ondas lentas ou em fusos de alta voltagem exibida pelos registros de EOsG cortical (Riekkinen-Jr, *et al.*, 1995). Adicionalmente, a administração de bloqueadores de receptores nicotínicos ou muscarínicos provocam o surgimento de atividade eletrográfica típica de estados não ativados (Steriade, 1991; Steriade *et al.*, 1990).

Alterações comportamentais também podem ser encontradas após administração de drogas que bloqueiam os receptores colinérgicos. A administração de escopolamina, um bloqueador muscarínico, induz um aumento da atividade motora de ratos. Nesses animais, a administração de fisostigmina, um anticolinesterásico, resulta em atenuação dessa hiperatividade (O'Neill *et al.*, 1994). Investigações acerca de comportamentos relacionados à memória e aprendizado indicam que a administração de escopolamina ou atropina (um outro bloqueador muscarínico), pre-

judica os processos de memória (*e.g.*, Jones e Higgins, 1995; Mineau, Boag e Beninger, 1994; Santi e Wiese, 1995), de forma semelhante à amnésia presente na senescência (Karczmar, 1990; 1993). Adicionalmente, existem evidências que demonstram uma facilitação dos processos cognitivos após administração de agonistas nicotínicos em indivíduos normais, e que a administração de bloqueadores de receptores nicotínicos como a mecamilamina, prejudica tais processos (*e.g.*, Decker e Majchrzak, 1993; Levin, 1992; Turchi *et al.*, 1995).

Uma droga colinomimética que apresenta uma influência apreciável sobre a transmissão colinérgica é um alcalóide natural, a eserina, também conhecida como fisostigmina. A eserina impede a ação degradativa da acetilcolinesterase sobre a ACh, deixando-a mais tempo disponível na fenda sináptica. Além dessa atividade anticolinesterásica, a eserina parece apresentar uma ação agonista colinérgica não competitiva sobre receptores nicotínicos (Maelicke, Schrattenholz e Schröder, 1995). O emprego da eserina como agente terapêutico é bastante antigo, tendo sido usada como antídoto do curare por índios da América do Sul. Antigo também foi o seu emprego no tratamento da *miastenia gravis*, uma patologia que compromete a comunicação sináptica na junção mioneural. Tem sido proposto o uso da eserina como coadjuvante no tratamento da doença de Alzheimer, baseado nos achados degenerativos colinérgicos que acompanham esta doença e também, na possível facili-

tação funcional por este alcalóide dos neurônios colinérgicos remanescentes (Karczmar, 1993).

Fortes evidências indicam que sistemas colinérgicos centrais estão presentes em todos os vertebrados, podendo ser detectados desde ciclóstomos (lamprêia) até os mamíferos (Wächtler, 1980). Estas evidências indicam que entre répteis (Ulinski e Morgaliash, 1990; Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock, 1991; Ulinski, 1990), aves (Medina e Reiner, 1994; Sorenson e Chiappinelli, 1992) e mamíferos (McGeer, Eccles e McGeer, 1987; Saper, 1990) existem diversas semelhanças anatômicas e, possivelmente também funcionais (Medina e Reiner, 1994; Wächtler, 1980), nos sistemas colinérgicos centrais. Além disso, muitas das aferências telencefálicas com origem no tronco encefálico e tálamo apresentam similaridades entre os diferentes grupos de vertebrados, e provavelmente são filogeneticamente antigas. Assim, é possível que alguns aspectos funcionais comportamentais de caráter fundamental e associadas a essas vias, podem ter sido estabelecidos já no início da evolução dos amniotas (Marino-Neto, 1988; Miceli e Repérant, 1985).

Estudos histoquímicos têm demonstrado que é possível a existência de aferências colinérgicas à formação hipocampal de aves, bem como a presença de receptores colinérgicos muscarínicos nesta região (Dietl, Cortez e Palacios, 1988; Kohler, Messer e Bingman, 1995; Medina e Reiner, 1994). De fato, a formação hipocampal de aves contém muitas das substâncias neuroativas que têm sido encontradas também no hi-

pocampo de mamíferos. Estudos hodológicos e imunohistoquímicos têm demonstrado que a formação hipocampal de aves recebe aferências noradrenérgicas (que podem ser originadas no locus coeruleus), dopaminérgicas (possivelmente oriundas da área tegmental ventral de Tsai) e serotoninérgicas (possivelmente originadas na rafe mediana) (Erichsen *et al.*, 1994; Krebs, Erichsen e Bingman, 1991). Além do mais, é possível encontrar fibras colinérgicas no complexo hipocampal, possivelmente com origem no prosencéfalo basal (banda diagonal e região septal medial) (Krebs, Erichsen e Bingman, 1991; Medina e Reiner, 1994). Assim, dados hodológicos, imunohistoquímicos e farmacológicos, parecem apontar para um notável grau de similaridade dos sistemas moduladores da atividade elétrica celular hipocampal entre aves e mamíferos.

Em vista do grau de comparabilidade exposto acima, é possível que os sistemas colinérgicos também tenham um papel relevante na regulação da atividade eletroscilográfica telencefálica geral e, particularmente, sobre o EOsG hipocampal de aves.

Existem poucas informações acerca do papel dos diversos sistemas de neurotransmissão e em particular dos sistemas colinérgicos, sobre a modulação do EOsG telencefálico de aves.

A despeito da importância da atividade colinérgica na regulação do EOsG de mamíferos, estudos acerca do papel colinérgico sobre o EOsG em aves são escassos e assistemáticos. Karmanova (1982) ad-

ministrou um agonista muscarínico (arecolina) via intramuscular em galinhas cronicamente implantadas com eletrodos bipolares. Esses eletrodos foram posicionados simetricamente nas regiões parietal e occipital de ambos os hemisférios cerebrais. Após a administração da arecolina, foi observado um aumento no número e na duração dos eventos de sono paradoxal. A administração periférica deste agonista provocou também: 1) um aumento considerável na atividade elétrica no núcleo rotundo do tálamo, principalmente na banda de frequências entre 15 e 20 Hz e, 2) aumento na incidência de episódios curtos e espontâneos de vigília atenta que surgiam durante o estado vígil (habitualmente dominado pela vigília relaxada).

Num estudo direcionado principalmente à investigação dos efeitos da aplicação periférica de catecolaminas sobre o EOsG em galinhas, Key e Marley (1962) examinaram adicionalmente os efeitos de algumas drogas colinérgicas. A administração periférica de nicotina em animais jovens e despertos provocou, durante o alerta, a ocorrência de um padrão de ondas lentas de 1 a 3 Hz, sobrepostas por ondas em ponta de 4 a 6 Hz com amplitudes em torno de 150 a 200 μV . Esse padrão era inexistente nos animais tratados com veículo. Em animais adultos, o mesmo tratamento provocou uma ativação do traçado eletrográfico durante o sono. Atividades de 4 a 6 Hz tornam-se dominantes, sendo sobrepostas por salvas de atividades de 18 a 20 Hz e ondas em ponta de 200 a 350 μV , surgindo de 4 a 5 vezes por segundo. A administração de atropina

(0,2 mg i.c.v. e 3,0 mg i.p.) em 3 pintos de 1 a 28 dias não produziu nenhum efeito significativo sobre a atividade eletrocortical desses animais. Em animais com três semanas de idade encontraram atividade rápida de baixa amplitude após administração de eserina.

Embora os autores acima citados não tenham apresentado e discutido os dados sobre os efeitos de agentes colinérgicos de forma pormenorizada e sistemática, torna-se aparente que manipulações colinérgicas por via periférica podem afetar o EOsG telencefálico em galinhas. Estes efeitos, em geral, são semelhantes aos observados em mamíferos, isto é, aumentos da atividade colinérgica (supostamente produzidos pela nicotina, pela arecolina e pela eserina) induzem estados eletrográficos ativados. O bloqueio de receptores muscarínicos, no entanto, parece não afetar o EOsG em animais jovens. Tanto quanto pudemos averiguar, estes trabalhos são os únicos na literatura que examinaram em aves os efeitos de drogas colinérgicas sobre o EOsG telencefálico em aves.

Outros estudos utilizando drogas neuroativas em aves se ocuparam também em examinar a influência colinérgica sobre diversos comportamentos (*e.g.*, Kohler *et al.*, 1996; Sanberg, 1983; Savage *et al.*, 1994; Thompson, 1977; Zolman, Mattingly e Sahley, 1978), e sugerem que, de forma similar ao observado em mamíferos, aplicações periféricas de bloqueadores de receptores colinérgicos produzem perturbações em processos cognitivos.

1.3. O Hipocampo

Apesar do telencéfalo dos vertebrados superiores ter evoluído em duas diferentes direções, uma levando às estruturas típicas das aves (com um desenvolvimento telencefálico globiforme), e outra levando à organização presente nos mamíferos (*e.g.*, com seu desenvolvimento laminar das estruturas corticais), ambas as linhas permitiram aquisições comportamentais complexas (Wächtler e Ebinger, 1989). Estudos neuroanatômicos comparativos indicam uma íntima relação entre o desenvolvimento de uma dada estrutura cerebral e a sua importância funcional nas diferentes espécies. Tanto a organização morfológica básica do sistema nervoso, quanto a regulação de funções como alimentação, orientação, reprodução e regulação interna de todas as espécies de vertebrados são similares, embora o grau de diferenciação e de tamanho das estruturas possam variar muito entre espécies relacionadas, por conta das diferentes demandas biológicas e da adaptação ao ambiente ao qual estão inseridos (Schwerdtfeger e Germroth, 1990).

O telencéfalo de aves é caracterizado por grandes grupamentos celulares revestidos por uma fina lâmina celular que os reveste, sendo alguns grupamentos comparáveis à estruturas cerebrais corticais e subcorticais específicas de mamíferos (Benowitz, 1980; Veenman e Reiner, 1995). Estudos utilizando técnicas anatômicas especiais para marcação de receptores sinápticos, têm demonstrado que existe uma distribuição muito similar desses receptores entre cérebro de aves e de mamí-

feros, indicando uma evolução conservativa do prosencéfalo de amniotas (Veenman *et al.*, 1994).

Uma estrutura ubíqua no telencéfalo de vertebrados superiores é o hipocampo (hp). Estudos embriológicos e de anatomia comparativa indicam que esta região telencefálica pode ter derivado do córtex dorso-medial de um ancestral comum tanto aos mamíferos quanto aos répteis e às aves (Casini, Bingman e Bagnoli, 1986). A formação hipocampal de mamíferos compreende quatro regiões corticais de organização relativamente simples. Estas incluem o giro denteado, o corno de Amon (hipocampo propriamente dito) que é subdividido em regiões CA1, CA2 e CA3, o complexo subicular (subdividido em subículo, pré-subículo e para-subículo) e córtex entorrinal (Amaral e Witter, 1989). Dado à sua simplicidade estrutural, estudos neuroquímicos do hipocampo de mamíferos têm fornecido informações importantes a respeito das substâncias neuroativas sobre esta região e de seus efeitos sobre a atividade elétrica que emerge de sua circuitaria. Moléculas neurotransmissoras como ácido-gama-amino-butírico (GABA), NA, ACh, DA, glutamato (GLU), aspartato (ASP) e diversos peptídeos têm sido identificadas, embora o respectivo papel funcional destes neurotransmissores não seja conhecido completamente. Existem sugestões de que estes neurotransmissores funcionem como moduladores da atividade elétrica regional (Franck *et al.*, 1989).

O hipocampo e estruturas a ele relacionadas têm um papel muito importante na regulação neural dos mais variados processos de memória (Paré, Dong e Gaudreau, 1995), particularmente aqueles envolvidos com o controle de certos tipos de comportamento espacial. Lesões hipocâmpais experimentais realizadas em roedores produzem déficits tanto em tarefas espaciais quanto na geração de comportamentos intencionais específicos dentro de um ambiente familiar (Bingman e Mench, 1990).

Numerosos estudos realizados nos últimos 50 anos têm sugerido que o telencéfalo de aves pode mediar padrões comportamentais complexos e bem organizados, principalmente aqueles envolvidos com o aprendizado (Benowitz, 1980). Uma estrutura telencefálica de aves bastante investigada neste contexto funcional é o hipocampo. Esta estrutura é tida como equivalente ao hipocampo de mamíferos (Benowitz e Karten, 1976). Apesar de o hipocampo de aves apresentar uma disposição citoarquitetônica que difere da dos mamíferos, nas aves este apresenta organização trilaminada, guarda uma relação espacial característica com o ventrículo lateral e apresenta diversidade celular e organização hodológica intrínseca e extrínseca similar àquela encontrada nos mamíferos (Bingman *et al.*, 1988a e 1988b; Casini, Bingman e Bagnoli, 1986).

O hipocampo de aves, a exemplo do de mamíferos, é considerado como parte do sistema límbico, participando de funções como compor-

tamento emocional e sexual, orientação espacial, regulação visceral, memória e aprendizado (Bingman 1988a, 1988b, 1990; Casini, Bingman e Bagnoli, 1986; Krebs, Erichsen e Bingman, 1991). As capacidades de armazenamento e evocação de informações verificadas em aves estão provavelmente relacionadas a um alto grau de desenvolvimento não só da formação hipocampal, mas também do telencéfalo como um todo. O hipocampo pode estar envolvido no redirecionamento da atenção a estímulos ambientais (olfativos, visuais, auditivos) relevantes e reagir a estes apropriadamente (Schwerdfeger e Germroth, 1990). O hipocampo de aves apresenta conexões recíprocas com o neocórtex e indiretas com estruturas olfativas via córtex piriforme, importantes para processar essas informações externas (Bingman *et al.*, 1988a, 1988b, 1994). Apesar de apresentar um bulbo olfativo modesto, pombos apresentam uma apreciável capacidade de processamento olfativo. Essas conexões recíprocas com o córtex piriforme indicam que o hipocampo está envolvido não só no controle de navegação baseado em sinais olfativos mas também com o aprendizado e memória (Bingman *et al.* 1994). Após lesões hipocampais experimentais, os pombos diminuem a sua capacidade em voar de volta para casa a partir de áreas onde podem marcar e identificar referenciais familiares (Bingman *et al.*, 1988a; 1988b; Gagliardo, Mazzotto e Bingman, 1996). Aves que estocam comida em diferentes locais (*e.g.*, corvo, pardal, pica-pau) conseguem após certo decurso de tempo, localizar com facilidade os locais de estocagem. Lesões da forma-

ção hipocampal dessas aves provocam déficits na localização dos locais de estocagem, sugerindo uma disfunção na memória de trabalho bem como na memória e na orientação espacial (Sherry *et al.*, 1989; Gagliardo, Mazzotto e Bingman, 1996). Esses dados demonstram que o hipocampo tem uma participação importante na capacidade de orientação espacial e no reconhecimento de referências ambientais familiares (Erichsen *et al.*, 1994). É interessante salientar que os efeitos resultantes de lesões hipocampais se assemelham muito aos efeitos provocados pela injeção de drogas bloqueadoras de receptores muscarínicos (Kohler *et al.*, 1996)

Em função do quadro de evidências acima, indicativas de uma possível interação funcional entre o hipocampo e os sistemas colinérgicos centrais de aves e mamíferos, e a ausência de evidências sobre uma possível modulação colinérgica do EOsG-hp de aves, o presente trabalho se propõe a iniciar um estudo sistemático do papel dos sistemas colinérgicos na regulação do EOsG hipocampal do pombo doméstico (*Columba livia*). Nesse trabalho, serão examinados os efeitos da administração periférica de drogas que afetam sinapses colinérgicas (bloqueadores de receptores nicotínicos e muscarínicos, e um agente anticolinesterásico) sobre os comportamentos de vigília relaxada, de vigília atenta espontânea e de vigília atenta provocada por estímulo sonoro e, sobre o EOsG hipocampal em pombos despertos e não restritos,

utilizando a análise espectral de potências e a análise aperiódica, além da análise visual do traçado.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados pombos (*Columba livia*) machos e fêmeas adultos, pesando entre 300 e 500 g, obtidos no biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, alojadas no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CCB/CFS-UFSC), com períodos claro-escuro de 12 horas cada (07:00 - 19:00 claro sob luz artificial), à temperatura ambiente, recebendo alimentação e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 1991).

2.2. Eletrodos

Foram utilizados eletrodos bipolares confeccionados em grafite de 0,3 mm de diâmetro (2H) dispostos em paralelo, montados e colados com epóxi-carbono (World Precision Instruments Inc.) em agulhas com parede fina de 28 x 7 mm. As agulhas foram separadas por um segmento isolante de 0,5 mm, composto de acrílico odontológico e cianoacrilato (figura 1). Um outro par de eletrodos, confeccionado com aço inoxidável envernizado de 0,5 mm de diâmetro, com um segmento descoberto de 1 cm, foi implantado na musculatura posterior do pescoço. Este par ser-

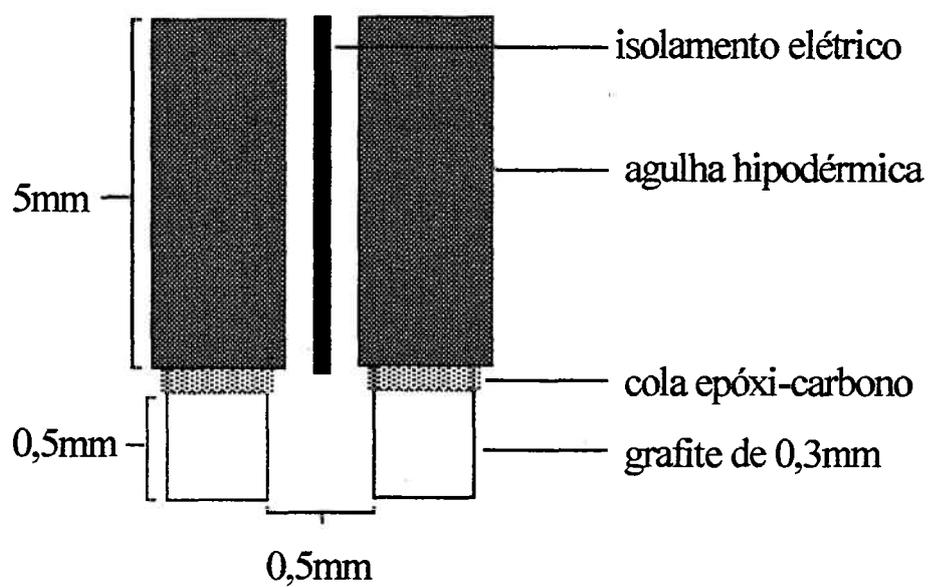


Figura 1- Desenho esquemático representando os eletrodos bipolares para registro da atividade eletroscilográfica cerebral. (Escala 1: 8)

viu para registrar o eletromiograma (EMG). Um único eletrodo, confeccionado com o mesmo material utilizado para os eletrodos de EMG, serviu de referência e aterramento para o animal. Este eletrodo foi instalado subcutaneamente, sendo fixado a um parafuso de aço inoxidável, sobre a região frontal do crânio do animal.

2.3. Cirurgia

Para a implantação dos eletrodos, os animais foram anestesiados com uma associação de 0,33 ml/Kg de peso corporal de solução aquosa de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun, Bayer) e 0,66 ml/Kg de peso corporal de cloridrato de quetamina (Ketalar, Parke-Davis) via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em um aparelho estereotático (David Kopf Instruments), com adaptador para pombos (Karten e Hodos, 1967). Depois de posicionados, foram administrados 0,2 ml de cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor (Xylestesin, Cristália) subcutaneamente, seguidos de uma incisão longitudinal sobre a pele para a exposição do crânio. A porção exposta do crânio foi então desbridada e seca. Em seguida o crânio foi perfurado com broca esférica de uso odontológico, sobre o ponto correspondente à formação hipocampal esquerda (a-p = + 4,0; l = -1,0) (figura 2), seguindo-se coordenadas derivadas do atlas estereotático para pombos de Karten e Hodos (1967). Após o posicionamento manual dos eletrodos no orifício correspondente, os espaços deste orifício foram preenchidos com fibrina do plasma de sangue bovi-

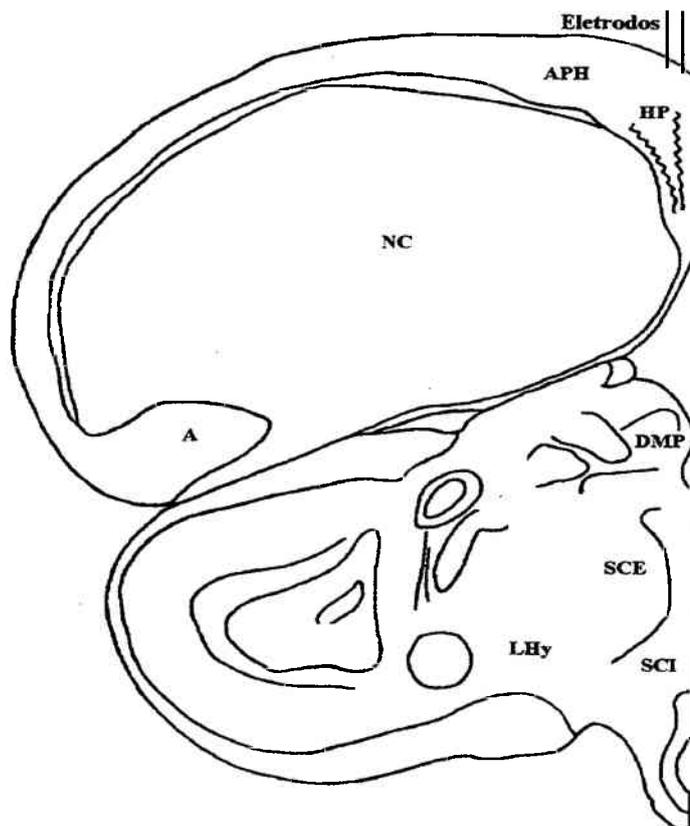


Figura 2- Esquema demonstrativo de corte frontal, do posicionamento dos eletrodos sobre a região hipocampal (modificado de Karten e Hodos, 1967). A: archistriatum; APH: area parahipocampalis; HP: hipocampus; NC: neostriatum caudale; DMP: nucleus dorsomedialis posterior thalami; SCE: stratum cellulare externum; SCI: stratum cellulare internum; LHy: nucleus lateralis hypothalami.

no (Fibrinol, Baldacci). Mais cinco orifícios foram realizados no crânio do animal, distantes do ponto de implantação do eletrodo hipocampal. Dois deles visaram a colocação de parafusos de aço inoxidável para fixação do capacete de acrílico ao crânio. Os três restantes para a implantação de eletrodos em outras áreas telencefálicas (hiperestriado acessório, hiperestriado ventral e área corticoidea dorso-lateral), visando a comparação da atividade elétrica circunscrita à essas áreas com o hipocampo (dados não apresentados no presente trabalho). Os eletrodos foram então soldados a um conector que foi fixado ao crânio do animal com acrílico autopolimerizável de uso odontológico. Após a sutura da pele, os animais receberam uma dose intramuscular de pentabiótico de uso veterinário (0,1ml/100g - Pentabiótico, Wyeth). Dois animais receberam implante crônico de eletrodos para registro do eletrocardiograma (ECG) sobre a musculatura peitoral, associado aos eletrodos para registro do EOsG hipocampal e do HP , e para registro do EMG.

2.4. Ambiente de Registro

A sala de registro é construída em alvenaria, possuindo forração interna em madeira, sendo esta afastada da parede por um espaço de 5 cm preenchido com placas de Isopor de 3 cm de espessura, para atenuação acústica e manutenção da temperatura interna da sala. Esta sala foi mantida com iluminação artificial por intermédio de 3 lâmpadas fluorescentes de 70 W cada, posicionadas nas paredes laterais. Esta sala conta com renovação de ar forçada, através de um exaustor posicionado

no teto da mesma. Um gerador de ruído branco (aprox. 35 dB) foi utilizado para mascaramento de possíveis interferências sonoras externas. Na parede anterior da sala encontra-se uma janela com vidro unidirecional (30 x 30 cm) para a observação do comportamento do animal durante os períodos de registro. Uma campainha posicionada internamente no teto da sala, foi utilizada para gerar um ruído de 90 dB por 3 s. durante os experimentos com estimulação sonora. Ainda no interior desta sala de registro, encontra-se uma gaiola de Faraday (1,0 x 0,7 x 0,6 m), que foi utilizada para alojar a gaiola do animal. Uma vez alojados na sala de registro, os capacetes dos pombos foram conectados a um “swivell” elétrico miniatura (Stoelting Co.) de dez circuitos independentes, que serviu de interface entre o animal e os cabos coaxiais que dão entrada dos sinais ao polígrafo.

2.5. Protocolo de Registro

Após um mínimo de 7 dias de recuperação, os animais foram transferidos (em gaiola individual) para a sala de registro, num período entre as 10:00 e 17:00 horas. Após um tempo mínimo de 2 horas de habituação ao ambiente de registro e aos cabos do swivell, os pombos foram submetidos ao protocolo de registro, que consistiu da aquisição do EOsG e do registro simultâneo da observação comportamental por um período de 20 minutos (controle). Durante um período comportamental de vigília relaxada, os pombos foram submetidos à estimulação sonora. Completando-se 20 minutos, encerrava-se o registro. Para as

sessões de registro com drogas (ver adiante), os animais receberam a dose estipulada da droga eleita e foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos para os registros de controle. As sessões com drogas tiveram duração de 30 minutos, iniciando-se a partir da injeção da droga (figura 3).

2.6. Drogas

Os pombos receberam por via intraperitoneal (i.p.) dose única de veículo (1 ml de solução salina à 0,9%) ou doses equimolares (8 mmol) das seguintes drogas: hidrocloreto de escopolamina (ESC, 2,7 mg/Kg - Scopolamine, Sigma Chemical Co.) - bloqueador muscarínico; metilbrometo de escopolamina (M-ESC, 3,18 mg/kg - Scopolamine methyl bromide, Sigma Chemical Co.) - agente antimuscarínico de ação periférica; hidrocloreto de mecamilamina (MEC, 1,6 mg/Kg - Mecamylamine, Sigma Chemical Co.) - antagonista nicotínico não competitivo; e eserina (ESE, 100 µg/kg - Eserine, Sigma Chemical Co.) - anticolinesterásico. Para a administração das drogas foi seguida uma ordem iniciando-se com solução salina. Após um mínimo de 4 dias de intervalo, administrou-se MEC ou ESC. A ESE foi a última droga a ser aplicada. Em trabalhos anteriores deste laboratório, realizados em 14 animais submetidos à condições semelhantes às do presente trabalho, foram explorados os efeitos eletrográficos e comportamentais de injeções periféricas de outras doses de ESC (0,4; 0,8; 1,6; 2,7 mg/kg). Em função da ausência de alterações nítidas quer no comportamento (nas doses 0,4 e

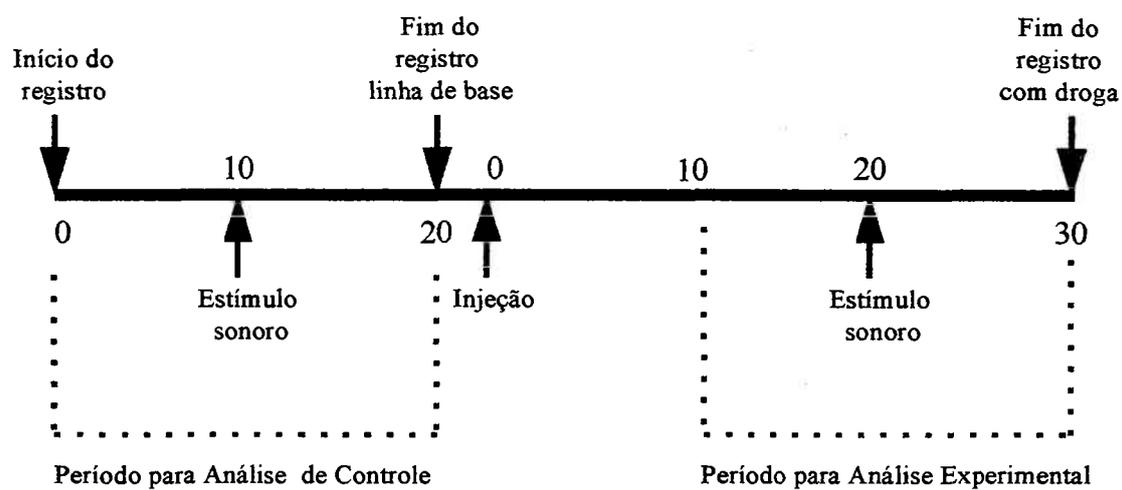


Figura 3- Diagrama demonstrativo do curso temporal, em minutos, das sessões de registro.

0,8mg/kg) quer nos atributos quantitativos do EOsG-hp aqui estudados (nas doses 0,4, 0,8 e 1,6 mg/kg), bem como da expressiva massa de dados produzida pelo estudo das relações dose-efeito da ESC, optou-se, no presente trabalho, pela dissecação minuciosa dos efeitos da dose de 2,7 mg/kg. Doses mais elevadas de ESC provocaram intensas disfunções viscerais (*e.g.*, vômito) e alterações locomotoras e posturais que impediram registros adequados.

As doses adotadas acima para ESC são suficientes para provocar perturbações nos comportamentos baseados na utilização da memória de trabalho e memória espacial em pombos (*e.g.*, Mineau, Boag e Beninger, 1994; Savage, Stanchfield e Overmier, 1994) e roedores (*e.g.*, Jones e Higgins, 1995; Moran, 1993), sobre comportamentos motores como por exemplo a imobilidade tônica em galinhas (*e.g.*, Sanberg, 1983; Thompson, 1977; Zolman, Mattingly e Sahley, 1978) e hiperatividade motora em roedores (*e.g.*, O'Neill *et al.*, 1994). Essas doses também interferem no traçado eletroscilográfico de diferentes animais (sapos - *e.g.*, Kostowski e Mészáros, 1967; ratos - *e.g.*, Neufeld *et al.*, 1994; Riekkinen *et al.*, 1991; Riekkinen-Jr *et al.*, 1991). Para a MEC, a dose estipulada induz mudanças sobre a atividade elétrica cortical (*e.g.*, Radek, 1993; Riekkinen *et al.*, 1991) e sobre o aprendizado e memória em roedores (*e.g.*, Decker e Majchrzak, 1993; Riekkinen-Jr *et al.*, 1992a; Turchi *et al.*, 1995) e sobre certos processos cognitivos em humanos (*e.g.*, Levin, 1992). A dose determinada para a ESE afeta tanto o comporta-

mento quanto o traçado eletroscilográfico em diferentes espécies animais (galinhas - *e.g.*, Key e Marley, 1962; ratos - *e.g.*, Muir *et al.*, 1992; O'Neill *et al.*, 1994; Santucci *et al.*, 1981; répteis - *e.g.*, Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock, 1991).

2.7. Registros Comportamentais

Os eventos comportamentais de interesse foram observados e anotados sistematicamente, utilizando-se códigos especiais (tabela 1) digitados no teclado do computador. Foram feitas anotações do comportamento espontâneo, das reações comportamentais à estimulação sonora e das alterações comportamentais provocadas pela administração de drogas. Estes registros comportamentais foram realizados simultaneamente à aquisição do sinal eletroscilográfico, de forma a permitir a análise dos dados tanto do EOsG quanto do comportamento na mesma seqüência temporal.

2.8. Aquisição do sinal

A aquisição do sinal eletroscilográfico foi realizada através dos amplificadores de um polígrafo analógico de quatro canais NARCOTRACE® 40 (NARCO Bio-Systems). Este equipamento que registra em papel o sinal recebido, teve a constante de tempo ajustada em 0,3 segundos. O polígrafo permite amplificação e filtragem (filtros de corte selecionável tipo passa-baixa "Butterworth" de segunda ordem e filtro "notch" para atenuação de 60 Hz) do sinal. Para os propósitos do presente trabalho

foi utilizada amplificação de 10 mV/cm, e com o filtro de corte ajustado em 100 Hz.

Após a amplificação e filtragem, os sinais do EOsG foram transmitidos para um computador clone IBM-PC/AT 80386 (Microgeneration, 33 MHz, monitor SVGA colorido, co-processador matemático 80387) por intermédio de uma placa conversora analógico-digital de 8 canais (ADAC/12, Digicart, ver.1.0), configurada para conversão em 8 bits e aquisição de sinais dos 4 canais simultaneamente (figura 4).

A aquisição e processamento pelo computador se deu por intermédio de um programa para aquisição e análise de sinais biológicos (Sistema para Aquisição e Análise de Sinais Biológicos - SAASBIO) (Coimbra, 1994), desenvolvido neste laboratório em colaboração com o GPEB (Grupo de Pesquisa em Engenharia Biomédica - UFSC). Este programa permite calibração com pulsos de 100 mV que são gerados pelos amplificadores do polígrafo. O SAASBIO foi ajustado para amostrar o sinal a uma frequência de 128 Hz, assegurando a reconstrução das ondas eletroscilográficas com apreciável definição (*e.g.*, Nilsson, Panizza e Hallett, 1993), necessária para as análises que foram utilizadas pelo presente trabalho.

Após a aquisição do sinal, o programa gera um arquivo binário, armazenando-o em disco rígido. Este arquivo então foi posteriormente acessado e transformado pelo programa em traçado eletroscilográfico apresentado no monitor de vídeo.

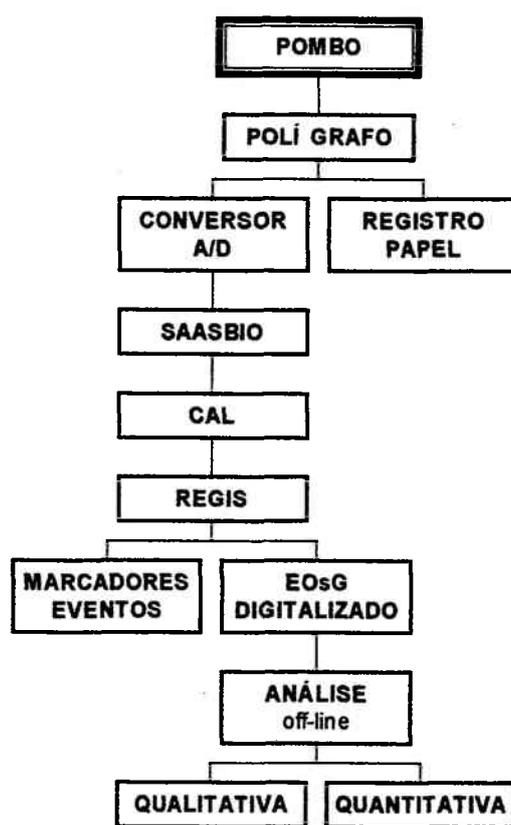


Figura 4 - esquema demonstrativo do sistema de aquisição e análise de EOsG.

Simultaneamente aos registros, o programa está habilitado a armazenar informações de um marcador de eventos (teclado do computador). Os eventos assinalados dão origem a um arquivo paralelo ao do sinal. Como resultado, os eventos são apresentados no monitor de vídeo ao mesmo tempo do arquivo referente ao sinal eletroscilográfico registrado. Este marcador de eventos contém os códigos resultantes da observação comportamental das sessões de registro.

Além da apresentação dos traçados na tela, este programa permite a realização de análise aperiódica, análise espectral, medição de voltagens, contagem de picos, derivada, integral e filtragem (filtros passa-faixa e passa-baixa) do sinal dos quatro canais individualmente quando necessário.

2.9. Histologia

Cumpridos os protocolos de registro, os pombos foram anestesiados com hidrato de cloral (0,4 ml/Kg de peso corporal, i.p.) e perfundidos intracardiacamente com solução salina (NaCl a 0,9%) seguida de formol a 10%. Os cérebros antes de serem dissecados, receberam uma corrente elétrica de 3,3 μ A por 5 s. através dos conectores do capacete, para demarcar a posição dos eletrodos. Uma vez dissecados, os cérebros foram mantidos em formol a 10% por uma semana. Após este período, foram incluídos em ágar-ágar, submetidos à microtomia em vibrátomo (Campden Instruments Ltd.) em cortes com espessura de 100 μ m. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, deixados para secar

ao abrigo do ar e da umidade por 48 horas, sendo então corados pela técnica de Nissl (Tionina a 0,1%). Depois de corados, os cortes foram cobertos com laminulas sobre bálsamo do Canadá, sendo finalmente examinados ao microscópio óptico (Olympus - BH2), para a avaliação do posicionamento dos eletrodos.

2.10. Análise dos Registros

Validadas as preparações pela análise histológica, os registros foram avaliados integralmente por inspeção visual em épocas de 10 s. Esta inspeção serviu para detectar períodos isentos de artefatos e sem flutuação de linha de base. A forma, duração, magnitude e incidência das diferentes ondas componentes do traçado eletroscilográfico foram avaliadas durante esta inspeção visual. Além da inspeção do traçado, eventos comportamentais contínuos e períodos de transição entre diferentes estados comportamentais também foram alvo de avaliação.

A análise comportamental foi realizada computando-se as durações acumuladas de eventos comportamentais (*vide* tabela 1) nas condições de controle e experimentais. De todo o registro, foram selecionadas épocas de EOsG de 10 segundos. Estas épocas correspondiam a estados comportamentais de vigília relaxada e vigília alerta espontâneos bem como de vigília alerta evocada por estimulação sonora. Utilizou-se critérios comportamentais e eletromiográficos para determinar a correspondência do traçado eletroscilográfico aos estados espontâneos de vigília relaxada (movimentos corporais discretos, postura em pé, olhos semi-

Tabela 1: Catálogo de 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 pernas, abertura das asas, seguidos de tremor do corpo;	V	Bater asas - movimentos de bater as asas, com o pombo apoiado sobre uma superfície;
F	Congelamento - comportamento imóvel, olhos fixos, sem movimentos palpebrais, pescoço ereto, movimentos de cabeça rápidos e de curta amplitude;	EX	Complexo comportamental exploratório compreendido por postura alerta, movimentos de cabeça rápidos, movimentos palpebrais rápidos ou ausentes. Eventualmente ocorrem deslocamentos do animal dentro da gaiola;
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	Comportamento de vomitar - indicado pelos movimentos espasmódicos do bico e pescoço, 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 consecutivos;	1	Olhos abertos - identificação da permanência dos olhos abertos por pelo menos dois segundos consecutivos;
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 imóvel, piscando lentamente, podendo estar associado a movimentos suaves e discretos da cabeça;	PA	Postura alerta - pombo imóvel com a cabeça elevada, olhos abertos e fixos, com movimentos de piscar muito rápidos, sem fechar os olhos;
PS	Postura de sono - animal imóvel com olhos fechados, cabeça fletida e apoiada sobre o peito, retração do pescoço, penas do peito eriçadas, eventualmente apoiado apenas em uma das pernas sobre o piso da gaiola ou no poleiro. Eventualmente poderá adotar a postura sentada;	SE	Postura sentada - animal permanece sentado sobre suas pernas fletidas, com a cabeça em posição ereta ou discretamente apoiada sobre o dorso, piscando lentamente ou rapidamente. Eventualmente apresenta penas eriçadas.

cerrados ou piscando lentamente e atividade eletromiográfica regular e de baixa amplitude), e vigília alerta (movimentos de cabeça orientados, olhos abertos ou piscando rapidamente e eletromiografia com atividade irregular e de alta amplitude) (*e.g.*, Amlaner e Ball, 1994; Tobler, 1988). Além dessas amostras, eventuais períodos alterados de comportamento ou demonstração de dissociação entre comportamento e EOsG, também foram colhidos para análise. Após a escolha das épocas de 10 segundos, essas foram submetidas à análise quantitativa.

Esta análise foi realizada de forma comparativa entre os registros obtidos após administração das drogas ou veículo e os de linha de base correspondentes e, entre após administração das drogas e após injeção de salina.

A etapa quantitativa consistiu da análise aperiódica (período-amplitude) e da análise espectral (análise de potência) pela transformada rápida de Fourier (FFT - fast Fourier transform), das amostras de EOsG. A análise aperiódica foi utilizada para fornecer informações acerca do número total de ondas (períodos) e a somatória das amplitudes contidas em cada segundo da amostra de 10 segundos selecionada (Bühner *et al.*, 1990; Coimbra, 1994; Geering *et al.*, 1993). Esta ferramenta de análise identifica seletivamente eventos elétricos contidos entre dois extremos relativos (picos - vale - pico) de um determinado sinal. Inicialmente o sinal é filtrado por um filtro passa - baixa de 30 Hz para atenuar possíveis distorções de alta frequência que possam prejudicar a

identificação das ondas. Uma vez filtrado, são: 1) contadas as ocorrências dos eventos elétricos consecutivos (pico-vale-pico) correspondendo ao período (variável denominada número de ondas, expressa em ondas/s); 2) somadas as tensões dessas ondas (medidas de pico-à-tangente, variável denominada de somatório de amplitudes, expressa em $\mu\text{V/s}$), correspondendo por sua vez à amplitude. Após este tratamento do registro, o sinal é novamente filtrado em 10 Hz para a identificação e tomada das mesmas medidas para as ondas de “baixa frequência”. Como resultado foram obtidos valores de número de ondas e somatório das amplitudes das ondas tanto de altas quanto de baixas frequências (Coimbra, 1994).

A análise espectral forneceu informações sobre as frequências componentes do traçado eletroscilográfico e as suas contribuições à potência total do sinal. O algoritmo da FFT dissecou as ondas do traçado bruto do EOsG, decompondo-as em múltiplas ondas senoidais. Este complexo de ondas senoidais (traçado bruto) é composto pela superposição de ondas (harmônicas) periódicas básicas de diferentes frequências, amplitudes e fases (Bührer *et al.*, 1990). O espectro de potência apresentado pela FFT traduz em $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$, a energia contida em uma sequência de sinais iterativos. Este espectro é obtido pelo cálculo integral dos quadrados das voltagens dos sinais num determinado intervalo de tempo segundo a frequência, permitindo estabelecer a distribuição média da potência de um sinal em relação à frequência. Quando há variações rítmicas do sinal, a potência prepondera sobre uma frequência

fundamental. Na ausência de ritmicidade, a energia contida no sinal distribui-se por extensa faixa de frequências, com pouca ou nenhuma concentração de potência em faixas específicas de frequência (Valle, 1992). O algoritmo utilizado pelo presente trabalho está habilitado a realizar a leitura dos dados diretamente do banco de dados global. Antes de serem processados pela FFT, esses dados são submetidos a uma janela de ponderação (*split-cosine-bell tapering*) nos 10% iniciais e finais da janela de tempo. Esse procedimento reduz o alastramento de uma frequência específica para as suas vizinhas imediatas dentro do periodograma. Determinada a distribuição espectral, tais bandas de frequência foram analisadas. Dessa forma, foi possível obter-se um panorama das atividades predominantes de determinadas bandas de frequência, nas situações de controle bem como sob o efeitos das drogas.

2.11. Estatística

Após essas etapas, os dados absolutos da análise aperiódica e da FFT, gerados pelo SAASBIO em forma de arquivo binário, foram exportados para uma planilha eletrônica (Excel for Windows versão 5.0 - Microsoft). Neste programa, os dados absolutos da FFT foram transformados em dados percentuais em relação à potência total. Os dados do EOsG-hp destinados à análise estatística, para cada segmento de 1 segundo das amostras selecionadas, incluíram: a potência absoluta total (em $\mu\text{V}^2/\text{Hz}$), a borda espectral de 50%, os dados das potências relativas de 1 a 30 Hz (frequência de resolução de 1 Hz) do espectro, e os da-

dos absolutos da análise aperiódica (número de ondas e amplitude). Previamente às análises estatísticas, os dados eletrográficos foram submetidos a uma transformação logarítmica [$x = \log(x)$], visando minimizar possíveis efeitos de 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 às análises paramétricas de variância. Após esta análise prévia assegurou-se o emprego da análise de variância (ANOVA de uma via) para os dados relativos.

As médias obtidas da duração acumulada dos comportamentos de interesse foram submetidas também à análise de variância (ANOVA de uma via). Neste teste comparou-se os dados experimentais *versus* a linha de base correspondente, e dados experimentais das drogas (ESC, MEC e ESE) *versus* salina.

Como nível de significância para todos os métodos estatísticos foi adotado um valor de $p < 0,05$. Esses procedimentos foram realizados através de um programa estatístico (Statistica versão 5.0 - Statsoft Inc.).

RESULTADOS

Do total de 23 animais usados no presente estudo, 13 preparações foram consideradas apropriadas tanto para a análise comportamental quanto para as análises eletroscilográficas. Foram descartados 10 animais por conta de problemas no posicionamento dos eletrodos hipocampais e pela presença de artefatos nos traçados eletroscilográficos. Para a análise dos efeitos da ESC foram utilizados 7 animais, para a M-ESC, 5 animais, para a MEC e ESE, 9 animais e para a administração de salina, 8 animais. Essa discrepância no número de amostras se justifica pelo de fato de não ter sido possível aproveitar os mesmos animais para a seqüência completa de procedimentos experimentais.

A VR foi o estado comportamental predominante nos animais não tratados ou tratados com salina. Os animais permaneciam na postura em pé, parados, com movimentos discretos de cabeça, movimentos palpebrais lentos e pequenos deslocamentos posturais dos membros inferiores (tabela 2). Comportamentos de ingestão de alimento ou de água raramente puderam ser observados entremeando a VR. Posturas compatíveis com o comportamento de sono foram observadas somente em 4 animais durante os períodos de controle. Os períodos de VR eram algumas vezes interrompidos por breves respostas comportamentais de alerta espontâneo (VA), caracterizadas por uma súbita mudança de postura de flexão de pescoço para ereção completa do pescoço, movi-

mentos palpebrais rápidos, acompanhados também de vários movimentos rápidos da cabeça. Eventualmente essa reação de alerta era acompanhada por locomção, ou ainda de comportamento exploratório. Movimentos de autolimpeza ou espreguiçar também puderam ser observados, interrompendo os períodos de VR. Esses dados são indicativos de uma boa adaptação do animal ao ambiente de registro.

Após a estimulação sonora (SOM), os animais reagiam em sobressalto, geralmente adotando postura ereta e movimentos exploratórios amplos do pescoço, podendo estar com os olhos fixamente abertos ou piscando rapidamente. Além dessas características, o sobressalto podia eventualmente, ser acompanhado de locomoção ou mais raramente, por imobilidade.

Comparações entre os períodos pré- e pós-injeção de salina, indicaram não haver diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes comportamentos em questão, embora exista uma certa tendência de diminuição dos comportamentos mais ativos (tabela 2).

3.1. Efeitos Comportamentais da Escopolamina

Quando os períodos de controle (pré-injeção) foram comparados com os períodos experimentais após injeção de ESC, observou-se um aumento na duração do comportamento de vômito [$F(1,10)=8,88$, $p<0,05$] (figura 5-B e tabela 2). Esse comportamento geralmente iniciava-se 2 minutos após a injeção da droga, tendo duração variável e persistindo praticamente durante todo o período de registro.

Tabela 2 - Duração em segundos (médias \pm E.P.M.) dos valores acumulados para os comportamentos observados durante os diferentes procedimentos experimentais.

	Salina		Escopolamina		Mecamilamina		Eserina	
	pré-	pós-	pré-	pós-	pré-	pós-	pré-	pós-
Vômito	4,57 \pm 4,57	4,00 \pm 4,00	0	* # 30,83 \pm 10,34	2,50 \pm 2,50	* # 25,62 \pm 6,57	4,88 \pm 4,88	4,22 \pm 2,87
Locomoção	50,00 \pm 15,98	31,57 \pm 10,11	5,24	55,33 \pm 20,32	34,25 \pm 17,83	35,75 \pm 6,44	43,22 \pm 12,97	37,00 \pm 17,64
Autolimpeza	21,85 \pm 8,57	15,14 \pm 4,92	4,31	26,33 \pm 9,17	17,25 \pm 10,64	17,37 \pm 4,85	13,00 \pm 4,54	15,22 \pm 7,07
Exploração	74,57 \pm 69,37	6,85 \pm 5,25	114,06	5,83 \pm 4,93	119,01 \pm 107,13	19,00 \pm 10,32	63,88 \pm 44,15	25,55 \pm 11,72
Congelamento	0	0	0	* # 333,83 \pm 94,30	0	0	0	0
Postura VR	532,01 \pm 90,13	666,28 \pm 60,44	657,66 \pm 106,79	* # 161,33 \pm 53,34	749,50 \pm 106,18	669,25 \pm 114,24	653,55 \pm 79,41	624,33 \pm 113,69
Postura VA	300,14 \pm 64,77	201,14 \pm 39,96	220,50 \pm 21,94	* # 90,33 \pm 39,41	152,75 \pm 22,22	100,62 \pm 32,02	256,44 \pm 51,49	112,88 \pm 38,10
Deglutição	5,85 \pm 2,75	4,28 \pm 3,96	4,83 \pm 1,60	4,83 \pm 2,50	3,00 \pm 0,75	6,25 \pm 5,44	4,22 \pm 1,55	3,11 \pm 1,85
Ingestão	0	0	0,50 \pm 0,34	1,16 \pm 1,16	0	0	1,55 \pm 1,32	0,88 \pm 0,88
Tremor	2,71 \pm 1,32	9,00 \pm 8,67	3,83 \pm 2,35	2,50 \pm 1,82	4,00 \pm 1,34	6,62 \pm 2,11	1,33 \pm 0,55	0,66 \pm 0,66
Espreguiçar	0,85 \pm 0,85	0,57 \pm 0,54	0,83 \pm 0,65	5,00 \pm 3,25	1,50 \pm 1,23	0,25 \pm 0,25	1,44 \pm 1,11	0
Deitado	85,71 \pm 85,71	51,42 \pm 51,42	0	0	150,00 \pm 150,00	0	0	58,66 \pm 58,66
Sono	0	10,85 \pm 10,85	12,08 \pm 10,41	0	0	0	0,88 \pm 0,88	0

(*) diferenças significantes em relação aos períodos pré-injeção; (#) diferenças significantes em relação à salina. $p < 0,05$.

A ESC foi capaz de induzir o surgimento de FZ [$F(1,10)=11,65$, $p<0,05$] (figura 5-A e tabela 2). Esse comportamento era caracterizado por uma postura ereta, imóvel, com a cabeça e o olhar direcionado a um ponto fixo no ambiente de registro. Alguns sujeitos apresentaram comportamento semelhante ao FZ após estimulação sensorial (SOM) durante os períodos de controle, enquanto outros responderam de forma oposta (hiperatividade motora e movimentos exploratórios amplos e rápidos). Vale notar que o FZ observado após injeção de ESC foi expresso de forma aparentemente espontânea, sem estar associado a qualquer evento ambiental perceptível pelo observador, ocorrendo em média 14,4 ($\pm 2,29$) episódios durante os 20 min de registro e durando, em média, 22,97 s ($\pm 3,70$), tendo sido observado em 2/3 dos animais tratados com ESC.

Os animais tratados com ESC permaneceram menos tempo em postura de VR [$F(1,10)=17,28$, $p<0,05$] e menos tempo em postura de VA [$F(1,10)=8,32$, $p<0,05$] que durante os períodos de controle (figuras 5-C e 5-D). Vale ressaltar que as diminuições ocorridas nas durações tanto de VR quanto de VA foram acentuadas quando comparadas aos períodos pré-injeção. A redução ocorrida na duração da VR foi de 77% enquanto que a redução na duração da VA foi de 78%.

Quando os períodos de registro após administração de ESC foram comparados com os registros após administração de salina (tabela 2), observou-se, além do aparecimento do FZ [$F(1,11)=14,83$, $p<0,05$] (figura 5-A), um aumento no comportamento de vômito [$F(1,11)=5,99$,

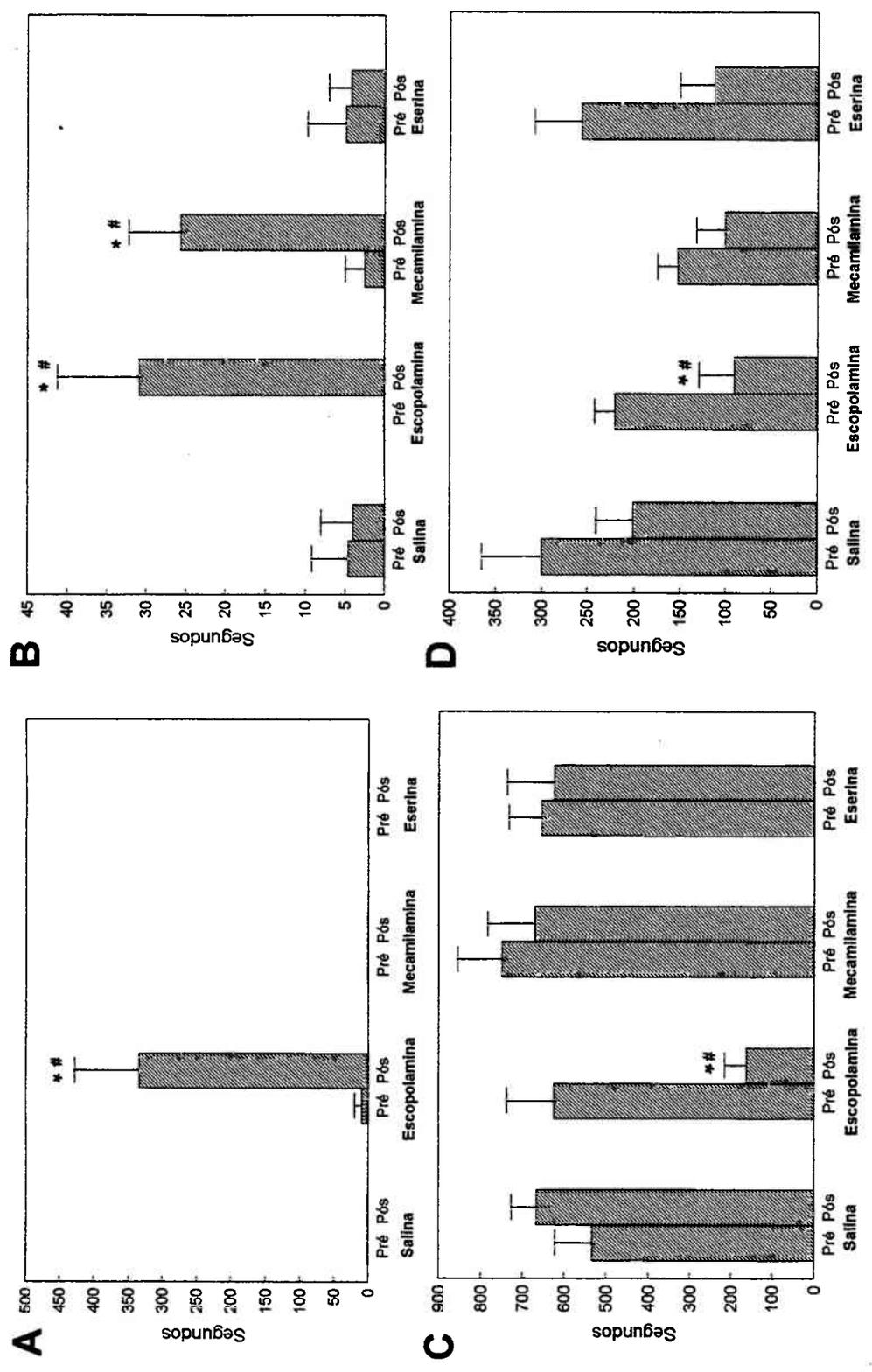


Figura 5 - Gráficos comparativos das durações (média ± E.P.M.) dos comportamentos de congelamento (A), vômito (B), vigília relaxada (C) e vigília alerta (D) antes e após injeção de salina, escopolamina, mecamilamina e eserina. (*) diferenças significantes em relação à linha de base (pré-). (#) diferenças significantes em relação à salina. $p < 0,05$.

$p < 0,05$] (figura 5-B) e diminuição da VR [$F(1,11)=37,97$, $p < 0,05$] (figura 5-C). A exemplo do ocorrido com o comportamento de FZ entre os períodos pré- e pós-injeção, pôde-se observar que a ESC, apesar de produzir aumentos na duração de uma situação de imobilidade (como é o caso do FZ), induziu aumentos na atividade motora, indicado pela diminuição da postura compatível com VR.

Experimentos adicionais realizados em animais ($n=3$) portadores de implantação crônica de eletrodos para registro do eletrocardiograma (EKG), revelaram um efeito importante da ESC sobre a frequência cardíaca (FC). Durante os períodos de controle, a FC referente aos estados de VR, de VA e após SOM, manteve-se em torno de 1,5 batimentos por segundo (bps), 2,3 bps e 3,1 bps respectivamente. Após administração de ESC, a FC manteve-se constantemente elevada (em torno de 5 bps), independente do estado comportamental (figura 6).

Em resumo, após a injeção de ESC foram observadas alterações consistentes tanto vegetativas quanto comportamentais. Entre essas últimas, destaca-se o surgimento do comportamento de FZ, caracterizado por imobilidade corporal e olhar fixo, de ocorrência espontânea e consistente em 2/3 dos animais tratados com ESC. Tal comportamento não foi observado após injeções de doses menores de ESC. Como veremos adiante, o FZ demonstra características eletrográficas tanto de VR quanto de VA.

Controle

Escopolamina

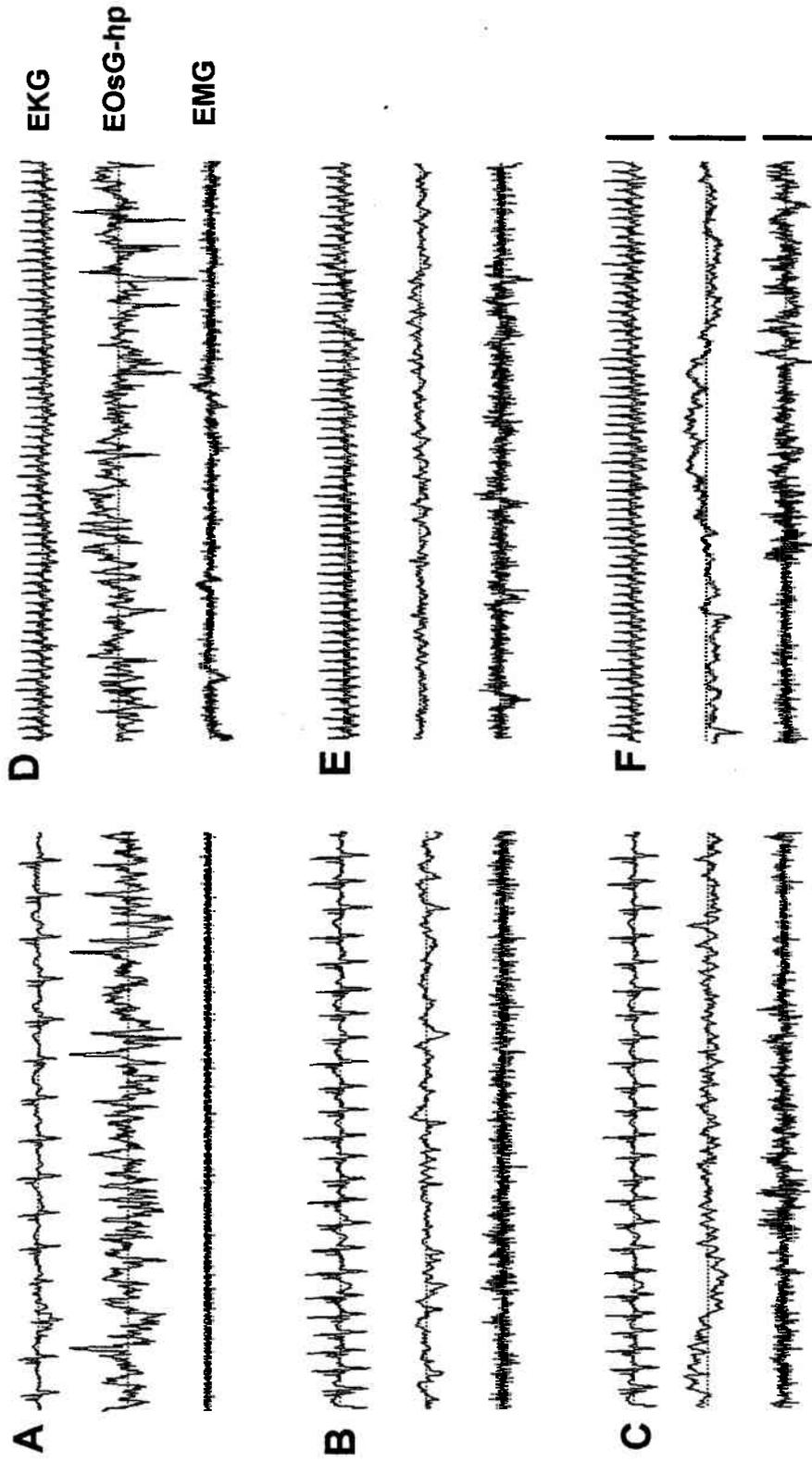


Figura 6 - Segmentos de registros de 10 s demonstrando traçados de eletrocardiograma (EKG), eletroscilograma hipocampal (EOsG-hp) e eletromiograma (EMG), durante períodos de vigília relaxada (**A** e **D**), de vigília alerta (**B** e **E**) e após estimulação sonora (**C** e **F**). Notar as diferenças no traçado eletrocardiográfico entre os períodos de controle (**A**, **B** e **C**) e após injeção de escopolamina (**D**, **E** e **F**). Barra horizontal = 2 s. Barras verticais: superior = 150 mV; média = 200 μ V; inferior = 50 mV.

Nenhuma modificação tanto eletrográfica quanto comportamental pôde ser observada após injeção periférica de M-Escopolamina (3,18 mg/Kg) (dados não apresentados). A ocorrência do vômito e do congelamento, usuais após tratamento com ESC, não foi vista em nenhum dos animais tratados com M-ESC. O traçado eletrográfico não sofreu nenhuma modificação tanto nos atributos qualitativos quanto nos quantitativos, sendo absolutamente similar aos registros obtidos após injeção periférica de salina.

3.2. Efeitos Comportamentais da Mecamilamina

A única diferença significativa observada entre os períodos de registro após a injeção de MEC e respectivos controles (tabela 2), foi um aumento na duração do comportamento de vômito [$F(1,12)=10,81$, $p<0,05$] (figura 5-B). Esse comportamento, de forma diferente daqueles encontrados após administração de ESC, iniciava-se tardiamente (7 - 10 min após a injeção), perdurando por um tempo limitado (5 min). Essa diferença também pôde ser observada pela comparação com os dados dos registros após salina [$F(1,13)=6,52$, $p=0,05$] (tabela 2). Assim, parece que a administração periférica de MEC na dose injetada não foi capaz de provocar alterações comportamentais evidentes além do aumento na duração total do comportamento de vômito.

3.3. Efeitos Comportamentais da Eserina

Na comparação realizada entre os dados de ESE e os dos respectivos controles, observou-se diminuição na duração da VA [$F(1,16)=5,02$, $p=0,05$] (figura 5-D e tabela 2). No entanto, tal dado deve ser considerado com cautela, já que há uma tendência de redução da VA em todos os tratamentos (figura 5-C). Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dados experimentais de ESE e de salina.

Em resumo, foi possível observar que o efeito provocado pela administração de ESC sobre o comportamento global dos animais foi maior do que aqueles provocados tanto pela MEC quanto pela ESE. Adicionalmente, a ESC foi capaz de induzir o surgimento de um comportamento diferenciado, aqui denominado de FZ. Tal comportamento não foi observado após injeção de M-ESC, indicativo de um efeito central da ESC.

3.4. O Eletroscilograma Hipocampal

Para a exploração dos possíveis efeitos da ESC, da MEC e da ESE sobre o EOsG-hp, as mesmas comparações empregadas na exploração dos efeitos comportamentais foram utilizadas (*i.e.*, droga *vs.* controle e droga *vs.* salina). Nenhuma diferença estatisticamente significativa pôde ser observada entre os períodos pré- e pós-injeção de salina, quando compararam-se os dados quantitativos (número de ondas, amplitude, borda espectral de 50%, potência total, e potências relativas de 0 a 30

Tabela 3 - Médias (\pm E.P.M.) do número de PGAs (Incidência = numero de ondas/20 s) e da voltagem (μ V) para cada estado comportamental nos diferentes tratamentos.

	Controle		Experimental	
	Incidência	Voltagem	Incidência	Voltagem
Salina				
VR	11,00 \pm 1,29	612,74 \pm 105,82	12,77 \pm 1,63	723,46 \pm 139,37
VA	0	0	0,22 \pm 0,14	16,75 \pm 11,35
SOM	0,33 \pm 0,33	21,11 \pm 21,11	0,88 \pm 0,45	59,04 \pm 33,55
Escopolamina				
VR	10,28 \pm 1,10	516,42 \pm 99,17	7,00 \pm 1,02	378,98 \pm 67,10
VA	0	0	0,28 \pm 0,18	15,09 \pm 11,11
SOM	0,42 \pm 0,29	20,72 \pm 17,57	0,14 \pm 0,14	6,15 \pm 6,15
Mecamilamina				
VR	11,44 \pm 1,46	560,30 \pm 133,14	10,44 \pm 0,97	501,98 \pm 76,46
VA	0,66 \pm 0,28	29,37 \pm 14,79	0,77 \pm 0,66	21,86 \pm 18,93
SOM	0,33 \pm 0,23	17,06 \pm 13,42	0,77 \pm 0,27	29,64 \pm 10,88
Eserina				
VR	8,55 \pm 1,33	1264,23 \pm 883,20	9,22 \pm 1,77	441,00 \pm 128,60
VA	1,33 \pm 0,79	44,18 \pm 31,93	0,77 \pm 0,73	18,84 \pm 13,02
SOM	0,33 \pm 0,16	13,40 \pm 7,92	1,44 \pm 0,60	64,75 \pm 27,60

Hz) (tabela 4) e qualitativos (forma e incidência das ondas componentes do traçado e das ondas PGAs) correspondentes (tabela 3).

3.4.1. Análise Qualitativa

Nenhuma diferença nas características visuais do traçado global pôde ser detectada quando compararam-se os períodos pré- e pós-injeção das diferentes drogas nos diferentes estados comportamentais (figura 7). A forma das ondas em ponta de grande amplitude (PGA), que são ondas típicas dos traçados de VR, não se modificou após os diferentes tratamentos. A incidência e a amplitude tipicamente reduzidas durante os períodos de VA, também não sofreram alterações quando analisadas nas mesmas condições (figura 7). Na avaliação da incidência e voltagem média das PGAs também não foi possível observar diferenças significantes entre as diferentes situações experimentais (tabela 3). Vale notar que durante a VA e o SOM (tanto após salina quanto após as diferentes drogas) foi possível observar a ocorrência de PGAs, embora elas tenham se apresentado com incidência e voltagens diminuídas. Períodos de 10 s de VA ou de SOM completamente isentos de PGAs não puderam ser coletados para a presente análise. Além disso, durante essas situações, as PGAs tendem a aparecer paulatinamente, mesmo estando o animal comportamentalmente alerta.

Foram estudados também, trechos de registro tomados durante os eventos de FZ. Nesses períodos, os animais se encontravam em um estado comportamental aparentemente alerta, mas apresentavam tra-

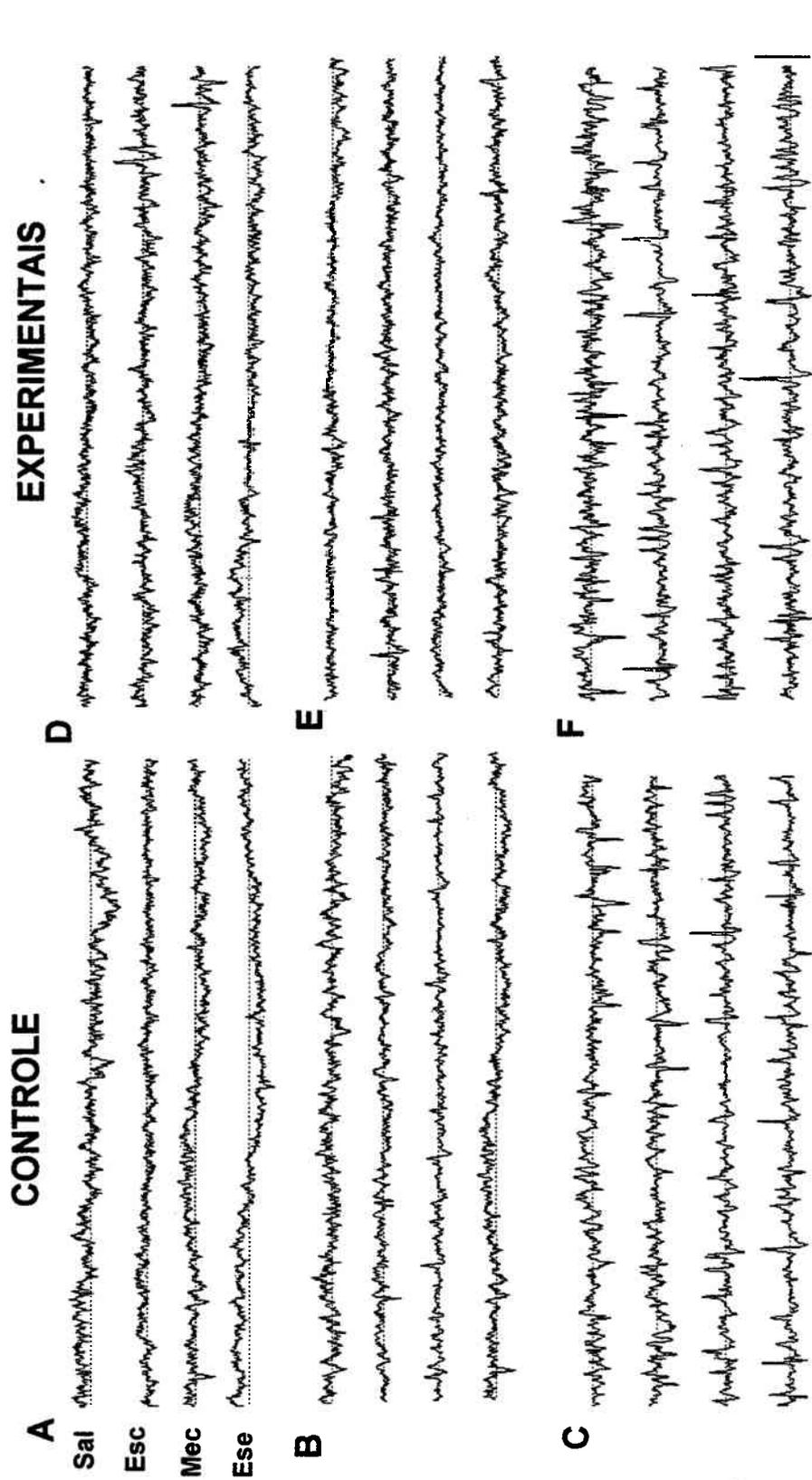


Figura 7 - Segmentos de registros de 10 s de EOsG-gp durante períodos de vigília relaxada (**C e F**), de vigília alerta (**B e E**) e após estimulação sonora (**A e D**), antes (**A, B e C**) e após (**D, E e F**) injeção de salina (Sal), escopolamina (Esc), mecamilamina (Mec) e eserina (Ese). Barras de calibração: horizontal = 2 s; vertical = 200 μ V.

çado de EOsG-hp que guardava semelhanças com VR, isto é, apresentando uma incidência aumentada de ondas PGA bem como uma atividade de fundo com características de VA, representada pela diminuição da amplitude do traçado. Esses períodos eram caracterizados pela exibição de uma postura compatível com VA (imobilidade, estando com os olhos fixamente abertos, podendo ser acompanhado inicialmente por tremor corporal discreto). Após a estimulação sonora, independente da situação experimental, alguns animais apresentaram reações comportamentais que lembram o FZ (imobilidade), mas tendo duração extremamente curta quando comparado ao FZ após injeção de ESC. Além disso, o EOsG-hp concorrente era composto de ondas de alta frequência e baixa amplitude e isento de PGAs, sendo compatível com estados eletrográficos ativados. O EMG relativo a essa situação é caracterizado por alta atividade demonstrando tônus muscular aumentado. No entanto, após a administração de ESC, o congelamento apresentou EOsG-hp e EMG concorrentes semelhantes à VR (figura 9).

3.4.2. Análise Quantitativa

Para as análises quantitativas do EOsG (análise aperiódica e análise espectral), foram avaliadas a somatória das médias dos valores absolutos (número de ondas e amplitude obtidos da análise aperiódica, e potência total e borda espectral de 50%, obtidos da análise espectral) e relativos (potências relativas de 0 a 30 Hz obtidas da FFT), referentes

Tabela 4 - Tabela dos valores médios (\pm E.P.M.) absolutos da análise aperiódica (número de ondas e amplitude) e da análise espectral (borda espectral de 50% e potência total) dos períodos de vigília relaxada (VR), de vigília alerta (VA) e períodos de alerta provocado por estimulação sonora (SOM) antes (pré-) e após (pós-) injeção de salina, escopolamina, mecamilamina e eserina.

	Número de Ondas (ondas/s)		Amplitude (μ V)		Borda Espectral de 50% (Hz)		Potência Total (μ V ² /Hz)	
	pré-	pós-	pré-	pós-	pré-	pós-	pré-	pós-
VR								
Salina	12,75 \pm 0,26	13,15 \pm 0,29	252,91 \pm 15,03	259,61 \pm 13,77	5,54 \pm 0,24	5,71 \pm 0,20	439,76 \pm 51,50	436,82 \pm 45,47
Escopol.	13,03 \pm 0,30	*11,73 \pm 0,31	224,00 \pm 11,70	*177,36 \pm 10,77	5,66 \pm 0,21	5,57 \pm 0,23	321,55 \pm 36,02	*283,57 \pm 34,78
Mecamil.	12,91 \pm 0,26	*12,27 \pm 0,29	237,71 \pm 13,68	*217,79 \pm 9,97	6,14 \pm 0,19	5,78 \pm 0,19	325,54 \pm 37,30	341,80 \pm 40,40
Eserina	12,95 \pm 0,25	12,95 \pm 0,22	278,45 \pm 12,64	283,71 \pm 16,45	6,18 \pm 0,17	5,60 \pm 0,18	537,76 \pm 60,30	523,33 \pm 63,87
VA								
Salina	10,52 \pm 0,33	10,91 \pm 0,29	121,69 \pm 7,23	135,35 \pm 7,94	5,34 \pm 0,20	5,35 \pm 0,22	139,19 \pm 14,65	166,56 \pm 22,11
Escopol.	11,13 \pm 0,27	11,33 \pm 0,36	18,69 \pm 7,08	119,22 \pm 7,57	5,23 \pm 0,22	5,36 \pm 0,20	131,63 \pm 14,64	135,94 \pm 18,90
Mecamil.	10,86 \pm 0,23	10,30 \pm 0,24	131,97 \pm 5,57	*111,68 \pm 4,68	6,26 \pm 0,21	*6,05 \pm 0,23	92,19 \pm 8,03	*97,69 \pm 9,86
Eserina	11,77 \pm 0,25	11,32 \pm 0,29	169,65 \pm 9,71	154,07 \pm 8,17	6,25 \pm 0,20	*6,21 \pm 0,23	207,27 \pm 28,50	143,64 \pm 13,05
SOM								
Salina	10,60 \pm 0,33	11,35 \pm 0,27	135,82 \pm 7,76	142,15 \pm 8,48	5,34 \pm 0,22	5,22 \pm 0,17	197,83 \pm 22,34	173,45 \pm 21,80
Escopol.	11,18 \pm 0,35	11,35 \pm 0,30	121,29 \pm 7,12	139,47 \pm 11,66	5,23 \pm 0,25	5,26 \pm 0,24	146,41 \pm 16,99	164,16 \pm 21,88
Mecamil.	10,96 \pm 0,27	10,71 \pm 0,26	120,01 \pm 5,14	*120,66 \pm 4,94	6,15 \pm 0,23	*5,90 \pm 0,20	110,86 \pm 13,17	*105,49 \pm 10,56
Eserina	11,78 \pm 0,26	11,46 \pm 0,26	179,03 \pm 9,51	172,37 \pm 8,60	6,18 \pm 0,22	*6,08 \pm 0,20	198,42 \pm 10,99	200,32 \pm 22,59

(*) diferenças significantes em relação à salina. $p < 0,05$.

aos períodos de VR, de VA e de SOM das diferentes situações (controle, salina e experimentais) de todos os animais.

3.4.2.1. Efeitos da Escopolamina sobre o EOsG Hipocampal

O tratamento com ESC provocou uma redução no número de ondas [F(1,138)=8,97, $p<0,05$] e na amplitude [F(1,138)=8,82, $p<0,05$] durante períodos de VR, deixando inalterados os demais índices eletrográficos (tabela 4). O EOsG-hp dos períodos de VA apresentou redução nas potências relativas de 2 Hz [F(1,138)=6,06, $p<0,05$] e aumento na de 14 Hz [F(1,138)=4,87, $p<0,05$]. Para o EOsG-hp dos períodos após SOM, foi possível observar aumento na potência relativa de 13 Hz [F(1,138)=4,70, $p<0,05$].

Quando compararam-se os registros da ESC com os de salina, observou-se que nos períodos relacionados à VR, o número de ondas [F(1,148)=9,11, $p<0,05$], a amplitude [F(1,148)=19,87, $p<0,05$] e a potência total [F(1,148)=8,34, $p<0,05$] diminuem (tabela 4). Essa diminuição nos atributos absolutos de EOsG-hp apresentados acima, indicam que a ESC provocou uma atenuação de atividades sincronizadas do EOsG-hp. Nenhuma modificação pode ser observada nos dados relativos da análise espectral (figura 8). Durante os períodos de VA, nenhuma diferença estatisticamente significativa pôde ser observada tanto nos valores absolutos (tabela 4) quanto nos relativos (figura 8). Nos períodos após o SOM, observou-se aumento na potência relativa de 6 Hz [F(1,148)=4,53, $p<0,05$] e de 13 Hz [F(1,148)=4,29, $p<0,039$] e diminui-

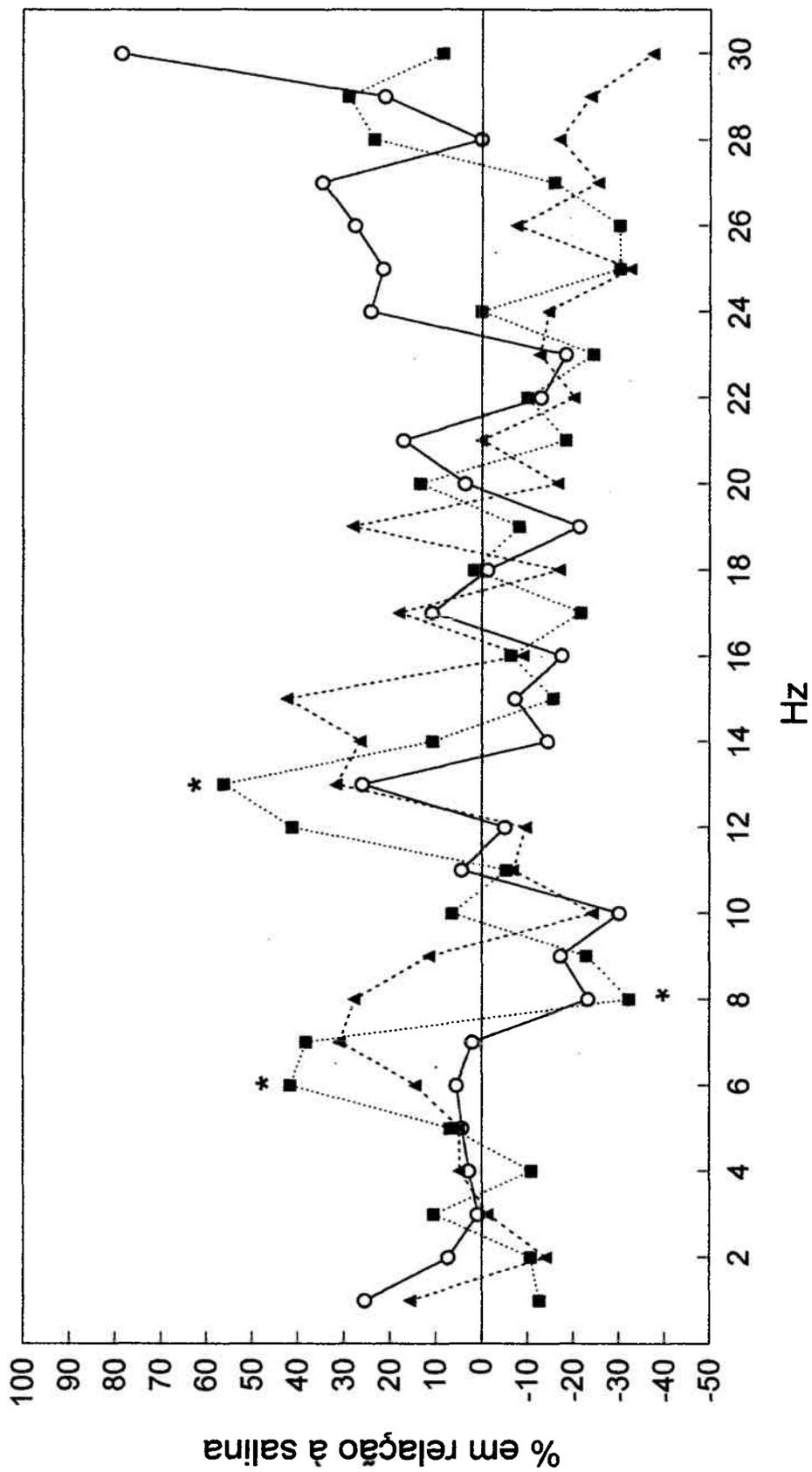


Figura 8 - Comparação entre as potências relativas (médias de 10 períodos de 1 s) do espectro de frequências em períodos de vigília relaxada (—○—), de vigília alerta (- -▲- -) e após estimulação sonora (...■...), obtidos após injeção de escopolamina, em relação a estados similares observados após injeção de salina (0%). (*) indicam diferenças significantes em relação à salina. $p < 0,05$.

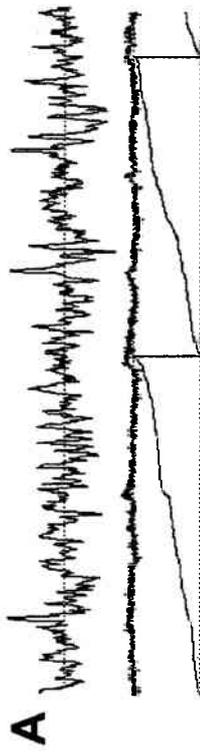
ção na frequência de 8 Hz [$F(1,148)=4,29, p<0,05$] (figura 8). Não foram observadas quaisquer modificações eletrográficas após injeção de M-ESC nos diferentes estados comportamentais em questão.

Resumindo, os dados indicam que o tratamento com ESC produziu, durante a VR, uma redução no número de ondas e na amplitude e não afetou os atributos do EOsG-hp referente aos períodos de VA e após SOM. Apesar das diferenças encontradas nas potências relativas de 2 Hz, bem como o aumento na faixa entre 13 e 14 Hz, essas devem ser consideradas com cautela, já que os dados não se repetem de forma consistente nos diferentes animais estudados ou nos diferentes estados comportamentais de interesse.

O EOsG-hp dos períodos de FZ foram comparados com trechos de VR e de VA após injeção de salina. Neste exame foi possível observar uma diminuição tanto na amplitude [$F(1,98)=5,22, p<0,05$] quanto no número de ondas [$F(1,98)=5,37, p<0,05$] durante o FZ, quando comparado com a VR (tabela 5 e figura 10). Os demais índices eletrográficos permaneceram inalterados (figura 11).

Comparados com os períodos referentes à VA, o FZ provocado pela ESC mostra um aumento no número de ondas [$F(1,98)=7,57, p<0,05$], na amplitude [$F(1,98)=19,82, p<0,05$] e na potência total [$F(1,98)=17,53, p<0,05$] (tabela 5 e figura 10). Sobre as variáveis relativas da análise espectral, foi possível observar diminuição das potências relativas acima de 20 Hz, atingindo especificamente as frequências de 21 Hz [$F(1,98)=9,87, p<0,05$], 25 Hz [$F(1,98)=7,88, p<0,05$], 28 Hz

CONTROLE



ESCOPOLAMINA

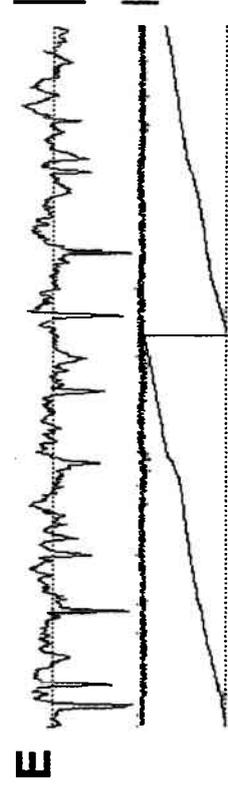
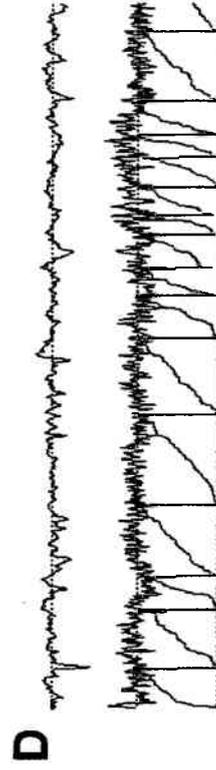
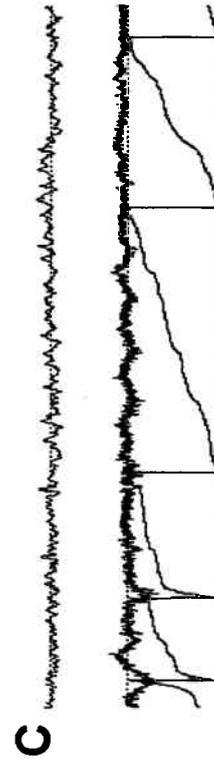
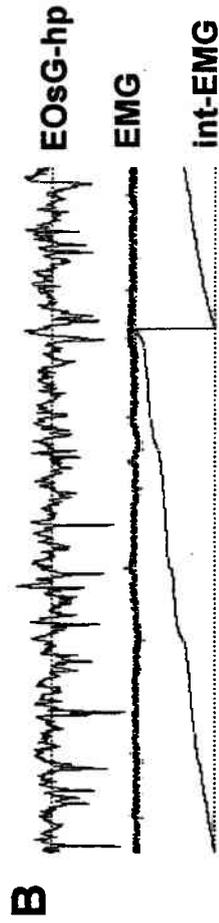


Figura 9 - Segmentos de 10 s do eletroscilograma hipocampal (EOsG-hp), eletromiograma (EMG) e integral do eletromiograma (*int-EMG*). **A**- Segmento de um período de vigília relaxada. **B**- Registro de vigília relaxada após injeção de escopolamina. **C**- Segmento de um registro de vigília alerta de um período de controle. **D**- Segmento de um período de vigília alerta após injeção de escopolamina. **E**- Segmento de registro referente a um período de congelamento após injeção de escopolamina. Barra horizontal = 2 s. Barras verticais: *superior* = 200 μ V; *inferior* = 50 mV.

Tabela 5- Médias \pm E.P.M. (n=5) da incidência e da voltagem das PGAs, e valores absolutos da análise aperiódica (Número de Ondas e Amplitude e da análise espectral (Borda de 50% e Potência Total) de períodos de 10 s de congelamento (FZ) após tratamento com escopolamina e de vigília relaxada (VR) e de vigília alerta (VA) dos períodos de controle.

	Incidência PGAs (nº de ondas/20s)	Voltagem PGAs (μ V)	No. de Ondas (nº de ondas/s)	Amplitude (μ V)	Borda de 50% (Hz)	Potência Total (μ V ² /Hz)
FZ	8,00 \pm 0,89	380,75 \pm 99,01	21,14 \pm 0,31	180,47 \pm 3,13	5,14 \pm 0,22	347,88 \pm 50,21
VR	10,80 \pm 1,39	445,20 \pm 101,30	* 13,28 \pm 0,32	* 223,59 \pm 13,55	5,56 \pm 0,21	321,20 \pm 42,31
VA	0	0	* 10,88 \pm 0,20	* 112,15 \pm 0,21	5,27 \pm 0,20	* 126,03 \pm 16,89

(*) indicam diferenças significantes em relação ao FZ. $p < 0,05$.

Tabela 6- Médias \pm E.P.M. dos valores relativos da análise espectral (médias de 10 períodos de 1 s) de congelamento (FZ) após injeção de escopolamina e de vigília relaxada (VR) e de vigília alerta (VA) de períodos de controle.

	2 Hz	6 Hz	21 Hz	25 Hz	28 Hz	29 Hz	30 Hz
FZ	21,50 \pm 2,41	7,32 \pm 0,90	0,35 \pm 0,09	0,24 \pm 0,03	0,21 \pm 0,04	0,22 \pm 0,04	0,16 \pm 0,04
VR	15,95 \pm 1,81	6,72 \pm 0,70	0,44 \pm 0,06	0,28 \pm 0,07	0,23 \pm 0,04	0,23 \pm 0,04	0,17 \pm 0,03
VA	* 30,90 \pm 2,50	* 4,79 \pm 0,50	* 0,89 \pm 0,11	* 0,48 \pm 0,07	* 0,46 \pm 0,08	* 0,39 \pm 0,06	* 0,30 \pm 0,04

(*) diferenças significantes em relação ao FZ. $p < 0,05$.

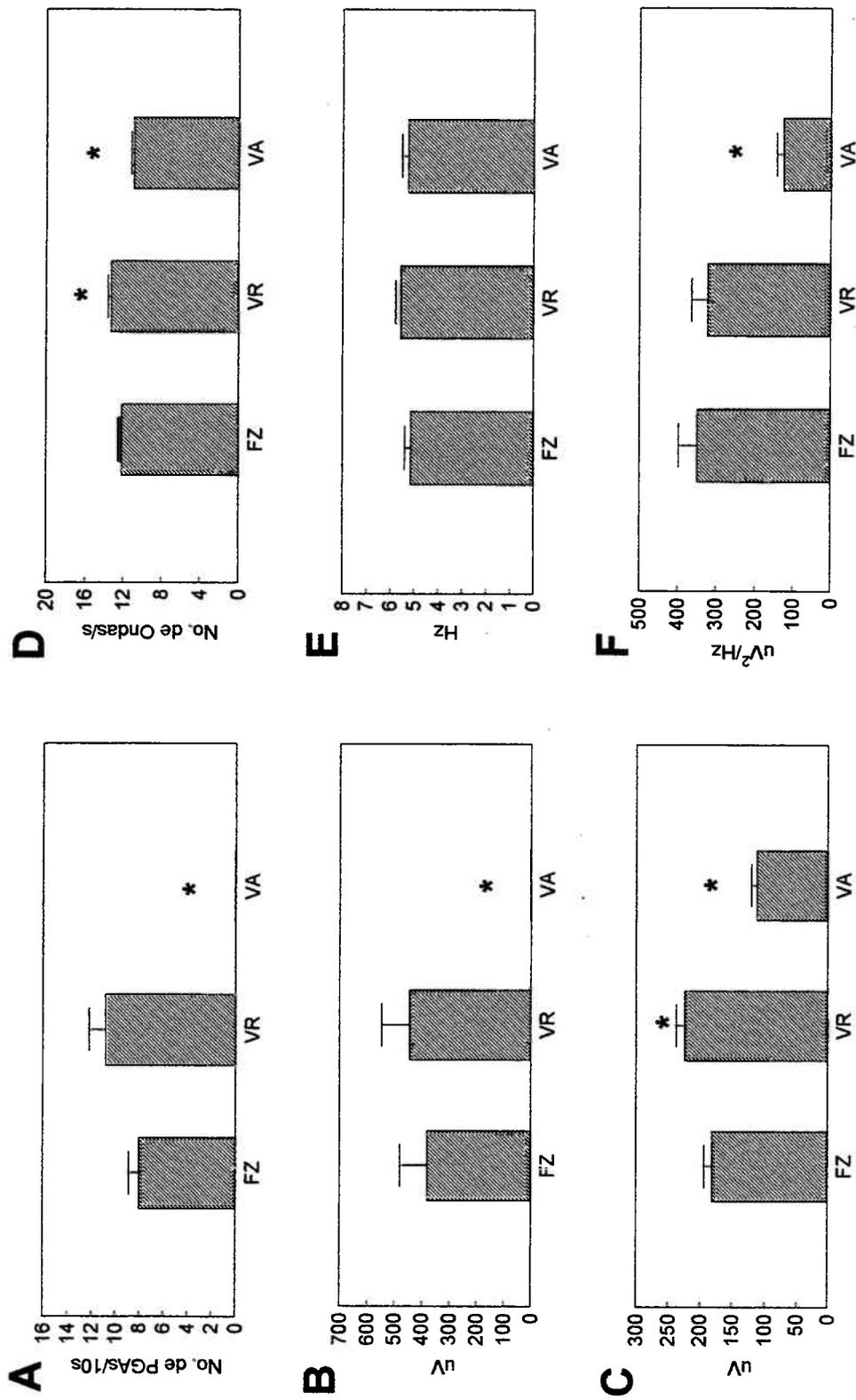


Figura 10 - Gráficos comparativos dos dados absolutos médios (média \pm E.P.M.) do número de PGAs (A), voltagem de PGAs (B), amplitude total (C), número de ondas (D), borda espectral de 50% (E) e potência total (F) de épocas de 10 s de EOsG-hp de vigília relaxada (VR) e de vigília alerta (VA) de períodos de controle, e de congelamento (FZ) após injeção de escopolamina. (*) indicam diferenças significantes. $p < 0,05$.

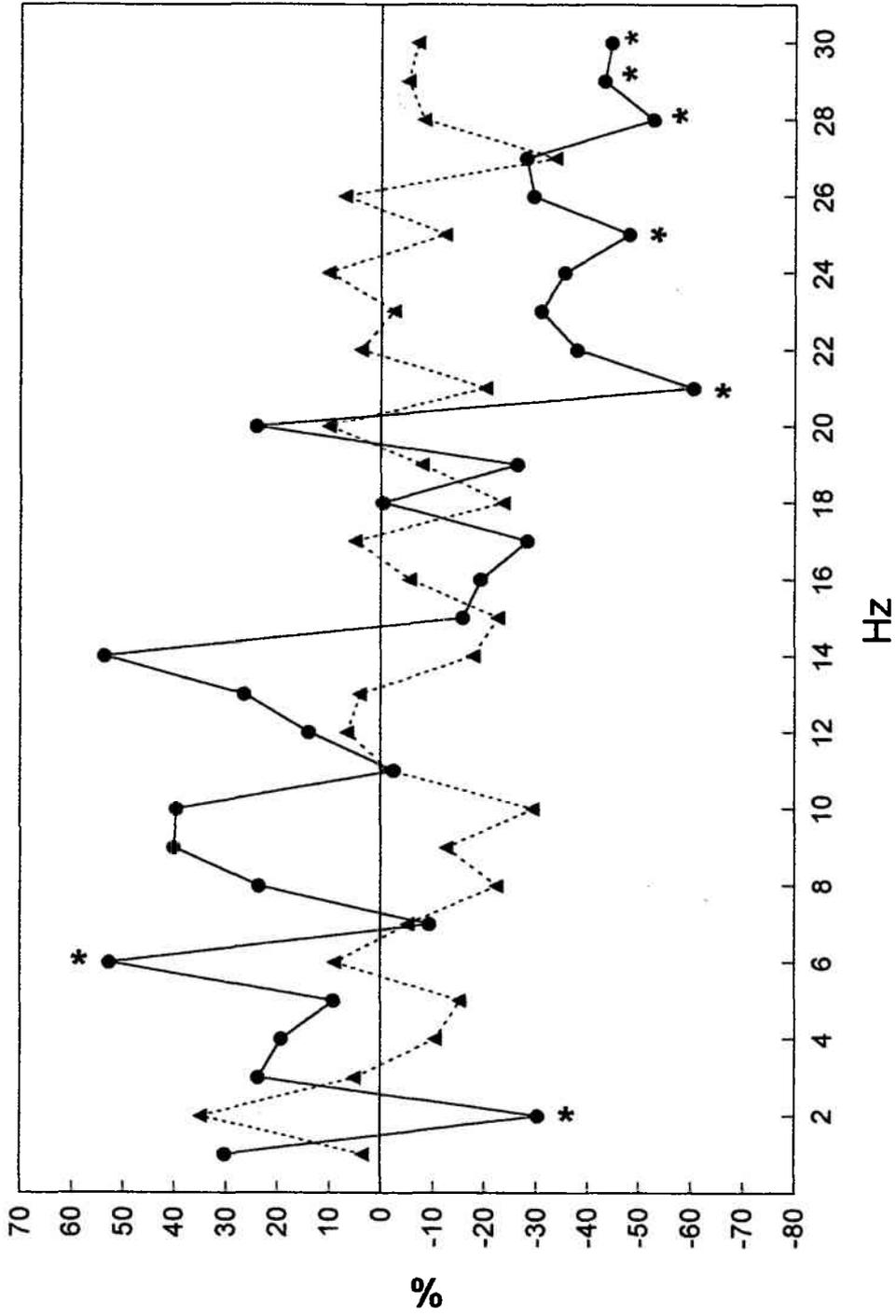


Figura 11 - Comparações entre as potências relativas (médias de 10 períodos de 1 s) do espectro de frequências dos estados de FZ em relação à VR (-▲-) (0%) e em relação à VA (-●-) (0%). (*) indicam diferenças significantes em relação à VA. $p < 0,05$.

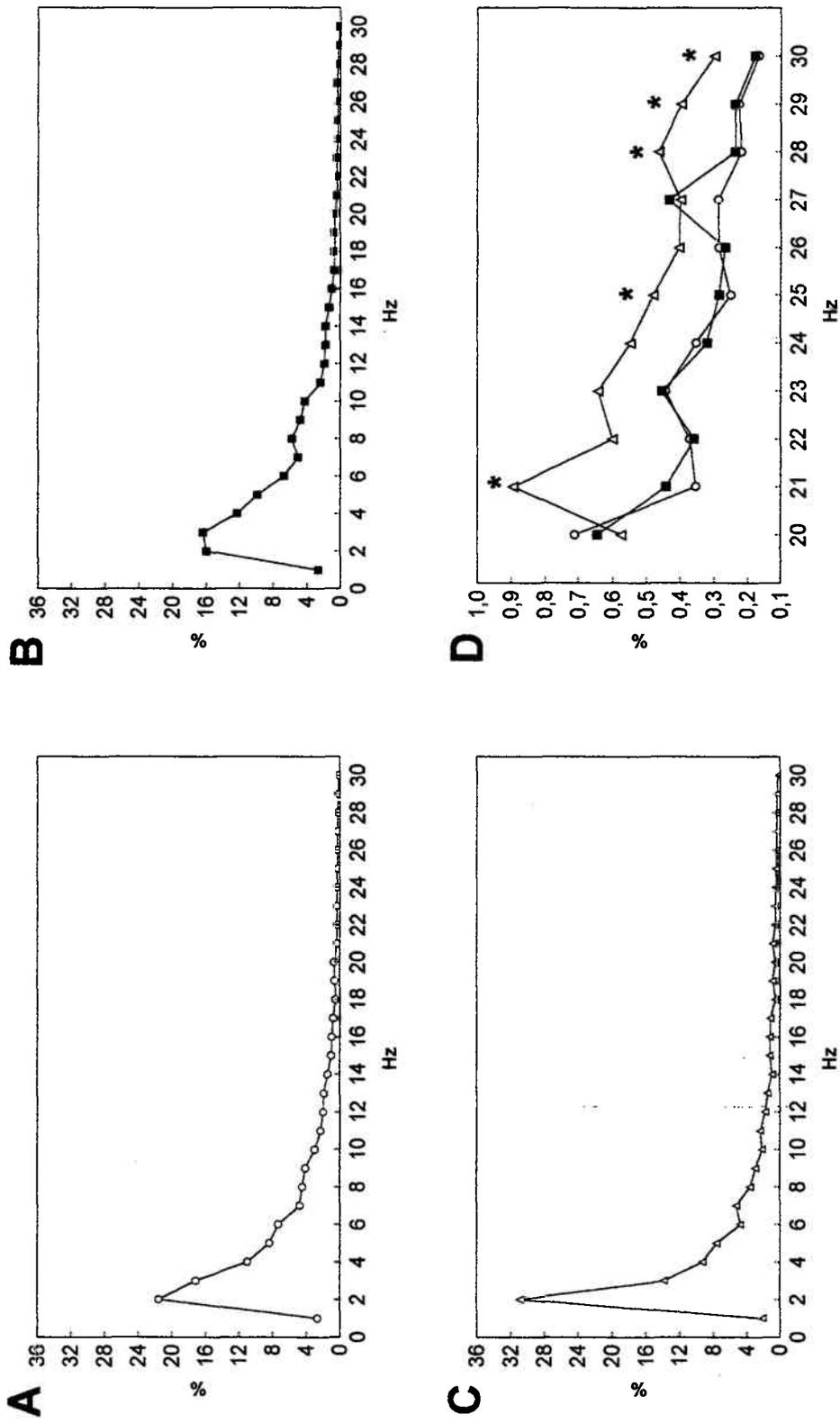


Figura 12 - Espectrogramas relativos médios do EOsG-hp das freqüências de 0 a 30 Hz para os estados de FZ (A), de VR (B) e de VA (C). D - espectrogramas médios do EOsG-hp das freqüências de 20 a 30 Hz dos períodos de FZ (—○—), VR (—■—) e VA (—△—). (*) indicam diferenças significantes em relação ao FZ. $p < 0,05$.

[F(1,98)=6,87, $p<0,05$], 29 Hz [F(1,98)=5,0, $p<0,05$] e 30 Hz [F(1,98)=4,32, $p<0,05$] (figuras 11 e 12). Foi possível observar também diminuição em 2 Hz [F(1,98)=6,87, $p<0,05$] e aumento em 6 Hz [F(1,98)=5,05, $p<0,05$] (tabela 6 e figura 11).

Esse aumento em 6 Hz pode estar associado ao aumento na incidência [F(1,8)=80,0, $p=0,00001$] e nas voltagens [F(1,8)=14,78, $p<0,05$] das PGAs durante os eventos de FZ, quando comparados aos períodos de VA (tabela 5, figuras 9 e 10), já que as PGAs apresentam uma frequência intrínseca entre 6 e 8 Hz.

Assim, o FZ provocado pela injeção periférica de ESC parece representar uma situação diferenciada, caracterizada de um lado por um estado aparente de alerta comportamental e por outro lado, de um EOsG-hp que guarda semelhanças com os traçados eletrográficos de vigília relaxada.

3.4.2.2. Efeitos da Mecamilamina sobre o EOsG Hipocampal

A injeção de MEC produziu, durante os períodos de VR (tabela 4), diminuição no número de ondas [F(1,178)=4,06, $p<0,05$], quando comparados aos respectivos controles. Nos períodos de VA, observou-se diminuição na amplitude [F(1,178)=5,93, $p<0,05$] (tabela 4). Através das comparações utilizadas para os períodos de SOM, observou-se aumento na potência relativa de 16 Hz [F(1,178)=4,63, $p<0,05$] após administração de MEC.

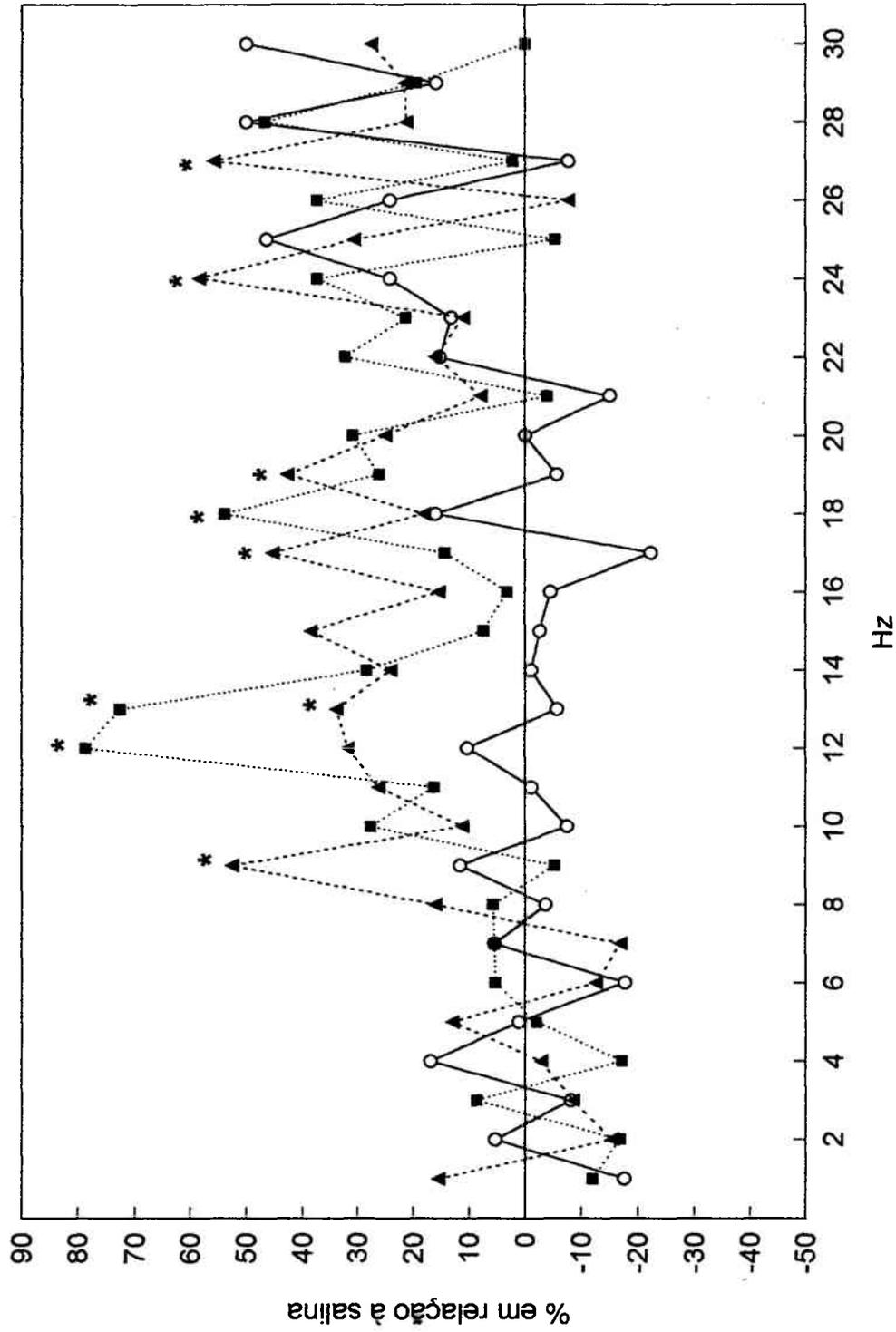


Figura 13 - Comparação entre as potências relativas (médias de 10 períodos de 1 s) do espectro de freqüências em períodos de vigília relaxada (—○—), de vigília alerta (- -▲- -) e após estimulação sonora (...■...), obtidos após injeção de mecamilamina, em relação a estados similares observados após injeção de salina (0%). (*) indicam diferenças significantes em relação à salina. $p < 0,05$.

Comparados com os registros pós-salina, a MEC induziu uma diminuição no número de ondas [F(1,168)=4,29, p<0,05] e na amplitude [F(1,168)=6,17, p<0,05] durante a VR (tabela 4). Nenhuma modificação pode ser observada nos dados relativos da análise do espectro de frequências (figura 13). Durante os períodos de VA, observou-se uma diminuição na amplitude [F(1,168)=4,89, p<0,05] e na potência total [F(1,168)=10,49, p<0,05] e um aumento na borda espectral de 50% [F(1,168)=6,76, p<0,05] (tabela 4). Em relação às potências relativas, foi possível observar aumentos nas frequências de 9 Hz [F(1,168)=8,56, p<0,05], 13 Hz [F(1,168)=4,32, p<0,05], 17 Hz [F(1,168)=4,00, p<0,05], 19 Hz [F(1,168)=4,00, p<0,05], 24 Hz [F(1,168)=5,04, p<0,05] e 27 Hz [F(1,168)=4,37, p<0,05] (figura 13). Tais efeitos ocorreram em 2/3 dos animais tratados com MEC. Observou-se diminuições na amplitude [F(1,168)=5,76, p<0,05] e na potência total [F(1,168)=6,72, p<0,05] e um aumento na borda espectral de 50% [F(1,168)=5,06, p<0,05] (tabela 4). Aumentos nas frequências relativas de 12 Hz [F(1,168)=9,98, p<0,05], 13 Hz [F(1,168)=6,30, p<0,05] e 18 Hz [F(1,168)=5,84, p<0,05] em 2/3 dos animais pesquisados, foram também observados após SOM (figura 13).

Com o intuito de averiguar uma possível relação entre as variações provocadas pela MEC sobre o espectro de frequências e as frequências obtidas após injeção de salina, foi utilizado um teste de correlação linear (Pearson). Esse teste acusou uma correlação positiva entre o delta da VR ($r = 0,551$, $p < 0,05$), o da VA ($r = 0,435$, $p < 0,05$) e do SOM

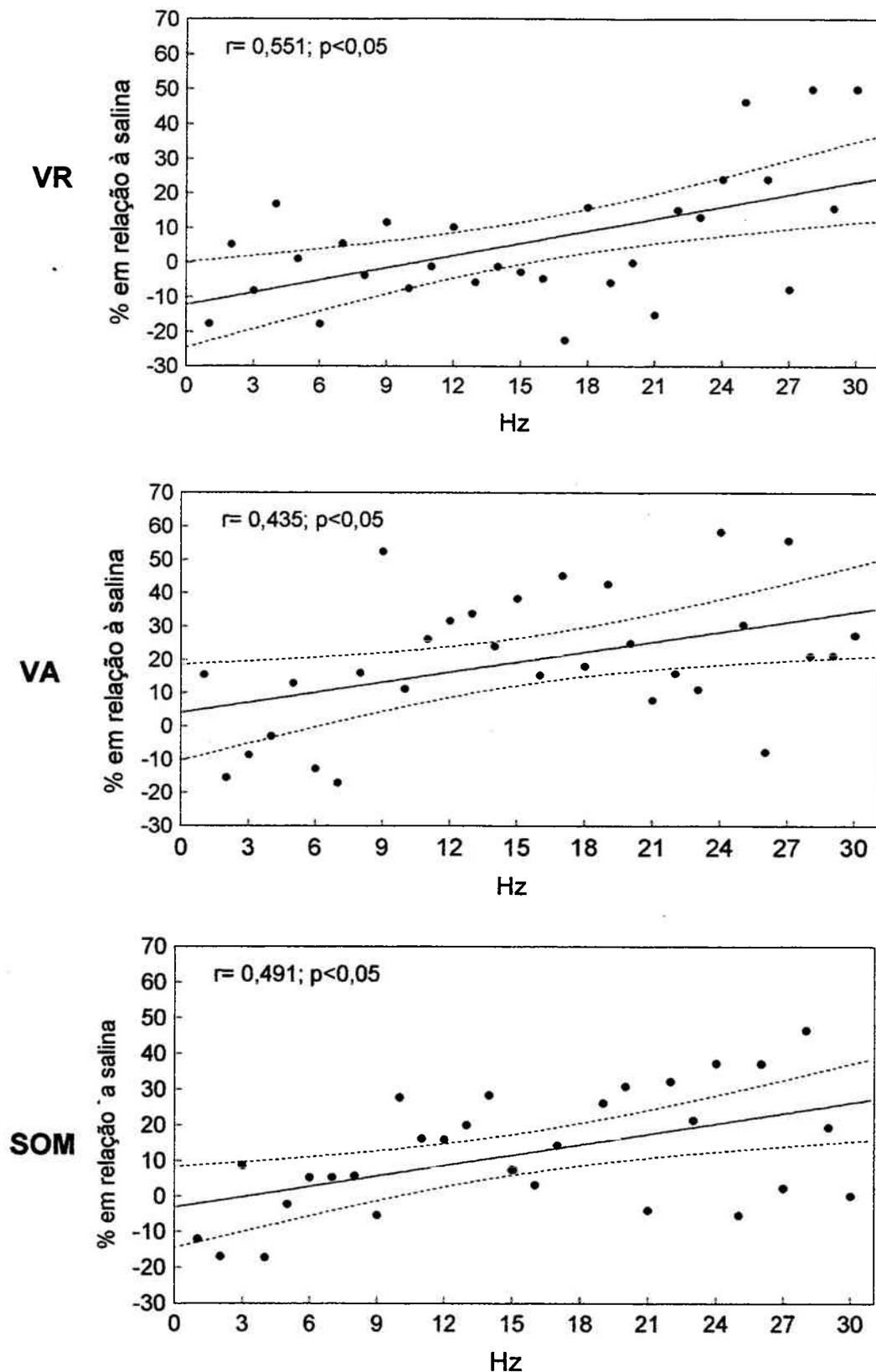


Figura 14 - Representação gráfica da função de correlação (produto-momento) entre as variações das potências relativas (médias de 10 períodos de 1 s) obtidas após injeção de mecamilamina e a frequência. O gráfico indica que existe correlação positiva entre a frequência e as variações de frequência durante a VR, a VA e após SOM. Intervalo de confiança 95%. $p < 0,05$.

($r = 0,491$, $p < 0,05$) quando comparados com a salina (figura 14). Os dados indicam que a MEC foi capaz de produzir aumentos nas potências das frequências mais altas do espectro (acima de 10 Hz).

Em resumo, os dados indicam que a injeção i.p. de MEC produziu diminuição consistente no número de ondas e na amplitude durante os períodos de VR, demonstrando afetar os componentes sincronizados do EOsG-hp desses períodos. Já para os estados ativados, a MEC parece ter induzido a diminuições na amplitude e na potência total, além de aumentos na contribuição de frequências localizadas entre 10 e 30 Hz (VA) e entre 10 e 20 Hz (SOM). Tomados em conjunto, esses dados apontam para um efeito dessincronizador da injeção periférica de MEC sobre o EOsG-hp. As demais mudanças quantitativas nos períodos de VA (borda espectral de 50%) e de SOM (amplitude e borda espectral) detectadas pela análise estatística, devem ser consideradas com cautela, posto que tais modificações não se apresentaram de forma consistente na maioria dos animais estudados.

3.4.2.3. Efeitos da Eserina sobre o EOsG Hipocampal

Para a análise dos dados referentes à ESE, replicaram-se os procedimentos empregados para as drogas bloqueadoras de receptores colinérgicos. Durante os períodos de VR após injeção de ESE, foi possível observar aumentos na borda espectral de 50% [$F(1,178)=5,16$, $p < 0,05$] (tabela 4), nas potências relativas de 2 Hz [$F(1,178)=6,78$, $p < 0,05$], de 3 Hz [$F(1,178)=5,85$, $p < 0,05$], 4 Hz [$F(1,178)=5,07$, $p < 0,05$] e diminuições

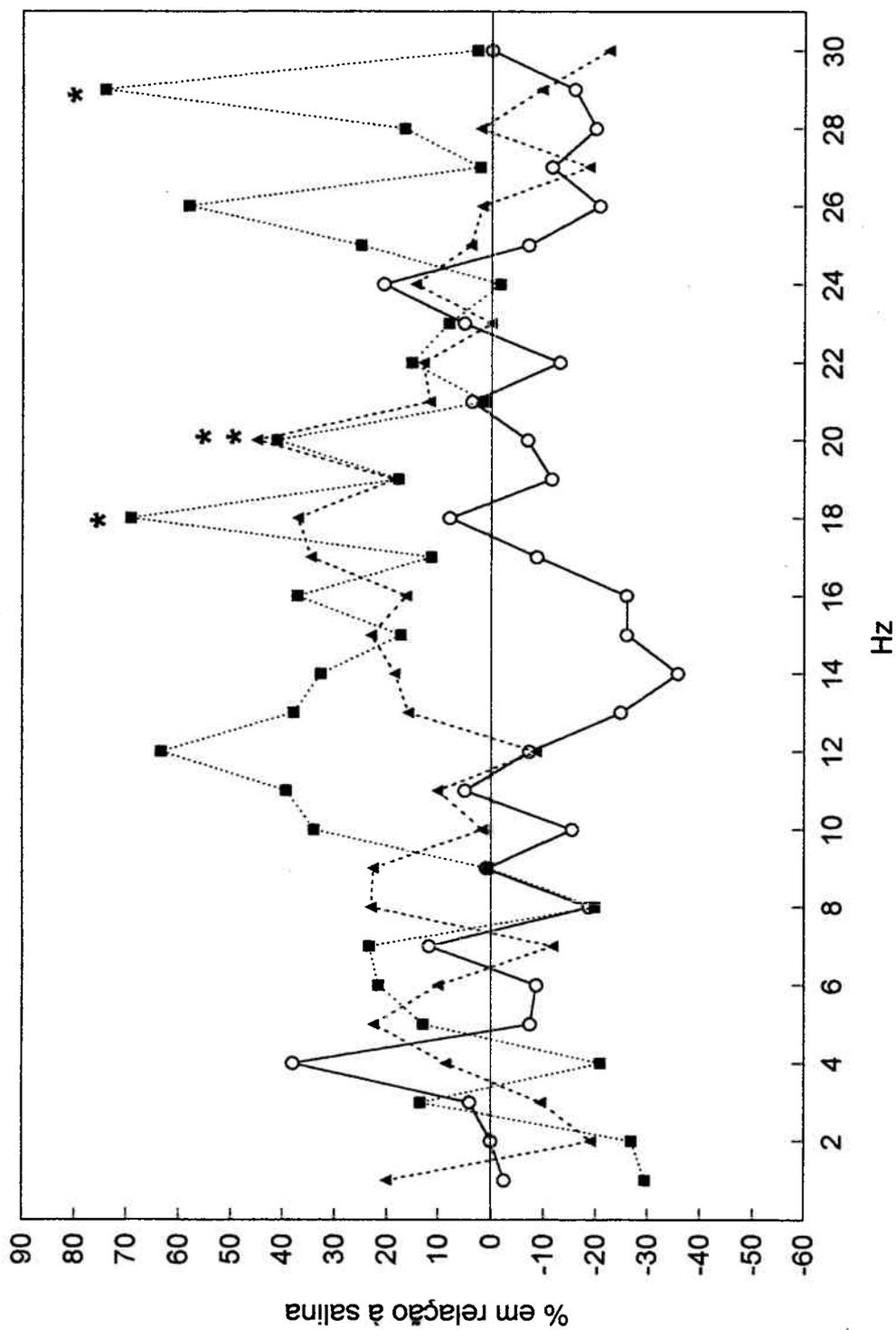


Figura 15 - Comparação entre as potências relativas (médias de 10 períodos de 1 s) do espectro de frequências em períodos de vigília relaxada (—○—), de vigília alerta (-▲-) e após estimulação sonora (...■...), obtidos após injeção de eserina, em relação a estados similares observados após injeção de salina (0%). (*) indicam diferenças significantes em relação à salina. $p < 0,05$.

em 13 Hz [$F(1,178)=5,86$, $p<0,05$] e em 14 Hz [$F(1,178)=7,16$, $p<0,05$]. Nos períodos de VA após aplicação de ESE, observou-se diminuição na potência total [$F(1,178)=4,12$, $p<0,05$] (tabela 4), nas potências relativas de 8 Hz [$F(1,178)=4,04$, $p<0,05$] e aumento em 22 Hz [$F(1,178)=3,91$, $p<0,05$]. Em relação aos períodos após SOM, observaram-se diminuições nas potências relativas de 3 Hz [$F(1,178)=6,20$, $p<0,05$] e aumentos em 8 Hz [$F(1,178)=5,29$, $p<0,05$] e em 9 Hz [$F(1,178)=6,19$, $p<0,05$].

Confrontados os dados de ESE e salina, durante os períodos referentes à VR, não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes (tabela 4 e figura 15). Para os períodos de VA, foi possível observar na maioria dos animais tratados (2/3), aumentos na borda espectral de 50% [$F(1,168)=11,29$, $p<0,05$] (tabela 4) e na potência relativa de 20 Hz [$F(1,168)=5,52$, $p<0,05$] (figura 15). Durante os períodos de SOM, observou-se aumento na borda espectral [$F(1,168)=14,10$, $p<0,05$] (tabela 4), nas potências relativas de 18 Hz [$F(1,168)=8,28$, $p<0,05$], de 20 Hz [$F(1,168)=4,85$, $p<0,05$] e de 29 Hz [$F(1,168)=5,64$, $p<0,05$] (figura 15).

Em resumo, nossos dados indicam que a ESE, administrada perifericamente, foi capaz de produzir aumentos significantes na frequência média do espectro de potências durante os estados ativados (VA e SOM), verificado através do aumento na borda espectral de 50%, bem como aumentos nas potências relativas compreendidas entre 10 e 30 Hz.

Vale ressaltar que, após a injeção de ESE, foi possível detectar diferenças isoladas em alguns dos índices eletrográficos em questão.

Entretanto, a incidência dessas diferenças não apresentaram consistência suficiente nos animais estudados para que permitissem assumi-las como significativas.

DISCUSSÃO

Uma possível participação dos sistemas colinérgicos centrais no controle do EOsG-hp de pombos durante diferentes estados de vigília motivou o desenvolvimento do presente trabalho. Para a execução do presente estudo, utilizou-se a implantação crônica de eletrodos bipolares para o registro da atividade elétrica coletiva de neurônios hipocâmpais antes e após a administração i.p. de bloqueadores muscarínicos (ESC, 2,7 mg/Kg de peso; M-ESC, 3,18 mg/Kg), de um antagonista nicotínico (MEC, 1,6 mg/Kg) e de um anticolinesterásico (ESE 100µg/Kg de peso).

A injeção de ESC, provocou uma diminuição significativa no número de ondas, na amplitude e na potência total do EOsG-hp, modificações muito discretas sobre o perfil espectral do EOsG-hp e nenhuma mudança nos atributos qualitativos e quantitativos das PGA's durante estados de VR. Durante os estados mais ativados (VA e SOM) nenhuma diferença pôde ser observada.

As modificações no número de ondas, na amplitude e na potência total, observadas durante a VR, podem sugerir uma diminuição nas características sincronizadas da VR, ou ainda, uma superficialização da VR. Essa superficialização da VR pode ter ocorrido em função do aumento na incidência e na duração do comportamento de vomitar, provocado pela injeção i.p. de ESC. O desconforto produzido pela injeção

poderia impedir o retorno dos animais a níveis de VR mais profundos, mantendo um nível de vigília limítrofe entre VR e VA. É interessante notar que apesar dessa superficialização da VR, um dos seus principais atributos (PGAs) não sofreu nenhuma modificação. É importante lembrar também que, injeções de M-ESC em doses equimolares à ESC, não produziram comportamento de vômito. Essa observação sugere que o comportamento de vômito possivelmente tenha ocorrido por um efeito central da ESC e não por um efeito irritativo sobre as vísceras abdominais após a injeção. Apontando para a mesma direção, Thompson (1977) observou que galinhas ficavam menos inibidas e mais alertas após injeção de ESC.

Dados do nosso laboratório revelaram que doses inferiores (0,4; 0,8; 1,6 mg/Kg de ESC) à utilizada no presente trabalho, não foram suficientes para provocar quaisquer alterações eletrográficas tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo sobre o EOsG-hp de pombos domésticos (Ribeiro *et al.*, 1993). De forma similar, Key e Marley (1962) utilizaram a atropina (bloqueador muscarínico) em doses de 0,2 mg i.c.v. e 3,0 mg i.p. e notaram que, independente da via de administração, não foi possível observar qualquer efeito sobre a atividade eletrocortical de galinhas.

Por outro lado, Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock (1991) encontraram um efeito sincronizante da atropina (4,5 mg/kg i.v.) em tartarugas. Esse efeito consistiu da reversão dos efeitos dessincronizantes da ESE

sobre o EOsG do córtex medial desses animais. Em um estudo realizado em sapos (*Rana esculenta*) com implantação crônica de eletrodos sobre os lobos olfativos, Kostowski e Mészáros (1967) observaram que doses de 3,0 a 5,0 mg/kg de ESC foram incapazes de provocar quaisquer efeitos sobre o EOsG telencefálico em situações de repouso mas, induziram aumentos na amplitude das ondas após estimulação sensorial. Em ratos, Riekkinen-Jr e colaboradores (1991) aplicaram 2 doses diferentes de ESC (0,1 mg/kg e 2,0 mg/kg) sendo que na dose mais baixa nenhuma modificação pôde ser observada, enquanto que na dose mais alta ocorreu um aumento significativo nos valores da amplitude espectral, revelando uma lentificação do traçado eletrográfico. Num estudo conduzido por Vanderwolf (1992), doses de 5,0 mg/kg de ESC modificam a atividade neocortical e hipocampal de ratos, lentificando o traçado que acompanha estados comportamentais alertas. Stewart, MacFabe e Vanderwolf (1984) utilizaram a atropina e observaram que doses variando entre 1 e 5 mg/kg eram incapazes de alterar a atividade elétrica neocortical de ratos e que modificações importantes ocorrem somente com doses em torno de 50 mg/kg. Assim, enquanto que os efeitos sincronizadores encontrados após bloqueio muscarínico parecem ser observáveis em anfíbios, répteis e mamíferos, os mesmos não puderam ser vistos no pombo.

É também possível que a ausência de efeitos relevantes sobre o EOsG-hp esteja relacionada à dose empregada. Todavia, doses compa-

ráveis e até mesmo muito inferiores são suficientes para produzir déficits cognitivos em diferentes espécies animais (ver adiante). É concebível que, se a dose de ESC fosse aumentada, distúrbios comportamentais mais intensos poderiam ocorrer. De fato, doses de bloqueadores de receptores muscarínicos, superiores à empregada no presente trabalho, produzem aumento acentuado da atividade motora (Stewart, MacFabe e Vanderwolf, 1984; O'Neill *et al.*, 1994; Zolman, Mattingly e Sahley, 1978), desconexão entre comportamento e EOsG e desorganização comportamental (Karczmar, 1995; Vanderwolf, 1992). A utilização de doses intermediárias de ESC no presente trabalho, buscou a observação de efeitos eletrográficos de situações comportamentais próximas do natural e não daquelas que fossem resultantes de uma ação maciça e provavelmente tóxica da ESC.

Uma outra possibilidade para a ausência de efeitos eletrográficos importantes da ESC sobre o EOsG-hp, poderia residir numa distribuição desigual de receptores muscarínicos colinérgicos na região hipocampal registrada. No entanto, no presente trabalho os eletrodos foram posicionados em distritos hipocampais que apresentam concentração de receptores muscarínicos de moderada à baixa no pombo, distribuição essa que é similar à observada em mamíferos (Kohler, Messer e Bingman, 1995).

Mudanças estruturais podem ocorrer no hipocampo, dependendo das condições ambientais as quais certos animais estão expostos. Ani-

mais apresentam dois tipos de estratégias comportamentais para manter o equilíbrio entre o suprimento alimentar e o balanço energético. Uma delas é a hibernação, que reduz a necessidade de ingestão alimentar, reduzindo a taxa de consumo energético. A outra estratégia abarca dois comportamentos distintos: a migração e a estocagem de alimento. Estas últimas são acompanhadas de modificações morfológicas do hipocampo. Em animais que hibernam, é possível observar uma diminuição na estrutura hipocampal. Por outro lado, em animais que migram ou que estocam comida, observa-se aumentos estruturais do hipocampo. Essas modificações plásticas parecem estar relacionadas às funções hipocâmpais (cognitivas espaciais) necessárias para a navegação durante a migração ou localização de locais de estocagem de alimento. Tais modificações poderiam ser acompanhadas de mudanças funcionais hipocâmpais (Jacobs, 1997). Já que o hipocampo pode apresentar essa plasticidade dependente do ambiente, e que as condições experimentais do presente trabalho não exigiam uma atividade hipocampal mais elaborada de orientação e localização espacial, é possível que a influência colinérgica em tais condições não seja relevante o suficiente para ser atingida pela ação da ESC. É razoável imaginar que, uma vez que modificações morfológicas ocorrem no hipocampo, mudanças tanto na concentração quanto na distribuição de receptores muscarínicos também podem ocorrer, acompanhando esses ajustes plásticos do hipocampo.

Nossos dados indicam por outro lado, que a ESC pode, num certo grau, interferir na regulação da atividade elétrica hipocampal de pompos. Essa afirmação está apoiada na ocorrência de um estado comportamental e eletrográfico diferenciado, que surgiu após tratamento com ESC, aqui denominado de congelamento (FZ). Este estado comportamental apresentou um EOsG-hp particular, contendo características eletrográficas encontradas tanto em VR quanto em VA.

O FZ induzido pela ESC, caracterizado por imobilidade, tônus muscular compatível com estados relaxados e olhos fixamente abertos, era mais duradouro que o sobressalto observado eventualmente após SOM. Ao contrário do sobressalto, o FZ surgia espontaneamente, sem estar associado a qualquer estimulação sensorial observável, sendo acompanhado de atividade eletroscilográfica hipocampal peculiar. Um comportamento que aparentemente apresenta elementos comuns ao FZ (imobilidade, tônus muscular, movimentos oculares e palpebrais diminuídos) é a hipnose animal ou imobilidade tônica (IT). A IT parece ser uma estratégia comportamental inibitória, associada a situações de grande stress (*e.g.*, estimulação sensorial potente, medo) ou a manobras manipulativas específicas do animal (Fugishita, Hisamitsu e Takeshige, 1991; Thompson, 1977). Mesmo estando aparentemente alheio ao ambiente, parece que os animais ainda apresentam certo grau de interação com o meio durante a IT (Hoffmann e Menescal, 1988). Tal sugestão está amparada nos achados eletrográficos que revelam a existência de

atividade teta hipocampal em mamíferos (Harper, 1971) e atividade dessincronizada no telencéfalo de sapos (Hoffmann e Menescal, 1988). É interessante notar que a IT é sensível à drogas colinérgicas. Bloqueadores muscarínicos (*e.g.*, ESC) reduzem acentuadamente a duração desse comportamento (Sanberg, 1983; Thompson, 1977; Zolman, Mattingly e Sahley, 1978) enquanto que o tratamento com compostos colinomiméticos (*e.g.*, carbacol) (Franchi, Hoffmann e Hoffmann, 1994) ou com ESE (Thompson, 1977) aumenta sua duração. É interessante notar também que a IT em mamíferos, pode ter sua duração diminuída após lesões hipocampais ou septais (Thompson, 1977). Observações assistemáticas de aves tratadas com ESC, indicaram que os animais passavam menos tempo com seus olhos fechados, e mostraram menos tónus. O panorama geral do comportamento sugeria que as aves estavam mais alertas e menos inibidas (Thompson, 1977, pp. 114). Este comentário parece estar em concordância com os achados eletrográficos da VR após tratamento com ESC, que indicam diminuição no número de ondas, na amplitude e na potência total, aproximando-a da VA. É possível que esse “aumento” no alerta observado por Thompson esteja associado com o aumento do FZ.

O FZ, como descrito no presente trabalho, parece não estar correlacionado a estados de alerta ou medo extremos, uma vez que surgem de forma espontânea nos animais tratados e, ainda nesses animais, o FZ não surge após estimulação sonora intensa. Assim, ambos compor-

tamentos imóveis (FZ e IT) parecem estar relacionados com circuitos colinérgicos centrais, mas possivelmente representando categorias comportamentais distintas. Portanto, os circuitos colinérgicos centrais estariam envolvidos tanto na geração da IT (imobilidade com interação com o meio ambiente) quanto na geração do FZ (imobilidade mas aparentemente sem interação com o meio), ambas possivelmente envolvendo também o hipocampo.

Uma outra situação comportamental parecida, ocorrendo em pombos destelencefalados, também já foi relatada (comportamento de fixar). Esse comportamento, provocado por estimulação sensorial intensa, é caracterizado por ausência de padrão motor observável de qualquer parte do corpo, com a cabeça e o olhar direcionados a um ponto fixo no ambiente, geralmente precedido por extensão restrita do pescoço, com ou sem inclinação da cabeça (Toledo, 1989).

É interessante notar que o tratamento combinado de ESC (5 mg/Kg, sc.) com para-clorofenilalanina (PCPA, 500 mg/Kg, i.p.) induziu o surgimento de um estado comportamental desorganizado em ratos, semelhante ao observado em estados avançados de demência. Esse estado desorganizado foi caracterizado pela expressão comportamental de VA acompanhado de um traçado eletrográfico incoerente com esse estado isto é, semelhante a estados mais relaxados. O tratamento isolado tanto de ESC quanto de PCPA também induziam tal comportamento,

mas de menor magnitude se comparado ao resultante do tratamento combinado (Vanderwolf, 1992).

Quando comparado com a VR, o FZ apresentou diminuição no número de ondas e na amplitude sem modificar consistentemente outros atributos eletrográficos hipocampais. Essas modificações, detectadas pela análise aperiódica, demonstram haver componentes dessincronizados no EOsG-hp durante o FZ, associados a componentes sincronizados (PGAs). Pela análise visual, este componente dessincronizado pôde ser visto como atividade de fundo às PGAs. Vale notar que esse tipo de traçado misto não pôde ser visto em nenhuma outra situação experimental.

Pelas comparações entre FZ e VA, observou-se aumentos no número de ondas, na amplitude, na potência total, e diminuição nas potências relativas de 2 Hz e acima de 20 Hz, apresentando aumento na faixa dos 6 Hz. Essas observações indicam que associado ao traçado de fundo, caracterizado por ondas rápidas e de pequena amplitude, ocorreu um aumento acentuado tanto na incidência quanto na amplitude das PGAs. Um outro ponto a ser destacado é a diminuição das potências relativas das freqüências de 2 Hz e acima de 20 Hz. Essas diminuições indicam uma sincronização do traçado, que é característica de estados mais relaxados. Apesar disso, as mudanças ocorridas em 2 Hz e acima de 20 Hz não conduziram o espectro de potências a níveis de VR, caracterizando, novamente, um estado eletrográfico particular.

Assim, o EOsG-hp deste estado apresenta características mistas, tanto de VR quanto de VA. Tais achados apontam para a ocorrência de uma dissociação entre o estado comportamental e o EOsG-hp subjacente. Essa dissociação poderia refletir uma desorganização comportamental gerada pela ESC, sendo essa desorganização o resultado da interferência da ESC na interação do animal com o meio ambiente.

Um considerável número de evidências, sugerem que os sistemas colinérgicos centrais apresentam papel importante no aprendizado, na memória e na cognição (*e.g.* Molchan *et al.*, 1992; Neufeld *et al.*, 1994). Drogas que bloqueiam receptores muscarínicos, como a atropina ou a ESC, podem prejudicar tanto a aquisição quanto a performance de comportamentos aprendidos, prejuízos esses, similares a aqueles produzidos por lesão estereotáxica de núcleos colinérgicos centrais ou do hipocampo.

Doses intramusculares de ESC em torno de 0,02 mg/Kg, são suficientes para provocar déficits cognitivos em ratos e em pombos (Santi e Weise, 1995). Em pombos (Kohler *et al.*, 1996) e em pardais (Mineau, Boag e Beninger, 1994), 1,0 mg/Kg de ESC provoca perturbações na orientação espacial, nas estratégias de navegação e na habilidade de reconhecer locais familiares, como por exemplo retornar a locais de estocagem de alimento. Em pombos, injeções i.p. de ESC (0,03, 0,015 e 0,007 mg/Kg) são incapazes de interferir nos processos de memória, sem apresentar qualquer relação com a dose aplicada (Savage, Stan-

chfield e Overmier, 1994). Doses de ESC variando entre 0,03 e 0,1 mg/Kg produziam perturbações na realização de tarefas que requeriam atenção seletiva de ratos (Jones e Higgins, 1995).

Uma conseqüência notável de uma dose alta de ESC é o FZ. A ESC em doses baixas provoca disfunções cognitivas, mas não provoca alterações perceptíveis no comportamento espontâneo do pombo. As disfunções centrais associadas às doses de ESC, poderiam ser expressas no comportamento espontâneo apenas em doses mais elevadas. Além disso, o EOsG-hp, que espelharia este contínuo, não seria sensível (como o comportamento espontâneo não o é) ou não seria afetado de modo observável pela presente técnica, mesmo durante alterações funcionais do hipocampo. Isso pode ocorrer também em mamíferos, a julgar pelas altas doses de ESC empregadas para provocar efeitos notáveis na atividade eletrográfica cerebral (*e.g.*, Stewart, McFabe e Vanderwolf, 1984; Vanderwolf, 1992).

Em mamíferos, a atividade eletroscilográfica hipocampal espontânea é caracterizada por uma variedade de ondas sincronizadas (Harper, 1971; Monmaur, Ayadi e Breton, 1993). Dentre essas, destacam-se a atividade lenta e irregular (LIA) e a atividade rítmica lenta (RSA) ou atividade teta. A LIA apresenta grande amplitude e pico espectral entre 2 e 4 Hz, associada com ondas em ponta que surgem isoladas ou em grupos, ocorrendo em intervalos regulares. A LIA ocorre durante vigília imóvel e durante a realização de movimentos estereotipados e automáti-

cos (Vanderwolf, 1992). Por sua vez, o ritmo teta está seletivamente presente durante atividade motora voluntária e durante o sono paradoxal, apresentado frequências entre 3 e 9 Hz e denominado de teta tipo II (Simões, Valle e Timo-Iaria, 1996; Vertes *et al.*, 1993) e parece estar associado a processos de aprendizado e memória (Harper, 1971). O ritmo teta tipo II é sensível a agentes colinérgicos, podendo surgir após tratamento com compostos colinomiméticos (arecolina, carbacol ou ESE) e pode ser abolido após administração periférica de atropina ou ESC (Monmaur, Ayadi e Breton, 1993). O ritmo teta tipo I está sempre presente durante atividade motora voluntária, apresenta frequência em torno de 6 a 12 Hz, é sensível a agentes anestésicos (*e.g.* uretano) e é resistente a compostos antagonistas muscarínicos (*e.g.*, atropina).

É interessante notar que o EOsG-hp de pombos também apresenta características distintas dependendo do estado comportamental que o animal se encontra (Bruno-Neto, 1996), mas responde à essas mudanças de forma diferente do hipocampo de mamíferos. O EOsG-hp de pombos que acompanha a vigília relaxada apresenta atividade irregular de grande amplitude e baixa frequência, entremeada por ondas PGA. Durante a vigília alerta e após SOM o EOsG-hp é caracterizado por ondas de baixa amplitude e alta frequência, podendo estar completamente desprovido de ondas PGA. Essas ondas PGA, que poderiam sugerir a existência de uma atividade rítmica semelhante ao teta hipocampal de mamíferos, ocorrem durante situações comportamentais diferentes

àquelas onde são encontradas o ritmo teta. As PGAs são resistentes à agentes anestésicos (*e.g.*, ketalar ou equitesin) (Bruno-Neto, André e Marino-Neto, dados não publicados) e são resistentes também ao bloqueio muscarínico (*e.g.*, ESC). Dessa forma, não temos evidências que denotem a existência de uma atividade no hipocampo de aves que seja comparável à atividade teta hipocampal encontrada nos mamíferos. Adicionalmente, pelas análises qualitativa e quantitativa do EOsG-hp, o comportamento elétrico hipocampal do pombo parece assemelhar-se mais à LIA do que à RSA ou teta do hipocampo de mamíferos.

Paralelamente ao encontrado com a aplicação de ESC, déficits cognitivos semelhantes também podem ser produzidos ou por lesão de núcleos colinérgicos centrais ou por lesões do hipocampo de mamíferos (Nicholls, Martin e Wallace, 1992). Lesões hipocampais de pombos domésticos prejudicam a performance de navegação, retorno a ambientes familiares e orientação espacial, além de prejudicar tarefas que requerem aquisição de memória (Bingman *et al.*, 1988a e 1988b; Bingman e Mench, 1990; Gagliardo, Mazzotto e Bingman, 1996). Esses efeitos, provocados por lesão hipocampal de pombos, são muito semelhantes aqueles encontrados em lesões hipocampais de roedores (Gagliardo, Mazzotto e Bingman, 1996).

Portanto, a atividade elétrica hipocampal de pombos, possivelmente associadas a processos cognitivos aos quais o hipocampo está

vinculado, não se assemelham à dos mamíferos e parecem não ser crucialmente dependentes da atividade de sistemas colinérgicos.

Por outro lado, efeitos comportamentais e eletrográficos, associados ao tratamento com a ESC, talvez pudessem ser observados durante contextos ou tarefas que requeiram atividade conspícua ou especialmente relevante do hipocampo, como paradigmas de aprendizado que demandem tarefas orientadas a referências ao espaço extra corpóreo do animal.

Em resumo, a injeção periférica de ESC foi incapaz de promover modificações significativas no EOsG-hp de pombos nos diferentes estados de vigília estudados, mas foi capaz de provocar um estado comportamental diferenciado, desconexo do EOsG-hp concorrente, semelhante ao encontrado em mamíferos. Esses últimos efeitos parecem ser provocados pelo bloqueio central, já que a M-ESC em dose equimolar não modificou o EOsG-hp nem provocou o aparecimento do FZ.

Apesar da existência de evidências conflitantes, parece que os receptores nicotínicos podem participar na mediação de processos de memória e atenção em mamíferos (*e.g.* Decker e Majchrzak, 1993; Levin, 1992; Moran, 1993; O'Neill *et al.*, 1994; Turchi, Holley e Sarter, 1995). O tratamento com nicotina melhora o rendimento de uma variedade de tarefas que requerem memória e aprendizado e, parece melhorar alguns dos prejuízos de memória provocados por lesões do prosencéfalo basal

(Decker e Majchrzak, 1993). Adicionalmente, muitas dessas facilitações provocadas pela nicotina são antagonizadas pelo tratamento com MEC ou com clorisondamina (outro bloqueador nicotínico). A MEC produz, em ratos, prejuízos na performance de tarefas de pressionamento de barras, esQUIVA passiva e navegação no labirinto aquático (water maze, Turchi, Holley e Sarter, 1995).

Nossos dados revelam que a MEC foi incapaz de produzir alterações comportamentais observáveis pelo método utilizado no presente trabalho. A exemplo do ocorrido com a ESC, os possíveis efeitos comportamentais da MEC talvez pudessem ser observados em condições experimentais favoráveis à tarefas cognitivas mais exigentes.

Durante a VR, a injeção periférica de MEC produziu uma diminuição no número de ondas e na amplitude total e um aumento nas potências das frequências relativas acima de 15 Hz. Durante a VA espontânea observou-se também uma diminuição na amplitude e na potência total, acompanhadas de aumentos na borda espectral de 50% e nas potências relativas de 9, 13, 17, 19, 24 e 27 Hz. No mesmo sentido, após a estimulação sonora, foi possível observar diminuição na amplitude e na potência total, acompanhadas de aumento na borda espectral de 50% bem como aumentos nas potências relativas de 12, 13 e 18 Hz, estando os demais índices eletrográficos inalterados.

Assim, a MEC provocou um aumento na contribuição de componentes de alta frequência do EOsG-hp, sem modificar as PGAs, que são atributos sincronizados conspícuos da VR. Essa atenuação provocada pela injeção de MEC é algo diferente daquela encontrada após a injeção de ESC. Uma vez que desconfortos viscerais não puderam ser observados, que os animais permaneciam a maior parte do tempo de registro aparentemente confortáveis (em VR), e que o vômito apresentado não era tão intenso e duradouro quanto aquele provocado pela ESC, descartou-se a hipótese da relação entre desconforto visceral e as ocorrências eletrográficas da VR. Dessa forma, parece que a MEC apresenta um efeito dessincronizador sobre o EOsG-hp, independente do estado comportamental subjacente. Esse efeito, demonstrado pela tendência de aumento da frequência do traçado e independente do estado comportamental, pôde ser observado intensamente durante estados comportamentais de VA e após SOM.

Durante os estados mais ativados, a MEC produziu modificações mais expressivas e significativas, atingindo principalmente as frequências entre 10 e 20 Hz, aumentando a participação dessa faixa no espectro de frequências. De acordo com dados obtidos anteriormente no nosso laboratório (Bruno-Neto, 1996), essa faixa de frequência (10 a 20 Hz), não modifica suas características, independente do estado comportamental ser de VR, de VA, de vigília após estimulação sonora ou luminosa, de sono de ondas lentas ou de sono paradoxal. Uma vez que não foi

possível observar qualquer modificação comportamental que acompanhasse esse aumento na banda de 10 a 20 Hz, explorações mais aprofundadas sobre o significado fisiológico desse aumento são desejáveis.

A injeção i.c.v. de nicotina (25 μ g) em pintos despertos, provoca um padrão eletrográfico semelhante ao encontrado durante períodos de sono (Key e Marley, 1962). A nicotina aplicada durante o sono comportamental de animais adultos, por outro lado, provoca um aumento marcante da frequência da atividade elétrica registrada. Em animais adultos despertos, a nicotina produzia os mesmos efeitos. Até o presente, não existem estudos acerca dos possíveis efeitos da MEC sobre o EOsG telencefálico de aves.

Em ratos, a MEC administrada perifericamente em doses variando entre 10 e 20 mg/kg de peso (i.p.), não produziu nenhum efeito significativo sobre os componentes espectrais de derivações frontais ou occipitais (Riekkinen-Jr *et al.*, 1991). Por outro lado, quando administrada em combinação com a ESC, produziu aumento na amplitude do traçado de tais derivações, demonstrando que a MEC foi capaz de potencializar os efeitos de doses sublimiáres de ESC (Riekkinen-Jr *et al.*, 1991). Radek (1993) ao estudar os efeitos da manipulação nicotínica sobre a atividade neocortical de ratos em vigília relaxada, observou que a MEC (3 e 5 mg/kg i.p.) produzia acentuação na atividade em fuso de alta voltagem quando aplicada isoladamente ou após injeção de nicotina, enquanto que na dose de 1mg/kg (i.p.) nenhum efeito pôde ser observado. Inje-

ções de MEC ou de hexametônio, aplicadas localmente no hipocampo, foram incapazes de antagonizar a atividade teta hipocampal espontânea observada durante estados comportamentais de vigília imóvel (Golebiewski, Eckersdorf e Konopacki, 1993).

No neocórtex de mamíferos a MEC produz um aumento de atividade em fusos de alta voltagem e no hipocampo ela é incapaz de interferir na atividade teta espontânea. No presente trabalho, a MEC produziu um deslocamento do espectro médio de frequências para frequências mais altas durante a VR e acentuou esse aumento de atividade de alta frequência durante a VA e após SOM. Assim, parece que o bloqueio nicotínico provoca modificações eletrográficas hipocampais diferentes daquelas encontradas em mamíferos.

Em vertebrados, a neurotransmissão colinérgica se processa através de receptores muscarínicos e nicotínicos, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (Janowsky e Overstreet, 1995; Maelicke, Schrattenholz e Schröder, 1995). Nos últimos 30 anos, os esforços na exploração da atividade colinérgica tem sido concentrados principalmente na manipulação de receptores muscarínicos. Todavia, com as recentes descobertas do envolvimento dos receptores nicotínicos na modulação do comportamento afetivo, na modulação da liberação de neurotransmissores envolvidos com processos cognitivos e na habilidade de produzir dessincronização eletrográfica, essa tendência tem diminuído progressivamente (Arneric, Sullivan e Williams, 1995).

Estudos relacionando a transmissão colinérgica nicotínica e tarefas cognitivas são abundantes na literatura. No entanto, poucos são os estudos que avaliaram os efeitos da manipulação de receptores nicotínicos sobre a atividade eletrográfica coletiva hipocampal. A concentração de receptores nicotínicos no telencéfalo de aves pode ser tão ampla quanto no telencéfalo de roedores (McMahon, Yoon e Chiappinelli, 1994) mas a distribuição detalhada dessa concentração ainda necessita ser determinada.

Em resumo, a MEC administrada em dose equimolar à ESC, não foi capaz de provocar modificações comportamentais observáveis e, contrariamente ao observado em mamíferos, provocou uma diminuição na amplitude, na potência total e aumento na potência das frequências mais altas do EOsG-hp de pombos durante a VR, a VA e após SOM.

A ESE foi incapaz de modificar consistentemente tanto o comportamento quanto o traçado eletrográfico hipocampal durante estados de VR. Esses dados tomados em conjunto com os dados de VR coletados após injeção de ESC ou de MEC, sugerem que a atividade colinérgica sobre o EOsG-hp se processa de forma tônica e discreta. Essa suspeita reside no fato de não ter sido possível observar modificações significativas no EOsG-hp da VR após os tratamentos com ESC e MEC ou ESE.

Durante os estados ativados (VA e SOM) a ESE foi capaz de produzir exclusivamente aumentos na borda espectral de 50%. Outros

efeitos puderam ser observados (aumentos nas frequências acima de 20 Hz), mas se apresentaram de forma inconsistente, não oferecendo segurança na assunção desses dados como significativos. Apesar disso, parece haver uma tendência de a ESE provocar um aumento na atividade de frequências acima de 20 Hz durante os estados ativados. O efeito sobre a borda espectral e a tendência de aumentar a atividade de frequências acima de 20 Hz durante a VA e após o SOM, pode ter surgido como resultado de uma acentuação da atividade colinérgica durante esses estados.

Em pintos de 3 semanas, a injeção de ESE (dose não informada) provoca o surgimento de uma atividade elétrica de baixa voltagem e alta frequência nos registros eletrocorticais (Key e Marley, 1962). Até onde pudemos avançar, esse é o único trabalho que trata da ESE e seus efeitos sobre o EOsG em aves.

Injeções periféricas de ESE (0,5 a 1,5 mg/kg) produzem progressivamente o desaparecimento de ondas lentas bem como aumentos tanto na amplitude quanto na frequência do EOsG do córtex medial de répteis (Gaztelu, Garcia-Austt e Bullock, 1991). Injeções de 1 a 3 mg/kg de ESE no saco linfático dorsal, causaram somente aumentos discretos de amplitude e frequência da atividade telencefálica de sapos (Kostowski e Mészáros, 1967). O registro da atividade elétrica coletiva hipocampal e neocortical de ratos não restritos, após a injeção de ESE (1 mg/kg, i.p.) mostra dessincronização neocortical e hipocampal, acompanhada de

movimentos de vibrissas e respiratórios compatíveis com comportamento exploratório (Bringmann, 1995). Doses de ESE (0,01, 0,05 e 0,1 mg/Kg) aplicadas perifericamente melhoram o rendimento em tarefas de aprendizagem em ratos (Loizzo *et al.*, 1996). Essas mesmas doses provocam, paralelamente, aumento consistente na potência da banda espectral (4-7 Hz) do ritmo teta hipocampal. Em humanos, a tacridina (outro anticolinesterásico) produz redução na atividade delta e no ritmo mu, que acompanham déficits cognitivos, sugerindo uma melhora do quadro eletrográfico da doença de Alzheimer (Riekkinen *et.al.*, 1991).

Assim, parece que os efeitos da ESE sobre o EOsG-hp de pombos não se processam da mesma forma quem em outras espécies, denotando uma ação colinérgica tônica, mas por outro lado modesta, a ponto de não poder ter sido notada pelo método aqui empregado.

Diversas evidências demonstram que, para a ESE atingir seu ponto máximo de efeito, é necessário mantê-la em níveis altos de concentração no sangue. Essa concentração ótima de ESE é conseguida mediante tratamento continuado (Marin e Davis, 1995). No presente trabalho, os registros com ESE foram realizados imediatamente após uma única injeção e não após tratamento crônico. Dessa forma, é possível que os potenciais efeitos que o tratamento continuado com a ESE viesse a provocar, não puderam ser observados.

É interessante notar também, que a meia-vida da ESE é muito curta. Em pardais, observou-se que os níveis de depressão de acetilcolinesterase cerebral resultante da injeção intramuscular de ESE, retornavam a patamares da normalidade por volta de 5 min após a injeção (Mineau, Boag e Beninger, 1994). No presente trabalho, os registros foram iniciados imediatamente após a injeção da ESE e no entanto, nenhuma modificação eletrográfica pôde ser observada nesse intervalo.

Um crescente corpo de evidências tem demonstrado que a ESE pode, além inibir a acetilcolinesterase, ativar receptores nicotínicos de forma não competitiva (Maelicke, Schrattenholz e Schröder, 1995; O'Neill *et al.*, 1994). Assim sendo, seria de se esperar, uma acentuação da atividade colinérgica local, resultante tanto da inibição da acetilcolinesterase quanto da ativação de receptores nicotínicos. Entretanto, nenhum efeito que lembrasse aumento de atividade colinérgica pôde ser observado após a aplicação de ESE. Novamente, esses resultados ajudam a confirmar a suspeita de uma influência colinérgica apenas discreta sobre o EOsG-hp de pombos.

Apesar de a acetilcolina estar, de certa forma envolvida na atividade elétrica hipocampal de pombos, essa pequena atuação pode ter sido reforçada pelo tratamento com ESE. A ESE tem sido utilizada como instrumento terapêutico há muitos anos, mas recebeu maior atenção depois da assunção da “hipótese colinérgica” para os distúrbios cognitivos que acompanham a doença de Alzheimer. Partindo desse princípio,

o tratamento com a ESE facilitaria a atividade de neurônios colinérgicos remanescentes do processo degenerativo colinérgico dessa doença (Karczmar, 1993). Muitos estudos tem demonstrado que, pelo menos em alguns casos, a ESE é capaz de atenuar os déficits cognitivos que acompanham processos demenciais (Marin e Davis, 1995; Muir *et al.*, 1992).

Baseado em dados obtidos através de estudos sobre o EOsG e sobre potenciais provocados, Karczmar (1994) afirma que a ação colinérgica sobre a atividade elétrica cerebral está associada muito mais com a relação entre o indivíduo e o meio ambiente do que com o próprio comportamento de despertar. Essa influência sobre os processos de interação com o meio ambiente parece se dar durante a atenção seletiva. Novamente, uma vez que o método empregado não utilizou nenhum paradigma cognitivo, eventuais efeitos da ESE sobre o EOsG-hp que pudessem ter ocorrido, não permitiram ser observados. Por outro lado, os resultados obtidos durante a VA e principalmente após o SOM, se coadunam com essa afirmação, sugerindo uma influência positiva da acetilcolina durante os processos de atenção seletiva.

Em resumo, a ESE foi incapaz de provocar modificações tanto comportamentais quanto eletrográficas hipocampais. Esses últimos dados sugerem uma participação discreta e tônica da acetilcolina na geração do EOsG-hp de pombos, uma vez que o aumento da disponibilidade

da acetilcolina na fenda sináptica não produziu nenhum efeito consistente.

O papel dos circuitos colinérgicos centrais na modulação do EOsG-hp de pombos parece ser menos intenso que em répteis e mamíferos. Nossos dados sugerem ainda que essa discreta influência colinérgica sobre o EOsG-hp de pombos se dá de forma tônica e modesta durante os estados de vigília estudados. O bloqueio de receptores muscarínicos pela ESC, foi incapaz de provocar modificações observáveis no EOsG-hp. A ausência de quaisquer efeitos eletrográficos importantes após a injeção de ESC sugere que a acetilcolina, nas situações experimentais do presente trabalho, desempenha uma ação muito discreta. A MEC, por sua vez, produziu efeitos eletrográficos hipocampais diferentes daqueles encontrados em mamíferos. No entanto, não temos informações suficientes para discutir mais aprofundadamente esse achado envolvendo a MEC. Adicionalmente, os efeitos, mesmo que discretos da ESE, indicam que a acetilcolina participa em certo grau da atividade elétrica hipocampal, principalmente durante estados mais alertas. É importante lembrar que apesar dos dados apontarem para uma influência discreta da ESC sobre o EOsG-hp, após o tratamento com essa droga ocorreu um comportamento diferenciado, acompanhado de atividade eletrográfica igualmente diferenciada que surgia espontaneamente. Esse comportamento diferenciado apresenta características eletrográficas hipocampais intermediárias entre a VR e a VA, eletromiograma com-

patível com VR, acompanhando um estado comportamental que lembra vigília fortemente alerta. Esse comportamento diferenciado produzido pela injeção periférica de ESC, lembra aqueles estados desconexos encontrados em mamíferos após o mesmo tratamento.

Algumas evidências sugerem que circuitos colinérgicos estejam envolvidos mais intensamente com processamento cognitivo e atenção seletiva do que com o despertar (Karczmar, 1991). A influência colinérgica sobre a atividade elétrica cerebral parece estar vinculada principalmente com as interações entre o indivíduo e o meio ambiente. Investigações acerca das conseqüências eletroscilográficas e de manipulações farmacológicas dos sistemas colinérgicos centrais de pombos durante tarefas cognitivas, poderiam ser úteis para determinar mais precisamente essa relação. É possível que a acetilcolina afete a atividade elétrica hipocampal somente em circunstâncias comportamentais específicas e não exploradas no presente trabalho.

Evidências neuroanatômicas sugerem similaridades entre os sistemas colinérgicos centrais em vertebrados superiores (Medina e Reiner, 1994; Veenman et al., 1994; Wächtler, 1980). Outras evidências sugerem que a distribuição de receptores muscarínicos no hipocampo de pombos parece semelhante àquela encontrada em mamíferos (Kohler, Messer e Bingman, 1995). Adicionalmente, parecem existir conexões recíprocas entre o hipocampo e estruturas colinérgicas centrais (área septal e núcleo da banda diagonal de Broca) em aves (Casini, Bingman e

Bagnoli, 1986; Krebs, Erichsen e Bingman, 1991; Rehkämper, Frahm e Zilles, 1991), similares às dos mamíferos (Rehkämper, Frahm e Zilles, 1991).

Apesar das similaridades apontadas pelas evidências acima descritas, os dados do presente trabalho sugerem que a acetilcolina parece participar apenas discretamente da regulação do EOsG-hp de pombos. Adicionalmente, possíveis alterações funcionais no hp do pombo, induzidas pelas manipulações colinérgicas aqui estudadas, não foram acompanhadas por mudanças evidentes no EOsG-hp durante estados comportamentais semelhantes aos da vigília desse animal. Por outro lado, o desencadeamento de um comportamento aparentemente alerta associado a um EOsG-hp com características sincronizadas após bloqueio muscarínico, reforça a noção, colocada na literatura acima revisada, de uma evolução conservativa de atributos funcionais do hipocampo de amniotas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, D.G. e WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, 31 : 571-591, 1989.
- AMLANER, Jr.C.J. e BALL, N. Avian sleep In: KRYGER, M.H.; ROTH, T. e DEMENT, W.C. (EDS.) **Principles and Practice of Sleep Medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 69-94.
- ARNERIC, S.P., SULLIVAN, J.P. e WILLIAMS, M. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: novel targets for central nervous system therapeutics In: BLOOM, F.E. e KUPFER, D.J. (EDS.) **Psychopharmacology: a fourth generation of progress**. New York : Raven, 1995. p. 95-153.
- BASSANT, M.H.; APARTIS, E.; JAZAT-POINDESSOUS, F.R.; WILEY, R.G. e LAMOUR, Y.A. Selective immunolesion of the basal forebrain cholinergic neurons: effects on hippocampal activity during sleep and wakefulness in the rat. **Neurodegeneration**, 4: 61 - 70, 1995.
- BENOWITZ, L. Functional organization of the avian telencephalon In: EBESSON, S.O.E. (ED.) **Comparative Neurology of the Telencephalon**. New York: Plenum, 1980. p. 389-421.
- BENOWITZ, L. e KARTEN, H.J. The tractus infundibuli and other afferents to the parahippocampal region of the pigeon. **Brain Research**, 102 : 174-180, 1976.
- 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. **Journal of Comparative Physiology**, 163 : 559-563, 1988a.
- BINGMAN, V.P.; IOALÉ, P.; CASINI, G. e BAGNOLI, P. Unimpaired acquisition of spatial reference memory, but impaired homing performance in hippocampal-ablated pigeons. **Behavioral Brain Research**, 27 : 179-187, 1988b.

- BINGMAN, V.P. e MENCH, J.A. Homing behavior of hippocampus and parahippocampus lesioned pigeons following short-distance releases. **Behavioral Brain Research**, 40 : 227-238, 1990.
- BINGMAN, V.P.; CASINI, G.; NOCJAR, C. e JONES, T.J. Connections of the piriform cortex in homing pigeons (*Columba livia*) studied with fast-blue and WGA-HRP. **Brain, Behavior and Evolution**, 43 : 206-218, 1994.
- BRINGMANN, A. Topographic mapping of the cortical EEG power in the unrestrained rat: peripheral effects of neuroactive drugs. **Archives Italiennes de Biologie**, 133 : 1-16, 1995.
- BRUNO-NETO, R.; ANDRÉ, E.S.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A. e MARINO-NETO, J. Análise qualitativa e quantitativa do eletroscilograma hipocampal em diferentes estados comportamentais em pombos. FESBE, **Anais**. Caxambu, 1996.
- BRUNO-NETO, R. **Análise eletroscilográfica de distritos telencefálicos em pombos (*Columba livia*), em diferentes estados comportamentais**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Comportamento, 1996.
- 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. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 48 : 544-554, 1990.
- CASINI, G.; BINGMAN, V.P. e BAGNOLI, P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and ³H-Proline. **Journal of Comparative Neurology**, 245 : 454-470, 1986.
- CAMPBELL, S.S. e TOBLER, I. Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 8 : 269-300, 1984.
- CHASE, M.H. e MORALES, F.R. The control of motoneurons during sleep In: KRYGER, M.H.; ROTH, T. e DEMENT, W.C. (EDS.) **Principles and Practice of Sleep Medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 163-175.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - COBEA. **Os Princípios Éticos da Experimentação Animal**. São Paulo, 1991.

COIMBRA, A.J.F. **Análise computadorizada de sinais bioelétricos**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica, 1994.

COOPER, R.; OSSELTON, J.W. e SHAW, J.C. **EEG Technology**. London : Butterworths, 1974.

DECKER, M.W. e MAJCHRZAK, M.J. Effects of central nicotinic cholinergic receptor blockade produced by chlorisondamine on learning and memory performance in rats. **Behavioral and Neural Biology**, 60 : 163-171, 1993.

DEMENT, W.C. History of sleep physiology and medicine In: KRYGER, M.H.; ROTH, T. e DEMENT, W.C. (EDS.) **Principles and Practice of Sleep Medicine**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. p. 3-15.

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. **Physiology and Behavior**, 35 : 67-73, 1985.

DIETL, M.M.; CORTÉS, R. e PALACIOS, J.M. Neurotransmitter receptors in the avian brain. II. Muscarinic cholinergic receptors. **Brain Research**, 439: 360-365, 1988.

DRINGENBERG, H.C. e VANDERWOLF, C.H. Cholinergic activation of the electrocorticogram: an amygdaloid activating system. **Experimental Brain Research**, 108: 285-296, 1996.

EGLIN, R.M.; REDDY, H. e WATSON, N. Selective inactivation of muscarinic receptor subtypes. **International Journal of Biochemistry**, 26, 12 : 1357-1368, 1994.

EHLERT, F.J.; ROESKE, W.R. e YAMAMURA, H.I. Molecular, biology, pharmacology, and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor In: BLOOM, F.E. e KUPFER, D.J. (EDS.) **Psychopharmacology: a fourth generation of progress**. New York : Raven, 1995. p. 111-124.

- 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. **Journal of Comparative Neurology**, 345 : 537-561, 1994.
- FRANCHI, C.R., HOFFMANN, V. e HOFFMANN, A. Involvement of the cholinergic system and the basal midbrain in the organization of tonic immobility in the toad *Bufo paracnemis*. **Physiology Behavior**, 55, 5 : 831-837, 1994.
- FRANCK, J.O.; SCHWARTZKROIN, P.A.; PHILLIPS, J.O e FUCHS, A.F. The limbic system In: PATTON, H.D. *et al.* (EDS.) **Textbook of Physiology** : excitable cells and neurophysiology. 21.ed. Philadelphia: Saunders, 1989. v.1. p. 693-717.
- FUGISHITA, M.; HISAMITSU, T. e TAKESHIGE, C. Role of cholinergic fibers in a center essential to animal hypnosis. **Brain Research Bulletin**, 27 : 59-62, 1991.
- GAGLIARDO, A.; MAZZOTTO, M. e BINGMAN, V.P. Hippocampal lesion effects on learning strategies in homing pigeons. **Proceeds of Royal Society**, 263 : 529-534, 1996.
- GASSER, T.; BÄCHER, P e MÖCKS, J. Transformations towards the normal distribution of broad band spectral parameters of the EEG. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 53 : 119-124, 1982.
- GAZTELU, J.M.; GARCIA-AUSTT, E. e BULLOCK, T.H. Electroencephalograms of hippocampal and dorsal cortex of two reptiles: comparison with possible mammalian homologues. **Brain, Behavior and Evolution**, 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. **Neuroscience 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. **Journal of Sleep Research**, 2 : 121-129, 1993.
- GOLEBIEWSKI, H.; ECKERSDORF, B e KONOPACKI, J. Muscarinic (M1) mediation of hippocampal spontaneous theta rhythm in freely moving cats. **Neuropharmacology and Neurotoxicology**, 4 : 1323-1326, 1993.
- GOTTESMANN, C. Theta rhythm: the brain stem involvement. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 16 : 25-30, 1992.
- HARPER, R.M. Frequency changes in hippocampal electrical activity during movement and tonic immobility. **Physiology and Behavior**, 7 : 55-58, 1971.
- HOFFMANN, A. e MENESCAL, L.O. Electrical activity of the toad telencephalon during tonic immobility (animal hypnosis). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 21,1 : 141 - 145, 1988.
- HOLMES, C.J. e JONES, B. Importance of cholinergic, gabaergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. **Neuroscience**, 62, 4 : 1179-1200, 1994.
- IMERI, L.; BIANCHI, S.; ANGELI, P. e MANCIA, M. M₁ and M₃ muscarinic receptors: specific roles in sleep regulation. **Developmental Neuroscience**, 3 : 276-378, 1992.
- INGLIS, F.M. e FIBIGER, H.C. Increases in hippocampal and frontal cortical acetylcholine release associated with presentation of sensory stimuli. **Neuroscience**, 66, 1 : 81-86, 1995.
- JACOBS, L.F. The economy of winter: phenotypic plasticity in behavior and brain structure. **Biological Bulletin**, 191 : 92-100, 1996.
- JANOWSKY, D.S. e OVERSTREET, D.H. The role of acetylcholine mechanisms in mood disorders In: BLOOM, F.E. e KUPFER, D.J. (EDS.) **Psychopharmacology: a fourth generation of progress**. New York : Raven, 1995. p. 945-956.

- JONES, B.E. Basic mechanisms of sleep-wake states In: KRYGER, M.H.; ROTH, T. e DEMENT, W.C.(EDS.) **Principles and Practice of Sleep Medicine**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1994. p.145-162.
- JONES, B.E. e CUELLO, A.C. Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic-catecholamine, serotonin, and acetylcholine-neurons. **Neuroscience**, 31, 1 : 37-61, 1989.
- JONES, D.N.C. e HIGGINS, G.A. Effect of scopolamine on visual attention in rats. **Psychopharmacology**, 10 : 142-149, 1995.
- KARMANOVA, I.G. **Evolution of Sleep**: stages of the formation of the "wakefulness-sleep" cycle in vertebrates. Basel: Karger, 1982. p. 63-127.
- KARCZMAR, A.G. Physiological cholinergic functions in the CNS In: AQUILONIUS, S.M. e GILLBERG, P.G. (EDS.) **Progress in Brain Research**. [s.d.] Elsevier, 1990. p. 437-466.
- KARCZMAR, A.G. Brief presentation of the story and present status of studies of the vertebrate cholinergic system. **Neuropsychopharmacology**, 3, 9 : 181-199, 1993.
- KARCZMAR, A.G. Cholinergic substrates of cognition and organism-environment interaction. **Program of Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 19 : 187-211, 1995.
- KARTEN, H. J. e HODOS, W. **A Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon** (*Columba livia*). Baltimore : Johns Hopkins, 1967.
- KEY, B.J. e MARLEY, E. The effect of the sympathomimetic amines on behavior and electrocortical activity of chicken. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 14 : 90-105, 1962.
- KOHLER, E.C.; MESSER, W.S. e BINGMAN, V.P. Evidence for muscarinic acetylcholine receptor subtypes in the pigeon telencephalon. **Journal of Comparative Neurology**, 362, 2 : 271-282, 1995.
- KOHLER, E.C.; RITERS, L.V.; CHAVES, L. e BINGMAN, V.P. The muscarinic acetylcholine antagonist scopolamine impairs short-distance

- homing pigeon navigation. **Physiology & Behavior**, 60, 4 : 1057-1061, 1996.
- KOSTOWSKI, W. e MÉSZÁROS, J. Pharmacological analysis of bioelectrical activity of the central nervous system of anphibia. I. The effect of some cholinergic and anticholinergic drugs on the frog's EEG. **Journal of Brain Research**, 6 : 783-785, 1967.
- KREBS, J.R.; ERICHSEN, J.T. e BINGMAN, V.P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of pigeon (*Columba livia*). **Journal of Comparative Neurology**, 314 : 467-477, 1991.
- LEANZA, G.; NILSSON, O.G.; WILEY, R.G. e BJÖRKLUND, A. Selective lesioning of the basal forebrain cholinergic system by intraventricular 192 IgG-saporin: behavioral, biochemical and stereological studies in the rat. **European Journal of Neuroscience**, 7 : 329-343, 1995.
- LENOVÈRE, N. e CHAGEUX, J.P. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. **Journal of Molecular Evolution**, 40 : 155 - 172, 1995.
- LEVIN, E.D. Nicotinic systems and cognitive functions. **Psychopharmacology**, 108 : 417-431, 1992.
- LOIZZO, A.; PALAZZESI, S.; LOIZZO, S.; BATTAGLIA, M. e SANSONE, M. Effects of low doses of physostigmine on avoidance learning and EEG in two strains of mice. **Behavioural Brain Research**, 81 : 155 - 161, 1996.
- LYDIC, R. e BAGHDOYAN, H.A. Cholinergic pontine mechanisms causing state-dependent respiratory depression. **NIPS**, 7 : 220-224, 1992.
- MAELICKE, A.; SCHRATTENHOLZ, A. e SCHRÖDER, H. Modulatory control by non-competitive agonists of nicotinic cholinergic neurotransmission in the central nervous system. **The Neurosciences**, 7 : 103-114, 1995.
- MARIN, D.B. e DAVIS, K.L. Experimental Therapeutics In: BLOOM, F.E. e KUPFER, D.J.(EDS.) **Psychopharmacology**: the fourth generation of progress. New York : Raven, 1995. p. 1417-1426.

- 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.
- McCARLEY, R.W. Sleep, Dreams and States of Consciousness In: CONN, P.M. (ED.) **Neuroscience in Medicine**. Philadelphia : Lippincott, 1995. p. 537-553.
- McCARLEY, R.W.; GREENE, R.W.; RAINNIE, D. e CHIARA, M.P. Brainstem neuromodulation and REM sleep. **The Neurosciences**, 7 : 341-354, 1995.
- McCORMICK, D.A. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. **Progress in Neurobiology**, 39 : 337-388, 1992.
- McGEER, P.L.; ECCLES, J.C. e McGEER, E.G. **Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain**. New York : Plenum, 1987. pp.235-263.
- McGINTY, D. e SZYMUSIAK, R. Neuronal unit activity patterns in behaving animals: brainstem and limbic system. **Annual Review of Psychology**, 39 : 135-168, 1988.
- MCMAHON, L.L.; YOON, K.W. e CHIAPPINELLI, V.A. Nicotinic receptor activation facilitates gabaergic neurotransmission in the avian lateral spiriform nucleus. **Neuroscience**, 59, 3 : 689-698, 1994.
- MEDINA, L. e REINER, A. Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the pigeon brain. **Journal of Comparative Neurology**, 342 : 497-537, 1994.
- MESULAM, M.M. The cholinergic contribution to neuromodulation in the cerebral cortex. **The Neurosciences**, 7 : 298-307, 1995a.
- MESULAM, M.M. Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and the thalamus of the human brain In: BLOOM, F.E. e KUPFER, D.J. (EDS.) **Psychopharmacology: a fourth generation of progress**. New York : Raven, 1995b. p. 135-153.

- MICELI, D e REPÉRANT, J. Telencephalic afferent projections from the diencephalon and brainstem in the pigeon. A retrograde multiple-label fluorescent study. **Experimental Biology**, 44 : 71-99, 1985.
- MINEAU, P.; BOAG, P.T. e BENINGER, R.J. The effects of physostigmine and scopolamine on memory for food caches in the black-capped chickadee. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 49, 2 : 363-370, 1994.
- MOLCHAN, S.E., MARTINEZ, R.A.; HILL, J.L.; WEINGARTEN, H.J.; THOMPSON, K.; VITIELLO, J.L. e SUNDERLAND, T. Increased cognitive sensitivity to scopolamine with age and a perspective on the scopolamine model. **Brain Research Reviews**, 17 : 215-226, 1992.
- MONMAUR, P.; AYADI, K. e BRETON, P. Hippocampal EEG responses induced by cabachol and atropine infusions into the septum and the hippocampus in the urethane-anaesthetized rat. *Brain Research*, 631 : 317-324, 1993.
- MONNIER, M. Comparative electrophysiology of sleep in some vertebrates. **Experientia**, 36: 16-19, 1980.
- MOORE, H., DUDCHENKO, P.; COMER, K.S., BRUNO, J.P. e SARTER, M. Central versus peripheral effects of muscarinic antagonists: the limitation of quaternary ammonium derivatives. **Psychopharmacology**, 108 : 241-243, 1992.
- MORAN, P.M. Differential effects of scopolamine and mecamylamine on working and reference memory in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 45 : 533-538, 1993.
- MUIR, J.L.; DUNNETT, S.B.; ROBBINS, T.W. e EVERITT, B.J. Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task. **Experimental Brain Research**, 89 : 611-622, 1992.
- MÜLLER, C.M. Differential effects of acetylcholine in the auditory neostriatum and hyperstriatum ventrale: studies in vivo and in vitro. **Journal of Comparative Physiology**, 161 : 857-866, 1987.

- NEUFELDT, M.Y.; RABEY, M.J.; PARMET, Y.; SIFRIS, P.; TREVES, T.A. e KORCZYN, A.D. Effects of a single intravenous dose of scopolamine in the quantitative EEG in Alzheimer's disease patients and age-matched controls. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 91 : 407-412, 1994.
- NICHOLLS, J.G.; MARTIN, A.R. e WALLACE, B.G. **From Neuron to Brain: a cellular and molecular approach to the function of the nervous system**. Massachusetts: Sinauer, 1992. pp. 311-327.
- NIEUWENHUYS, R. **Chemoarchitecture of the Brain**. Berlin : Springer-Verlag, 1985.
- NILSSON, J.; PANIZZA, M. e HALLETT, M. Principles of digital sampling of a physiologic signal. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 89 : 349-358, 1993.
- OOKAWA, T. e GOTOH, J. Electroencephalogram of the chicken recorded from the skull under various conditions. **Journal of Comparative Neurology**, 124: 1-14, 1965.
- O'NEILL, M.F.; FERNANDEZ, A.G.; GRISTWOOD, R.W. e PALACIOS, J.M. Mecamylamine reverses physostigmine-induced attenuation of scopolamine-induced hyperactivity. **Journal of Neural Transmission**, 96 : 9-18, 1994.
- PARÉ, D.; SMITH, Y.; PARENT, A. e STERIADE, M. Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. **Neuroscience**, 25, 1 : 69-86, 1989.
- PARÉ, D.; DONG, J. e GAUDREAU, H. Amygdalo-entorhinal relations and their reflections in the hippocampal formation: generation of sharp sleep potentials. **The Journal of Neuroscience**, 15, 3 : 2482-2503, 1995.
- PHILLIPS, N.H. e BERGER, R.J. Regulation of body temperature, metabolic rate, and sleep in fasting pigeons diurnally infused with glucose or saline. **Journal of Comparative Physiology**, 161 : 311-318, 1991
- RADEK, R.J. Effects of nicotine on cortical high voltage spindles in rats. **Brain Research**, 625 : 23-28, 1993.

- RAY, P.G. e JACKSON, W.J. Lesions of nucleus basalis alter ChAT activity and EEG in rat frontal neocortex. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 79: 62-68, 1991.
- REINER, P.B. Are mesopontine cholinergic neurons either necessary or sufficient components of the ascending reticular activating system? **The Neurosciences**, 7 : 355-359, 1995.
- REHKÄMPER, G., FRAHM, H.D. e ZILLES, K. Quantitative development of brain structures in birds (galliformes and passeriformes) compared to that in mammals (insectivores and primates). **Brain, Behavior and Evolution**, 37 : 125-143, 1991.
- RIBEIRO, E.B.; BETTIKER, R.L.; BOGDANOV, M. e WURTMAN, R.J. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. **Brain Research**, 621 : 311-318, 1993.
- RIBEIRO, S.K.; DARIO, A.J.S.; CAMPOS, R.O.P.; FREITAS, C.G.; PASCHOALINI, M.A. e MARINO-NETO, J. Análises espectral e aperiódica dos efeitos da administração central de mecamilamina e de escopolamina no eletroscilograma em pombos. FESBE, **Anais**, 1993.
- RIEKKINEN, P.; BUSZAKI, G.; RIEKKINEN-Jr, P.; SOININEN, H. e PARTANEN, J. The cholinergic system and EEG slow waves. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 78 : 89-96, 1991.
- RIEKKINEN-Jr, P.; KOIVISTO, J.; SIRVIÖ, J. e RIEKKINEN, P. Joint modulation of neocortical electrical activity by nicotinic and muscarinic receptors. **Brain Research Bulletin**, 27 : 137-139, 1991.
- RIEKKINEN-Jr, P.; RIEKKINEN, M.; SIRVIÖ, J. e RIEKKINEN, P. Neurophysiological consequences of combined cholinergic and noradrenergic lesions. **Experimental Neurology**, 116 : 64-68, 1992a.
- RIEKKINEN-Jr, P.; RIEKKINEN, M.; SIRVIÖ, J.; MIETTINEN, R. e RIEKKINEN, P. Loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis induces neocortical electroencephalographic and passive avoidance deficits. **Neuroscience**, 47 : 823-831, 1992b.
- RIEKKINEN-Jr, P.; KUITUNEN, J. e RIEKKINEN, M. Effects of thalamic and nucleus basalis infusion of nicotine on cortical EEG. **Neuroreport**, 6 : 1625-1628, 1995.

- RODNITZKY, R.L. Dementia and abnormalities of cognition In: CONN, P.M. (ED). **Neuroscience and Medicine**. Philadelphia : Lippincott, 1995. p. 318-319.
- SAMSON, Y.; FRIEDMAN, A.H.; WU, J.J. e DAVIS, J.N. Loss of hippocampal acetylcholinesterase staining after fornix lesion in the monkey. **Experimental Neurology**, 114 : 123-131, 1991.
- SANBERG, P.R. Dopaminergic and cholinergic influences on motor behavior in chickens. **Journal of Comparative Physiology**, 97, 1 : 59-68, 1983.
- SANTI, A. e WEISE, L. The effects of scopolamine on memory for time in rats and pigeons. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 51 : 271-277, 1995.
- SANTUCCI, V.; GLATT, A.; DEMIEVILLE, H. e OLPE, H.D. Quantification of slow-wave EEG induced by atropine: effects of physostigmine, amphetamine and haloperidol. **European Journal of Pharmacology**, 73 : 113-122, 1981.
- SAPER, C. Cholinergic system In: PAXINOS, G. (ED.). **The Human Nervous System**. San Diego : Academic, 1990. p. 1095-1113.
- SATO, A. e SATO, Y. Regulation of regional cerebral blood flow by cholinergic fibers originating in the basal forebrain. **Neuroscience Research**, 14 : 242-274, 1992.
- SATO, A. e SATO, Y. Cholinergic neural regulation of regional cerebral blood flow. **Alzheimer Disease and Associated Disorders**, 9, 1 : 28-38, 1995.
- SAVAGE, L.M.; STANCHFIELD, M.A. e OVERMIER, J.B. The effects of scopolamine, diazepam and lorazepam on working memory in pigeons: an analysis of reinforcement procedures and sample problem type. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 49, 1: 183-191, 1994.
- SCHWARTZ, J.H. e KANDEL, E.R. Synaptic transmission mediated by second messengers In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. e JESSEL, T.M.(EDS.) **Principles of Neural Sciences**. 3.ed. New York : Elsevier, 1991. p. 173-193.

- SCHWERDTFEGER, W.K. e GERMROTH, P. Archicortical and periar-chicortical areas in the vertebrate forebrain. **Experimental Brain Research**, 19 : 197-212, 1990.
- SEMBA, K. e FIBIGER, H.C. Organization of central cholinergic systems. **Progress in Brain Research**, 79 : 37-63, 1989.
- SHERRY, D.F.; VACCARINO, A.L.; BUCKENHAM, K. e HERZ, R.S. The hippocampal complex of food-storing birds. **Brain, Behavior and Evolution**, 34: 308-317, 1989.
- SIMÕES, C.A.; VALLE, A.C. e TIMO-IARIA, C. Correlation between concomitant theta waves in nucleus reticularis pontis oralis and hippocampus, thalamus and neocortex during deaming rats. **Brazilian Journal of medical and Biological Research**, 29 : 1645-1650, 1996
- SORENSEN, E.M. e CHIAPPINELLI, V.A. Localization of H³-Nicotine, I¹²⁵-Kappa-bungarotoxin, and I¹²⁵-alpha-bungarotoxin binding to nicotinic sites in the chicken forebrain and midbrain. **Journal of Comparative Neurology**, 323 : 1-12, 1992.
- STERIADE, M. Alertness, quiet sleep, dreaming. In: PETERS, A. e JONES, E.G.(EDS.) **The Cerebral Cortex**. New York : Plenum, 1991. v.9. p. 279-345.
- STERIADE, M. Brain electrical activity and sensory processing during waking and sleep states In: KRYGER, M.H.; ROTH, T. e DEMENT, W.C.(Eds.) **Principles and Practice of Sleep Medicine**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1994. p. 105-124.
- STERIADE, M. Neuromodulatory systems of thalamus and neocortex. **The Neurosciences**, 7: 361-370, 1995.
- STERIADE, M. e McCARLEY, R.W. **Brainstem Control of Wakefulness and Sleep**. New York : Plenum, 1990. p. 39-65; 163-261; 325-361.
- STERIADE, M.; GLOOR, P.; LLINÁS, R.R.; DA SILVA, F.H.L. e MESULAM, M.M. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities¹. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, 76 : 481-508, 1990.

- STERIADE, M.; PARÉ, D.; PARENT, P. e SMITH, Y. Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. **Neuroscience**, 25, 1 : 47-67, 1988.
- 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 Research**, 322 : 219-232, 1984.
- SUGIHARA, K. e GOTOH, J. Depth-electroencephalograms of chicken in wakefulness and sleep. **Japanese Journal of Physiology**, 23 : 371-379, 1973.
- SUNDERLAND, T.; MOLCHAN, S.E. e ZUBENKO, G.S. Biological markers in Alzheimer's disease In: BLOOM, F.E. e KUPFER, D.J.(EDS.) **Psychopharmacology**: a fourth generation of progress. New York : Raven, 1995. p. 1389-1399.
- SUNDERLAND, T.; ESPOSITO, G.; MOLCHAN, S.E.; COPPOLA, R.; JONES, D.W.; GOREY, J.; LITTLE, J.T.; BAHRO, M. e WEINBERGER, D.R. Differential cholinergic regulation in Alzheimer's patients compared to controls following chronic blockade with scopolamine: a SPECT study. **Psychopharmacology**, 121 : 231 - 241, 1995.
- SZYMUSIAK, R. Magnocellular nuclei of the basal forebrain: substrates of sleep and arousal regulation. *Sleep*, 18, 6 : 478-500, 1995.
- TAUBER, E.S. Phylogeny of sleep In: WEITZMAN, E.D. (ED.) **Advances in Sleep Research**. New York: Spectrum, 1974. p. 133-172.
- TAYLOR, P e BROWN, J.H. Acetylcholine In: SIEGEL, G.J. *et al.* (EDS.). **Basic Neurochemistry**: molecular, cellular, and medical aspects. 5.ed. New York : Raven, 1994. p. 231-260.
- THOMPSON, R.W. A central cholinergic inhibition system as a basis for tonic immobility in chickens. **The Psychopharmacological Record**, 1 : 109-121, 1977.

- TOBLER, I. e BORBÉLY, A.A. Sleep and EEG spectra in the pigeon (*Columba Livia*) under baseline conditions and after sleep deprivation. **Journal of Comparative Physiology**, 163: 729-738, 1988.
- TOBLER, I. Evolution and comparative physiology of sleep in animals. **Clinical Physiology of Sleep**, 21-29, 1988.
- TOLEDO, C.A.B. **Facilitação da Habituação da Resposta Exploratória a Estímulos Sonoros em Pombos Destelencefalados**. Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Campinas como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, 1989.
- TRADARDI, V. Sleep in the pigeon. **Archives Italiennes de Biologie**, 104 : 526-521, 1966.
- TURCHI, J.; HOLLEY, L.A. e SARTER, M. Effects of nicotinic acetylcholine receptor ligands on behavior vigilance in rats. **Psychopharmacology**, 118 : 195-205, 1995.
- ULINSKI, P.S. The cerebral cortex of reptiles In: JONES, E. e PETERS, A.(EDS.) **The Cerebral Cortex: comparative structure and evolution of cerebral cortex**. New York: Plenum, 1990. v. 8A. p. 139-215.
- ULINSKI, P.S. e MORGALIASH, D. Neurobiology of the reptile-bird transition In: JONES, E. e PETERS, A.(EDS.) **The Cerebral Cortex: comparative structure and evolution of cerebral cortex**. New York : Plenum, 1990. v. 8A. p. 217-265.
- 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 Mestra em Ciências, 1992.
- VANDERWOLF, C.H. The electrocorticogram in relation to physiology and behavior: a new analysis. **Electroencephalography and Clinical Physiology**, 82 : 165-175, 1992.

- VAN TWYVER, H. e ALLISON, T. A polygraphic and behavioral study of sleep in the pigeon (*Columba livia*). **Experimental Neurology**, 35 : 138-153, 1972
- VAUCHER, E. e HAMEL, J. Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry. **The Journal of Neuroscience**, 15 , 11 : 7427-7441, 1995.
- VEENMAN, C.L.; ALBIN, R.L.; RICHFIELD, E.K. e REINER, A. Distributions of GABA_A, GABA_B, and benzodiazepine receptors in the forebrain and midbrain of pigeons. **Journal of Comparative Neurology**, 344 : 161-189, 1994.
- 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 projections targets. **Journal of Comparative Neurology**, 339 : 209-250, 1995.
- VERTES, R.P. An analysis of ascending brain stem systems involved in hippocampal synchronization and desynchronization. **Journal of Neurophysiology**, 46 : 1140-1159, 1981.
- VERTES, R.P.; COLOM, L.V.; FORTIM, W.J. e BLAND, B.H. Brainstem sites of carbachol elicitation of the hippocampal theta rhythm in the rat. **Experimental Brain Research**, 96 : 419-429, 1993.
- WALKER, J.M. e BERGER, R.J. Sleep in the domestic pigeon. **Behavioral Biology**, 7 : 195-203, 1972.
- WÄCHTLER, K. The regional production of acetylcholine in the brains of lower and high vertebrates. **Comparative Biochemical Physiology**, 65 : 1-16, 1980.
- WÄCHTLER, K. e EBINGER, P. The pattern of muscarinic acetylcholine receptor binding in the avian forebrain. **Journal für Hirnforschung**, 30 : 409-414, 1989.
- WOOLF, N.J. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. **Progress in Neurobiology**, 37 : 475-524, 1991.

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

ZOLMAN, J.F.; MATTINGLY, B.A. e SAHLEY, C.L. Cholinergic involvement in inhibitory behavior of the young domestic chick. **Behavioral Biology**, 23 : 415-432, 1978.