

Fernando Falkenburger Melleu

**A IMOBILIDADE TÔNICA EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*):
ASPECTOS ETOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E
NEUROANATÔMICOS DE UMA RESPOSTA DEFENSIVA A
UMA AMEAÇA INESCAPÁVEL**

Tese de doutorado submetida ao
Programa de pós-graduação em
Neurociências da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do grau de
doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto
Co-Orientadora: Prof. Dr^a. Cilene Lino de
Oliveira

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Melleu, Fernando Falkenburger
A IMOBILIDADE TÔNICA EM POMBOS (COLUMBA LIVIA) :
ASPECTOS ETOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E NEUROANATÔMICOS DE UMA
RESPOSTA DEFENSIVA A UMA AMEAÇA INESCAPÁVEL / Fernando
Falkenburger Melleu ; orientador, José Marino Neto ;
coorientadora, Cilene Lino de Oliveira. - Florianópolis,
SC, 2016.
156 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, . Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

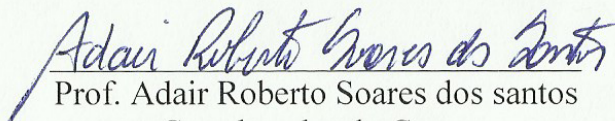
1. Neurociências. 2. Neuroetologia. 3. Fisiologia. 4.
Neuroanatomia. 5. Imobilidade tônica. I. Marino Neto, José.
II. Lino de Oliveira, Cilene. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.
IV. Título.

FERNANDO FALKENBURGER MELLEU

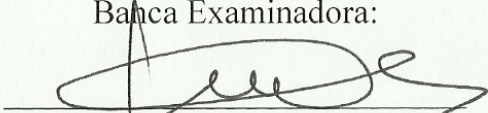
“A IMOBILIDADE TÔNICA EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*): ASPECTOS ETOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E NEUROANATÔMICOS DE UMA RESPOSTA DEFENSIVA A UMA AMEAÇA INESCAPÁVEL”.

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

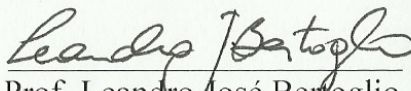
Florianópolis, 26 de fevereiro de 2016.

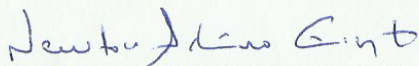

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

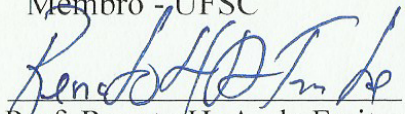
Banca Examinadora:

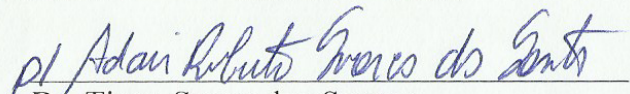

Prof. José Marino Neto
Orientador – UFSC


Prof. Eduardo Luiz G. Moreira
Membro - UFSC


Prof. Leandro José Bertoglio
Membro - UFSC


Prof. Newton Sabino Canteras
Membro da Banca Externo


Prof. Renato H. A. de Freitas
Membro - UFSC


Dr. Tiago Souza dos Santos
Membro da Banca Externo (videoconferência)

À memória de Antônio Fernando Dias Mellen, pai e amigo

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. José Marino Neto e Dr^a. Cilene Lino de Oliveira.
Pela mais que atenciosa orientação e amizade durante os últimos 7 anos.

Ao professor Dr. Antônio Renato Pereira Moro do CDS/UFSC
Pelo gentil empréstimo do equipamento de termografia.

Aos colegas e ex-colegas do laboratório de Neurofisiologia Comparada e
Neurobiologia do comportamento.

Pelo companheirismo durante estes anos.

Ao amigo e colega Tiaguinho

Você é o cara!

Às ICs Laís, Inaê e Isadora (ainda que brevemente)

Pela ajuda durante a realização de experimentos e análises.

Ao Sr. Nivaldo, secretário da PG-neurociências

Pela diligência, ajuda administrativa e conversas extensas e esclarecedoras.

Aos funcionários do Biotério central da UFSC

Pelos cuidados com os pombos utilizados neste trabalho

Aos colegas dos diversos programas de pós-graduação do CCB

Pelo companheirismo e conversas (científicas ou não) durante o café.

Aos meus amigos (KK e DC)

Pelo apoio e compreensão durante minha ausência intermitente durante
estes últimos 4 anos.

À Priscyla, Gabriela, Docinho e Paçoca

Pelo apoio, carinho e momentos felizes.

À Karolina Domingues

Por toda ajuda, amizade, discussões e pela correção atenciosa deste texto.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional
de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*"We came so far, we came so far
So deeply wounded and so scarred our despair-ridden hearts
Frail as we are, frail as we are
Firmly united we will stand 'til the world falls apart"*

(Sami Lopakka, Despair-Ridden Hearts, Century Media records, 2005)

RESUMO

Introdução: A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, presente em vertebrados e invertebrados, caracterizada por um estado reversível de profunda inibição comportamental, acompanhada de uma diminuição de responsividade e perda total ou parcial do tônus antigravitacional. A IT é um comportamento conservado em vertebrados, podendo ser observado em diversas espécies de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos e nestes animais é desencadeado pela contenção e restrição de movimentos do animal. A IT, portanto, parece ser uma resposta defensiva utilizada como último recurso durante o ataque de predadores. Estudos sobre este fenômeno, realizados principalmente em mamíferos (roedores e lagomorfos) e aves (galiformes) verificaram que a IT é acompanhada de uma série de alterações de variáveis fisiológicas como pressão arterial, frequência cardíaca, temperatura e de níveis plasmáticos de glicocorticóides comparáveis àquelas observadas em outras reações defensivas. Entretanto, esta reação foi pouco estudada do ponto de vista etológico e fisiológico em pombos (*C. livia*). Mesmo em mamíferos e galiformes, pouco se conhece sobre os circuitos encefálicos, especialmente circuitos mesencefálicos e límbicos, que atuam no controle deste comportamento. **Métodos:** Neste trabalho descrevemos o comportamento de IT em pombos e realizamos um estudo sobre atributos etológicos da IT, como a sua distribuição em uma coorte e habituação por meio de re-testes. Também foram avaliados parâmetros fisiológicos de temperatura corporal interna e frequência cardíaca (FC) em pombos durante a IT, utilizando aferências através da implantação de sensores telemétricos na cavidade celomática, bem como a avaliação da temperatura corporal externa utilizando termografia por detecção de infravermelho. Utilizando métodos imunistoquímicos para detecção da proteína c-Fos, verificamos o padrão de ativação neural em diversas regiões mesencefálicas e límbicas de pombos após a indução da IT, ou manipulação em comparação com pombos não-manipulados, e, no hipotálamo, verificamos a ativação de células CRH+ utilizando dupla marcação CRH/c-Fos. **Resultados:** Durante a IT, pombos apresentaram movimentos palpebrais e movimentos de cabeça que se alteram com o tempo em imobilidade. O

comportamento de IT é prevalente na população sendo que apenas 5% dos animais não exibe imobilidade após a contenção. A duração de IT em pombos é alterada quando o teste é repetido por 4 vezes em intervalos de 7 dias ou 24h, entretanto, 4 repetições *in tandem* parecem aumentar, ainda que de maneira não significativa a duração da imobilidade. Tanto a temperatura interna quanto a FC aumentam de maneira significativa nos períodos iniciais da IT, porém estes aumentos também podem ser observados em animais apenas manipulados. A temperatura corporal externa diminui em uma relação linear com a duração da IT. A indução da IT promove o aumento da expressão de c-Fos em áreas mesencefálicas: n. intercolicular (lateral e medial), substancia cinzenta periventricular e n. mesencefálico lateral, e límbicas: Arcopallium dorsal, Arcopallium ítermédio, região dorsolateral ventral do hipocampo, área septal lateral e do núcleo intersticial da estria terminal. No hipotálamo, tanto a IT quanto a manipulação provocaram um aumento da ativação de células CRH+.

Conclusão: A IT é um comportamento prevalente em pombos e não é homogêneo em sua duração. Tanto a IT quanto a manipulação promove respostas fisiológicas de temperatura e FC semelhantes, sugerindo que essas respostas sejam comuns ao estresse em pombos. A indução da IT promove ativação de áreas mesencefálicas comparáveis à região periaqueductal de mamíferos (PAG), também envolvida com comportamentos de defesa. A indução da IT promove a ativação de regiões límbicas no encéfalo do pombo comparáveis a áreas que também estão envolvidas em respostas defensivas em mamíferos, sugerindo que esta resposta é modulada por circuitos prosencefálicos descendentes e que circuitos controlando essa resposta podem ser conservados em amniotas.

Palavras chave: Imobilidade tônica, comportamento defensivo, temperatura corporal, frequência cardíaca, Mesencéfalo, Sistema límbico, Pombos (*Columba livia*).

ABSTRACT

Introduction: Tonic Immobility (TI) is an innate defensive response, seen in vertebrates and invertebrates, characterized by a reversible state of profound behavioral inhibition, accompanied by a lack of responsiveness and partial or total loss of antigravitational tonus. TI is a conserved behavior across vertebrates, being observed in several species of fish, amphibians, reptiles, birds and mammals. In these animals, the TI is achieved by restraining the animals' movements in an inverted position. Therefore, TI is interpreted as a defensive response utilized as the last resort against predator attacks. Studies about this phenomenon, done especially in mammals (rodents and lagomorphs) and birds (galliforms) showed that TI is accompanied by a series of alterations of physiological variables such as arterial pressure, heart rate, temperature and plasmatic levels of glucocorticoids comparable to those seen in other defensive reactions. Nevertheless, this reaction was studied to a lesser extent, regarding its ethological and physiological features in pigeons (*C. livia*). Even in mammals and galliform birds, little is known of the encephalic circuitry, especially of the mesencephalic and limbic, that controls this behavior.

Methods: In this study we describe the TI behavior in pigeons and its ethological attributes, as well as its distribution in a cohort and its habituation by means of re-testing. Heart rate and core temperature during TI were also evaluated by implanting telemetric sensors into the celomatic cavity of pigeons. External body temperature during TI was evaluated utilizing thermographic detection of infrared. Utilizing immunohistochemical detection of c-Fos we evaluated the pattern of neural activation in mesencephalic and limbic brain regions after TI induction or handling in comparison with non-handled controls, and, in the hypothalamus we assessed the activation of CRH+ cells in the PVN utilizing double-labeling CRH/c-Fos.

Results: We found that TI is a prevalent behavior in a cohort of pigeons whereas only 5% of animals failed to become immobile after movement restraint. During TI they presented eyelid and head movements that changed over TI duration. The TI duration in pigeons is not altered after 4 repetitions in intervals of 7 days or 24 hours, however 4 repetitions *in tandem* seemed to increase (not

significantly) the TI duration. Both the core temperature and heart rate showed increases in the beginning of TI of pigeons; however, these increases were not significantly different from those observed after manipulation; We found that the external temperature of pigeons linearly decreases with the duration of tonic immobility. TI induction in pigeons caused an increase in c-Fos expression in mesencephalic areas: intercolicularis (lateral e medial), stratum griseum periventriculares and n. mesencephalicus lateralis pars dorsalis and limbic areas: dorsal Arcopallium, Arcopallium intermedium, ventral dorsolateral region of the hippocampus, lateral septal area and in the bed nucleus of the stria terminalis. In the hypothalamus, both IT and handling increased de number of activated CRH+ neurons **Conclusion:** Tonic immobility is a prevalent behavior in pigeons. This behavior is not homogenous. Both TI and manipulation promote physiological responses of temperature and heart rate, suggesting that these responses are common to stress reactions in general and not byproducts of the TI itself. The induction of TI promotes increases in neural activity in mesencephalic regions comparable to the mammalian periaqueductal region (PAG), also implicated in the control of defensive behaviors. The IT induction elicit neuronal activity in limbic regions of the pigeon brain comparable to areas that are also involved with defensive responses in mammals, suggesting that this response is modulated by descending prosencephalic pathways, and that the circuits controlling this response may be highly conserved in amniotes.

Keywords: Tonic immobility, Defensive behavior, body core temperature, heart rate, Mesencephalon, Limbic system, Pigeons (*Columba livia*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de imobilidade tônica.....	43
Figura 2. Controles imunistoquímicos e descrição das áreas de quantificação.....	58
Figura 3. Descrição da imobilidade tônica.....	61
Figura 4. Análise dos movimentos palpebrais durante a IT.....	62
Figura 5. Distribuição de duração e tentativas de IT na coorte.....	64
Figura 6. Efeito re-teste de imobilidade tônica.....	66
Figura 7. Modificação da temperatura corporal superficial de pombos submetidos à IT.....	70
Figura 8. Modificações da temperatura corporal interna de pombos submetidos à IT.....	72
Figura 9. Modificações cardíacas durante a imobilidade tônica.....	75
Figura 10. Expressão de c-Fos em regiões mesencefálicas do pombo.....	78
Figura 11. Distribuição de NADPH diaforase no complexo ICo/GCt do pombo.....	79
Figura 12. Quantificação de células c-Fos+ após IT em regiões mesencefálicas.....	80
Figura 13. Distribuição de células c-Fos+ e CRH+ no hipotálamo do pombo.....	82
Figura 14. Quantificação de células c-Fos+ e CRH+ após IT no hipotálamo do pombo.....	83
Figura 15. Distribuição de células c-Fos+ no complexo amigdalóide e área septal do pombo.....	85
Figura 16. Quantificação de células c-Fos+ após IT no complexo amigdalóide.....	86
Figura 17. Distribuição de células c-Fos+ no hipocampo do pombo.....	88
Figura 18. Quantificação de células c-Fos+ no hipocampo e área septal.....	88
Figura 19.....	92
Figura 20. Hipótese comparativa entre a PAG de mamíferos e o complexo ICo/GCt de aves.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Duração média de IT nos re-testes.	67
Tabela 2. Temperatura corporal interna média em intervalos 10 minutos após a manipulação/Indução da IT.....	70
Tabela 3. Frequência cardíaca nos períodos após manipulação/indução da IT.	71
Tabela 4. Quantificação de células c-Fos+, variação média em relação ao grupo controle e testes estatísticos nas diferentes regiões encefálicas	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: Complexo avidina-biotina	gl: Graus de liberdade
ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico	HPA: Eixo Hipotálamo- pituitária-adrenal
ASCII: American Standard Code for Information Interchange	i.p: Intraperitoneal
BC: Biotério Central	IgG: Imunoglobulina G
Bpm: Batimentos por minuto	IT: Imobilidade tônica
BSA: Soroalbumina bovina	K-W: Teste estatístico de Kurskall-Wallis
CCB: Centro de Ciências Biológicas	M-W: Teste estatístico de Mann- Whitney
c-Fos+ : Núcleos imunoreativos à proteína c-fos	NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
CFS: Departamento de Ciências Fisiológicas	NADPHd: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato diaforase
CRH: Hormônio liberador de corticotrofina	NADPHd+: Células imunoreativas à NADPHd
CRH+: células imunoreativas à CRH	PB: Tampão fosfato
DAB: 3,3'-Diaminobenzidina	PBS: Tampão fosfato salina
ECG: Eletrocardiograma	PBST: Tampão fosfato salina+ Triton x-100
EEG: Eletroencefalograma	PFA: Paraformolaldeído
EMG: Eletromiograma	s.c: Subcutânea
EOG: Electrooculograma	sR: Coeficiente de correlação do teste estatístico de Spearman
EPM: Erro padrão da média	UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
FC: Frequência cardíaca	
GABA: Ácido γ -aminobutírico	

LISTA DE SIGLAS NEUROANATÔMICAS

3v: Terceiro ventrículo	FLM: Fascículo longitudinal medial
Ad: Arcopallium dorsal	GCt: substância cinzenta central
Ai: Arcopallium intermédio	GLv: Núcleo geniculado lateral ventral
AL: Ansa lenticularis	GP: Globus pallidus
Aq: Aqueduto cerebral	HA: Hyperpallium apicale
BLA: Amígdala basolateral	HL: Habenula lateral
BSTn: Núcleo intersticial da estria terminal	HM: Habenula medial
BSTn-l: Núcleo intersticial da estria terminal lateral	Hp: Hipocampo
BSTn-m: Núcleo intersticial da estria terminal medial	ICo: Núcleo intercolicular
Ca: Comissura anterior	ICo-l: Núcleo intercolicular lateral
CDL: Área corticóidea dorsolateral	ICo-m: Núcleo intercolicular medial
DLd: Núcleo dorsolateral dorsal do hipocampo	LA: Amígdala lateral
DLM: Porção medial do núcleo dorsolateral anterior do tálamo	laq: expansão lateral do aqueduto cerebral
DLP: Núcleo dorsolateral posterior do tálamo	LH: Hipotálamo lateral
DLv: Núcleo dorsolateral ventral do hipocampo	ll: Lâmina lateral
DMA: Núcleo dorsomedial anterior do tálamo	lm: Lâmina medial
Dmd: Núcleo dorsomedial do hipocampo	M: Mesopallium
DMP: Núcleo dorsolateral posterior do tálamo	MeA: Amígdala medial
DMv: Núcleo dorsomedial ventral do hipocampo	MLd: Núcleo mesencefálico lateral dorsal
E: Entopallium	N: Nidopallium
EW: Núcleo de Edinger–Westphal	nIII: Núcleo do nervo oculomotor
	OM: Trato occipito-mesencefálico
	PAG: substância cinzenta periaquedutal
	PMH: Núcleo medial do hipotálamo posterior

PoA: Núcleo posterior do
arcopallium
POM: Núcleo préóptico medial
PT: Núcleo pré-tectal
PVM: Núcleo periventricular
magnocelular
PVNd: Núcleo paraventricular
dorsal
PVNv: Núcleo paraventricular
ventral
QF: Trato quinto-frontalis
QO: Quiasma óptico
RT: Núcleo rotundus
SCE: Extrato celular externo
SGPd: Substância cinzenta
periventricular dorsal

SGPv: Substância cinzenta
periventricular ventral
SHl: Núcleo subhabenular lateral
SHm: Núcleo subhabenular
medial
Sl: Área septal lateral
Sm: Área septal medial
SP: Núcleo sub prétectal
Stl: Estriado lateral
Stm: Estriado medial
Tha: Tálamo
TnA: Núcleo taeniae do
Arcopallium
TO: Teto óptico
Tr: Núcleo triangular do
hipocampo
V: Ventrículo lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	39
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO	41
3.2. IMOBILIDADE TÔNICA (IT)	41
3.3. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	42
3.3.1. Descrição qualitativa.....	42
3.3.2. Caracterização e quantificação dos movimentos palpebrais durante a IT.....	43
3.3.3. Distribuição da IT na coorte de pombos	44
3.3.4. Experimentos de habituação	45
3.4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA ... 46	
3.4.1. Temperatura corporal superficial.....	46
3.4.2. Temperatura corporal interna	47
3.4.3. Frequência cardíaca.....	50
3.5. ASPECTOS NEUROANATÔMICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA	53
3.5.1. Avaliação da expressão de c-Fos	53
3.5.2. Perfusão e histologia.....	53
3.5.3. Procedimentos histoquímicos	54
3.5.4. Microscopia e quantificação	56
3.5.5. Distritos encefálicos de interesse.....	57
4.1. ASPECTOS ETOLÓGICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA	59
4.1.1. Descrição qualitativa do comportamento de imobilidade tônica ..	59
4.1.2. Caracterização e análise dos movimentos palpebrais	61
4.1.3. Distribuição da IT em uma coorte de pombos	63
4.1.4. Experimentos de habituação: Efeitos do re-teste	65
4.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA: TEMPERATURA CORPORAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	67
4.2.1. Temperatura corporal superficial.....	67
4.2.2. Temperatura corporal interna	68
4.2.3. Frequência cardíaca.....	71

4.3. PADRÃO DE ATIVAÇÃO NEURAL DURANTE A IT AVALIADO POR MEIO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C-FOS.	76
.....	76
4.3.1. Mesencéfalo	76
4.3.2. Hipotálamo	80
4.3.3. Complexo Amigdalóide	84
4.3.5. Área septal e Hipocampo.....	86
4.3.5. Distribuição geral da proteína c-Fos após a IT	89
5. DISCUSSÃO	95
5.1. ASPECTOS ETOLÓGICOS DA IT	95
5.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA IT	102
5.3. MODIFICAÇÕES DA EXPRESSÃO DE C-FOS NO MESENCÉFALO E ÁREAS PROCENCEFÁLICAS APÓS A IT	106
5.3.1. Complexo ICo/GCt.....	106
5.3.2. Distritos hipotalâmicos	115
5.3.3. Distritos telencefálicos	119
5.3.4. Considerações finais	130
6. CONCLUSÕES	132
7. REFERÊNCIAS.....	134

1. INTRODUÇÃO

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, presente em vertebrados e invertebrados, caracterizada por um estado reversível de profunda inibição comportamental, acompanhada de uma diminuição de responsividade e perda total ou parcial do tônus antigravitacional (GALLUP e RAGER, 1996).

O primeiro registro sobre este fenômeno foi atribuído ao estudioso e padre jesuíta, Athanasius Kircher em 1671 (MASER e GALLUP, 1977; CLERICI *et al.*, 2012). Em sua obra *Ars magna lucis et umbrae*, Kircher apresenta uma breve descrição com ilustrações de uma galinha que após uma contenção e "demonstrando um esforço infrutífero para se levantar", permanece imóvel junto a uma linha desenhada no chão (KIRCHER, 1671). Maser e Gallup (1977) revisaram grande parte da bibliografia disponível sobre a IT desde o século XVII até a década de 1970. Inicialmente, a imobilidade tônica era tratada como um tipo de "hipnose animal" e muitas vezes relatada como uma mera curiosidade do comportamento dos vertebrados "inferiores" (MASER e GALLUP, 1977; CLERICI *et al.*, 2012). Como seria o esperado, 300 anos de relatos sobre esse fenômeno geraram uma grande riqueza de descrições e interpretações, e até mesmo grandes nomes da biologia como Darwin e Pavlov se propuseram a explicá-lo. Em um ensaio póstumo publicado em 1883, Darwin escreveu sobre a IT:

"Animals feigning, as it is said, Death—an unknown state to each living creature—seemed to me a remarkable instinct. I agree with those authors who think that there has been much exaggeration on this subject: I do not doubt that fainting (I have had a Robin faint in my hands) and the paralyzing effects of excessive fear have sometimes been mistaken for the simulation of death." (DARWIN, 1883 p.363)

Darwin interpretou a imobilidade tônica como sendo uma paralisia induzida por medo. Para ele, a IT seria um comportamento desencadeado "instintivamente" por animais em situações de ameaça. Por

outro lado, o fisiologista russo Ivan Pavlov acreditava que a IT se tratava de um comportamento reflexo da contenção e de sua inescapabilidade. Na visão de Pavlov esse comportamento seria consequência de uma inibição cortical reflexa, e em sua concepção apresentava características, tais como atonia, que ele comparou a estados de sono (PAVLOV, 1961). Pavlov também discute a terminologia aplicada para descrever o fenômeno, em especial o termo "hipnose animal", o qual acreditava ser incorreto (PAVLOV, 1961).

De fato, um dos problemas encontrados na literatura sobre a IT e que deve ser considerado, é a terminologia aplicada e utilizada em suas descrições. Principalmente em trabalhos publicados antes de 1990, os termos hipnose animal (LIBERSON, 1948), imobilidade ativa (KLEMM, 1989), imobilidade fásica (KLEMM, 1976), imobilidade dorsal (ROVEE e LUCIANO, 1973), imobilidade reflexa (MCGRAW e KLEMM, 1969) e imobilidade tônica (HOAGLAND, 1928) são utilizados como sinônimos para definir o mesmo fenômeno, gerando uma certa confusão para a realização de uma revisão bibliográfica abrangente sobre o tema.

Parte da confusão sobre a terminologia parece emergir das interpretações iniciais sobre o fenômeno que incluíam comparações analógicas com catalepsia, tanatose, paralisia e etc. (GALLUP, 1974), bem como, de especulações geradas em estudos observacionais sem grande rigor científico (para revisão ver: GALLUP, 1974).

Estudos das décadas de 1960 e 1970, realizados principalmente por W.R. Klemm, Gallup e colaboradores, contribuíram para refutar a hipótese da hipnose animal e, analisando uma série de experimentos comportamentais, propuseram a idéia de que a IT seria parte do repertório defensivo dos animais e atuaria como uma resposta extrema em situações inescapáveis durante o ataque de predadores (GALLUP, 1974).

Algumas evidências, frutos de experimentos realizados em diversas espécies, contribuíram para a idéia de que a IT teria características defensivas, ou ainda, seria um comportamento relacionado ao medo. Por exemplo, galinhas (*Gallus gallus*) e lagartos (*Anolis carolinensis*) apresentados a olhos artificiais mostram um aumento da duração de IT (GALLUP, NASH e ELLISON JR, 1971; HENNIG, 1977). A apresentação a predadores vivos ou artificiais também promove o aumento do estado de imobilidade

em galinhas (GALLUP, NASH e ELLISON JR, 1971). Outros estímulos aversivos, apresentados a diversas espécies, como isolamento social (LIBERSON, 1948), separação materna (SALZEN, 1963), manipulações prévias (PARKER, 1971) ou a exposição a ambientes desconhecidos (ROVEE, AGNELLO e SMITH, 1973) também aumentam a duração da IT. De maneira semelhante, a aplicação de choque nas patas também promove um aumento da duração da IT em lagartos (EDSON e GALLUP, 1972) e galinhas (GALLUP, CREEKMORE e HILL III, 1970). A apresentação de um tom sonoro, previamente pareado a um choque nas patas, também potencializa de maneira significativa a duração da IT em galinhas (GALLUP, ROSEN e BROWN, 1972). Esta modulação da IT por eventos aversivos parece contribuir para a hipótese de que a IT, de fato, é um comportamento defensivo dos vertebrados.

Comportamentos defensivos são padrões comportamentais presentes em todas as espécies animais (BLANCHARD *et al.*, 1991). A habilidade inata de uma espécie de executar comportamentos defensivos bem coordenados em resposta a estímulos ambientais potencialmente nocivos possui alto valor adaptativo e é indispensável para a sobrevivência da mesma (BLANCHARD *et al.*, 1991). É importante notar que tais reações estão fortemente associadas ao contexto ambiental e à própria natureza do estímulo. Dado um estímulo nocivo, existem quatro principais tipos de reações defensivas estereotipadas observadas em quase todos os grupos animais: 1) Fuga, 2) Ameaça defensiva 3) Luta e 4) Imobilidade ou inibição comportamental. A forma de defesa expressa pelo indivíduo está fortemente ligada ao ambiente onde ocorre o confronto e à distância do estímulo (e.g, distância do indivíduo em relação ao predador) (BLANCHARD *et al.*, 1991). Roedores expostos a um predador tendem a apresentar um comportamento de fuga caso a distância seja grande (1-5 m) e a fuga seja possível (BLANCHARD, FLANNELLY e BLANCHARD, 1986).

Também foi mostrado que a velocidade da fuga aumenta à medida que a distância do predador diminui (YDENBERG e DILL, 1986). Em distâncias muito pequenas em relação ao estímulo, sem condições para fuga, a tendência observada é que os animais expressem mais comportamentos de ameaça e luta (BLANCHARD, FLANNELLY e

BLANCHARD, 1986) ou, paradoxalmente, inibam completamente os movimentos (imobilidade) (MISSLIN, 2003). Dessa maneira a IT pode ser interpretada como uma reação defensiva de intensa imobilidade que ocorre quando a distância predador-presa é mínima e não há possibilidade de fuga (MARX *et al.*, 2008). Nessas situações extremas, o comportamento de IT, muitas vezes interpretado como "fingir de morto", pode fazer com que o predador perca o interesse na presa possibilitando uma fuga em uma oportunidade de distração. De fato, isso parece ocorrer e foi registrado em algumas situações na natureza (FRANCO, 1969; PARKER, 1971; SARGEANT e EBERHARDT, 1975; MISSLIN, 2003).

Em condições de laboratório, a IT pode ser induzida através da contenção física do animal em uma posição invertida (decúbito dorsal) e uma subsequente liberação, promovendo imobilidade que pode ter uma duração de alguns segundos até algumas horas, dependendo do indivíduo ou da espécie (GALLUP e RAGER, 1996). A indução da IT em laboratório, possibilita o estudo sistemático da fisiologia desse comportamento (GALLUP e RAGER, 1996), bem como a avaliação dos efeitos de fármacos sobre sua expressão (e.g. OLSEN, HOGG e LAPIZ, 2002; DA SILVA, COIMBRA e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2012; FERREIRA e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2012).

Os estudos sobre a IT estão concentrados, em sua maioria, em aves e mamíferos. Porém, esse fenômeno é extremamente conservado em vertebrados e pode ser induzido de maneira semelhante em indivíduos de diversas espécies. Elasmobrânquios (tubarões e raias) e teleósteos (peixes ósseos), ao terem sua posição invertida por um experimentador, exibem imobilidade tônica (DAVIE, FRANKLIN e GRIGG, 1993; HENNINGSSEN, 1994; WELLS, MCNEIL e MACDONALD, 2005). A IT também foi reportada em anfíbios anuros (sapos e rãs) e urodelos (salamandras) (BRODIE JR, JOHNSON e DODD JR, 1974; GARGAGLIONI, PEREIRA e HOFFMANN, 2001; TOLEDO, SAZIMA e HADDAD, 2010) e reptéis (Squamata, lagartos e serpentes) (PRESTRUDE e CRAWFORD, 1970; PARKER, 1971; EDSON e GALLUP, 1972; BURGHARDT e GREENE, 1988; DAVIES *et al.*, 2002; GREGORY, 2008). Em aves a IT foi extensamente estudada em galiformes como codornas (*Coturnix coturnix japonica*) (MILLS e FAURE,

1991) e galinhas (JONES, 1986) e, em menor grau, em columbiformes (RATNER, 1967), anseriformes (SARGEANT e EBERHARDT, 1975) e passeriformes (BRUST, WUERZ e KRÜGER, 2013).

Finalmente, em mamíferos, a IT foi demonstrada em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (RATNER, 1958), cobaias (*Cavia porcellus*) (LIBERSON, 1948), porcos (*Sus scrofa domestica*) (ERHARD, MENDEL e CHRISTIANSEN, 1999), diversas espécies de murídeos (WEBSTER *et al.*, 1981), e até primatas não humanos (FOLEY JR, 1938). Em mamíferos, talvez o exemplo mais conhecido de imobilidade tônica seja o do gambá (*Didelphis sp.*), que apresenta uma intensa reação de imobilidade tônica quando confrontado por um predador (FRANCQ, 1969).

Ainda, é importante mencionar que alguns autores sugerem a existência de IT em humanos, buscando uma comparação entre a reação observada em outros animais e processos de inibição comportamental presentes em humanos durante eventos traumáticos (e.g. acidentes, violência sexual etc.) (SUAREZ e GALLUP, 1979; HEIDT, MARX e FORSYTH, 2005; ABRAMS *et al.*, 2009; VOLCHAN *et al.*, 2011). Porém, devido ao número limitado de investigações dos mecanismos envolvidos neste comportamento, a relação entre esses fenômenos não parece permitir uma comparação robusta com o comportamento de imobilidade tônica observado em humanos e outros vertebrados além da validade analógica.

A IT, apesar de ser um comportamento conservado em vertebrados, apresenta grande variabilidade entre intra-específica (BOISSY e BOUISSOU, 1995). Enquanto alguns indivíduos podem permanecer várias horas em IT, também foi reportada a existência de indivíduos refratários, ou seja, que não apresentam IT após a contenção (GALLUP, NASH e WAGNER, 1971; GALLUP e RAGER, 1996). As variações individuais do comportamento de IT parecem, pelo menos em parte, ser explicadas por características genéticas. Mills e Faure (1991) foram capazes de selecionar codornas em duas linhagens distintas quanto à duração de seus episódios de IT, uma com curta duração e outra com longa duração de imobilidade. Efeitos semelhantes de seleção artificial, utilizando a IT como fenótipo de seleção, também foram reportados em galinhas, ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) (GALLUP e RAGER, 1996).

Além de características genéticas, fatores ambientais podem influenciar na expressão da imobilidade tônica. Dados recentemente publicados por nosso laboratório mostraram que pombos adultos, alojados por 42 dias em um ambiente visualmente enriquecido, apresentavam maior duração de imobilidade tônica quando comparados aos animais alojados em gaiolas padrão privados de contato visual com seus co-específicos (MELLEU *et al.*, 2015).

As variações da duração, ou mesmo da expressão da imobilidade tônica, leva a maioria dos estudos farmacológicos ou interessados na investigação da fisiologia do fenômeno, a realizarem uma seleção prévia dos animais mais suscetíveis ou com durações de IT médias (VALANCE *et al.*, 2008), ou ainda submeter os animais à várias induções de IT utilizando as médias de duração dos episódios (GALLUP, NASH e WAGNER, 1971).

Uma outra estratégia experimental utiliza-se da variação das durações de IT promovida pela seleção artificial, para investigar tanto respostas fisiológicas durante a IT quanto o efeito dessa seleção sobre outras respostas defensivas. Codornas selecionadas para apresentarem longas durações de IT, respondem diminuindo a atividade locomotora em um campo aberto após manipulação, quando comparadas a animais selecionados para apresentarem imobilidades curtas. Essa resposta é semelhante em animais expostos a um ambiente novo (RICHARD *et al.*, 2010). Em outro estudo, codornas selecionadas para longas ITs mostraram uma diminuição significativa no tempo de exploração de um objeto novo, porém, habituam-se mais rapidamente a esse objeto (CALANDREAU *et al.*, 2013). Sendo assim, foi proposto que mecanismos centrais subjacentes ao controle da imobilidade tônica favorecem estratégias de *coping* passivo nesses animais (HAZARD *et al.*, 2008). A imobilidade tônica apresenta grande variação individual, porém seu caráter conservado através do grupo dos vertebrados sugere que o substrato neural responsável pelo controle da expressão da imobilidade tônica seja também um caráter plesiomórfico conservado nos vertebrados recentes.

Estudos utilizando estratégias farmacológicas e lesões encefálicas elucidaram, pelo menos em parte, o sistema de controle motor da IT, especialmente em relação a estruturas do tronco cerebral. Foi observado a

transecção encefálica a nível da borda rostral do cerebelo, incluindo a remoção do cerebelo, não elimina a IT em sapos (SVORAD, 1957). Transecções rostrais ao mesencéfalo também não impedem o aparecimento da IT em cobaias e coelhos (SPIEGEL e GOLDBLOOM, 1925 *apud* KLEMM, 1976). Por outro lado, transecções rostrais ao colículo inferior impediram a indução da IT em coelhos (CARLI, 1971). Essas evidências poderiam sugerir que a IT é um processo controlado exclusivamente pelo tronco encefálico. Porém, a estimulação elétrica do hipocampo, núcleo caudado e tálamo, além da estimulação da formação reticular pontina, aumentam de forma significativa a duração da IT em coelhos (KLEMM, 1965). Registros eletroencefalográficos também sugerem que, durante a IT, a ativação dos neurônios da formação reticular bulbar e pontina inibem motoneurônios da medula espinhal, inibindo esses neurônios e causando efetivamente a inibição dos movimentos observados durante o comportamento (KLEMM, 1971a)

Ainda, conforme revisado por KLEMM (1989), diversos sistemas de neurotransmissores parecem exercer diferentes influências sobre esse comportamento. A administração sistêmica tanto de antagonistas dopaminérgicos (d1 e d2), quanto de agonistas colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos), noradrenérgicos ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), GABAérgicos, peptidérgicos e opióides, aumentam a duração da IT em mamíferos (KLEMM, 1989). Uma possível explicação, proposta por Klemm (1989), para essa grande variedade de neurotransmissores atuando sobre esse comportamento seria que esses neurotransmissores estariam agindo em diferentes circuitos importantes para o desencadeamento da IT, como por exemplo, modulação do sistema sensorial (na periferia ou tálamo), efetores motores da medula espinhal, ou processos motores dos núcleos da base (KLEMM, 1989). Ou seja, é importante notar que mesmo que apenas o tronco encefálico seja necessário para a indução da IT, diversas outras estruturas encefálicas e sistemas de neurotransmissão devem estar envolvidos em sua modulação.

Entretanto, pouco se conhece o papel de processos corticais, límbicos e mesencefálicos, classicamente envolvidos com comportamentos defensivos sobre a IT. A investigação do papel destas estruturas no controle da IT poderia evidenciar componentes emocionais/cognitivos

envolvidos no comportamento defensivo em resposta a situações extremas. Grandes lesões prosencefálicas não impedem a expressão da imobilidade tônica em galinhas, mas parecem aumentar significativamente a sua duração (GENTLE, JONES e MAGUIRE, 1985). De maneira semelhante, lesões do Arcopallium de galinhas (parte do complexo amigdalóide das aves) promoveu um aumento significativo da IT nestes animais (MASER, KLARA e GALLUP, 1973).

Regiões prosencefálicas de mamíferos, também envolvidas com a expressão de comportamentos defensivos, parecem ter um papel na modulação da IT. Injeções bilaterais do agonista colinérgico carbacol ou muscimol (agonista GABA_A) na amígdala, estrutura límbica envolvida em respostas ao medo inato e condicionado em roedores (GROSS e CANTERAS, 2012), provocaram a diminuição da duração de imobilidade tônica em cobaias (LEITE-PANISSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002). Deste modo, regiões prosencefálicas podem atuar modulando a duração do episódio de IT em vertebrados.

Também é importante mencionar o papel do hipocampo no controle e modulação dos comportamentos defensivos. Em mamíferos, além do importante papel na codificação da memória espacial e emocional (EICHENBAUM, 1996; GROSS e CANTERAS, 2012), regiões hipocámpais também integram circuitos que modulam a expressão de respostas defensivas não-condicionadas (PENTKOWSKI *et al.*, 2006). Em coelhos submetidos à IT, lesões hipocámpais aumentam significativamente a duração dos episódios de imobilidade (WOODRUFF, HATTON e MEYER, 1975). Também em coelhos, foram observadas mudanças nos padrões de EEG hipocámpal dos animais em locomoção e durante a IT (HARPER, 1971).

Em aves, não existem estudos sobre o papel do hipocampo na expressão de comportamentos defensivos não condicionados. Dados publicados por nosso laboratório mostraram que pombos expostos a um ambiente enriquecido, além de apresentarem maiores durações de IT quando comparados a animais alojados em isolamento, também apresentam maior neurogênese na região do hipocampo (MELLEU *et al.*, 2015). Entretanto, não é possível estabelecer se o aumento da neurogênese

é causa direta do aumento das durações de IT, ou se os dois eventos acontecem em paralelo nesses animais.

Distritos hipotalâmicos, como o hipotálamo lateral, também parecem participar tanto do controle da IT quanto da expressão de outros comportamentos de defesa (DE OLIVEIRA, HOFFMANN e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1997a; GROSS e CANTERAS, 2012). Ainda, o hipotálamo também parece aumentar sua atividade durante a IT uma vez que os níveis de CRH (hormônio liberador de corticotrofinas) se elevam durante este comportamento, acarretando também em um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona em coelhos e cobaias (FARABOLLINI, DI PRISCO e CARLI, 1981; DE OLIVEIRA, HOFFMANN e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1997b). Esse aumento dos níveis de corticosterona, está normalmente associado com episódios de estresse e, também foi observado em pombos após episódios de imobilidade tônica (MELLEU *et al.*, 2011).

Estruturas mesencefálicas integrativas, como a substância cinzenta periaqueductal (PAG), também parecem ser ativadas durante a IT em cobaias (VIEIRA, MENESCAL-DE-OLIVEIRA e LEITE-PANISSI, 2011). A função da PAG, pelo menos em mamíferos, é bem conhecida, tendo sido extensivamente estudada em roedores. Ocupando a região adjacente ao aqueduto cerebral, a PAG, apresenta uma organização colunar e tem o papel de integrar informações de estímulos potencialmente nocivos descendentes e ascendentes de modo a desencadear respostas defensivas apropriadas (GROSS e CANTERAS, 2012). A estimulação elétrica da PAG de roedores induz a expressão de comportamentos defensivos, como fuga e luta. O efeito da estimulação elétrica dessa região depende não apenas da localização do estímulo mas também da intensidade do estímulo elétrico (GRAEFF, 1990). Essa circuitaria mesencefálica de defesa parece ser um atributo também presente em aves. O mesencéfalo de aves apresenta regiões comparáveis à PAG de mamífero. O GCt, também localizado na região periaqueductal do mesencéfalo das aves, e núcleo intercolicularis, apresentam características anatômicas, neuroquímicas e hodológicas que levam a hipótese de que tais regiões do encéfalo das aves possam ser comparáveis à PAG de mamíferos (KINGSBURY *et al.*, 2011). Essas regiões, da mesma maneira que ocorre

com a substância periaqueductal de mamíferos (CANTERAS e GOTO, 1999), parecem ser ativadas quando passeriformes são expostos a situações de predação simulada (COMOLI, RIBEIRO-BARBOSA e CANTERAS, 2003; KINGSBURY *et al.*, 2011).

Estruturas mesencefálicas e límbicas de mamíferos como a PAG, amígdala, hipotálamo e hipocampo parecem ser comparáveis, baseado em sua hodologia, embriologia e neuroquímica a regiões mesencefálicas e prosencefálicas de aves (REINER, YAMAMOTO e KARTEN, 2005). Contudo, de uma maneira geral, o envolvimento destas estruturas no controle de comportamentos de defesa em aves ainda não são conhecidos e, especificamente, o substrato neural responsável pela expressão da imobilidade tônica não foi investigado nessa classe de vertebrados.

Em mamíferos, grande número dos trabalhos dedicados ao estudo do papel de estruturas encefálicas no controle de comportamentos defensivos, utiliza-se da detecção imunoistoquímica de produtos de genes de resposta imediata como a c-Fos (CANTERAS e GOTO, 1999; KOLLACK-WALKER *et al.*, 1999; LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2001; COMOLI, RIBEIRO-BARBOSA e CANTERAS, 2003; LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006; MARTINEZ *et al.*, 2011). A modificação da expressão de c-Fos está diretamente relacionada com padrões de atividade neural (DRAGUNOW e FAULL, 1989), tornando sua detecção após um estímulo controlado uma ferramenta interessante para a avaliação de regiões encefálicas envolvidas na resposta ao estímulo (HOFFMAN *et al.*, 1992; HERRERA e ROBERTSON, 1996). A avaliação da expressão de genes de resposta imediata após estímulos defensivos também já foi utilizada em aves (BRITO, BRITTO e FERRARI, 2006; 2011; KINGSBURY *et al.*, 2011). Porém, com exceção de um trabalho em cobais (VIEIRA, MENESCAL-DE-OLIVEIRA e LEITE-PANISSI, 2011), esta ferramenta ainda não foi explorada afim de identificar regiões encefálicas ativadas pela indução da imobilidade tônica.

Estruturas encefálicas ativadas durante a imobilidade tônica, também podem ser responsáveis pelo controle de fenômenos fisiológicos sistêmicos que ocorrem durante este comportamento. Diversos estudos fisiológicos preocuparam-se em avaliar alterações de pressão arterial, frequência cardíaca, frequência respiratória e de temperatura promovidas

pela IT, principalmente em mamíferos (CARLI, 1974) e aves (NASH, GALLUP e CZECH, 1976), e em menor número, em répteis (HOAGLAND, 1928) e peixes (DAVIE, FRANKLIN e GRIGG, 1993). Coelho submetidos à IT apresentaram um aumento significativo da frequência cardíaca durante os episódios de imobilidade quando comparados a animais em repouso (CARLI, 1974). Esse aumento da frequência cardíaca durante a IT também pode ser observado em codornas (VALANCE *et al.*, 2008) e em galinhas (NASH, GALLUP e CZECH, 1976; GENTLE, JONES e WOOLLEY, 1989). Estes estudos averiguaram que apesar de existir um incremento da frequência cardíaca nos minutos iniciais da IT, o ritmo de ECG diminui com o tempo em imobilidade, alcançando níveis significativamente abaixo da linha de base (amostragem dos padrões de ECG antes da indução da IT). Porém, outros estudos em coelhos reportam uma diminuição da frequência cardíaca desde a indução da IT, e que dura até o seu término (HATTON *et al.*, 1979; GIANNICO *et al.*, 2014).

A IT também é acompanhada de alterações da pressão arterial e frequência respiratória. Durante episódios de imobilidade tônica, coelhos apresentaram um aumento duradouro da pressão arterial (CARLI, 1974). Em coelhos, um aumento da pressão arterial foi observado apenas no início da indução da IT, apresentando uma subsequente hipotensão duradoura, retornando aos níveis basais após a IT (HATTON *et al.*, 1979). Surpreendentemente, a denervação dos barorreceptores dos seios carotídeos, não impede o aparecimento da hipotensão, mas é capaz de abolir o retorno da pressão aos níveis basais (HATTON *et al.*, 1979). A frequência respiratória de galinhas também parece aumentar durante os minutos iniciais da IT com uma subsequente diminuição (NASH, GALLUP e CZECH, 1976). Todavia, esse aumento inicial não pode ser observado em iguanas (*Iguana iguana*) (PRESTRUDE e CRAWFORD, 1970).

Modificações da temperatura corporal durante a imobilidade tônica foram estudadas principalmente em aves. Galinhas submetidas à imobilidade tônica aumentam a temperatura corporal interna, diminuindo porém a temperatura cloacal. (NASH, GALLUP e CZECH, 1976; EDDY e GALLUP, 1990). Em pombos, um aumento da atividade do músculo peitoral pôde ser observado em animais em imobilidade tônica

(HOHTOLA, 1981). Isso parece sugerir uma ativação de mecanismos termogênicos promovida pela IT nesses animais.

O pequeno número de trabalhos fisiológicos disponíveis na literatura parece conter dados contraditórios quanto às mudanças cardiorrespiratórias durante a imobilidade tônica. Enquanto alguns estudos apontam para incrementos das frequências cardíaca e respiratória (CARLI, 1974), outros mostram uma diminuição destes parâmetros (GIANNICO *et al.*, 2014). O mesmo pode ser dito para investigações da pressão arterial (CARLI, 1974; HATTON *et al.*, 1979; DAVIE, FRANKLIN e GRIGG, 1993). Não podemos portanto, concluir se essas diferenças são devido às diferentes metodologias empregadas nos estudos ou a características espécie-específicas dos grupos utilizados nestas investigações. Também é importante mencionar que o desenho experimental presente nestes estudos não leva em conta o estresse de manipulação realizado antes e durante a indução da IT. A manipulação dos animais é parte necessária para a indução da IT, e foi mostrado que o ato de apenas manipular um animal pode promover mudanças térmicas (EDGAR *et al.*, 2013; BITTENCOURT, MELLEU e MARINO-NETO, 2015) e cardiovasculares (CABANAC e AIZAWA, 2000) importantes, portanto, se torna necessário separar as modificações fisiológicas que são fruto de processos desencadeados durante a IT daqueles que acontecem em outras situações estressantes como a manipulação.

O comportamento de IT é acompanhado, em todas as espécies estudadas, por diversas reações fisiológicas, que por sua vez, devem ser controladas por processos neurais agindo de modo a orquestrar esse fenômeno. Poucos estudos fisiológicos, etológicos e neuroanatômicos foram realizados com a intenção de elucidar as diferenças e semelhanças da IT com outros processos de inibição comportamental (e.g. *freezing*) (KLEMM, 2001). Está claro que a literatura disponível não nos permite fazer comparações robustas entre a IT e outras imobilidades observadas em resposta à estímulos potencialmente nocivos. É importante mencionar que não existem dados suficientes que permitam sequer a comparação do comportamento de imobilidade tônica entre as diversas espécies que a exibem. Isto é, o melhor entendimento dos processos fisiológicos e dos circuitos neuroanatômicos se faz necessário para permitir a afirmação de

que todas as imobilidades tônicas observadas são, de fato, o mesmo comportamento, e que este foi conservado através da história evolutiva dos vertebrados. O estudo de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse ou a situações que possam ser consideradas como ameaçadoras para diversas espécies de vertebrados, pode ajudar a evidenciar processos centrais conservados que atuam no controle e execução desses comportamentos.

Pombos constituem um grupo particularmente interessante para este tipo de trabalho. Além da riqueza de dados neuroanatômicos (REINER e KARTEN, 1982; ATOJI, YAMAMOTO e SUZUKI, 2001; BINGMAN *et al.*, 2003; REINER *et al.*, 2004), comportamentais (WATANABE, SAKAMOTO e WAKITA, 1995; DE SOUZA *et al.*, 2009; MELLEU *et al.*, 2015) e até de um conectoma da espécie (SHANAHAN *et al.*, 2013), pombos são comumente encontrados em ambientes urbanos, convivendo sem grandes influências da proximidade com humanos e outros predadores.

Ambientes urbanos são mais heterogêneos e estão em constante mudança devido a ação antrópica (MØLLER, 2009). Além disso, apresentam altas densidades de humanos e de predadores não nativos (e.g. gatos e chachorros) (PARTECKE, SCHWABL e GWINNER, 2006). Estes ambientes possuem menor diversidade biológica animal, uma vez que oferecem desafios fisiológicos e comportamentais, que não são suportados pela maioria das espécies (MCKINNEY, 2002). A colonização bem sucedida de ambientes urbanizados por uma espécie está relacionada a dois fatores principais: 1) Onivoria e flexibilidade de comportamentos de forrageio e 2) adaptações fisiológicas que confirmam alto limiar de medo e repostas menos intensas ao estresse (MØLLER, 2009).

Pombos (*C. livia*), como espécie, parecem extremamente bem adaptados a esse ambiente, o que sugere que esse animais apresentem adaptações do sistema de controle de comportamentos defensivos que permitam a eles ocuparem de maneira bem sucedida ambientes potencialmente aversivos à outras espécies. Adaptações do sistema defensivo e que favorecem a ocupação de regiões urbanizadas são pouco conhecidos (DIAMOND, 1986). O entendimento de tais mecanismos é extremamente importante para a ecologia urbana, todavia, investigações

sobre o tema foram principalmente realizadas em animais domésticos (objetos de extrema seleção artificial) (CALANDREAU *et al.*, 2011; CALANDREAU *et al.*, 2013) ou animais silvestres apenas tolerantes a vida em ambientes urbanos (BONIER, MARTIN e WINGFIELD, 2007; KINGSBURY *et al.*, 2011). Nesse sentido, o estudo do comportamento de imobilidade tônica em pombos, dos fenômenos fisiológicos que o acompanham e de seu controle central, pode conferir um melhor entendimento das reações de defesa em aves e em outros vertebrados, bem como, fornecer evidências que possam ajudar a elucidar parte do sucesso adaptativo dessa espécie cosmopolita.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo descrever o comportamento de imobilidade tônica em pombos (*C. livia*), bem como investigar modificações fisiológicas e neuroanatômicas relacionadas a este comportamento.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS

1) Descrever e detalhar o comportamento de imobilidade tônica de pombos.

1-I. Descrever o comportamento individual de pombos submetidos ao teste de imobilidade tônica, pormenorizando modificações comportamentais no tempo.

1-II. Averiguar as características populacionais da imobilidade tônica em pombos.

1-III. Estudar a influência do aprendizado e habituação sobre a imobilidade tônica de pombos.

2) Descrever e avaliar os efeitos da imobilidade tônica em pombos sobre parâmetros fisiológicos sistêmicos nesses animais.

2-I. Estudar os efeitos da imobilidade tônica sobre a temperatura corporal central e temperatura da superfície corporal de pombos.

2-II. Averiguar os efeitos da imobilidade tônica sobre a parâmetros cardíacos em pombos.

3) Descrever, em pombos, os circuitos encefálicos envolvidos no controle da imobilidade tônica, bem como, no controle central dos parâmetros fisiológicos a ela associados.

3-I. Avaliar a ativação de áreas do mesencéfalo de pombos submetidos à IT por meio da detecção imunoistoquímica de c-Fos, buscando regiões comparáveis à PAG de mamíferos.

3-II. Avaliar a ativação de áreas límbicas e sensoriais do encéfalo de pombos submetidos à IT por meio da detecção imunoistoquímica de c-Fos.

3-III. Verificar a ativação de distritos hipotalâmicos por meio da detecção imunistoquímica de c-Fos e de CRH no encéfalo de pombos submetidos à IT.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados pombos adultos (seis meses a dois anos), machos e fêmeas, pesando entre 350g e 500g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram reproduzidos pelo Biotério Central e alojados em viveiros coletivos abrigando de 12 a 30 pombos até o momento de sua transferência para o Biotério setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada do departamento de ciências fisiológicas (CCB/UFSC).

Após a chegada no Biotério setorial os animais foram alojados em gaiolas individuais (50cm x 50cm x 50cm) forradas com jornal, com acessos visual às gaiolas vizinhas e com livre acesso a água filtrada e ração (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda, Itajaí, SC). O ambiente teve a temperatura controlada através de um aparelho de ar condicionado e foi mantida em 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). A iluminação proporcionada por lâmpadas fluorescentes foi controlada por um *timer* mantendo o ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acessas às 7:00 horas e desligadas às 19:00 horas).

Três vezes por semana as gaiolas eram limpas, os forros de papel-jornal trocados e os comedouros e bebedouros limpos e reabastecidos. Os animais foram aclimatados às condições de alojamento do biotério setorial por no mínimo 7 dias antes de que fossem submetidos a qualquer procedimento experimental. Todos os procedimentos experimentais e protocolos aqui descritos foram aprovados pelo comitê de ética para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC), sob os números 23080.037851/2010-41 e 117/CEUA/PRPe/2008.

3.2. IMOBILIDADE TÔNICA (IT)

Um a um, os animais eram retirados de seus respectivos ambientes, cobertos por um pano escuro e transportados até uma sala iluminada artificialmente por uma luz branca. Dentro da sala, o pano foi retirado e o

animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre um suporte em formato de calha, localizado no centro de uma arena cilíndrica (80cm de altura por 30cm de altura) (Fig. 1 A, B). Ainda em decúbito dorsal, os animais foram contidos manualmente tendo suas asas levemente imobilizadas e suas cabeças cobertas pelas mãos do experimentador (Fig. 1 C). Esta contenção teve a duração de aproximadamente 30 segundos e após esse período os animais foram liberados. A resposta de imobilidade de cada animal foi registrada em vídeo por meio de uma webcam (Microsoft vx200) conectada a um microcomputador para auxiliar a quantificação quanto à sua duração em segundos e número de contenções necessárias para desencadear a resposta (Fig. 1 D). Apenas respostas de mais de 10 segundos foram consideradas como válidas para o teste. Cada animal foi submetido ao máximo de cinco contenções (tentativas) para obter a imobilidade tônica superior a 10 segundos (GALLUP e RAGER, 1996). Os animais que não apresentaram imobilidade após essas cinco tentativas foram considerados refratários ao teste. Ao final de cada teste, a arena era limpa com álcool 70% e toalhas de papel, o forro de tecido das calhas era removido e trocado, preparando a arena para um novo teste com o animal seguinte.

3.3. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

3.3.1. Descrição qualitativa

Para realização da descrição qualitativa da imobilidade tônica em pombos, foram analisados os registros em vídeos de mais de 120 testes de IT realizados em um período de 2009 a 2013 conforme descritos na seção 3.2. Também foram utilizadas as observações feitas simultaneamente durante a realização dos testes. A descrição do comportamento de IT foi realizada e registrada manualmente pelo mesmo experimentador.

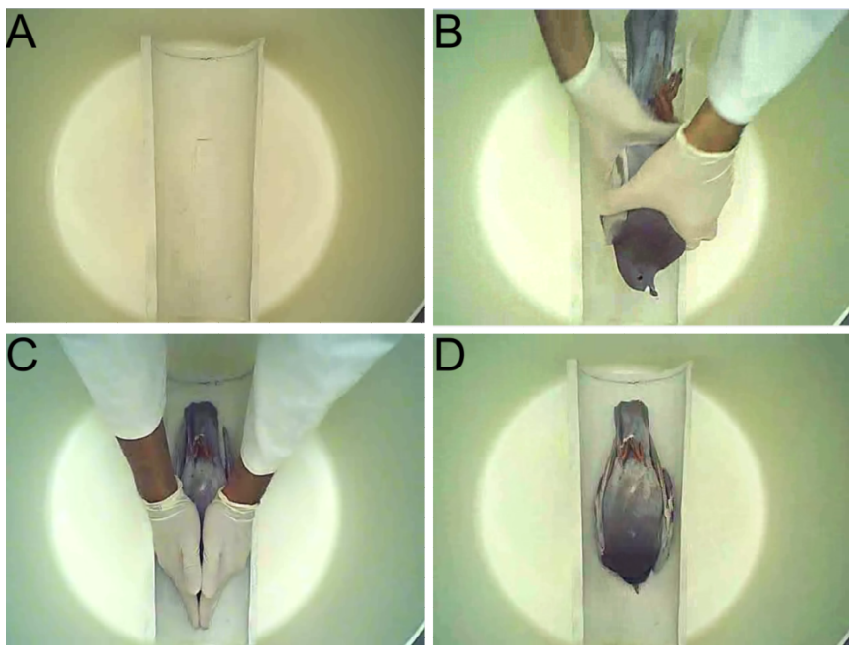


Figura 1. Teste de imobilidade tônica. A) Arena com suporte para realização da IT. B) Introdução do animal na arena. C) Contenção manual do animal. D) Animal em decúbito dorsal expressando o comportamento de imobilidade tônica

3.3.2. Caracterização e quantificação dos movimentos palpebrais durante a IT

Foram utilizados 14 pombos (4 fêmeas e 10 machos) cujas imobilidades excederam 600 segundos (10 minutos). Apenas os pombos que apresentaram o posicionamento rotacionado da cabeça puderam ser utilizados nessa análise (Ver resultados seção 4.1.2). Os primeiros 10 minutos dos vídeos da IT desses animais foi analisado utilizando o software Ethowatcher, desenvolvido em nosso laboratório (CRISPIM JR *et al.*, 2012 ; disponível em: www.etowatcher.ufsc.br). As frequências de movimentos palpebrais rápidos, lentos e olhos fechados foi quantificada e segmentada em intervalos de 1 minuto. Um movimento palpebral, ou

piscada, foi considerado rápido quando sua duração era menor que 600ms. Por sua vez, piscadas lentas foram consideradas aquelas que tinham duração entre 1 e 2,5s. Foram considerados olhos fechados quando as pálpebras se encontravam completamente cerradas por intervalos maiores que 1,5s (Ver resultados seção 4.1.2).

As frequências dos diferentes movimentos das pálpebras em cada um dos períodos de 1 minuto foi plotada em um gráfico pelo tempo. O dados de frequência absoluta foram transformados em frequências relativas, visando demonstrar a predominância de cada um dos tipos de movimentos das pálpebras nos diferentes momentos da IT. O cálculo para extração da frequência relativa se deu segundo a fórmula:

$$FR_{(Tx)} = \frac{FA_{(Tx)} \cdot 100}{FP_{(Total)}}$$

onde FR é a frequência relativa de um movimento palpebral em um determinado tempo (Tx) e FA é a frequência absoluta do movimento palpebral no período (Tx) e FP(total) é a frequência absoluta de todos os movimentos palpebrais na totalidade do tempo de registro. Também foram extraídos dados da latência para o aparecimento do primeiro evento de cada movimento palpebral.

3.3.3. Distribuição da IT na coorte de pombos

Para avaliar a variabilidade de parâmetros de duração e tentativas no teste de imobilidade tônica na coorte de pombos utilizada em experimentos comportamentais em nosso laboratório, foram utilizados 123 animais, machos (n=89) e fêmeas (n=34), em idade reprodutiva, oriundos do biotério central (BC/UFSC) e alojados durante sete dias de adaptação no biotério setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada. Esses animais foram aleatoriamente selecionados e transportados até o centro de ciências fisiológicas por funcionários do biotério central. As análises populacionais foram feitas sobre as imobilidades tônicas realizadas no período de 2010 a 2014 segundo o protocolo descrito na seção 3.2.

Nenhuma seleção *a priori* quanto os parâmetros da IT (duração e tentativas) foi realizada para a escolha dos animais para análise sendo os únicos requisitos utilizados para a escolha dos animais, a obrigatoriedade de sete dias de adaptação ao biotério setorial e que esses animais não houvessem sido submetidos a outros procedimentos laboratoriais prévios (e.g. procedimentos cirurgicos, injeção de fármacos, outros testes comportamentais e etc.). Também não existe por parte do BC/UFSC qualquer tipo de seleção reprodutiva dos pombos utilizados em atividade de pesquisa na universidade.

O dados de duração em segundos e número de tentativas foram plotados em histogramas e testados quando a sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram extraídos os dados de porcentagem e frequências de durações e número de tentativas dentro destas distribuições. Foi realizada uma análise de correlação entre os dados de duração e tentativas utilizando o teste de correlação de Spearman. Também investigamos dentro da coorte a possível influência do sexo dos animais sobre a duração de IT. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para avaliar as diferenças entre os sexos quando à duração da IT.

3.3.4. Experimentos de habituação

Para a realização dos experimentos de habituação 13 pombos (4 fêmeas e 9 machos) foram submetidos a 4 testes de imobilidade tônica em intervalos de 7 dias. Após cada um dos testes, os animais foram retornados às gaiolas do biotério setorial e não foram manipulados, com exceção dos dias de manutenção e limpeza do biotério. Outros 8 pombos (2 fêmeas e 6 machos) foram submetidos ao mesmo protocolo de IT, porém com 24 horas de intervalo entre o experimentos. Um outro grupo de 8 pombos (4 fêmeas e 4 machos) foi submetido a 4 testes de imobilidade tônica, porém uma nova contenção e IT era realizada logo após o momento em que os animais terminavam espontaneamente a imobilidade tônica. O tempo aproximado entre o fim de uma IT e a contenção subsequente foi de aproximadamente 30 segundos.

3.4. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA

3.4.1. Temperatura corporal superficial

Cinco pombos (2 fêmeas e 3 machos), aclimatados às condições de laboratório por sete dias foram retirados da gaiola casa e foram individualmente transportados para uma sala separada do biotério (sala experimental) contendo a gaiola experimental que consistia em uma arena retangular de polietileno (45cm de altura X 30 cm largura X 32cm profundidade) de cor branca, com exceção da face frontal, de vidro transparente para possibilitar o registro em vídeo do experimento e com a parte superior coberta com uma tela de arame. As gaiolas continham água filtrada e comida *ad libitum*. Os animais foram adaptados por 24 horas ao ambiente experimental antes da realização do experimento. Com exceção da modificação da arena e do período de adaptação prévia, o teste de imobilidade tônica se seguiu segundo o descrito na seção 3.2.

Durante o teste de IT, o período em que os animais permaneciam em imobilidade foram fotografado a intervalos de 30s utilizando uma câmera termográfica digital (ThermaCam B2, FLIR Systems, Wilsonville, Oregon, USA), calibrada para a detecção de radiação infravermelha equivalente a uma faixa entre -20°C e 100°C. Este sistema é capaz de registrar imagens fotográficas sobrepondo dados de emissão de radiação infravermelha, fornecendo um mapa térmico da fotografia. As imagens registradas desta maneira foram descarregadas em um microcomputador e analisadas utilizando o software fornecido pelo fabricante (FLIR Tools Versão 4.1). As regiões de maior dispersão térmica foram avaliadas e tiveram suas temperaturas avaliadas em todas as imagens termográficas. Essas regiões foram: 1) Anel orbital. 2) Porção ventral das asas/lateral do corpo. 3) Patas 4) Região medial do peitoral (Fig. 7 A). As temperaturas de cada uma das regiões foram aferidas a partir do ponto de maior temperatura em cada área.

3.4.1.1. Análise estatística

Os dados de temperatura foram plotados em um gráfico em relação ao tempo e ajustados utilizando um modelo linear com o auxílio do software Statistica 8. O modelo linear (temperatura vs tempo) foi então avaliado pelo teste de correlação não-paramétrico de Spearman utilizando o mesmo software. Os valores de "p" considerados como significantes foram os menores de 0,05.

3.4.2. Temperatura corporal interna

Foram implantados sensores telemétricos para aferência de temperatura, por meio de cirurgia, no interior da cavidade celomática de 19 pombos de ambos os sexos (12 machos e 7 fêmeas). Os sensores telemétricos miniaturizados (G2 E-Mitter, Starr Life sciences, Bend, Oregon, USA) possuem 15,5 mmx6,5 mm e 1,1g de peso. Estes sensores não utilizam baterias extras sendo alimentados por indução elétrica pela placa receptora (ER-4000, Mini-Mitter) posicionada à uma distância máxima de 12 cm (dados do fabricante). Este setup é capaz de registrar temperaturas de 37°C à 45°C conforme a calibração realizada em nosso laboratório (BITTENCOURT, MELLEU e MARINO-NETO, 2015).

3.4.2.1. Cirurgia

Após sete dias de aclimação ao biotério setorial do laboratório de neurofisiologia comparada, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina (0,33 mg/kg, i.p.) e Xilazina (0,66 mg/Kg, i.p.) e os sensores foram implantados através de uma incisão sobre a pele e músculo medindo 2,5 mm do lado direito do abdômem, 2 mm posterior à borda do esterno. Os sensores foram colocados na cavidade celomática e fixados ao músculo abdominal utilizando um fio de nylon. As incisões do músculo e pele foram então suturadas utilizando linha para sutura absorvível. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob uma manta elétrica coberta por papel filme mantendo a temperatura do animal entre 37°C e 39°C durante a cirurgia. Após a cirurgia os animais foram tratados com antibiótico (Baytrill

- 5% enrofloxacin, Bayer; 0,1 mg/Kg, s.c), e analgésico (Ketofen - Cetoprofen 1%, Merial; 0,2 mg/Kg, s.c) e o local de incisão tratado diariamente com Furacin (Nitrofurazolo, Mantecorp) por 5 dias. Foi resguardado o período de 10 dias de recuperação antes da utilização dos animais em procedimentos experimentais.

3.4.2.2. Procedimento experimental

Após o período de recuperação, os pombos eram individualmente transportados para uma sala separada do biotério contendo a gaiola experimental que consistia em uma arena retangular de polietileno (45 cm de altura X 30 cm largura X 32 cm profundidade) de cor branca, com exceção da face frontal, de vidro transparente para possibilitar o registro em vídeo do experimento e com a parte superior coberta com uma tela de arame. O Receptor/Energizador (ER-4000, Mini-Mitter) para os sensores telemétricos foi acoplado ao assoalho externo da gaiola experimental e ligado a um microcomputador para o registro dos sinais de temperatura e actimetria utilizando o software VitalView (Starr Life sciences, Bend, Oregon, USA) com uma taxa de aquisição de 1 Hz.

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, Controle e IT. Os animais de ambos os grupos foram adaptados à gaiola experimental, contendo água e ração *ad libitum*, por 24 h antes da realização do experimento. Os animais pertencentes ao grupo controle foram apenas manipulados por 1 minuto dentro da gaiola experimental, sem a indução de IT enquanto o grupo experimental (IT) foi submetido à imobilidade tônica. Com exceção da modificação da gaiola experimental e do período de aclimação de 24 h, a realização do experimento de imobilidade tônica se deu segundo o descrito na seção 3.2.

Os registros de temperatura e actimetria foram realizados durante todo o período em que os animais se encontravam dentro do ambiente de registro e se estenderam por mais duas horas após a contenção ou imobilidade tônica, gerando registros de aproximadamente 26 horas para cada animal.

3.4.2.3. Análise estatística

Os dados de temperatura interna e actimetria de cada um dos animais foram exportados do software de registro em formato de texto ASCII (American Standard Code for Information Interchange) e processados através de um algoritmo próprio utilizando o software MatLab® (versão 7, The MathWorks, inc. 2010) para extração da temperatura média de linha de base, médias de temperatura em períodos de 10 minutos a partir da contenção, tempo de latência para o pico de temperatura e temperatura média em cada um dos períodos da imobilidade tônica.

Todos os dados foram previamente testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e quanto à homocedasticidade (teste de Levene). Para a análise dos dados de temperatura interna foram utilizadas as médias de temperatura dos 30 segundos do início, 30 segundos intermediários e os 30 segundos finais da IT de cada um dos animais, bem como, a média de 30 segundos de 5, 30 e 60 minutos após o término da IT. A temperatura da linha de base foi então subtraída da temperatura média de cada período (T_x) segundo a fórmula:

$$\Delta^{\circ}\text{C} = T^{\circ}\text{C}_{(T_x)} - T^{\circ}\text{C}_{(\text{Basal})}$$

resultando na variação média de temperatura em $^{\circ}\text{C}$ em cada um dos períodos.

Para a análise de comparação entre os grupo no tempo após a manipulação/contenção, foram utilizadas as médias de 30 segundos de registro de temperatura dos animais em períodos de 10 minutos a partir da contenção (para os animais do grupo controle) ou indução da imobilidade tônica (para os animais do grupo IT). Para averiguação das diferenças destes dados foi utilizada uma ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de pós-teste de Duncan.

Os dados de temperatura média nos diferentes períodos da IT foram analisados utilizando uma ANOVA de uma via com medidas repetidas para averiguar diferenças entre a temperatura de linha de base e os demais períodos da IT seguida de pós-teste de Duncan. As diferenças

no tempo de latência para o pico de temperatura foi averiguada utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Statistica 8 e foram aceitos como significantes valores de "p" inferiores a 0,05.

3.4.3. Frequência cardíaca

Sensores telemétricos para aferência de frequência cardíaca (FC) foram cirurgicamente implantados na cavidade celomática de 16 pombos de ambos os sexos (10 machos e 6 fêmeas). Estes sensores (G2-HR E-Mitter, Starr Life sciences, Bend, Oregon, USA) são capazes de transmitir dados da média de FC para uma placa receptora (ER-4000, Mini-Mitter) localizada a até 12 cm de distância do animal. De maneira semelhante aos sensores de temperatura, os sensores de FC não utilizam baterias, sendo alimentados por indução elétrica pela placa receptora. Suas medidas são semelhantes aos utilizados para as aferências de temperatura corporal (15,5 mmx6,5 mm) porém, possuem uma peso de 1,3 g devido a presença dos eletrodos externos.

3.4.3.1. Cirurgia

Os procedimentos cirúrgicos se assemelham aos descritos na seção anterior. Após o período de aclimação às condições de laboratório os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina (0,33 mg/kg, i.p.) e Xilazina (0,66 mg/Kg, i.p.) e os sensores foram implantados através de uma incisão sobre a pele e músculo medindo 2,5 mm do lado direito do abdômem, 2 mm posterior à borda do esterno. Os sensores foram posicionados dentro da cavidade celomática. Os cabos dos eletrodos foram então transfixados pelo tecido muscular nas bordas da incisão através de duas pequenas perfurações, sendo os cabos dos eletrodos positivos e negativos transpassados pelos lados direito e esquerdo, respectivamente. Deste modo, os sensores permanecem fixados em posição dentro da cavidade celomática. A seguir, a incisão do tecido muscular foi fechada utilizando linha de sutura absorvível. Foi realizada uma pequena incisão (não superior à 1 mm) na pele sob o externo, 2 cm à direita da linha média.

Por essa incisão foi introduzido um trocater de 1,5 mm de diâmetro interno por baixo da pele até a região da incisão abdominal. O cabo do eletrodo positivo foi levado então até o ponto de entrada do trocater e fixado abaixo da pele no músculo utilizando um fio de nylon. Outra incisão foi feita na pele do lado esquerdo do corpo dos animais, logo acima das costelas. De maneira semelhante, o trocater era introduzido e o cabo do eletrodo negativo fixado formando um ângulo de aproximadamente 45° entre os eletrodos. As incisões laterais e abdominal sobre a pele foram suturadas utilizando linha de sutura absorvível.

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado sob uma manta elétrica coberta por papel filme mantendo a temperatura do animal entre 37°C e 39°C durante a cirurgia. Após a cirurgia os animais foram tratados com antibiótico (Baytrill - 5% enrofloxacina, Bayer; 0,1 mg/Kg, s.c), e analgésico (Ketofen - Cetoprofen 1%, Merial; 0,2 mg/Kg, s.c) e o local de incisão tratado diariamente com Furacin (Nitrofurazolo, Mantecorp) por 5 dias. Foi resguardado um período de 10 dias de recuperação antes da utilização dos animais em procedimentos experimentais.

3.4.3.2. Procedimento experimental

Após o período de recuperação os animais foram divididos em dois grupos experimentais Imobilidade tônica e grupo controle. Os procedimentos experimentais se deram de maneira semelhante aos descritos para a aferência da temperatura. Os animais foram individualmente transportados para uma sala separada do biotério contendo a gaiola experimental que consistia em uma arena retangular de polietileno (45 cm de altura X 30 cm largura X 32 cm profundidade) de cor branca, com exceção da face frontal, de vidro transparente para possibilitar o registro em vídeo do experimento e com a parte superior coberta com uma tela de arame. O Receptor/Energizador (ER-4000, Mini-Mitter) para os sensores telemétricos foi acoplado ao assoalho externo da gaiola experimental e ligado a um microcomputador para o registro da FC média utilizando o software VitalView (Starr Life sciences, Bend, Oregon, USA) com uma taxa de aquisição de 1Hz. Os animais de ambos os grupos foram ambientados à gaiola de registro por 24 horas antes do início do

experimentos. Durante este período os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração.

Após a ambientação os animais do grupo IT foram submetidos ao teste de imobilidade tônica conforme o descrito na seção 3.2. Os animais pertencentes ao grupo controle foram apenas contidos manualmente dentro do ambiente de registro, sem desencadear o comportamento de imobilidade tônica. Todos os registros de FC foram realizados durante todo o período em que os animais se encontravam na gaiola de registro (incluindo as 24 horas de ambientação) e se seguiram por mais duas horas após a contenção/IT, gerando um registro com aproximadamente 26 horas para cada um dos animais.

3.4.3.3. Análise estatística

Os dados de frequência cardíaca de cada um dos animais foram exportados do software de registro em formato de texto ASCII (American Standard Code for Information Interchange) e processados através de um algoritmo próprio utilizando o software MatLab® (versão 7, The MathWorks, inc. 2010) para extração da FC de linha de base, médias de FC em períodos de 10 minutos a partir da contenção, tempo de latência para o pico de FC e retorno à linha de base e FC média em cada um dos períodos da imobilidade tônica.

Todos os dados foram previamente testados quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e quanto à homocedasticidade (teste de Levene). A frequência cardíaca basal foi determinada para cada animal utilizando uma média da FC em período de 10 minutos anteriores ao teste de IT.

As médias de FC nos diferentes períodos da IT foram analisadas utilizando ANOVA de uma via com medidas repetidas para averiguar diferenças entre a FC de linha de base e os demais períodos da IT seguido por pós-teste de Duncan. Para averiguação das diferenças FC em comparação à FC basal e os períodos de 10 minutos após a contenção/manipulação e as diferenças entre as Frequências cardíacas do grupo controle e IT, foi utilizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do pós-teste de Duncan. As diferenças entre os grupos

controle e IT quanto à latência para o pico e queda de FC foram averiguadas utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney).

Todos os teste estatísticos foram realizados com o auxílio do software Statistica 8 e foram aceitos como significantes valores de "p" inferiores a 0,05.

3.5. ASPECTOS NEUROANATÔMICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA

3.5.1. Avaliação da expressão de c-Fos

Para a avaliação das expressão de c-Fos foram utilizados 12 pombos de ambos os sexos (7 machos e 5 fêmeas) divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: IT, controle manipulado e controle não manipulado. Os animais pertencentes ao grupo IT foram retirados da gaiola casa e submetidos os teste de imobilidade tônica (seção 3.2). Após o teste os animais foram devolvidos à gaiola casa e sacrificados por perfusão transcardíaca (descrição abaixo) 90 min. após o término da IT.

De maneira semelhante, os animais do grupo manipulado foram transportados individualmente até a sala experimental onde foram manipulados por 5 min., sem a indução de imobilidade tônica. Após esse período eram levados à gaiola casa e perfundidos 90 min após a manipulação. Os animais do grupo controle não manipulado foram apenas retirados da gaiola casa e eutanasiados de modo a fornecerem dados sobre a expressão basal de c-Fos no encéfalo.

3.5.2. Perfusão e histologia

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (0,05 g/100 g de peso corporal) e Cetamina (0,15 g/100 g de peso corporal) e perfundidos transcordialmente com 300 ml de solução de sacarose (9,25% mantida a 37°C, com heparina 1%) seguida por 300 ml de solução de paraformaldeído (4% em tampão fosfato pH 7,4). Os encéfalos foram retirados, blocados e pós-fixados em paraformaldeído (4% em tampão

fosfato) a 4°C por 24 h. Após esse período os blocos foram transferidos para uma solução de tampão fosfato-salina (PBS) 0,1M e armazenados a 4°C. Os blocos foram incluídos em gelatina 10% e seccionados em vibrátomo (Vibratome® 1500, St. Louis, MO, USA) em cortes coronais a uma espessura de 50 µm. As secções foram coletadas em PBS 0,01M e divididas em 5 compartimentos seriados sendo então transferidas para tubos plásticos de 4 ml contendo solução anticongelante (Propilenoglicol 10%+Sacarose 30% em PB 0,2 M). Os tubos foram armazenados em freezer a -24°C até que as secções fossem processadas nas reações de imunoistoquímica.

3.5.3. Procedimentos histoquímicos

3.5.3.1. c-Fos

As secções obtidas conforme descrito acima foram lavadas em solução tampão fosfato salina 0,1 M + Triton 0,15% (PBST), em 3 banhos de 5 min cada, logo após foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando H₂O₂ 0,3% + metanol por 30 min. Novamente, as secções foram lavadas com PBST em 4 banhos de 5min. cada. Após esse processo as secções foram incubadas por 60 min. em solução de PBST + soroalbumina bovina 2% (BSA, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Em seguida foram incubados com o anticorpo primário Anti-c-fos (IgG polyclonal de coelho, SC-52, Santa cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) em diluição de 1:2000 a 4°C *overnight* (18 horas). Após o período de incubação do anticorpo primário as secções foram lavadas em 3 banhos de PBST por 5 min., após os quais, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (Vectastain®, Elite ABC kit anti-IgG de coelho, PK-6101, Vector labs, Burlingame, CA, USA) em diluição de 1:1000 por 90 min. Os cortes foram novamente submetidos a 3 banhos de PBST por 5 min e então incubados com ABC (PBST. + avidina + peroxidase biotinilada) em diluição de 1:1000 por 2 h. Em seguida, as secções foram lavadas com PBST 3 vezes por 5 min. e lavadas novamente por 1 vez de 5min. com PBS sem a adição de triton x-100. Após esse processo as secções foram reveladas utilizando o kit DAB de reação da peroxidase (SK-4700, Vector

labs, Burlingame, CA, USA). Para todas as reações foram realizados controles negativos, que seguem todo o procedimento exceto a adição do anti-corpo secundário de modo a descartar marcações inespecíficas. Finalmente os cortes foram lavados com água destilada, montados sobre lâminas gelatinizadas, desidratados, diafanizados ecobertos com lamínula.

3.5.3.2. Dupla marcação c-Fos/CRH

Secções contendo o hipotálamo, obtidas conforme o descrito acima, foram lavadas em PBST em 4 banhos de 5 min cada. Logo após, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando H_2O_2 0,3% + metanol por 30 min. Novamente, as secções foram lavadas com PBST em 4 banhos de 5 min. cada. A seguir as secções foram incubadas por 60 min em solução de PBST + soroalbumina bovina 2% (BSA, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Em seguida foram incubados com o anticorpo primário Anti-c-fos (IgG polyclonal de coelho, SC-52, Santa cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA) em diluição de 1:2000 a 4°C *overnight* (18 horas). Após o período de incubação do anticorpo primário as secções foram lavadas em 4 banhos de PBST por 5 min., após os quais, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (Vectastain®, Elite ABC kit anti-IgG de coelho, PK-6101, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) em diluição de 1:1000 por 90min. Os cortes foram novamente submetidos a 4 banhos de PBST por 5 min. e então incubados com ABC (PBST. + avidina + peroxidase biotinizada) em diluição de 1:1000 por 2 h. Em seguida, as secções foram lavadas com PBST 4 vezes por 5 min. e lavadas novamente por 1 vez de 5min. com PBS. Após esse processo as secções foram reveladas utilizando o kit DAB de reação da peroxidase (SK-4700, Vector Labs, Burlingame, CA, USA). A reação de revelação foi interrompida com um banho de PBS 0,1M a 4°C e novamente as secções foram lavadas por 4 vezes de 5 minutos com PBST. Foi realizado um novo bloqueio da peroxidase lavando as secções por 40 min. com metanol + H_2O_2 0,3%. As secções foram então lavadas por 4 vezes de 5 min. com PBST e incubadas por 90min. com PBST + soroalbumina bovina 2% (BSA, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Após este processo o tecido foi incubado com o anticorpo primário anti-CRH (IgG polyclonal de cobaia, T-5007.0050,

Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA) *overnight* (18 horas) a 4°C em diluição de 1:2000. Após a incubação do anticorpo primário as secções foram lavadas por 4 vezes de 5 minutos e incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coabaia biotilado, BA-7000, Vector labs, Burlingame, CA, USA) por 2 h. As cortes foram novamente submetidos a 4 banhos de PBST por 5 min. e então incubados com ABC (PBST. + avidina + peroxidase biotilada, Standard Kit, Vector Labs) em diluição de 1:1000 por 2 h. As secções foram lavadas por 4 vezes de 5 minutos em PBS e reveladas utilizando o kit NovaRed para substrato da reação da peroxidase (VECTOR NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate Kit, SK-4800, Vector Labs) por 4 minutos. A reação foi interrompida com PBS a 4°C e os cortes foram lavados com água destilada, montados sobre lâminas gelatinizadas, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula.

3.5.3.3. NADPH Diaforase

Secções do mesencéfalo, obtidas conforme descrito acima, foram processadas para a detecção de NADPH diaforase segundo o protocolo descrito por Vincent e Kimura (1992). As secções foram lavadas 3 vezes por 5 min. em PB 0,2 M+Triton x-100 0,3%, em seguida as secções foram incubadas em uma solução de nitroblue tetrazolium (0,1 mg/ml)+β-NADPH (1 mg/ml) em PB 0,2M+ 0,3% Triton x-100 à 37°C por 60 minutos. Após esse período as secções foram lavadas por 2 vezes de 5 minutos em PB 0,2 M à 4°C para interromper a reação. As secções foram então montadas sobre lâminas gelatinizadas, desidratadas, diafanizadas e cobertas com lamínula.

3.5.4. Microscopia e quantificação

As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Olympus BH2) acoplado a uma câmera digital (PixeLink® PL-B623) para documentação fotográfica do material e subsequente quantificação de núcleos c-Fos+. A quantificação de células c-Fos+ e CRH+ nas regiões de interesse foram realizadas em duas secções adjacentes com um intervalo de 250 µm entre si. As fotomicrografias de cada uma das áreas foram

transformadas em imagens binárias com um limiar relativo de 0.35 utilizando o software ImageJ. Este procedimento eliminou todos os núcleos fracamente marcados, proporcionando um critério objetivo para a marcação mínima de c-Fos a ser quantificada (Fig. 2 A,B). O centro de cada um dos núcleos de interesse foi incluso em uma área de 0,2mm² e os núcleos c-Fos+ dentro desta área foram quantificados também utilizando o software ImageJ. Este procedimento foi realizado de modo com que o experimentador não tivesse conhecimento sobre o grupo experimental ao qual cada animal pertencia.

O número total de núcleos quantificados em cada uma das regiões foi dividido pela área de quantificação gerando uma estimativa do número de núcleos c-Fos+ por milímetro quadrado. Para cada animal, o número de células c-Fos+/mm² em cada uma das regiões foi gerado através da média aritmética da quantificação das duas secções adjacentes. Este número foi então utilizado para a análise estatística dos dados.

3.5.5. Distritos encefálicos de interesse

De uma maneira geral, utilizamos o atlas estereotáxico do encéfalo do pombo (KARTEN e HODOS, 1967) para definir as regiões e os níveis anatômicos (no eixo rostro-caudal), bem como para a definição dos subnúcleos da área septal do Arcopallium utilizados neste trabalho. O complexo ICo/GCt foi subdividido em suas diferentes regiões anatômicas segundo o proposto por Kingsbury *et al.* (2011).

A formação hipocampal, rostral e caudal, foi subdividida conforme suas características hodológicas (ATOJI e WILD, 2006) e principalmente neuroquímicas, conforme o proposto por HEROLD e cols. (2014). Para a definição dos distritos hipotalâmicos usamos como referência os trabalhos de Kuenzel e van Tienhoven (1982) e Nagarajan *et al.* (2014) para a definição entre as porções dorsais e ventrais do núcleo paraventricular do hipotálamo. Finalmente, para a definição das subdivisões do núcleo intersticial da estria terminal foram utilizados os trabalhos de Aste *et al.* (1998) e Atoji, Saito e Wild (2006). A nomenclatura dos distritos encefálicos adotada neste trabalho foi a proposta pelo fórum

para a revisão da nomenclatura anatômica do encéfalo de aves de 2004 (REINER *et al.*, 2004).

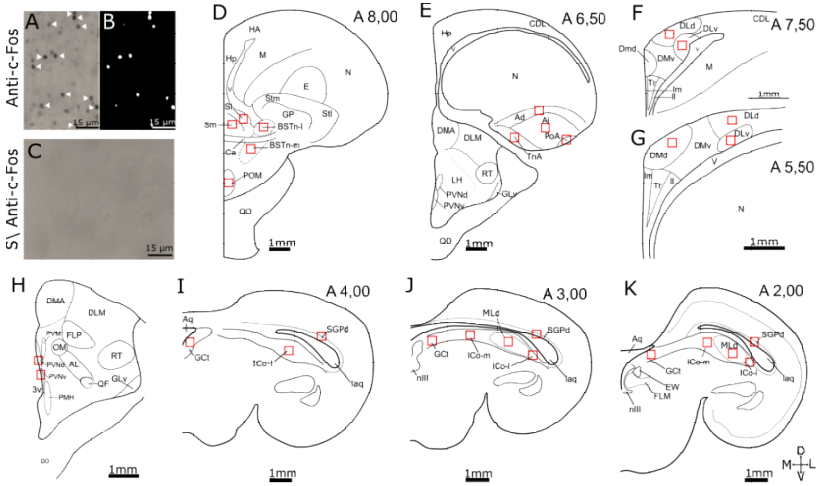


Figura 2. Controles imunohistoquímicos e descrição das áreas de quantificação. A) Imagem representativa da marcação para c-Fos. Setas indicam núcleos quantificados. B) Imagem binária mostrando o limiar que define as células a serem quantificadas. C) Controle negativo da reação, sem a adição do anticorpo primário anti-c-Fos. D-K) Desenhos esquemáticos de seções coronais do encéfalo do pombo. D) Desenho esquemático mostrando áreas de quantificação nas regiões da área septal, BSTn e área préoptica medial E) Desenhos esquemático mostrando áreas de quantificação no complexo amigdalóide. F-G) Detalhe do hipocampo rostral (F) e caudal (G) mostrando áreas de quantificação. H) Detalhe do diencefalo, mostrando áreas de quantificação no PVNd e PVNv. I-J) desenhos detalhados do mesencefalo mostrando áreas de quantificação em regiões do complexo ICo/GCt rostral (I), intermediário (J) e caudal (K).

4. RESULTADOS

4.1. ASPECTOS ETOLÓGICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA

4.1.1. Descrição qualitativa do comportamento de imobilidade tônica

Após o posicionamento em decúbito dorsal e subsequente contenção das asas e cabeça, todos os pombos resistem à manipulação, mantendo as patas perpendiculares ao corpo e forçando os dedos contra a mão do experimentador. Naqueles animais que expressam imobilidade tônica (95%; 117 pombos; Fig. 5A) essa resistência termina após alguns segundos e os animais deixam de apresentar esse comportamento de esquiva. É comum nos animais que são refratários ao teste (5%; Fig. 5A), que a tentativa de esquiva se dê durante todo o período de contenção. Entretanto, encerrar a resistência à contenção não pode ser considerada como um preditor para a IT uma vez que, uma parcela dos animais refratários também deixa de resistir ao período de contenção. Com o fim da contenção, ou seja, liberação da cabeça e asas, os animais não refratários parecem perder o tônus dos membros posteriores, mantendo as patas paralelamente à superfície ventral do corpo durante o restante da imobilidade (Fig. 3B).

Em 16% dos animais (19 pombos), um certo tônus dos membros posteriores parece perdurar durante a maior parte do teste mantendo-se perpendicular ao eixo rostro-caudal (Fig. 3A). Em menor número, pudemos observar ocasiões em que apenas uma das patas era movida enquanto a outra permanecia na posição perpendicular. Durante a IT, todos os animais mantêm as asas junto ao corpo. Este posicionamento das asas não parece se alterar no decorrer do teste.

Imediatamente após a liberação é possível observar contrações rápidas da musculatura peitoral superficial (*shivering*). Também observamos variações individuais quanto ao posicionamento da cabeça durante a IT. Os pombos mantêm a cabeça 1) rotacionada no eixo latero-lateral mantendo os olhos perpendiculares ao assoalho (Fig 3C) ou 2) voltada na direção do assoalho mantendo o bico no mesmo eixo do corpo (Fig. 3D).

Esse posicionamento diferenciado com a cabeça parece ser relevante, pois durante toda a duração de IT são observados movimentos sutis da cabeça.

Os animais que mantêm a cabeça rotacionada a movem para cima, levando o bico e o olho na direção do corpo, enquanto os animais que posicionam a cabeça no mesmo eixo do corpo movem o bico para os dois lados ao longo do eixo latero-lateral. Nos primeiros minutos de imobilidade esses movimentos são sutis e podem ser mais facilmente visualizados quando o vídeo é analisado em uma velocidade acelerada. Todavia, a mobilidade da cabeça tende a aumentar nos minutos que precedem o final da IT, ou seja, o retorno do animal à postura normal. Ainda que os movimentos da cabeça pareçam prever o final da IT, qualitativamente, não observamos uma relação entre os tipos de posicionamento da cabeça com a duração da IT em cada um dos animais.

De forma notável, movimentos oculares e palpebrais estão presentes e se modificam durante todo o tempo em que os animais permanecem em imobilidade tônica. Os movimentos oculares parecem acompanhar os movimentos da cabeça e são mais intensos nos períodos finais da IT. Diferentemente, os movimentos palpebrais estão pouco presentes no início da IT. Nesses períodos, podemos observar apenas movimentos rápidos de piscar com durações pequenas (200 ± 60 ms) e os animais passam a maior parte do tempo com os olhos abertos. Avançando no tempo de IT, os movimentos rápidos parecem ser substituídos por piscadas lentas ($1s \pm 0,3s$) que se assemelham com o comportamento de sonolência observado em pombos. Em imobilidades superiores à 7 minutos é possível observar esses movimentos palpebrais lentos serem substituídos novamente pela ausência de piscadas, porém os animais passam mais tempo com os olhos completamente fechados. A volta da predominância de piscadas lentas pode ser súbita e 1) ou o ciclo de movimentos palpebrais se reinicia ou 2) o animal finaliza o período de IT. Ao final da IT os animais levam as patas novamente a posição perpendicular ao corpo, e propelem-se para a frente retornando a postura bípede normal. Logo após o retorno postural, os pombos são manualmente retirados da arena e levados para a gaiola-casa. Durante esta manipulação os pombos apresentam movimentos balísticos e angulares da cabeça e também é possível notar uma queda de temperatura das patas.

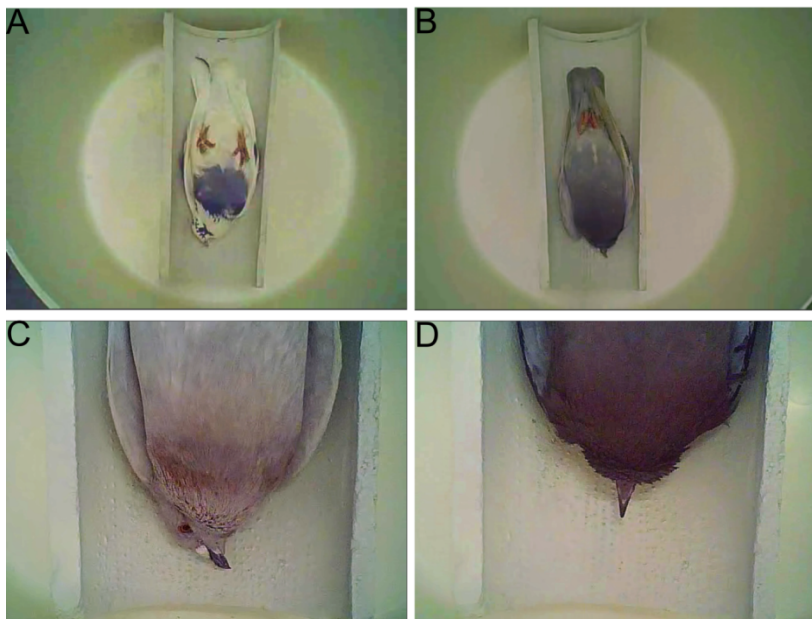


Figura 3. Descrição da imobilidade tônica. A) Pombo em imobilidade tônica apresentando membros posteriores em posição perpendicular ao eixo do tronco. B) Pombo em imobilidade tônica apresentando perda do tônus da musculatura dos membros inferiores. C-D) Comparação entre os posicionamentos da cabeça durante a IT em pombos.

4.1.2. Caracterização e análise dos movimentos palpebrais

Nos 14 pombos avaliados, a latência média para o aparecimento dos movimentos palpebrais rápidos foi de $48,5 \pm 4,75s$ (Média \pm EPM). Os animais iniciaram a apresentação de piscadas lentas por volta do terceiro minuto em imobilidade tônica, com uma latência média de $222,30 \pm 14,91s$. O comportamento semelhante ao sono (olhos fechados por períodos maiores que 1,5s) se iniciou a partir do sexto minuto de imobilidade tônica, como uma latência média de $409,90 \pm 210,07s$.

A figura 4 (A-C) ilustra os diferentes tipos de movimentos palpebrais e sua velocidade utilizando 1 a cada 3 frames de 2 segundos de

vídeo. Nos primeiros 3 minutos em IT os animais apresentam apenas movimentos palpebrais rápidos, porém a frequência média desses movimentos no primeiro minuto foi de apenas $8 \pm 0,3$ piscadas. Ou seja, em 1 minuto de análise esses animais piscam em média 8 vezes, mantendo os olhos abertos durante quase todo o tempo avaliado (Fig 4 D).

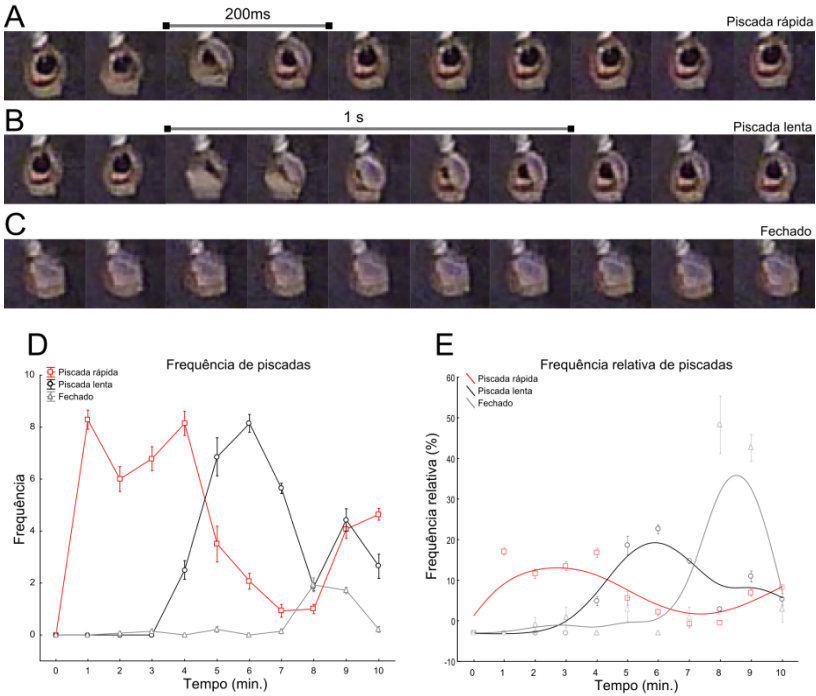


Figura 4. Análise dos movimentos palpebrais durante a IT. A-C) Ilustração dos movimentos palpebrais retirados de 2 segundos de vídeo. Cada frame equivale a um intervalo de 100ms. A) Detalhe do olho de um pombo realizando movimentos palpebrais rápidos durante a IT. O tempo do início e fim do movimento é de aproximadamente 200ms. B) Detalhe do olho de um pombo realizando movimentos palpebrais lentos durante a IT. O tempo do início e fim do movimento é de aproximadamente 1s. C) Detalhe do olho de um pombo com os olhos fechados durante o período de 2 segundos. D) Frequência absoluta de movimentos palpebrais rápidos, lentos, e olhos fechados durante 10 minutos de IT (Média±EPM). E) Frequência relativa de movimentos palpebrais durante a IT.

Uma análise das frequências relativas revelou uma predominância dos movimentos rápidos nos três primeiros minutos do teste. A partir do quarto minuto a frequência de movimentos rápidos começa a cair dando lugar aos movimentos lentos. Esses movimentos por sua vez são substituídos por uma predominância de olhos fechados a partir do oitavo minuto em IT. A figura 4E ilustra as mudanças dos movimentos palpebrais no tempo durante a imobilidade tônica.

Em resumo, nos primeiros minutos da IT existe uma predominância de movimentos palpebrais rápidos, que é substituído por movimentos lentos nos minutos seguintes. Com o aumento do tempo em IT, os pombos começam a apresentar um comportamento semelhante ao sono, mantendo seus olhos predominantemente fechados.

4.1.3. Distribuição da IT em uma coorte de pombos

A média de duração de IT para a coorte estudada foi de $452,53 \pm 40,75$ s (Média \pm EPM), contando com um mínimo de 0 segundos e um máximo de 2050 segundos. A distribuição das durações de imobilidade tônica da população de pombos (Fig. 5 A) não segue uma distribuição gaussiana (teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$). Cinco por cento dos animais avaliados apresentaram durações menores que 10 segundos, ou seja, são considerados refratários ao teste segundo nossos critérios.

A maior parte dos animais (57%) apresenta durações de IT concentradas entre 10 e 500 segundos e apenas uma pequena parcela da população (8.8%) apresenta durações superiores a 1000 segundos. O número de tentativas para desencadear a IT também possui uma distribuição não-gaussiana (teste de Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$), 70% dos animais apresentam imobilidade tônica na primeira tentativa e esse número parece decrescer com o aumento do número de tentativas (Fig. 5B). Em 5 tentativas estão contidos os animais refratários ao teste (6 animais) e os animais que apresentaram IT após o máximo de tentativas (2 animais).

O número de tentativas para que um animal exiba imobilidade tônica apresentou uma correlação negativa significante com a duração de

IT (teste de Spearman: $r=-0.31$, $p=0.00049$). Ou seja, a probabilidade para que um pombo permaneça em IT por grandes durações diminui linearmente com o aumento do número de tentativas para desencadear o comportamento (Fig. 5 C). O teste de Mann-Whitney ($U=613,5$ $p=0,14$) não revelou diferenças significativas entre machos ($n=89$; Média \pm EPM: $403,97\pm 42,58$) e fêmeas ($n=34$; Média \pm EPM: $579,64\pm 94,22$) quanto ao tempo de permanência em IT (Fig. 5 D).

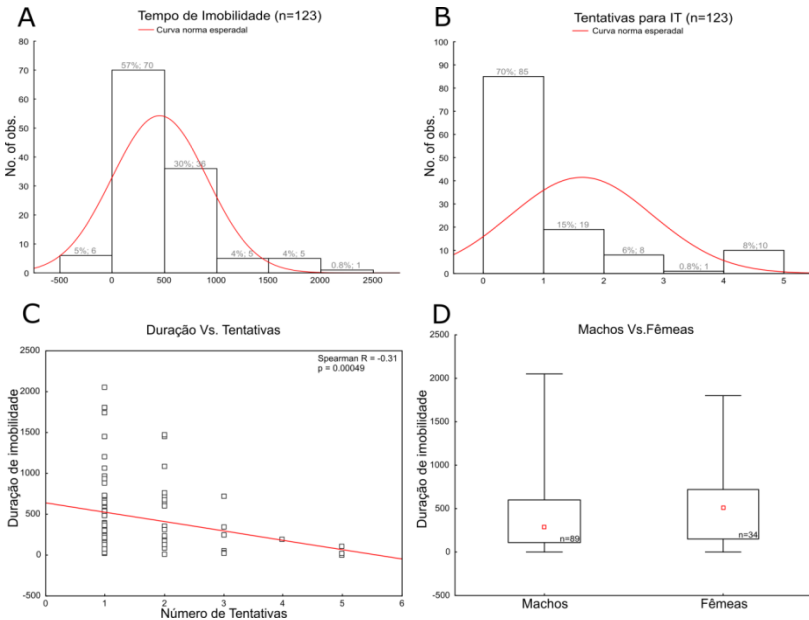


Figura 5. Distribuição de duração e tentativas de IT na coorte de pombos A) Histograma das distribuição das durações de imobilidade tônica em uma população de 123 pombos. A porcentagem das observações e o número bruto de observações encontra-se marcada acima de cada uma das barras. A linha vermelha mostra a distribuição normal esperada. B) Distribuição das tentativas para desencadear IT na população de 123 pombos. A porcentagem das observações e o número bruto de observações encontra-se marcada acima de cada uma das barras. A linha vermelha mostra a distribuição normal esperada. C) gráfico de correlação entre a duração de IT (ordenadas) e o número de tentativas para desencadear a IT (Abscissas). D) Comparação entre machos e fêmeas quanto a duração de IT. O

gráfico é representado pela mediana (ponto central), quartis (caixa) e mínimo e máximo (bigodes).

4.1.4. Experimentos de habituação: Efeitos do re-teste

Para os animais submetidos a um teste de IT a cada 7 dias a duração média da primeira IT foi de $329,23 \pm 104,57$ s (Média \pm EPM; n=13) com uma duração mínima de 27 s e máxima de 1450s. A análise de variância com medidas repetidas (ANOVA de Friedman) não indicou diferenças significativas entre as repetições ($\chi^2_{(df=3)} = 0,809$ p=0,847; Fig. 6A). As análises de correlação entre as durações das IT realizadas nos diferentes testes revelou correlações positivas estatisticamente significantes entre as duração da primeira IT e as durações das demais imobilidades com coeficientes de correlação acima de 0.90 para todos os testes (Para valores de r e "p" ver Fig. 6B).

Para os testes de IT repetidos em intervalos de 24 horas, a duração média da primeira IT foi de $670,25 \pm 157,92$ s (Média \pm EPM; n=8) com um mínimo de 73 s e um máximo de 1296s.

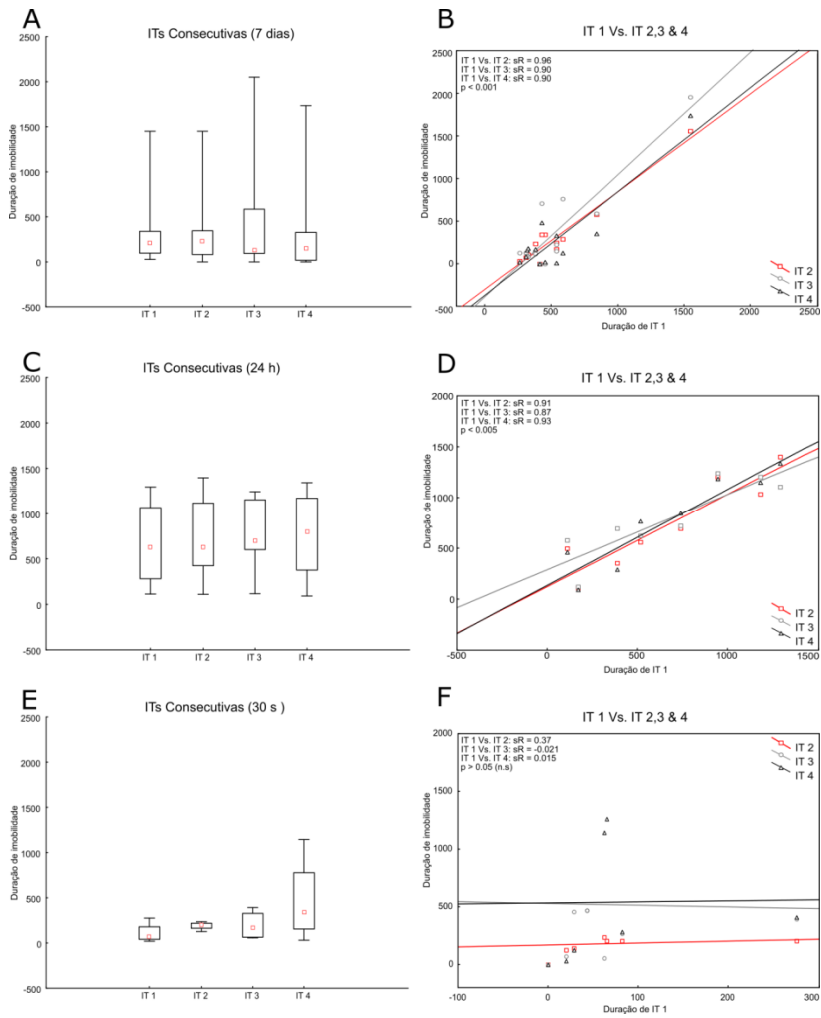


Figura 6. Efeito re-teste de imobilidade tônica em diferentes intervalos. A, C, E) Gráficos das durações medianas das ITs repetidas nos mesmos animais em intervalos de (A) 7 dias (n=14), (B) 24 horas (n=8) e (C) 30 segundos (n=8). B,D,F). Gráficos de correlação entre a primeira imobilidade tônica e as demais ITs repetidas em intervalos de (B) 7 dias, (D) 24 horas e (F) 30 segundos. Os gráficos (A,C,E) estão representados pelas medianas (ponto central), quartis (caixa) e mínimo e máximo (bigodes). Para os gráficos de correlação: sR= índice

decorrelação conforme o teste não-paramétrico de Spearman. Significância estatística foi considerada para valores de "p" inferiores a 0,05.

Não houve efeito do re-teste com 24 h de intervalo sobre as durações médias de IT ($\chi^2_{(df=3)} = 2,55$ $p=0,466$; Fig. 6C). As análises de correlação entre a duração da primeira IT e as demais, relevou correlações estatisticamente significantes para todos os testes com coeficientes de correlação superiores a 0.83 (Fig. 6D).

Os re-testes realizados em intervalos de 30 segundos não apresentaram diferenças significantes, embora pareça haver uma tendência ao aumento da duração de IT com a repetição do teste. A análise de variância com medidas repetidas revelou uma diferença marginalmente significativa entre as durações de IT em cada um dos testes ($n=8$; $\chi^2_{(df=3)} = 7,40$ $p=0,06$; Fig. 6E). O teste de Spearman não revelou correlações significantes entre a duração da primeira IT e a duração apresentada nos testes subsequentes, sendo todos os coeficientes de correlação inferiores a 0.37 (Fig 6F). As durações médias das quatro ITs realizadas em cada um dos intervalos estão apresentadas da tabela 1.

Tabela 1. Duração média de IT (em segundos) nos re-testes.

Intervalo	Duração da 1ª IT	Duração da 2ª IT	Duração da 3ª IT	Duração da 4ª IT
7 dias	329,23±104,6	310,82±112,2	377,23±149,5	278,92±128,0
24 h	670,25s±157,3	730,87±156,3	785,00±134,6	767,62±160,2
30 s	77,7143±32,8	81,8571±24,7	175,1429±64,4	369,2857±163,5

Valores expressos em média±EPM.

4.2. ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA IMOBILIDADE TÔNICA: TEMPERATURA CORPORAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

4.2.1. Temperatura corporal superficial

A duração média de imobilidade tônica para os cinco animais utilizados nesse estudo foi de 173,2±39,9s (Média±EPM) sendo o mínimo de 87s e o máximo de 311s. As linhas de base de temperatura das regiões analisadas foram retiradas a partir da primeira imagem termográfica (logo

após o término da contenção). A porção ventral da asa/lateral do corpo mostrou-se com a temperatura basal mais elevada ($39,84 \pm 0,59$ °C) e as temperaturas médias mais baixas registradas foram as da região peitoral ($36,0 \pm 0,47$ °C). A variação da temperatura com o tempo de IT pode ser visualmente observada pelas imagens presentes na figura 7A.

As variações de temperatura foram então correlacionadas com o tempo de imobilidade tônica utilizando um modelo de regressão linear e testados utilizando o teste de correlação não-paramétrico de Spearman. A figura 7B mostra o gráfico da variação média de todas as regiões durante a IT. De uma maneira geral, a temperatura externa dos pombos submetidos à IT diminui em função do tempo em imobilidade (Spearman $r = -0,663$; $p = 0,0004$). A mesma análise para cada uma das regiões obteve resultados semelhantes (Fig. 7 C, E, F), com exceção da região ventral da asa que não apresentou queda significativa de temperatura com o tempo em IT (Fig. 7 D).

4.2.2. Temperatura corporal interna

A figura 8A mostra o registro de temperatura e actimetria de um pombo durante a imobilidade tônica, bem como de duas horas antecedentes e duas horas subseqüentes à IT. Para as análises dos dados foi utilizado a média de temperatura dos 10 minutos antecedentes à IT como linha de base para cada animal. As medidas de actimetria não foram analisadas uma vez que durante a imobilidade tônica não existe a presença de atividade locomotora (Fig. 8 A).

A média de imobilidade do grupo IT manteve a mesma variabilidade esperada (Média \pm EPM: $994,0 \pm 409,20$ s) com uma média de temperatura interna basal de $40,84 \pm 0,20$ °C. A ANOVA de medidas repetidas revelou um aumento estatisticamente significativo da temperatura interna nos períodos analisados ($F_{(gl=6)} = 7,2$; $p < 0,001$). Em análise *post-hoc* (Duncan) foi averiguado que as temperaturas médias registradas durante a IT são significativamente maiores do que a linha de base, e que esse aumento perdura até 30 minutos após o fim da imobilidade. Não foram encontradas diferenças entre a temperatura base e a temperatura registrada 60 minutos após a IT (Fig. 7B).

Para averiguar a influência da manipulação sobre a temperatura interna, comparamos as temperaturas médias dos animais do grupo controle (manipulado por 1 minuto) e daqueles animais nos quais foi induzida a imobilidade tônica. A linha de base de temperatura foi extraída da média de temperatura de cada um dos animais nos 10 minutos antecedentes à manipulação ou contenção (Média±EPM: Controle: 41,16±0,24 °C / IT: 40,84±0,20 °C). A figura 8 C mostra o gráfico no qual foram plotadas as diferenças de temperatura em cada um dos períodos com relação à linha de base (Δ = Temperatura período - temperatura base) de ambos os grupos. A análise de variância de duas vias com medidas repetidas revelou diferenças significantes na temperatura em cada um dos grupos no fator tempo (ANOVA: $F_{(df=6)}=16,78$; $p<0,001$), porém, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA: $F_{(df=1)}=2,34$; $p=0,145$).

No grupo controle, o teste *post-hoc* de Duncan revelou um aumento significativo da temperatura em cada um dos períodos quando comparados a linha de base e com a exceção do período de 60 minutos após a contenção, essa diferença também pode ser observada no grupo IT, porém, neste grupo não existe diferença estatística entre os períodos de 50 min. e 60 min. e a temperatura de linha de base (Fig. 8 C). Os valores das temperaturas médias em cada um dos períodos, bem como a temperatura de linha de base estão apresentadas na tabela 2.

Análise da latência mediana para que cada grupo atingisse o pico de temperatura após a manipulação ou contenção ($p=0,65$) não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos (Fig. 8 D). Também não pudemos encontrar uma correlação entre a duração de imobilidade tônica e a latência para o pico de temperatura (Spearman: $R=0,26$; $p=0,46$) nos animais do grupo IT (Fig. 8 E).

Tabela 2. Temperatura corporal interna média em intervalos 10 minutos após a manipulação/Indução da IT

Período	Controle (manipulado)	Imobilidade tônica
Linha de base	41,16±0,25°C*	40,79±0,22°C
10 minutos	41,81±0,22°C*	41,27±0,17°C*
20 minutos	41,84±0,24°C*	41,46±0,10°C*
30 minutos	41,78±0,24°C*	41,40±0,11°C*
40 minutos	41,65±0,24°C*	41,18±0,10°C*
50 minutos	41,49±0,24°C*	41,04±0,10°C*
60 minutos	41,45±0,26°C*	41,05±0,12°C*

Valores expressos em média±EPM; "*"marca significância estatística entre um período e sua respectiva linha de base

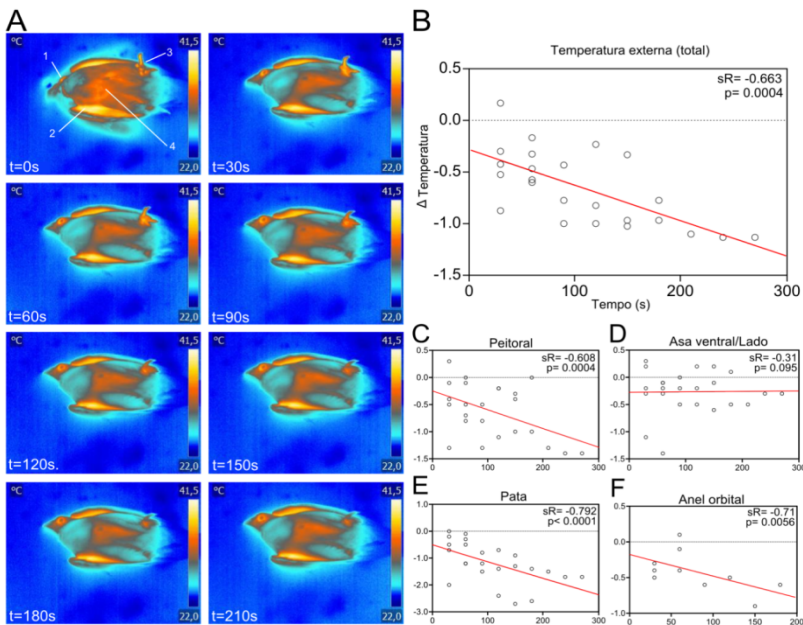


Figura 7. Modificação da temperatura corporal superficial de pombos submetidos à IT. A) Imagens termográficas sequenciais, em intervalos de 30 segundos, de um animal durante Imobilidade tônica. A primeira imagem (t=0.0) foi usada como linha de base; As regiões marcadas foram utilizadas para as análises: 1) Anel orbital

(n=3). 2) Porção ventral das asas/lateral do corpo (n=5). 3) Patas (n=5). 4) Região medial do peitoral (n=5). B) Médias das variações de temperatura (n=5) de todas as regiões analisadas em função do tempo em IT. C) Variação de temperatura da região peitoral em função do tempo de IT. D) Variação de temperatura da porção ventral da asa em função do tempo em IT. E) Variação da temperatura da pata em função do tempo em IT. F) Variação da temperatura do anel orbital em função do tempo em IT. Abreviatura: t=tempo, Sr=índice de correlação de Spearman.

4.2.3. Frequência cardíaca

Dos 16 pombos submetidos à cirurgia para a implantação do sensor telemétrico de FC, apenas 9 apresentaram registros viáveis para a análise dos dados. Devido a problemas nos sensores implantados os registros que apresentavam falhas ou inconsistências forçaram a exclusão destes animais dos grupos experimentais. A figura 9A mostra um exemplo de um bom registro (pombo macho, P7) de FC utilizado na análise dos dados aqui apresentados.

Tabela 3. Frequência cardíaca nos períodos após manipulação/indução da IT.

Período	Controle	Imobilidade tônica
FC Basal	132,6±21,41	115,9±16,87
10 min.	242,2±29,23 (*)	246,2±52,81 (*)
20 min.(#)	256,9±18,76 (*)	138,4±69,21
30 min.(#)	197,1±45,18 (*)	122,3±23,82
40 min.	155,3±64,98	149,4±48,10
50 min.	157,7±48,07	141,9±24,71
60 min.	140,5±29,93	117,5±20,10

"*" diferenças significantes em comparação à FC basal. "#" diferença significativa entre os grupos. Valores expressos em média ±EPM.

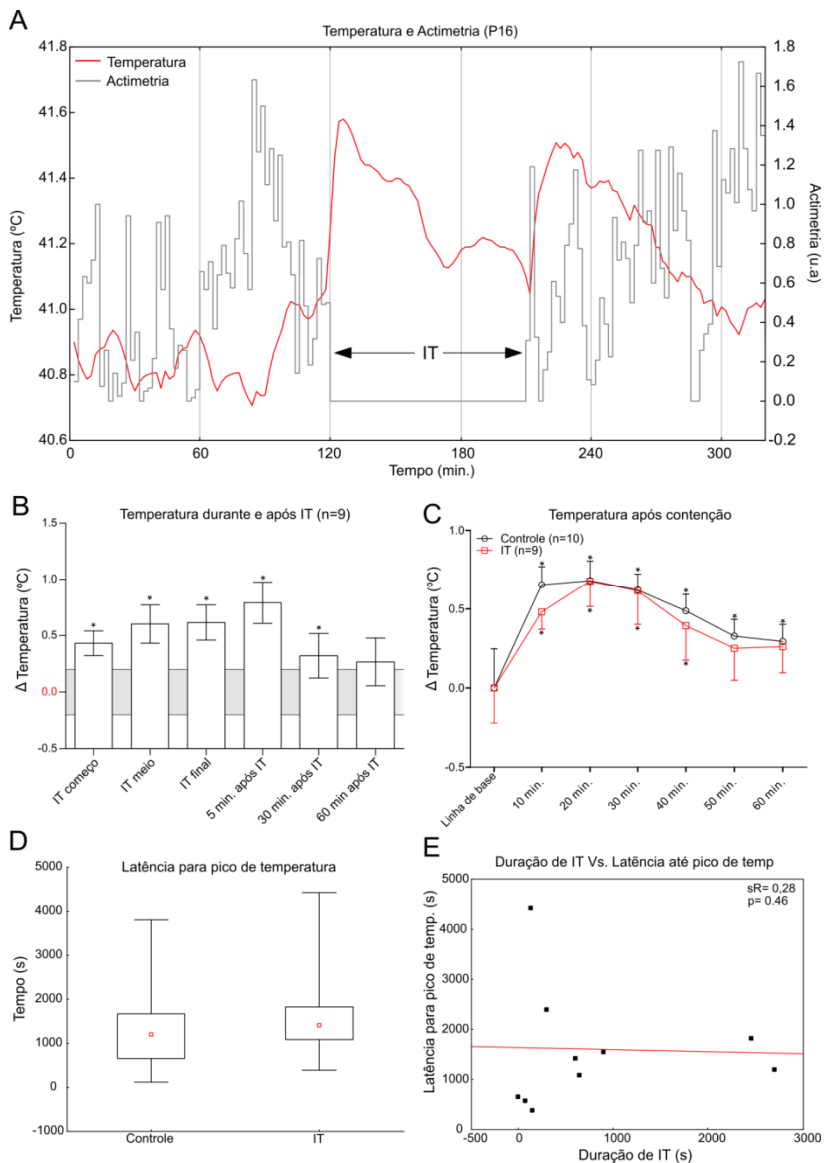


Figura 8. Modificações da temperatura corporal interna de pombos submetidos à IT. A) Registro de temperatura interna (linha vermelha, lado esquerdo) e actimetria (lado direito, linha cinza) de um animal (P16) mostrando as variáveis de interesse no período de duas horas antecedentes à IT, durante a imobilidade e duas horas

após. As setas marcam o período em que o animal permaneceu em imobilidade tônica, note aumento de temperatura e ausência de atividade actimétrica. B) Variação de temperatura (Média±EPM) registrada nos animais do grupo IT. (*) marca diferença significativa entre os períodos e a linha de base (Área em cinza: Média±EPM). C) Variação de temperatura (Média±EPM) em períodos de 10 minutos após manipulação do grupo controle e contenção do grupo IT. (*) marca diferença estatística entre períodos de 10 minutos e respectivas linhas de base para cada grupo. Não foram encontradas diferenças significantes para comparações entre grupos. D) Comparação entre grupos da latência para atingir o pico de temperatura após manipulação ou contenção. Dados representados como mediana (ponto central), quartis (caixa) e mínimo e máximo (bigodes). E) Correlação entre tempo de IT e latência para o pico de temperatura nos animais do grupo IT.

A média de duração de imobilidade tônica do grupo IT (n=4) foi de 588,35±107,35s (Média±EPM), refletindo a média e variabilidade dos dados encontrados nos demais experimentos. A média de FC basal dos animais IT, ou seja, a média de FC nos 10 minutos que antecederam o teste de imobilidade tônica, foi de 115,95±16,87 batimentos por minuto (Média±EPM) e não diferiu de maneira significativa da FC basal média apresentada pelos animais do grupo controle (132±21,41 bpm).

A análise da FC média durante e após a IT através da ANOVA de uma via com medidas repetidas, revelou diferença significativa entre os períodos ($F_{(6,18)}=11,095$, $p=0,0003$). A análise post-hoc de Duncan mostrou que a FC de linha de base difere da FC do período inicial ($p<0,001$) e do período intermediário da IT ($p=0,0025$). Nos demais períodos (Final, Após a IT, 30 minutos e 60 minutos após) essas diferenças em relação a FC média basal não podem mais ser observadas (Fig. 9 B). A frequência cardíaca média do período inicial e intermediário da imobilidade tônica, também apresentam diferenças estatisticamente significantes quando comparados aos demais períodos pelo teste de Duncan (Fig. 9 B).

Comparando a FC do grupo IT com o grupo controle (Fig. 9 C), utilizando uma análise de variância de duas vias com medidas repetidas puderam ser observadas diferenças significantes dos fatores tempo ($F_{(6,42)}=12,63$, $p<0,001$) e grupo ($F_{(1,7)}=5,16$, $p=0,05$), bem com uma interação significativa entre os fatores ($F_{(6,42)}=3,463$, $p=0,007$).

De uma maneira geral, ambos os grupos apresentam um aumento significativo da FC nos períodos iniciais após a manipulação ou contenção

para IT. Esses valores retornam aos níveis basais dentro de 60 minutos (Fig.9C). Em uma análise *pos hoc* (Duncan) foi possível observar que tanto o grupo IT, quanto o grupo controle, apresentaram um aumento significativo da FC nos primeiros 10 minutos após a contenção/manipulação em comparação a FC basal. Entretanto, o aumento significativo de FC observado no grupo controle persiste até 30 minutos após a manipulação enquanto aos 20 min. após a contenção essa já não pôde mais ser observada no grupo IT (Fig. 9 C).

Os períodos de 20 e 30 min. após a contenção/manipulação apresentam diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 9 C). Diferenças entre grupos não puderam ser observadas em nenhum dos outros períodos avaliados (Fig. 9 C; 20 minutos: $p=0,0003$; 30 min.: $p=0,021$). Os valores médios \pm erro padrão de frequência cardíaca para cada um dos períodos nos dois grupos estão apresentadas na tabela 3.

Foram analisados os tempos médios necessários para que cada grupo atingisse o pico de FC após a manipulação. O grupo submetido ao teste de IT apresentou uma latência média de $221 \pm 41,49$ s (Média \pm EPM) para atingir o pico médio de FC (Fig. 9 D). Para o grupo manipulado a latência média para o pico de FC foi de $115,4 \pm 12,06$ s (Média \pm EPM). Não puderam ser encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos utilizando a análise não-paramétrica de Mann-Whitney ($p=0,086$). A análise da latência para o retorno aos níveis basais de FC revelou diferenças estatísticas significantes entre os grupos (Fig. 9 E; $p=0,014$). Com o grupo IT retornando mais cedo ($451,7 \pm 61,75$ s) à FC basal quando comparado ao grupo controle ($2838,2 \pm 76,77$ s).

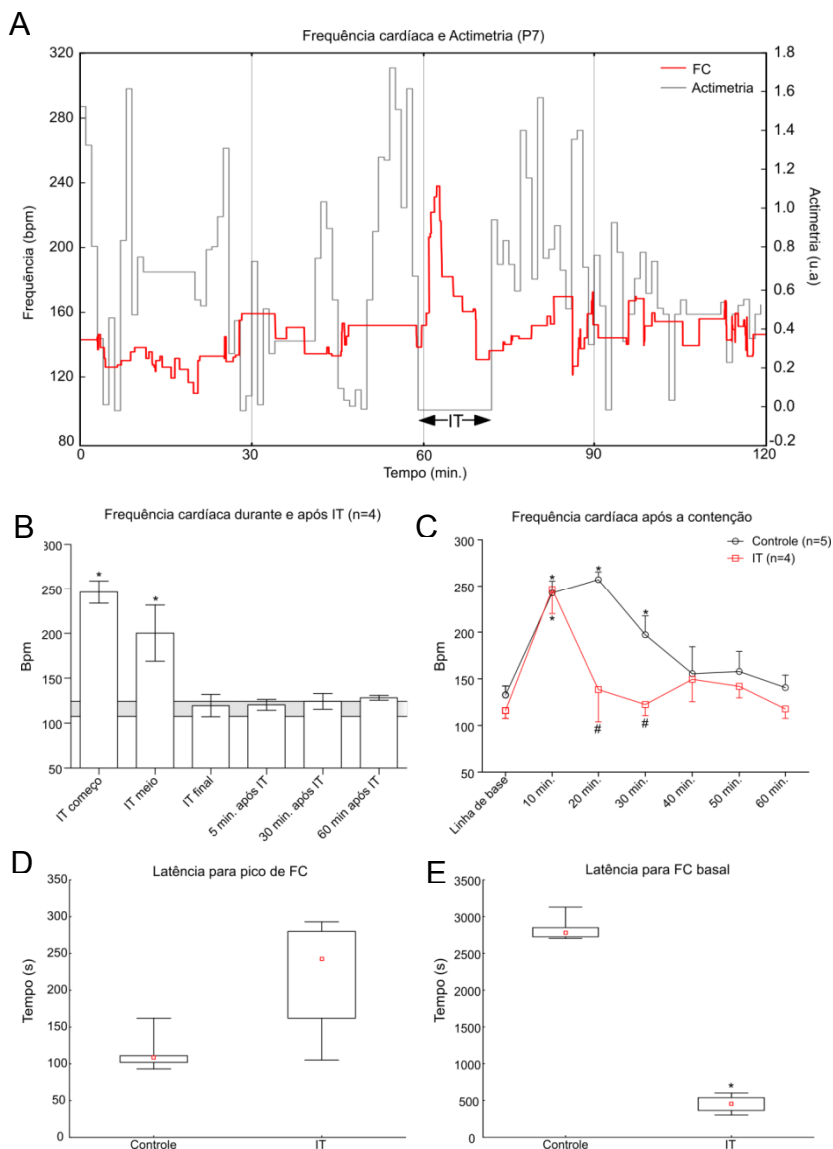


Figura 9. Modificações cardíacas durante a imobilidade tônica. A) Registro de FC (linha vermelha, lado esquerdo) e actimetria (linha cinza, lado direito) de um animal (P7) mostrando as variáveis de interesse no período de uma hora antecedente à IT, durante a imobilidade e uma hora após a IT. As setas marcam o período em que o

animal permaneceu em imobilidade tônica. B) Variação de FC (Média±EPM) registrada nos animais do grupo IT. (*) marca diferença significativa entre os períodos e a linha de base (Área em cinza: Média±EPM). C) Variação de FC (Média±EPM) em períodos de 10 minutos após manipulação do grupo controle e contenção do grupo IT. (*) marca diferença estatística entre períodos de 10 minutos e respectivas linhas de base para cada grupo. (#) marca diferença significativa entre os grupos em um determinado período. D) Comparação entre grupos da latência para atingir o pico de FC após manipulação ou contenção. Dados representados como mediana (ponto central), quartis (caixa) e mínimo e máximo (bigodes). E) Comparação entre grupos da latência para o retorno à FC basal após manipulação ou contenção. Dados representados como mediana (ponto central), quartis (caixa) e mínimo e máximo

Em resumo, durante a IT a temperatura corporal externa de pombos, com exceção da temperatura do lado do corpo, decresce linearmente com o tempo em que os animais permanecem em imobilidade. Observamos um aumento significativo da temperatura corporal interna em comparação à temperatura basal nos animais submetidos à IT e à manipulação. Este aumento persiste até 60 minutos após a indução da IT ou após a manipulação e não é diferente entre os grupos manipulado e IT. A frequência cardíaca durante a IT aumenta de maneira significativa em comparação à linha de base. Este aumento também pode ser observado em pombos que foram apenas manipulados, porém, nestes animais o aumento da FC é mais duradouro. Ou seja, após a manipulação ou indução da IT o retorno aos níveis basais de FC acontece mais cedo nos animais submetidos à IT do que nos animais manipulados.

4.3. PADRÃO DE ATIVAÇÃO NEURAL DURANTE A IT AVALIADO POR MEIO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C-FOS.

4.3.1. Mesencéfalo

Qualitativamente, o MLd pareceu apresentar marcação basal (grupo NM) de c-Fos+ mais intensa do que os demais núcleos, enquanto a marcação c-Fos no GCt pareceu ser a de menor intensidade em todos os níveis anatômicos. A análise das secções processadas para NADPHd

revelou a presença de neurônios poligonais apresentando processos terciários na região do GCt (Fig. 11 J-L), enquanto em todos os níveis anatômicos, células NADPHd+ não puderam ser observadas dentro do MLd (Fig. 11 E, H, I). Para todos os grupos e níveis anatômicos a marcação c-Fos foi ausente na região ventral do SGP, estando restrita apenas às regiões dorsais deste núcleo (Fig.10 F-H). De maneira análoga, a distribuição de corpos celulares expressando NADPHd também foi restrita à região dorsal do SGP, e ausente na porção ventral do núcleo (Fig. 11 G-H). As células NADPHd do SGPd, parecem, em suas porções laterais, distribuídas em um contínuo com as células marcadas no ICo-l.

A porção mais rostral do *n.* intercolicular lateral, núcleos c-Fos+ se encontravam distribuídos em duas regiões distintas (Fig. 10 B-D), coincidente com a distribuição observada de células expressando NADPHd nesta região (Fig. 11 D). Consistentemente, em todos os grupos experimentais, foi observada a presença de núcleos c-Fos+ nas porções intermediárias e caudais do ICo-l e ICo-m (Fig. 10 J-L). Também observamos a presença de neurônios NADPHd+ (pequenos e com menor arborização dendrítica do que aqueles presentes no GCt) nestas regiões (Fig. 11 E-F).

Em níveis rostrais (Fig. 10 A), a análise dos dados da quantificação de células c-Fos+ revelou diferenças significantes entre os grupos experimentais apenas na região dorsal da substância cinzenta periventricular (SGPd - K-W(2,12)=7,269; p=0,026). O teste post-hoc revelou um aumento significativo no número médio de células c-Fos+ no grupo IT comparado com os demais grupos, porém sem diferenças entre os grupos M e NM (Fig. 12 B).

A marcação c-fos+ em níveis intermediários do GCt não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (Fig. 12 C; K-W(2,12)=1,65; p=0,43). Diferenças significantes puderam ser observadas nos níveis intermediários do ICo-l (K-W(2,12)=8,346 p=0,015), ICo-m, (K-W(2,12)=2,961 p=0,03), SGPd (K-W(2,12)=8,0; p=0,018) e MLd (K-W(2,12)=7,538 p=0,02). A análise post-hoc revelou diferenças significantes entre o grupo IT e os grupos M e NM em todos os núcleos. Nenhuma diferença do número de células c-fos+ foi observada entre os grupos M e NM (Fig. 12 C).

Nos níveis caudais, diferenças significantes quanto a marcação de c-Fos puderam ser observadas entre os grupos experimentais quanto aos núcleos ICo-L ($K-W(2,12)=6,00$ $p=0,049$), MLd ($K-W(2,12)=6,50$ $p=0,038$), e SGPd ($K-W(2,12)=8,34$ $p=0,015$). Nenhuma diferença pode ser observada no GCl e ICo-m quanto ao número de células c-fos+ nesse nível. Novamente, o teste pos-hoc apontou diferenças entre o grupo IT e os demais grupos. Nenhuma diferença quanto ao número de células c-Fos+ pode ser observada entre os grupos M e NM.

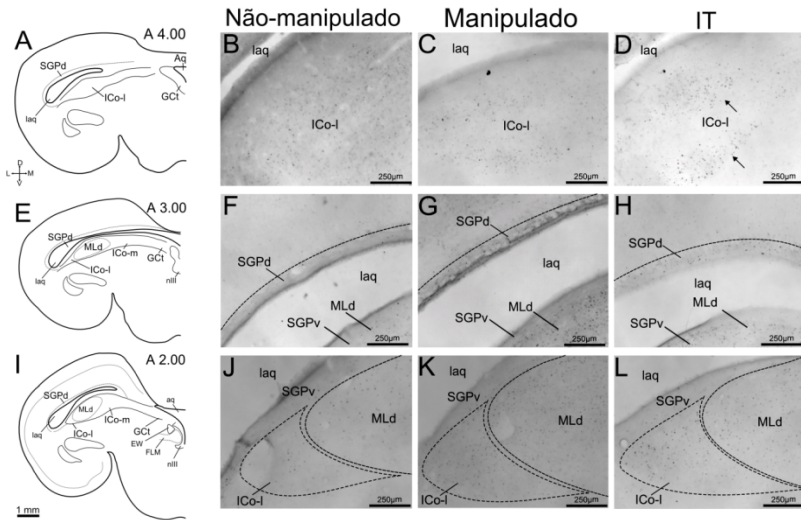


Figura 10. Expressão de c-Fos em regiões mesencefálicas do pombo. Desenhos esquemáticos de secções coronais do mesencéfalo em três níveis anatómicos: A) rostral, E) intermediário, I) caudal. Fotomicrografias ilustrando a expressão de c-Fos: (B-C) Distribuição de células c-Fos+ em secções rostrais. (F-H) Distribuição de células c-Fos+ em secções intermediárias. (J-L) Distribuição de células c-Fos+ em secções caudais. Setas em (D) mostram manchas contendo núcleos c-Fos+.

Em resumo, A indução da IT, promoveu um aumento significativo de núcleos c-Fos+ em comparação a animais manipulados e não manipulados nas regiões do SGPd (rostral, intermediário e caudal), ICo-l (intermediário e caudal), ICo-m (intermediário) e MLd (intermediário e caudal). Com exceção do MLd, todos os aumentos significantes foram

observados em regiões ricas em neurônios NADPHd+. Não pudemos observar aumentos significativos, em nenhum dos níveis, no GCt, onde também pudemos observar neurônios NADPHd+.

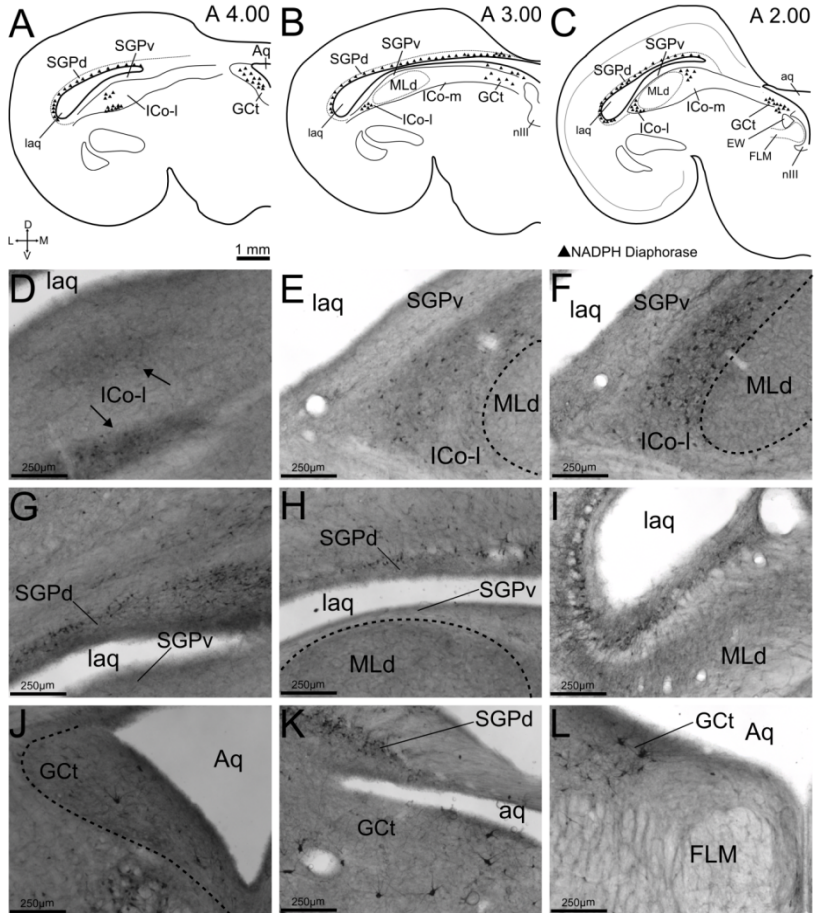


Figura 11. Distribuição de NADPH diaforase no complexo ICo/GCt do pombo. A-C) Desenho esquemático do mesencéfalo do pombo em nível rostral (A 4,00), intermediário (A 3,00) e caudal (A 2,00), mostrando a distribuição de neurônios NADPHd imunoreativos (triângulos). D-L) Fotomicrografias das regiões contendo neurônios NADPHd+. D) ICo-I rostral. setas apontam para duas regiões distintas contendo neurônios NADPHd+. E) Nível intermediário do ICo-I. F) ICo-I caudal. G-I) SGP rostral, intermediário e caudal. Mostrando a diferença de

marcação entre as porções dorsal e ventral do SGP e marcação ausente no MLd. J-L) Neurônios NADPHd+ no GCt em nível rostral, intermediário e caudal.

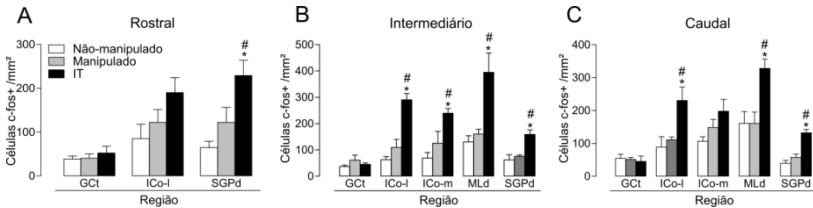


Figura 12. Quantificação de células c-Fos+ após IT em regiões mesencefálicas. Gráficos expressos em média±EPM para a quantificação de células c-Fos+ nos níveis: A) Rostral, B) intermediário e C) Caudal. (*) representa significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo não-manipulado. (#) representa significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo manipulado.

4.3.2. Hipotálamo

Em todos os grupos experimentais, a marcação c-Fos no hipotálamo se concentra nas regiões adjacentes ao terceiro ventrículo. Uma intensa marcação inespecífica pode ser observada nas regiões magnocelulares do hipotálamo, principalmente, no PVM e PMH (Fig 13 B-C). Esta marcação, citoplasmática e ausente da região do núcleo, foi consistentemente observada em todos os grupos experimentais e também pode ser detectada nas reações dos controles negativos (nas quais o anticorpo primário anti-c-Fos foi suprimido). No PVNv e PVNd apenas a marcação nuclear, tipicamente associada à reação para c-Fos, foi observada, sem a presença de marcações inespecíficas.

Pericários imunorreativos à CRH no hipotálamo concentram-se na região do PVN. Estas células são, em sua maioria, bipolares, apresentando processos orientados perpendicularmente à parede do terceiro ventrículo (Fig. 13 D-E). Também foram observadas fibras varicosas CRH+ intensamente marcadas pela reação. Estas fibras parecem se originar do PVNv e orientam-se lateralmente para o parênquima (Fig. 13 D-E), e parecem atingir a eminência mediana, também podendo ser vistas na região do núcleo intersticial da estria terminal. Células duplamente

marcadas para c-Fos e CRH puderam ser observadas no PVN_v e PVN_d, estando ausentes das demais regiões hipotalâmicas (Fig. 13 D-E). Em análise qualitativa do material, a região do POM apresentou grande expressão de c-Fos, principalmente nos casos pertencentes ao grupo IT (Fig. G-H). Entretanto, nossa análise de variância não foi capaz de detectar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais (Fig. 14 A).

Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais no PVN_d ($K-W_{(2,12)} = 1,765$; $p=0,413$) ou PVN_v ($K-W_{(2,12)}=4,515$. $p=0,104$) quanto ao número de células c-Fos. Também não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos quanto ao número total de pericários CRH+ no PVN_d (Fig. 14 B; $K-W_{(2,12)} = 1,856$; $p=0,395$) ou PVN_v (Fig. 14 C; $K-W_{(2,12)} = 2,496$; $p=0,287$).

Observamos uma diferença significativa entre os grupos quanto ao número de células duplamente marcadas para c-Fos e CRH no PVN_v ($K-W_{(2,12)} = 7,138$; $p=0,028$). Nesta região, uma análise *post-hoc* detectou um aumento estatisticamente significativo no número de células duplamente marcadas no grupo manipulado em comparação ao grupo não-manipulado ($p=0,028$; Fig. 14 C). Também foi observado um aumento marginalmente significativo quanto ao número de células duplamente marcadas no grupo IT em comparação ao controle não-manipulado ($p=0,057$; Fig. 14 C). Nenhuma diferença significativa quanto ao número de células duplamente marcadas pode ser observada do PVN_d (Fig. 14 B).

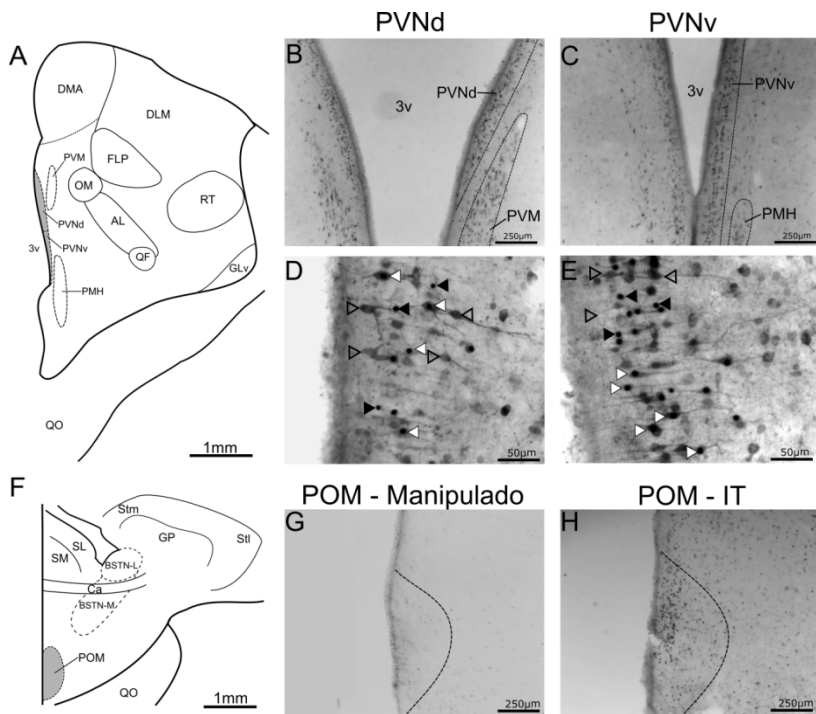


Figura 13. Distribuição de células c-Fos+ e CRH+ no hipotálamo do pombo. A) Desenho esquemático do hipotálamo do pombo (A 6,50). Área hachurada marca o PVNd e PVNv. B) Fotomicrografia ilustrando marcação c-Fos+ no PVNd e marcação inespecífica no PVM. C) Fotomicrografia ilustrando marcação c-Fos+ no PVNv e marcação inespecífica no PMH. D) Fotomicrografia ilustrando dupla marcação c-Fos/CRH no PVNd. E) Fotomicrografia ilustrando dupla marcação c-Fos+/CRH no PVNv. D-E) Setas brancas apontam para células com marcação nuclear para c-Fos e marcação citoplasmática para CRH. Setas pretas apontam para núcleos marcados apenas por c-Fos. Setas vazadas apontam para marcação positiva apenas para CRH. F) Desenho esquemático do prosencéfalo ventral. Área hachurada marca o POM. G) Fotomicrografia ilustrando marcação c-Fos+ no POM de um animal do grupo manipulado (caso manip. P3). H) Fotomicrografia ilustrando marcação c-Fos+ no POM em um animal submetido ao teste de imobilidade tônica (caso IT P12).

A análise da porcentagem de células CRH+ ativadas, isto é, a relação entre o número total de células CRH+ e o número de células duplamente marcadas, revelou uma diferença estatisticamente significativa

entre os grupos experimentais no PVNv ($K-W_{(2,12)} = 8,00; p = 0,018$; Fig. 14 D). A análise post-hoc detectou um aumento significativo da porcentagem de células CRH+ nos grupos manipulado e IT, ambos em relação ao controle não-manipulado (NM vs M: $p = 0,0209$; NM vs IT: $p = 0,02$; Fig. 14 D). Entretanto, nenhuma diferença pode se observada entre os grupos IT e Manipulado. Também não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais quanto à porcentagem de células CRH+ ativadas no PVNd (Fig. 14 D).

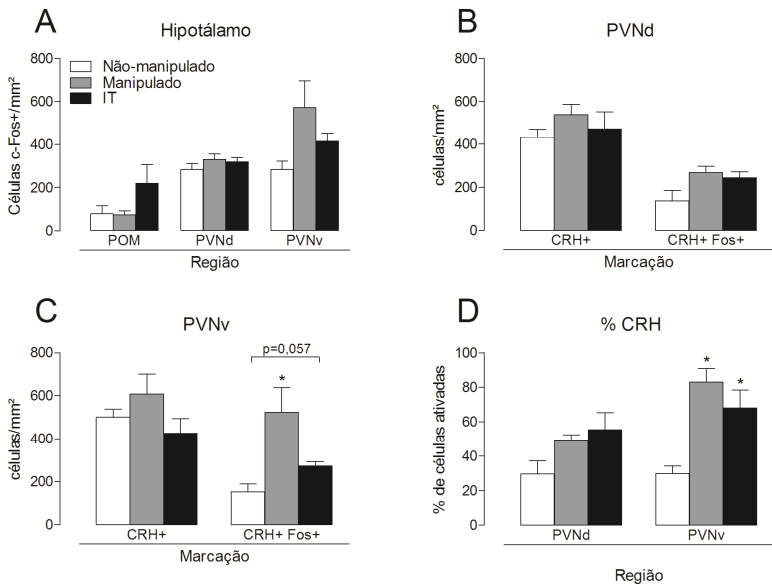


Figura 14. Quantificação de células c-Fos+ e CRH+ após IT no hipotálamo do pombo. A) Quantificação de células c-Fos+ nas regiões do POVD, PVNv e POM. B-C) Quantificação de células CRH+ e duplamente marcadas CRH+/c-Fos+ no PVNd (B) e PVNv (C). D) Porcentagem de células CRH+ ativadas (c-Fos+) nas regiões do PVNd e PVNv. Gráficos expressos em média±EPM. (*) marca diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle não-manipulado.

Em resumo, a manipulação promove o aumento do número de núcleos c-Fos+ no PVNv, enquanto a IT promove um aumento

marginalmente significativa nesta região. Tanto a IT quanto a manipulação promovem um aumento significativo da porcentagem de células CRH+ ativadas (c-Fos+) no PVNv, porém não no PVNd.

4.3.3. Complexo Amigdalóide

De uma maneira geral, a marcação c-Fos no Arcopallium é intensa em todos os grupos experimentais. Esta marcação parece contrastar o Arcopallium do Nidopallium adjacente, o qual não apresenta expressão intensa de c-Fos, mesmo no grupo controle não-manipulado (Fig. 15 B-D). A presença de núcleos c-Fos+ na região do Arcopallium parece ser homogênea, não permitindo uma boa separação entre os subnúcleos da região (Fig. 15 A-D).

O núcleo intersticial da estria terminal (BSTn) também apresenta núcleos marcados pela reação. A nível da comissura anterior a porção dorsal adjacente ao ventrículo lateral, o BSTn lateral, apresentou uma marcação visualmente mais intensa no grupo IT (Fig. 15 F-H). O mesmo ocorreu na região medial do BSTn, dorsal e medial à comissura anterior.

A análise estatística dos dados de quantificação de núcleos c-Fos+ na região do Arcopallium dorsal (AD) detectou diferenças significantes entre os grupos experimentais ($K-W_{(2,12)} = 9,846$; $p=0,0073$). Em análise *post-hoc* foi possível observar um aumento significativo no número de células c-Fos+ no grupo manipulado em comparação ao grupo não-manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 16 A). Também foi observado um aumento no número de núcleos c-Fos+ no grupo IT em comparação ao grupo NM (M-W: $p=0,0209$; Fig. 16 A). Entretanto, o número de núcleos c-Fos+ observado no AD foi estatisticamente menor no grupo IT quando comparado ao grupo manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 16 A).

A análise de variância dos dados de quantificação do Arcopallium intermédio (Ai) detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais ($K-W_{(2,12)} = 7,713$; $p=0,0211$). Uma análise *post-hoc* dos dados revelou um aumento significativo no número de células c-Fos+ no grupo IT tanto em comparação ao grupo NM (M-W: $p=0,0209$; Fig. 14 A), quanto em comparação ao grupo manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 14 A).

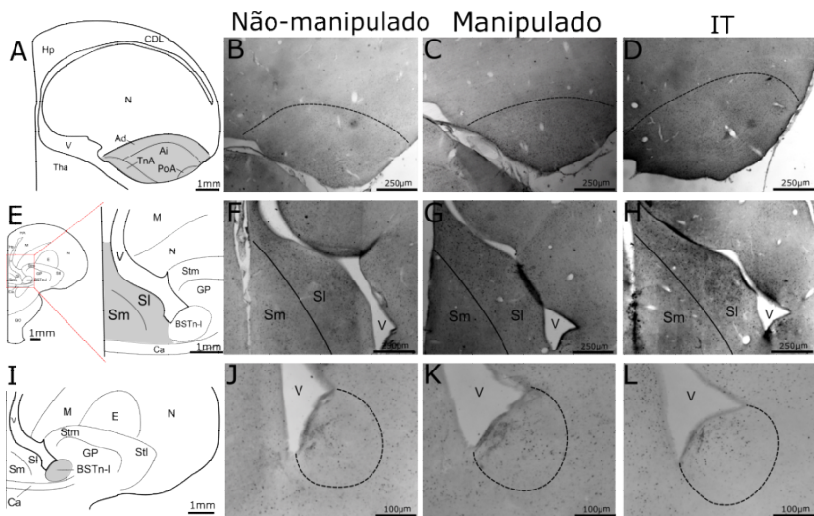


Figura 15. Distribuição de células c-Fos+ no complexo amigdalóide e área septal do pombo. A) Desenho esquemático do telencéfalo do pombo (A,6,50). Fotomicrografias ilustrando a presença de marcação c-Fos+ no arcoplácio nos grupos B) não-manipulado, C) manipulado e D) IT. E) Desenho esquemático da Área septal. Fotomicrografias ilustrando a presença de marcação c-Fos+ na área septal nos grupos F) não-manipulado, G) manipulado e H) IT. I) Desenho esquemático do telencéfalo do pombo marcando a região do BSTn-m. J-L) Fotomicrografias ilustrando a presença de marcação c-Fos+ na área septal nos grupos J) não-manipulado, K) manipulado e L) IT.

Na região do núcleo posterior do Arcopallium (PoA), a análise estatística detectou diferenças significantes entre os grupos ($K-W_{(2,12)} = 7,538$; $p=0,0231$). O teste *post-hoc* revelou um aumento significativo no número de núcleos c-Fos+ no grupo manipulado em comparação ao grupo não-manipulado ($M-W: p=0,0209$; Fig. 16 A) e em comparação ao grupo IT ($M-W: p=0,0209$; Fig. 16 A). Não foram encontradas diferenças entre o grupo IT e o grupo não-manipulado (Fig 16 A).

No núcleo taeniae do Arcopallium (TnA), foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos ($K-W_{(2,12)} = 7,423$; $p=0,0244$). Nesta região, pudemos observar um aumento significativo nos grupos manipulado ($M-W: p=0,0209$; Fig. 16 A) e IT ($M-W: p=0,0209$; Fig. 16 A) em

comparação ao grupo não-manipulado, sem diferença significativa entre eles (M-W: $p=0,77$; Fig. 16 A).

Foram detectadas diferenças significantes entre os grupos na região do BSTn-m (K-W_(2,12)= 6,73; $p=0,034$). O grupo IT apresentou um aumento significativo no número de núcleos c-Fos+ em comparação aos grupos M (M-W: $p=0,0209$; Fig. 16 A) e NM (M-W: $p=0,0209$; Fig. 16 A). Entretanto, não pudemos observar diferenças significantes no BSTn-l (Fig.16 B).

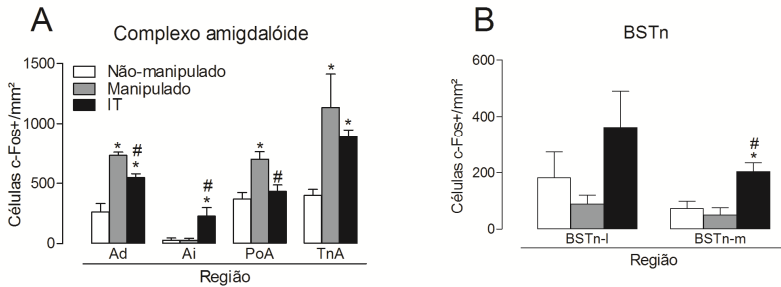


Figura 16. Quantificação de células c-Fos+ após IT no complexo amigdalóide. A) Quantificação de células c-Fos+ em regiões do complexo amigdalóide. B) Quantificação de células c-Fos+ no BSTn. Gráficos expressos em média±EPM. (*) marca diferença significativa com relação ao grupo não-manipulado. (#) marca diferença significativa ($p<0,05$) em comparação ao grupo manipulado.

Em resumo, a indução da IT promove uma aumento significativo do número de núcleos c-Fos+ no BSTn-m, bem como no Ai. Somente a manipulação foi capaz de aumentar o número de núcleos c-Fos+ no PoA. Tanto a manipulação quando a indução da IT aumentaram o número de núcleos c-Fos+ no AD e no TnA.

4.3.5. Área septal e Hipocampo

Em todos os grupos, de uma maneira geral, a marcação c-Fos na área septal é mais intensa na porção lateral quando comparada à região medial (Fig. 15 F-H). Quanto ao número de núcleos c-Fos+, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na área septal lateral (K-W_(2,12)= 7,73; $p=0,0210$), mas não na área septal medial (K-W_(2,12)= 2,00;

$p=0,36$). A análise *pos-hoc* revelou um aumento significativo no número de núcleos c-Fos+ no grupo IT em comparação com grupo não-manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 18 C) e manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 18 C).

A distribuição de núcleos c-Fos+ em níveis caudais do hipocampo está restrita às regiões dorsomedial dorsal (DMD), dorsolateral dorsal (DLd) e dorsolateral ventral (DLv), estando ausente, em todos os grupos experimentais, das regiões mais mediais e ventrais (e.g. n. triangular, DMv) (Fig. 17 A-L).

A análise de variância dos dados quantitativos, não foi capaz de detectar diferenças significantes do número de núcleos c-Fos+ em nenhum dos subnúcleos do hipocampo rostral (Fig. 18 A). Também não pudemos encontrar diferenças significantes entre os grupos experimentais na região dorsomedial dorsal do hipocampo caudal (Fig 18 B).

Foram encontradas diferenças significantes entre os grupos quanto o número de núcleos c-Fos+ na região do DLd caudal ($K-W_{(2,12)}=6,613$; $p=0,0366$). A análise *post-hoc* revelou uma diminuição significativa no grupo IT comparado aos grupos manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 18 B) e não-manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 18 B).

Diferenças significantes entre os grupos experimentais também foram detectadas quanto ao número de núcleos c-Fos+ no DLv caudal ($K-W_{(2,12)}=7,42$; $p=0,0244$). Um aumento significativo pode ser observado no grupo IT quando comparado aos grupos manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 18 B) e não-manipulado (M-W: $p=0,0209$; Fig. 18 B).

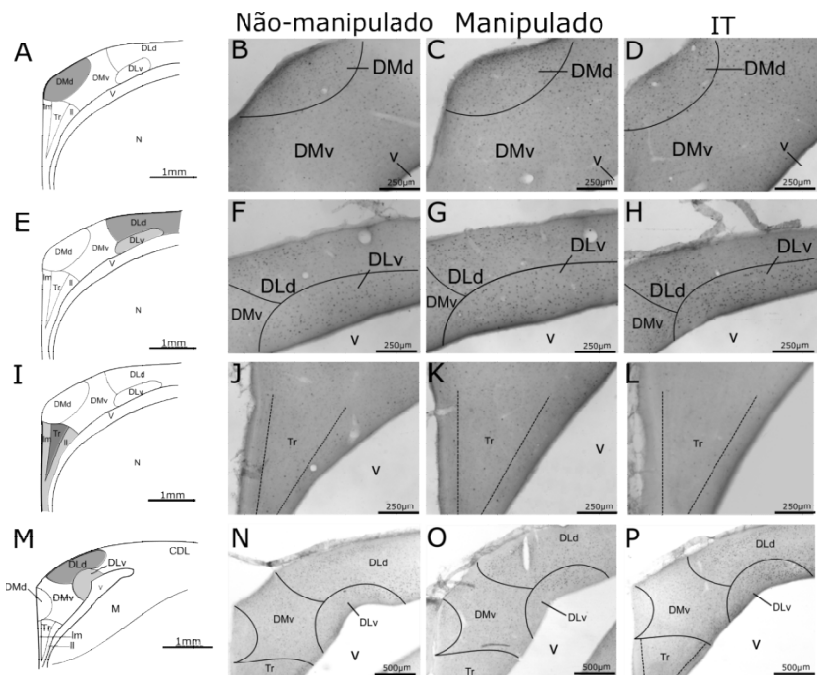


Figura 17. Distribuição de células c-Fos+ no hipocampo do rato. A, E, I, M) Desenhos esquemáticos das subdivisões do hipocampo. Fotomicrografias ilustrando a expressão de c-Fos na região do DMd caudal nos grupos B) não-manipulado, C) Manipulado e D) IT. Fotomicrografias ilustrando núcleos c-Fos+ na região do DLv caudal nos grupos F) não-manipulado, G) Manipulado e H) IT. Fotomicrografias ilustrando a ausência de núcleos c-Fos+ na região do Tr caudal nos grupos J) não-manipulado, K) Manipulado e L) IT. Fotomicrografias ilustrando núcleos c-Fos+ nas regiões do DLv rostral e DLd rostral nos grupos N) não-manipulado, O) Manipulado e P) IT.

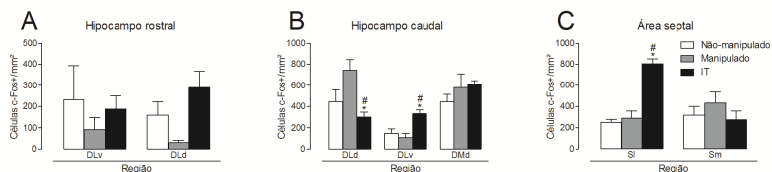


Figura 18. Quantificação de células c-Fos+ no hipocampo e área septal. A) Quantificação de células c-Fos+ nas regiões do DLv e DLd do hipocampo rostral. B) Quantificação de células c-Fos+ nas regiões do DLd, DLv e DMd do hipocampo caudal. C) Quantificação de células c-Fos+ nas regiões lateral (SI) e

medial (Sm) da área septal. Gráficos expressos em média±EPM. (*) marca a diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação ao grupo não-manipulado. (#) marca diferença em comparação ao grupo manipulado.

Em resumo, a indução da IT foi capaz de promover o aumento do número de células c-Fos+ na área septal lateral. No hipocampo caudal, a IT promoveu uma diminuição significativa de células expressando c-Fos no DLd e, ao mesmo tempo, um aumento destas células no DLv.

4.3.5. Distribuição geral da proteína c-Fos após a IT

A imobilidade tônica promoveu incrementos significativos do número de células c-Fos+, tanto em comparação ao grupo controle não-manipulado quanto em comparação ao grupo manipulado. A figura 19-A mostra os dados da quantificação dos núcleos c-Fos+ dos grupos IT e manipulado, em todas as regiões de interesse deste trabalho, apresentados em porcentagem de mudança em relação ao grupo controle não-manipulado. Esses dados foram organizados em ordem decrescente no grupo IT e permitem a visualização das estruturas encefálicas onde o aumento da expressão de c-Fos+ foi mais intenso neste grupo.

Sete das trinta regiões estudadas apresentaram um aumento superior a 200% no número médio de células c-Fos+ no grupo IT em relação ao grupo não manipulado (Fig 19 A). Estas apresentaram diferenças estatísticas significantes tanto em comparação ao grupo não-manipulado quanto em comparação ao grupo manipulado.

Também foi possível a observação de regiões em que o aumento do número de células c-Fos+ foi mais expressivo no grupo manipulado do que o observado no grupo IT. As regiões do Arcopallium dorsal (Ad) e n. taeniae, ambos apresentaram aumentos superiores à 170% no número de células c-Fos+ em relação ao grupo não manipulado. Esse incremento foi superior e estatisticamente significativo em comparação ao observado no grupo IT (Fig. 19 A,D). Portanto, é possível observar regiões encefálicas em que incrementos no número médio de células c-Fos+ foram exclusivos da indução do comportamento de IT, bem como, exclusivos da manipulação.

A figura 19 B é uma representação gráfica da clusterização das regiões encefálicas quanto a porcentagem de variação (normalizada pelo grupo não-manipulado) no número de células c-Fos+ em relação ao grupo IT (eixo das abscissas) e grupo manipulado (eixo das ordenadas). Essa visualização permite determinar regiões em que observou-se incremento de c-Fos no grupo IT ao mesmo tempo em que houve uma diminuição do grupo manipulado (e.g. Área septal lateral, ICo-l inetrmediário e Arcopallium intermédio) e vice e versa (e.g. DLd Caudal).

O complexo ICo/GCt apresentou o maior número de áreas em que a indução da imobilidade tônica promoveu um aumento significativo da expressão de c-Fos (Fig. 19 E). Nove das 13 regiões do complexo ICo/GCt estudadas apresentaram aumentos superiores a 100% no número médio de células c-Fos+ após a indução da imobilidade tônica, enquanto o maior aumento observado no grupo manipulado ocorreu no SGPd com 89% de incremento em relação ao grupo não manipulado (Fig. 19 A,E)

A área septal apresentou um aumento significativo no número médio de células c-Fos+ no grupo submetido a IT quando comparado aos demais grupos. Este aumento foi de 222% em comparação ao grupo não manipulado (Fig. 19 C), expressivamente maior do que o observado para a região no grupo manipulado (15%).

No hipocampo rostral, a região do DLd apresentou um aumento significativo no número médio de células c-Fos+ no grupo IT (82%), enquanto na mesma região, foi possível observar uma redução deste número no grupo manipulado (-81,2% em relação ao não-manipulado) (Fig. 19 C). O contrário, isto é uma redução no grupo IT e um aumento no grupo manipulado, pode ser visto na região do DLd caudal (Fig. 19 C). O DLv caudal apresentou um aumento expressivo e significativo no grupo IT (126% em relação ao grupo não-manipulado) enquanto no grupo não manipulado é possível ver uma redução (não significativa) do número médio de células c-Fos+.

No complexo amigdalóide, o Arcopallium intermédio apresentou a maior variação no número de núcleos c-Fos+. No grupo IT o aumento observado foi de 742% em relação ao grupo não manipulado, enquanto o grupo manipulado apresentou uma queda (não significativa) de 5,26%. O

aumento da expressão de c-Fos no grupo IT nesta região foi o maior em todas as áreas quantificadas neste estudo (Fig 19).

Em resumo, a indução da imobilidade tônica promoveu aumento do número de células c-Fos+ em regiões mesencefálicas e límbicas do encéfalo do pombo. Esse aumento pode ser discriminado do efeito da manipulação principalmente nas regiões do complexo ICo/GCt, Arcopallium intermédio e área septal lateral e BSTn lateral. A tabela 4 mostra os dados da quantificação de células c-Fos+ nas diferentes regiões do encéfalo do pombo, bem como, a variação média com relação ao grupo não-manipulado, e a significância estatística.

Tabela 4. Quantificação de células c-Fos+, variação média em relação ao grupo controle e testes estatísticos nas diferentes regiões encefálicas

Região	Não-manipulado	Manipulado	Imob. Tônica	M - NM	IT - NM	M vs NM	IT vs NM	IT vs M
	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM	(%)	(%)	Sign.	Sign.	Sign.
Ai	26,99±17,57	25,57±18,04	227,27±70,32	-5,26%	742,11%	n.s	*	#
ICo-l (l)	62,99±11,52	109,58±30,26	290,23±24,16	73,96%	360,75%	n.s	*	#
SGPd (R)	64,54±14,47	122,31±34,04	229,03±34,75	89,49%	254,84%	n.s	*	#
ICo-m (l)	68,99±21,37	125,22±44,87	239,20±17,77	81,52%	246,73%	n.s	*	#
SGPd (C)	39,30±8,97	57,54±9,96	132,33±10,73	46,41%	236,69%	n.s	*	#
Sl	250,00±26,95	288,35±67,36	805,40±47,16	15,34%	222,16%	n.s	*	#
MLd (Interm.)	130,65±22,84	160,16±18,32	394,69±73,48	22,58%	202,09%	n.s	*	#
POM	78,13±37,21	73,86±18,41	220,17±85,93	-5,45%	181,82%	n.s	n.s	n.s
BSTn-m	72,44±25,76	49,72±24,81	203,13±30,89	-31,37%	180,39%	n.s	*	#
ICo-l (Caudal)	88,82±31,39	111,04±8,55	230,43±41,00	25,01%	159,42%	n.s	*	#
SGPd (Interm.)	61,83±20,12	75,38±5,60	158,83±17,21	21,90%	156,86%	n.s	*	#
DLv (Caudal)	146,31±42,42	106,53±40,40	330,97±36,48	-27,18%	126,21%	n.s	*	#
TnA	397,73±51,03	1133,52±277,6	892,05±55,09	185,00%	124,29%	*	*	n.s
ICo-l (Rostral)	85,36±32,60	122,23±29,29	190,11±34,13	43,20%	122,73%	n.s	n.s	n.s
Ad	261,36±70,43	730,11±27,49	546,88±30,72	179,35%	109,24%	*	*	#
MLd (Caudal)	160,80±36,39	160,54±34,63	327,74±28,58	-0,16%	103,82%	n.s	*	#
BSTn-l	181,82±90,23	88,07±31,51	362,22±127,46	-51,56%	99,22%	n.s	n.s	n.s
ICo-m (Caudal)	106,49±13,67	148,36±24,54	197,85±35,77	39,32%	85,80%	n.s	n.s	n.s
DLd (Rostral)	159,09±62,67	29,83±10,97	289,77±76,19	-81,25%	82,14%	n.s	n.s	n.s
PVNv	284,09±38,81	573,86±123,57	414,77±37,55	102,00%	46,00%	n.s	n.s	n.s
DMD (Caudal)	443,18±72,24	579,55±128,71	607,95±37,04	30,77%	37,18%	n.s	n.s	n.s
GCt (Rostral)	38,45±7,13	40,45±10,08	52,55±13,12	5,18%	36,65%	n.s	n.s	n.s
GCt (Interm.)	36,95±4,98	60,99±19,05	44,53±6,03	65,07%	20,53%	n.s	n.s	n.s
PoA	367,90±56,60	698,86±61,41	431,82±52,54	89,96%	17,37%	*	n.s	#
PVNd	284,09±27,05	329,55±27,05	318,18±20,75	16,00%	12,00%	n.s	n.s	n.s
Sm	318,18±80,59	433,24±104,03	274,15±82,77	36,16%	-13,84%	n.s	n.s	n.s
GCt (Caudal)	54,20±13,01	51,41±6,23	45,47±16,12	-5,15%	-16,10%	n.s	n.s	n.s
DLv (Rostral)	231,53±162,21	90,91±57,80	187,50±63,40	-60,74%	-19,02%	n.s	n.s	n.s
DLd (Caudal)	443,18±116,23	741,48±103,46	301,14±44,26	67,31%	-32,05%	n.s	*	#

M: Grupo manipulado **NM:** Grupo não-manipulado; **IT:** Grupo Imobilidade tônica; n.s: Não significante; EPM: Erro padrão da média; * e # p < 0,05 teste de Mann-Whitney.

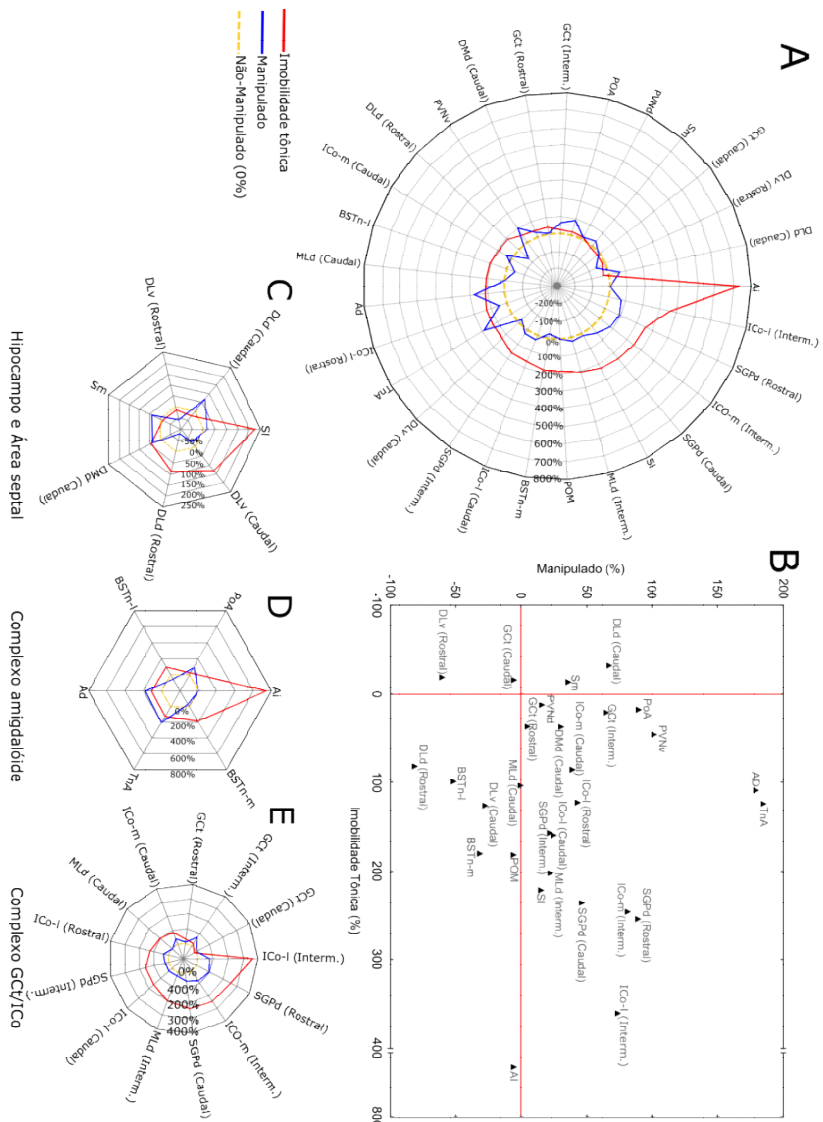


Figura 19. Gráficos polares da porcentagem de mudança na expressão de c-Fos em diferentes regiões encefálicas. A) Gráfico polar mostrando a porcentagem de mudança na expressão de c-Fos dos grupos manipulado (linha azul) e imobilidade tônica (linha vermelha) em relação ao grupo não-manipulado em todas as regiões

encefálicas analisadas. B) Clusterização dos dados das porcentagens de mudança na expressão de c-Fos em relação aos grupos manipulado e IT. Gráfico polar ilustrando a porcentagem de mudança do número de células c-Fos dos grupos manipulado e IT em relação ao grupo não manipulado nas regiões do C) hipocampo e área septal, D) complexo amigdalóide e E) Complexo ICo/GCt.

5. DISCUSSÃO

5.1. ASPECTOS ETOLÓGICOS DA IT

Neste trabalho apresentamos uma descrição pormenorizada do comportamento de imobilidade tônica em resposta à imobilização breve em decúbito dorsal em pombos. Em oposição à maior parte das descrições e medidas comportamentais correntes na literatura, nossa descrição da IT inclui, além da ausência de uma reação de endireitamento que mantém o tronco imóvel, movimentos discretos da cabeça, dos olhos, além de tremores corporais. Podem ser encontradas algumas menções breves dos tipos de movimentos existentes durante a IT em galinhas. Gallup e Rager (1996) apresentam uma tabela que cita como características marcantes da IT, falta de movimento, hipertonia muscular, tremores e mudanças dos padrões de movimentos palpebrais. No presente trabalho, pudemos observar algumas destas características (e.g. modificações dos movimentos palpebrais e tremores) e fomos capazes de descrever movimentos da cabeça dos animais durante a IT pormenorizando a descrição dos movimentos palpebrais e as variações posturais de pombos submetidos à imobilidade tônica. Nesse sentido, a descrição apresentada no presente trabalho representa a única análise etológica da imobilidade tônica realizada em pombos, aumentando assim a compreensão de processos encefálicos subjacentes à regulação deste comportamento.

Nossos dados indicam que apesar do comportamento de imobilidade tônica ser prevalente na coorte de pombos aqui estudada, existem grandes variações das durações de IT. Avaliando a distribuição da duração da IT em uma coorte de pombos, pudemos identificar uma porcentagem de animais que não apresentam IT ou seja, são refratários ao teste, e animais que apresentam longas durações de imobilidade após a contenção. Uma distribuição semelhante da duração de IT também pode ser observada em galinhas (GALLUP, NASH e WAGNER, 1971). Até onde pudemos encontrar na literatura, este é o único trabalho, além do presente, a avaliar tal distribuição em um grupo de animais não selecionados quanto à susceptibilidade à IT.

A ampla distribuição de durações de imobilidade tônica em pombos sugere a presença de diferentes estratégias de *coping* (ou temperamentos) em resposta a situações ameaçadoras dentro da população. Essa variação não deve estar limitada somente às respostas a situações inescapáveis, uma vez que os parâmetros da IT, pelo menos em aves, parecem se correlacionar com as respostas defensivas a outras situações potencialmente estressantes (RICHARD *et al.*, 2010; CALANDREAU *et al.*, 2011). Foi demonstrado que codornas que apresentam longas durações de IT parecem executar, preferencialmente, estratégias passivas quando expostas a objetos novos (RICHARD *et al.*, 2010) ou ambientes desconhecidos (CALANDREAU *et al.*, 2013). O mesmo parece ocorrer em porcos (*Sus scrofa domestica*) jovens, uma vez que indivíduos resistentes à indução da IT apresentaram comportamentos mais ativos do que indivíduos que apresentavam longas durações de IT (ERHARD, MENDEL e CHRISTIANSEN, 1999).

Em duas espécies de passeriformes, o pardal-montês (*Passer montanus*) e bispo-de-coroa-amarela (*Euplectes afer*), também foram observadas diferenças individuais na duração da IT (EDELAAR *et al.*, 2012). Neste mesmo estudo a duração da imobilidade tônica foi inversamente correlacionada com a atividade locomotora na presença de um predador (falcão empalhado), novamente sugerindo que longas ITs podem ser preditivas de *coping* passivo frente a situações ameaçadoras (EDELAAR *et al.*, 2012).

Encontramos uma correlação negativa entre o número de tentativas para deflagrar o comportamento de imobilidade tônica e a sua duração. Este efeito foi reportado anteriormente em galinhas (LEFEBVRE e SABOURIN, 1977). Essas evidências, parecem reforçar a idéia de que a estratégia de enfrentamento à contenção, ou seja, se a resposta à contenção será imobilidade tônica, ou tentativa de luta contra a contenção, é uma característica individual e um balanço entre estratégias ativas e passivas.

Nossos dados, também apontam para a repetibilidade intra-individual da IT (experimentos de habituação) e sugerem que não há influência do sexo dos animais quanto a susceptibilidade ou duração da imobilidade tônica. É importante salientar que diferenças na performance defensiva entre machos e fêmeas foram observadas em roedores

(BLANCHARD e BLANCHARD, 1989), porém não em situações extremas como a IT. A habituação da resposta de IT foi observada em outro estudo que concluiu que repetidas induções levavam a uma diminuição do tempo de imobilidade em galinhas (NASH e GALLUP, 1976). Entretanto, outros estudos observaram tanto a ausência da influência do sexo, quanto a repetibilidade da resposta em coelhos (EWELL, CULLEN e WOODRUFF, 1981), pombos (SANTOS *et al.*, 2015) e passeriformes (EDELAAR *et al.*, 2012; BRUST, WUERZ e KRÜGER, 2013). Juntamente com os dados aqui apresentados, essas evidências fortalecem a ideia de que a imobilidade tônica reflete a "personalidade", ou o temperamento, de um indivíduo, independente de fatores hormonais ou cromossômicos (sexuais).

Uma certa variabilidade ou flexibilidade de respostas comportamentais é esperada dentro de uma dada população, sendo que a variação de fenótipos é o substrato indispensável para a ação da seleção natural (RÉALE *et al.*, 2007; 2010). Entretanto, pode ser "contraintuitivo" pensar que um comportamento que eventualmente apresenta algumas características que se assemelham ao comportamento de sono (discutido em maiores detalhes abaixo) e que é intensamente variável em uma espécie possa favorecer a sobrevivência da mesma em situações de ameaça.

Experimentos laboratoriais (EWELL, CULLEN e WOODRUFF, 1981; THOMPSON *et al.*, 1981) e observações em ambientes naturais (FRANCO, 1969; SARGEANT e EBERHARDT, 1975), mostraram que a expressão da IT promoveu um aumento da sobrevivência de indivíduos de diversas espécies (patos, codornas, coelhos e gambás) quando atacados por predadores, que tendiam a perder o interesse por presas sem movimento (SARGEANT e EBERHARDT, 1975; THOMPSON *et al.*, 1981). Em um artigo recente, Santos *et al.* (2015) mostraram que a duração de imobilidade tônica, e outros comportamentos defensivos (e.g. distância para fuga do experimentador), está negativamente correlacionada com o risco de que pombos sejam predados por falcões (*Falco peregrinus*) durante o vôo.

Ainda que a IT favoreça a sobrevivência da espécie em nível individual, podendo ser portanto considerada como um comportamento defensivo, a manutenção da variabilidade individual em uma população

observada neste, e em outros trabalhos, não pode ser facilmente explicada em termos de vantagem adaptativa.

Uma possível explicação para a manutenção dessa variabilidade individual é a hipótese de que "personalidades" defensivas que se correlacionam com o modo com que os indivíduos de um determinado grupo utilizam o nicho ambiental. Por exemplo, animais mais "úmidos" escolhem locais mais protegidos para forragearem enquanto animais mais "ousados" se alimentam em regiões mais abertas e, portanto, potencialmente mais ameaçadoras (BERGMÜLLER e TABORSKY, 2010). Essa segmentação de uma população pode diminuir a competição intra-específica por alimento, parceiros para reprodução e etc (BERGMÜLLER e TABORSKY, 2010). Neste sentido, áreas urbanizadas constituem ambientes mais ameaçadores do que outros ambientes menos antropizados (BÓKONY *et al.*, 2012). Ainda, a capacidade de ocupação de ambientes urbanizados apresentada por uma espécie é atribuída à flexibilidade fisiológica e comportamental, incluindo variações individuais de comportamentos defensivos, apresentadas pela mesma (BONIER, MARTIN e WINGFIELD, 2007; CARRETE e TELLA, 2011; LOWRY, LILL e WONG, 2013). Foi observado que pardais (*Passer domesticus*) vivendo em ambientes urbanizados apresentavam características mais ousadas em comparação a co-específicos habitando regiões rurais (BÓKONY *et al.*, 2012). Diversas espécies de aves que habitam ambientes urbanos também apresentam uma maior distribuição latitudinal e elevacional, tolerando uma maior variação ambiental do que co-específicos habitantes de ambientes rurais (BONIER, MARTIN e WINGFIELD, 2007). Entretanto, pombos, animais extremamente prevalentes nestes ambientes e bem adaptados à vida na cidade, não foram estudados quanto a estes parâmetros.

Dados experimentais prévios de nosso laboratório, em fase de preparação para publicação, sugerem que exista uma correlação linear entre a duração da IT e a latência para que pombos se alimentem em locais desconhecidos e potencialmente ameaçadores. Uma maior propensão a forragear em ambientes ameaçadores também foi observada em aves de ambientes urbanos comparadas com co-específicos de ambientes rurais (CARRETE e TELLA, 2011). Nesse sentido, nossos dados sugerem que

uma maior variação individual de comportamentos defensivos em pombos pode ter uma relação direta com a capacidade que esta espécie apresenta em se adaptar a ambientes estressantes e em constante mudança como ambientes urbanos.

Todavia, uma vez que nossa coorte de pombos foi criada em cativeiro, ainda é necessário testar esta hipótese em aves vivendo em seu habitat natural, afim de verificar se a variabilidade quanto à IT, observada no presente trabalho e quanto a outros comportamentos defensivos, também ocorre nestes ambientes ou é fruto da ausência de seleção natural promovida pelo cativeiro.

Nossa descrição dos movimentos palpebrais em pombos ao longo do tempo em que permanecem em imobilidade tônica parece sugerir que este comportamento não é homogêneo, ou seja, parecem existir mudanças nos movimentos dentro da imobilidade tônica que podem indicar mudanças do estado de atenção e modificações na aquisição sensorial (*e.g.* visual e auditiva) nestes animais. Em aves, movimentos com a cabeça estão associados com a exploração do ambiente em situações de estresse (DE SOUZA *et al.*, 2009; FEENDERS, KLAUS e BATESON, 2011; MELLEU *et al.*, 2015), podendo ser modificados com a apresentação de estímulos visuais (MELLEU *et al.*, 2015), auditivos (FERRARI *et al.*, 1999) ou ainda, pela antecipação de estímulos positivos ou nocivos (ZIMMERMAN *et al.*, 2011). A presença desses movimentos durante a IT pode amparar a aquisição visual/auditiva sobre o ambiente de maneira a fornecer informações sensoriais que possibilitam o término do comportamento de imobilidade (GENTLE, JONES e MAGUIRE, 1985; O'CONNELL e HOFMANN, 2012).

De fato, ainda que lesões do córtex visual de sapos (KLEMM, 1976) e lesões corticais extensas em pombos (GENTLE, JONES e MAGUIRE, 1985) não tenham impedido a indução da IT, tais lesões foram capazes de aumentar de forma significativa o tempo de IT desses animais. Ao mesmo tempo, o comportamento de imobilidade tônica pode ser interrompido por estímulos auditivos (RATNER, 1958; HATTON e THOMPSON, 1975), visuais (DOTY, 1969) ou nociceptivos (KLEMM, 1965), sugerindo que informações sensoriais sejam necessárias para o término da IT.

Modificações dos movimentos palpebrais durante a IT já foram mencionados (porém, não descritos) em galinhas (GALLUP, NASH e WAGNER, 1971; GALLUP e RAGER, 1996). No presente trabalho, descrevemos as modificações palpebrais ao longo da duração da IT, mostrando maior prevalência de piscadas rápidas ou a manutenção dos olhos abertos nos períodos iniciais da IT. Nos períodos finais da IT pudemos observar uma maior prevalência de piscadas lentas e olhos fechados.

Registros de EEG cortical e EOG realizados em nosso laboratório mostraram que piscadas lentas (entre 0,2 e 0,9 Hz) são acompanhadas por padrões de alta voltagem e baixa frequência de EEG, que foi classificado como sonolência (DARIO *et al.*, 1996). Estes padrões eletroencefalográficos e de EOG são distintos dos observados durante a vigília (EEG de baixa voltagem com EOG superior a 1Hz), sono de ondas lentas (EEG de alta voltagem e baixa frequência, porém com movimentos de EOG inferiores à 0,2 Hz) e sono paradoxal (EEG de alta frequência e baixa voltagem) (DARIO *et al.*, 1996). Portanto, é possível sugerir que as piscadas lentas, observadas nos períodos finais da IT em pombos devem estar relacionadas à sonolência enquanto a predominância de olhos fechados pode representar algum tipo de sono nesses animais.

É interessante notar que corvos (*Corvus brachyrhynchos*), quando confrontados com estímulos aversivos (neste caso o experimentador responsável por uma manipulação prévia do animal) diminuem de forma significativa os movimentos palpebrais, mantendo os olhos abertos e fixos em direção ao estímulo aversivo (experimentador) (MARZLUFF *et al.*, 2012; CROSS *et al.*, 2013). Nestes corvídeos, os movimentos palpebrais puderam ser inversamente correlacionados com a ativação de áreas encefálicas envolvidas com a expressão de comportamentos de medo como o complexo amigdalóide (MARZLUFF *et al.*, 2012; CROSS *et al.*, 2013). Ainda, outros estudos analisando padrões de EEG durante a IT puderam detectar traçados eletroencefalográficos relacionados com aumento da excitação cortical nos minutos iniciais da IT em galinhas (JONES, 1986). Outros autores, utilizando coelhos (KLEMM, 1966; 1971b; a) e galinhas (GALLUP, 1974) também foram capazes de identificar padrões elétricos, corticais e hipocâmpais, indicativos de excitação

encefálica durante a IT. Porém, nestes estudos não está claro se os registros foram realizados nos períodos iniciais ou finais da imobilidade tônica.

Foram ainda observados padrões relacionados ao sono de ondas lentas durante a IT em galinhas (OOKAWA, 1972) e, em uma nota incidental, padrões de EEG indistinguíveis daqueles observados durante o sono paradoxal em coelhos (KLEMM, 1971b). Somados aos nossos dados, estas evidências sugerem que a IT nos pombos não é um estado funcionalmente homogêneo, parecendo incluir fases diferentes de atividade sensorial e motora. Estas diferentes fases incluiriam um estado inicial de intensa atividade sensório-motora, seguida por uma gradual desativação neural.

A existência de tais processos de desativação gradual foi proposta por Juan Delius para explicar o aparecimento de comportamentos deslocados (DELIUS, 1967). Gaivotas (*Larus sp.*), expostas a situações estressantes, como manipulação ou proximidade de um experimentador, repondem ao estímulo aumentando os movimentos da cabeça, mantendo os olhos abertos e produzindo vocalizações de alarme (DELIUS, 1988). Gradualmente estas respostas são substituídas por comportamentos pós-consumatórios de conforto, como auto-limpeza (*preening*) e sonolência. Em situações de estresse esses comportamentos são considerados como deslocados, uma vez que não parecem ter uma função clara na resposta ao estímulo (DELIUS, 1970; DELIUS, 1988). É interessante notar que os padrões de EEG hipocampal parecem seguir o mesmo gradiente ao longo de comportamentos de vigília até repouso, tornando-se mais sincronizados à medida que os comportamentos de conforto, como auto-limpeza e sonolência, tornam-se prevalentes (DELIUS, 1988). Neste sentido, o aparecimento gradual durante a IT, de comportamentos que possam ser relacionados ao sono, parecem contribuir para a hipótese de que processos de desativação estejam acontecendo durante a imobilidade tônica em pombos. Entretanto, a heterogeneidade da IT em pombos foi observada neste estudo por métodos etológicos e pudemos apenas inferir sobre a existência de variações temporais dos estados de atenção e da aquisição sensorial ao longo de sua duração. Estudos que façam uma análise temporal pormenorizada dos padrões de EEG durante a IT podem

fornecer mais evidências sobre os processos encefálicos envolvidos no controle de cada uma das fases da imobilidade tônica.

5.2. Aspectos fisiológicos da IT

Os dados obtidos em nossos experimentos para avaliar modificações térmicas durante a imobilidade tônica apontam que, enquanto a temperatura externa dos pombos decresce em função do tempo em IT, a temperatura interna aumenta significativamente durante o período de imobilidade comparadas à temperatura de linha de base (10 minutos antes da indução da IT). Esse aumento da temperatura interna parece persistir até 30 minutos após o final da IT e não são mais visíveis após 60 minutos. A queda da temperatura corporal externa observada em nossos experimentos utilizando termografia, parece implicar que durante a imobilidade tônica ocorre uma diminuição da dissipação de temperatura que, somada a um aumento da termogênese por meio do incremento da atividade muscular, contribuem de forma a aumentar a temperatura interna.

Nossos resultados parecem estar de acordo com os encontrados em galinhas (*Gallus gallus*). Eddy e Gallup (1990) observaram que galinhas adultas submetidas à IT apresentavam temperaturas médias da crista e das asas inferiores à linha de base durante a IT, bem como, um aumento significante da temperatura interna. Outro trabalho, também utilizando galinhas, mostrou queda significante da temperatura cloacal dos animais submetidos à IT (NASH, GALLUP e CZECH, 1976). De maneira semelhante, essas evidências parecem consistentes com as observações comportamentais do aumento de tremores observado em pombos submetidos à IT e dados obtidos de registros de EMG durante a IT em galinhas (GENTLE, JONES e WOOLLEY, 1989) e pombos (HOHTOLA, 1981), que também apontam para um aumento da frequência de atividade do músculo peitoral durante o período de imobilidade. Esses dados tornam-se importantes, uma vez que aves utilizam-se da atividade muscular como principal mecanismo de termogênese (BICEGO, BARROS e BRANCO, 2007).

É interessante notar que o aumento da temperatura interna de pombos durante a IT não foi diferente daquela observada nos animais que foram apenas manipulados, sem que houvesse indução de imobilidade tônica. Ou seja, nesses animais, a manipulação, isoladamente, foi capaz de desencadear respostas térmicas semelhantes àquelas promovidas pela IT. Nenhuma das investigações anteriores sobre as modificações térmicas durante a IT utilizou-se de controles apenas manipulados (*e.g.* NASH *et al.*, 1976; GENTLE *et al.*, 1989; EDDY e GALLUP, 1990). Outro estudo verificou aumento significativo da temperatura interna em galinhas utilizando como estímulo a manipulação por um experimentador (ROVEE-COLLIER *et al.*, 1991). Neste estudo, porém, as repostas térmicas observadas, não foram comparadas com outros estímulos, também potencialmente termogênicos (*e.g.* IT).

Dados previamente publicados por nosso grupo mostraram que diferentes tipos de estresse como manipulação, transferência para um ambiente novo ou mesmo a simples entrada do experimentador na sala de registro, são capazes de desencadear respostas hiper ou hipotérmicas duradouras em pombos (BITTENCOURT, MELLEU e MARINO-NETO, 2015). De fato, a intensidade e sentido da resposta térmica (aumento ou diminuição da temperatura corporal) em pombos parece existir em função do tipo de estresse ao qual os animais são submetidos (BITTENCOURT, MELLEU e MARINO-NETO, 2015). Aumentos de temperatura em resposta à estímulos estressores também foram observados em aves: patos (MALONEY e GRAY, 1998; CABANAC e GUILLEMETTE, 2001), galinhas (CABANAC e AIZAWA, 2000) e gaivotas (BALL e AMLANER, 1980) e mamíferos: musaranhos (KOHLHAUSE *et al.*, 2011), roedores (GROENINK *et al.*, 1994; BUSNARDO *et al.*, 2010) e humanos (VINKERS *et al.*, 2013). Tanto em aves quanto em mamíferos o aumento da temperatura corporal foi associado principalmente à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), e à consequente liberação de glicocorticóides, (GROENINK *et al.*, 1994; BUSNARDO *et al.*, 2010) e vasoconstrição periférica (MOE *et al.*, 2012; EDGAR *et al.*, 2013). Portanto, as modificações da temperatura corporal observada nos animais submetidos à IT parecem ser um ponto

comum de respostas gerais ao estresse e não uma consequência de processos centrais iniciados especificamente pela imobilidade tônica.

A interpretação dos dados aqui apresentados parece sugerir que circuitos centrais que atuam no controle de comportamentos defensivos e de resposta a estímulos estressores podem ser independentemente ativados por diferentes tipos de estímulos, e que as modificações comportamentais/fisiológicas registradas em resposta a esses estímulos são a soma da ativação de cada um desses circuitos, que orquestrados em uma ordem particular gerem reações apropriadas aos diferentes estímulos. Nesse sentido, modificações de temperatura parecem ser um ponto comum das reações defensivas em pombos.

No presente trabalho também foram observadas quedas da temperatura corporal superficial em pombos submetidos à IT. Este tipo de reação ao estresse também foi observada em galinhas (MOE *et al.*, 2012; EDGAR *et al.*, 2013). Somado aos dados que apontam para o aumento da temperatura interna, uma explicação possível poderia ser que processos autonômicos simpáticos poderiam estar levando a uma vasoconstrição em vasos superficiais nesses animais, contribuindo para o aumento da temperatura corporal interna.

Neste trabalho, não foi possível realizar experimentos para averiguar tais modificações de pressão arterial periférica em pombos durante a IT. Em coelhos, os períodos iniciais da IT são marcados por um aumento significativo da pressão arterial e frequência cardíaca (CARLI, 1974), enquanto outros estudos, também em coelhos, sugerem uma diminuição da pressão arterial (HATTON *et al.*, 1979) e bradicardia (GIANNICO *et al.*, 2014) durante a IT. O fato da IT ser um comportamento heterogêneo, parece explicar a variedade de respostas encontradas na literatura. Ainda, é importante ressaltar que, até onde pudemos averiguar, nenhum estudo foi realizado sobre as respostas da pressão arterial durante a IT em pombos. Nossos dados mostram um aumento da frequência cardíaca durante a IT, somados à diminuição da temperatura corporal superficial, e assim, deve ser examinada a possibilidade de que esses dois eventos estrejam associados a uma vasoconstrição periférica, bem como a alterações da pressão arterial em pombos.

O aumento da FC perdura por 10 minutos após a indução da IT, retornando aos níveis basais, sem que pudesse ser identificada queda significativa da FC. Um aumento de FC durante a IT em pombos também pode ser observado em outro trabalho (RATNER, 1967), mas parece diferir da bradicardia observada durante a IT em galinhas, codornas e coelhos (GENTLE, JONES e WOOLLEY, 1989; VALANCE *et al.*, 2008; GIANNICO *et al.*, 2014). Em coelhos, foi sugerido que durante a IT, a bradicardia observada nestes animais é devida a um aumento do tônus parassimpático (GIANNICO *et al.*, 2014).

Estas evidências parecem contrastar com os dados aqui apresentados, sugerindo que o aumento duradouro da FC observado em pombos submetidos à IT e à manipulação possam ser respostas espécie-específicas. Dados recentemente publicados por nosso laboratório mostraram que pombos apresentam respostas hipotérmicas significantes frente à estímulos nociceptivos ou isolamento social, resposta esta que não pode ser vista em nenhuma outra espécie estudada (para revisão ver: BITTENCOURT, MELLEU e MARINO-NETO, 2015).

O fato de que respostas fisiológicas a certos estímulos sejam apomórficas em pombos, parece contribuir com a idéia de que esses animais possuem adaptações que possibilitam lidar especialmente bem com estresse, permitindo-os assim, colonizar de maneira bem sucedida ambientes urbanos.

É interessante notar que, da mesma forma que ocorreu com a temperatura, as modificações cardíacas observadas no presente trabalho, não são exclusivas da imobilidade tônica. Pudemos observar um aumento significativo da FC em pombos submetidos apenas a manipulação. Este aumento da FC é mais duradouro do que o observado em animais submetidos à IT. O grupo manipulado também apresentou uma menor latência para o retorno aos níveis basais de FC, bem como, uma menor latência (ainda que não significativa) para atingir o pico de FC em comparação ao grupo IT (Fig. 9 D).

Estas diferenças temporais das modificações da FC entre pombos submetidos à IT ou manipulação, parecem reforçar a idéia de que a IT favorece processos semelhantes a uma desativação fisiológica que não pode ser observada após estresses de manipulação apenas. Estes processos

podem ocorrer em paralelo à desativação sensório motora e comportamental discutida acima. É possível sugerir que a resposta da FC durante a IT é bifásica, com uma predominância da atividade simpática durante os períodos iniciais que deve ser substituída por uma ativação parassimpática ao longo do tempo. Se levarmos em conta a tendência dos animais manipulados de atingirem o pico de FC mais cedo do que os animais submetidos à IT, é possível especular que a indução da IT deve mudar o balanço autonômico favorecendo a ativação parassimpática desde o início e que, em um determinado ponto de inflexão predomine sobre a ativação simpática. Entretanto, a metodologia empregada neste estudo não permite testar essa hipótese, uma vez que análises de frequência cardíaca mais apuradas (ECG) devem ser realizadas para estabelecer a contribuição do tônus vagal durante a indução e duração da IT e durante a manipulação.

5.3. Modificações da expressão de c-Fos no mesencéfalo e áreas procencefálicas após a IT

5.3.1. Complexo ICo/GCt

Nossos dados mostram um aumento significativo no número médio de células c-Fos+ em regiões do complexo ICo/GCt mesencefálico de pombos submetidos a uma imobilidade tônica quando comparados aos grupos manipulado e não-manipulado. Em geral, essas mudanças foram mais pronunciadas em níveis intermediários e caudais do mesencéfalo. Em regiões rostrais, o aumento de c-Fos provocado pela imobilidade tônica só pode ser observado na região dorsal do SGP (porém, não na ventral). Todas as regiões do ICo/GCt que apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre o grupo IT e o grupo não-manipulado em nossa análise, também apresentaram tais diferenças em relação ao grupo manipulado.

Portanto, é possível concluir que o aumento do número de células c-Fos observado neste estudo (pelo menos para estas regiões mesencefálicas) foi exclusivamente provocado pela IT (Fig. 12 A-C; Fig 19

B), ou seja, independente do estresse de manipulação, que é indispensável para a indução de imobilidade tônica em pombos.

A manipulação prévia dos animais (*e.g.* manutenção semanal das gaiolas) poderia ter mascarado algum efeito da manipulação sobre a ativação do complexo ICo/GCt pela habituação deste estímulo. Entretanto, nossos dados de temperatura e frequência cardíaca (discutidos acima) mostram que a manipulação experimental foi suficiente para provocar modificações significantes destes parâmetros, sugerindo que mesmo em animais adaptados às condições do biotério estas respostas ao estresse não são sensíveis à habituação. Isto também implica que diferentes circuitos, independentes da ativação do ICo/GCt são responsáveis por estas modificações fisiológicas, e que aparentemente estas regiões encefálicas devem estar associadas aos componentes motores da resposta de IT.

Além disso, foi observado que estímulos de contenção em pombos também não alteraram a expressão de outros genes de resposta imediata (*Egr-1*) no complexo ICo/GCt. Porém, no mesmo trabalho, puderam ser observadas alterações da expressão do *Egr-1* em outras regiões mesencefálicas, diencefálicas (com exceção de núcleos hipotalâmicos), e prétectais (CUNHA, REINER e TOLEDO, 2007). No presente estudo, não foram detectadas modificações da expressão de *c-Fos* nestas regiões em que o *Egr-1* tem sua expressão modificada pela contenção. Essas evidências parecem implicar que diferentes marcadores de atividade neural são sensíveis a diferentes tipo de estresse. Ainda, diferentes marcadores podem ter expressão restrita à diferentes regiões encefálicas. Portanto, seria importante a utilização, em conjunto, de mais marcadores de atividade neural a fim de elucidar os componentes de circuitos encefálicos relacionados com repostas defensivas em pombos.

No presente trabalho, comparamos a marcação *c-Fos* no complexo ICo/GCt com a distribuição de neurônios NADPH-diaforase nesta região. A distribuição da NADPH-diaforase observada neste trabalho foi semelhante à descrita em outros trabalhos no pombo (ATOJI, YAMAMOTO e SUZUKI, 2001) e na galinha (BRÜNING, 1993), porém, nossa descrição no complexo ICo/GCt proporciona mais detalhes de sua distribuição mesencefálica. Além da presença de neurônios NADPHd+

no GCt e ICo descritas nos trabalhos citados, pudemos observar marcação NADPH na região do SGP dorsal previamente não demonstrada. A NADPHd marca regiões específicas da PAG de mamíferos (CARRIVE e PAXINOS, 1994; CANTERAS e GOTO, 1999) e foi utilizada neste, assim como em outros trabalhos (KINGSBURY *et al.*, 2011), para melhor comparar o complexo ICo/GCt de aves com a PAG de mamíferos.

A marcação c-Fos observada no complexo ICo/GCt está apenas parcialmente restrita a regiões ricas em neurônios NADPHd+. Neurônios expressando NADPHd puderam ser encontrados em todos os níveis do GCt que não apresentaram alterações na expressão de c-Fos após a IT, e em todas as subdivisões ICo, nas quais um aumento do número de núcleos c-fos+ pode ser observado após a IT. Pericários NADPHd+ estavam agrupados em duas manchas coincidentes com a marcação c-Fos no ICo-l rostral, enquanto a marcação c-Fos no ICo-m intermediário e caudal ocorreu dentro e fora da área contendo neurônios NADPHd. Imunoreatividade à oxido nítrico sintase neuronal (nNOS) também foi observada no GCt e ICo-m de mandarins (*Taeniopygia guttata*) (KINGSBURY *et al.*, 2011).

O aumento do número de células expressando c-Fos nestas regiões ricas em neurônios NADPHd+ do ICo-l e ICo-m induzido pela IT é especialmente relevante, uma vez que estas áreas foram associadas com a produção de vocalizações de alarme desencadeadas por estímulos ameaçadores em outras aves (*e.g.* ANDREW, 1974; DE LANEROLLE e ANDREW, 1974; CHENG, AKESSON e DE LANEROLLE, 1987; CHENG e HAVENS, 1993; WILD, 1997; DUBBELDAM e DEN BOER-VISSER, 2002b; KINGSBURY *et al.*, 2011; ELLIS e RITERS, 2012). Vocalizações de alarme também podem ser observadas em mamíferos após a estimulação elétrica da PAG (YAJIMA, HAYASHI e YOSHI, 1980; SIEBERT e JÜRGENS, 2003). Juntamente com nossos dados, essas evidências contribuem para a hipótese de que o ICo de aves possa conter circuitos funcional e anatomicamente comparáveis à PAG dorsal de mamíferos (DUBBELDAM e DEN BOER-VISSER, 2002b; KINGSBURY *et al.*, 2011).

O GCt, também dotado de pericários expressando NADPHd, não teve o número de núcleos c-Fos+ modificado pela indução da IT ou

manipulação. Foi sugerido que esta região possa ser comparável à PAG ventral de mamíferos (DUBBELDAM e DEN BOER-VISSER, 2002b; KINGSBURY *et al.*, 2011). Devido à sua posição anatômica, dorsal ao núcleo do nervo oculomotor, e a expressão de NADPHd observada no pombo por nós e por outros autores (ATOJI, YAMAMOTO e SUZUKI, 2001; KINGSBURY *et al.*, 2011), o GCt pode ser comparado à região da PAG lateral, rica em pericários NADPHd, e descrita por Carrive e Paxinos (1994) em gatos, ratos, coelhos, macacos e humanos, denominada cápsula supraoculomotora (*Supraoculomotor cap*).

Aumentos da expressão de c-Fos foram observados no GCt e associados à fase consumatória do comportamento sexual de codornas (IYILIKCI *et al.*, 2014). Aumentos da expressão de c-Fos, também puderam ser observados após comportamentos de fuga e subordinação à co-específicos em passeriformes (*Uraeginthus granatina*; Kingsbury *et al.* 2011). Foi observado que a exposição a predadores aumentou a expressão de c-Fos nas colunas ventrolaterais e laterais da PAG rostral, bem como da cápsula supraoculomotora. Estes mesmos estudos também observaram aumento da expressão de c-Fos em resposta a estes estímulos nas colunas dorsomedial e dorsolateral em ratos (CANTERAS e GOTO, 1999; COMOLI, RIBEIRO-BARBOSA e CANTERAS, 2003) e humanos (SATPUTE *et al.*, 2013). Além disso, a exposição a situações de estresse incontrolável, como contenção ou natação forçada, foram capazes de aumentar o número de núcleos c-Fos+ tanto na coluna dorsal, quanto na coluna ventrolateral da PAG de ratos (LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que a região ventral da PAG de mamíferos é crucial para a expressão de estratégias passivas de enfrentamento (e.g. imobilidade durante testes de medo condicionado) (CARRIVE *et al.*, 1997; WALKER e CARRIVE, 2003). A ativação da PAG ventrolateral em ratos e gatos promove a interrupção ou redução da atividade locomotora, reduz comportamentos ativos e reduz a responsividade à estímulos exteroceptivos (BANDLER e DEPAULIS, 1991; LOVICK, 1993). Esses comportamentos estão associados a estratégias passivas de enfrentamento, e também parecem com os componentes classicamente associados à imobilidade tônica (e.g. imobilidade e diminuição da responsividade à estímulos sensoriais) (GALLUP e RAGER, 1996). Ademais, a indução da

IT promoveu o aumento da expressão de c-Fos nas colunas lateral e ventrolateral (e em menor intensidade, ainda que significativa, nas colunas dorsolateral e dorsomedial) da PAG de cobaias (VIEIRA, MENESCAL-DE-OLIVEIRA e LEITE-PANISSI, 2011). Nesse sentido, a semelhança na expressão de c-Fos no GCt após a IT ou manipulação observada em nossos experimentos parecem contradizer as observações prévias feitas tanto em aves, quanto em mamíferos. Todavia, esta pode ser uma diferença espécie-específica importante dos circuitos defensivos centrais do pombo, especificamente aqueles relacionados a respostas ativas ou passivas em situações de estresse inescapável.

A indução da imobilidade tônica, mas não a manipulação, promoveu o aumento do número de células c-Fos+ no SGP em todos os níveis do eixo rostro-caudal. O aumento observado neste trabalho ocorreu apenas na região dorsal do SGP (SGPd), onde também foram observadas células NADPHd+. A porção ventral do SGP (SGPv) não apresentou a presença de células c-Fos e também não contém neurônios expressando NADPHd.

O SGP circunda a expansão lateral do aqueduto e é classicamente considerada como parte das camadas profundas do teto óptico (Lâmina 15). A distribuição da NADPHd observada no SGPd parece ser contínua com as células presentes no ICo-l (Fig. 11 I). É interessante notar que células NADPH+ presentes na coluna dorsolateral da PAG de mamíferos, também parecem distribuir-se em um contínuo com as camadas profundas do colículo superior (CARRIVE e PAXINOS, 1994). Em pombos, neurônios do SGPd, bem como neurônios do ICo medial e lateral, contribuem para as projeções descendentes tetopontinas e tetobulbares para a formação reticular no tronco encefálico (REINER e KARTEN, 1982; HELLMANN e GÜNTÜRKÜN, 1999). O SGP, dorsal e ventral, também diferem das demais lâminas do teto óptico no sentido de que não são fonte de projeções tectofugais ascendentes para o tálamo visual (*n. rotundus*) (REINER e KARTEN, 1982; HELLMANN e GÜNTÜRKÜN, 1999). As projeções descendentes do SGP e ICo parecem influenciar neurônios da formação reticular envolvidos no controle de circuitos cerebelares e movimentos do pescoço e olhos, bem como circuitos da medula espinhal (REINER e KARTEN, 1982). Portanto, essas regiões

estão em posição de participar nos fenômenos motores e viscerais que acompanham a resposta de IT.

As características anatômicas e funcionais do SGPd em pombos ainda é bastante desconhecida, porém sua posição anatômica é intrigante. O SGPd é adjacente à parede dorsal do ventrículo tectal. Embriologicamente, o ventrículo tectal de aves é considerado como sendo a expansão lateral do aqueduto cerebral (PUELLES *et al.*, 1994), desta forma o SGPd é uma estrutura que, por definição, está contido na região dorsal periaqueductal. Os dados aqui apresentados permitem especular que o SGPd possa ser comparável à PAG dorsolateral ou às camadas profundas dorsomediais, adjacentes à PAG, do colículo superior de mamíferos. Consequentemente, se essa hipótese se provar verdadeira, a posição relativa do ICo, entre o SGPd (comparável a PAG dorsal) e o GCt (comparável à PAG ventral), juntamente com sua intensa marcação NADPHd+, levaria a conclusão de que a região do ICo poderia apresentar características semelhantes à PAG lateral de mamíferos.

As camadas profundas, multimodais sensorio/motoras, do teto óptico são relevantes para a expressão de comportamentos defensivos, especialmente imobilidade em resposta a estímulos ameaçadores em mamíferos (BITTENCOURT *et al.*, 2005; SCHENBERG *et al.*, 2005; FURIGO *et al.*, 2010; DESJARDIN *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2015), répteis (DISTEL, 1978; SUGERMAN e DEMSKI, 1978) e anfíbios (EWERT, 1985; HOFFMANN, BRAZIL ROMERO e DE OLIVEIRA, 1993; GARGAGLIONI, PEREIRA e HOFFMANN, 2001). Foi sugerido que vias teto-reticulares originadas destas camadas do colículo superior, estão envolvidas com a expressão de comportamentos defensivos em roedores (*e.g.*, COIMBRA *et al.*, 2006). Também foi observado em mamíferos um aumento da expressão de c-Fos tanto nas camadas profundas do teto óptico quanto na PAG dorsolateral após a apresentação de estímulos ameaçadores (*e.g.*, SILVEIRA, SANDNER e GRAEFF, 1993; CANTERAS e GOTO, 1999; COMOLI, RIBEIRO-BARBOSA e CANTERAS, 2003; VIEIRA, MENESCAL-DE-OLIVEIRA e LETTE-PANISSI, 2011)

Esse similaridade anatômica e funcional geral entre a PAG e as camadas profundas do teto óptico pode refletir suas origens embriológicas

comuns. A porção alar dorsal do mesencéfalo embrionário que origina o colículo superior e a PAG em mamíferos também origina o teto óptico e o *torus semicircularis* de vertebrados não mamíferos (BUTLER e HODOS, 2005). De fato, nossos dados podem fortalecer a noção de que a PAG e camadas profundas do teto óptico podem ser consideradas como uma única estrutura geral (segmentada por feixes de fibras dirigindo-se do e para o teto óptico) derivada da formação reticular mesencefálica. Esta hipótese foi sugerida por trabalhos neuroanatômicos iniciais a respeito destas estruturas em mamíferos (HOLSTEGE, 1991) e pombos (REINER e KARTEN, 1982), indicando que essas áreas devam ter sido originadas como especializações dos sistemas defensivos da formação reticular de vertebrados antepassados (EWERT, 1985).

Nossos dados também apontam para um aumento significativo do número de células c-Fos+ na região do MLd. Esse núcleo que se localiza ventral à expansão lateral do aqueduto e divide o ICo em suas porções lateral e medial, faz parte da circuitaria auditiva das aves, sendo comparável ao *torus semicircularis* de répteis e ao colículo inferior de mamíferos (CONLEE e PARKS, 1986). Esse aumento da expressão de c-Fos no MLd pode ter duas interpretações distintas. O MLd pode fazer parte da circuitaria defensiva de aves, modulando a expressão do comportamento defensivo nesses animais. Essa interpretação estaria de acordo com trabalhos que mostraram que a estimulação elétrica ou química do colículo inferior de roedores provoca aumento do comportamento de *freezing* (FERREIRA-NETTO, BORELLI e BRANDÃO, 2007), bem como um aumento da expressão de c-Fos após *freezing* (BRANDÃO *et al.*, 2005). Todavia, essa explicação poderia não ser correta para o caso da IT, uma vez que Vieira e cols. (2011) não observaram aumento do número de células c-Fos+ no colículo inferior de cobaias submetidas à imobilidade tônica.

É importante notar que estímulos sonoros parecem influenciar a duração da IT em aves (GALLUP e RAGER, 1996). Foi observado em galinhas que a apresentação de tons com intensidades de 60db a 80db, aos quais os animais não estavam habituados, provocou um aumento significativo na duração da IT. Em contrapartida, no mesmo experimento, a apresentação de tons com intensidade de 90db provocou o término da IT

em 100% dos animais testados (HATTON e THOMPSON, 1975). Esses dados sugerem que estímulos auditivos, dependendo da intensidade, podem aumentar a aversividade do ambiente (consequentemente aumentando a duração da IT) ou promover o término da IT através de sobressaltos causados por tons mais intensos.

O aumento de c-Fos no MLd, observado no presente trabalho, pode ser devido a um aumento da atividade de vias sensoriais auditivas que podem estar envolvidas na modulação da duração da IT. Ainda, um aumento da excitabilidade de regiões responsáveis pelo processamento de estímulos auditivos, poderia contribuir para o término da IT, tornando os animais mais responsivos a estímulos sonoros do ambiente, e por consequência, mais propensos a apresentarem sobressaltos durante a imobilidade tônica. Evidências que reforçariam essas hipóteses poderiam ser fornecidas por uma investigação da expressão de c-Fos após a IT, em outras regiões responsáveis por processamento sensorial (em aves, principalmente visual e auditivo).

É importante mencionar que conexões recíprocas topograficamente organizadas entre as camadas profundas do teto óptico (incluindo a lâmina 15, SGPd) e as camadas externas (concha) do MLd foram descritas na coruja (*Tyto alba*), sendo proposto que esse circuito é responsável por criar um mapa auditivo que guia e orienta o movimento destes animais (HYDE e KNUDSEN, 2000). Também foi observado que a área do ICo responsável por vocalizações reprodutivas em rolinhas (*Streptopelia risoria*) possui neurônios que projetam-se para MLd (CHENG e HAVENS, 1993) e recebem projeções originadas no MLd (AKESSON, DE LANEROLLE e CHENG, 1987; CHENG, AKESSON e DE LANEROLLE, 1987). Além disso, foi observado que partes do ICo recebem informações auditivas do MLd, e integram essa informação com entradas sensoriais multimodais não auditivas, faz o relé dessa informação, via tálamo, para regiões do Arcopallium, homólogo da amígdala de mamíferos, e implicado na expressão de comportamentos defensivos em aves e mamíferos (WANG, BRZOZOWSKA-PRECHTL e KARTEN, 2010; CALABRESE e WOOLLEY, 2015; KARTEN, 2015).

É interessante notar que em inspeção qualitativa do material c-Fos, não pudemos encontrar expressão significativa no córtex auditivo

primário (campo "L" do Mesopallium) dos pombos submetidos a IT, nem em outras regiões talâmicas parte das vias auditivas ascendentes (e.g. n. ovoidalis), sugerindo que a ativação do MLd observada no presente trabalho seja de fato parte do processamento defensivo e, possivelmente, independente de processamentos sensoriais de alta ordem.

Em resumo, ainda que o GCt tenha sido classicamente comparado à PAG de mamíferos (DUBBELDAM e DEN BOER-VISSER, 2002a), é importante notar que devido a lateralização e hipertrofização do teto óptico das aves, regiões comparáveis às subdivisões da PAG de mamíferos (situadas próximas à linha média e ventrais ao colículo superior nestes animais) nas aves, também devem ser lateralizadas acompanhando o posicionamento ventral ao teto óptico. Dados neuroanatômicos e funcionais revisados por GOODSON e KINGSBURY (2013) levaram a hipótese de que a PAG das aves teria um formato de cálice aberto, com o GCt sendo homólogo da coluna ventrolateral e o ICo homólogo às regiões dorsais da PAG de mamíferos. De fato, os dados apresentados e discutidos neste trabalho, indicam que as regiões laterais como o ICo-l, ICo-m, dividem atributos anatômicos e funcionais (no controle de comportamentos defensivos) com a região periaqueductal de mamíferos, sustentando essa hipótese.

Entretanto, nossas observações da ausência de modificações da expressão de c-Fos no GCt após a IT, e a intensa ativação do SGPd, após a IT, pode complementar a hipótese de GOODSON e KINGSBURY (2013). Somando nossos dados de expressão de c-Fos e NADPHd aos encontrados na literatura, poderíamos formular a hipótese de que a PAG das aves seria melhor comparada a um cálice fechado, onde o GCt e ICo-m seriam comparáveis à PAG ventral e ventrolateral respectivamente, colocando o SGPd como possível homólogo de regiões dorsais da PAG de mamíferos. A figura 20 ilustra a hipótese porposta por GOODSON e KINGSBURY (2013) para a possível homologia entre as regiões do meencéfalo de passeriformes e a PAG de mamíferos, em comparação com a hipótese do presente trabalho.

Ainda que dados anatômicos e funcionais sejam escassos e que os circuitos encefálicos relacionados com comportamentos defensivos estejam longe de ser completamente elucidados na maioria das classes de

vertebrados, a similaridades de padrões de expressão gênica e efeitos comportamentais, fruto da estimulação de regiões mesencefálicas, comparáveis, indicam ao menos algum grau de conservação destes circuitos ao longo da evolução. Neste sentido, nossos resultados indicam que circuitos mesencefálicos envolvidos em comportamentos de medo e defesa podem ser substancialmente, mas talvez não completamente, conservados em aves e mamíferos.

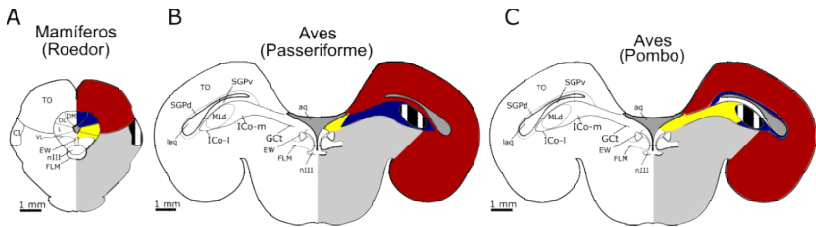


Figura 20. Hipótese comparativa entre a PAG de mamíferos e o complexo ICo/GCt de aves. A) Desenho esquemático do mesencéfalo de mamíferos. B) Desenho esquemático do mesencéfalo de aves mostrando a comparação hipotética com as regiões do mesencéfalo de mamíferos baseado no proposto por GOODSON e KINGSBURY (2013). C) Desenho esquemático do mesencéfalo de aves mostrando a comparação hipotética com as regiões do mesencéfalo de mamíferos baseado no proposto por GOODSON e KINGSBURY (2013) somados aos dados do presente trabalho.

5.3.2. Distritos hipotalâmicos

No presente trabalho investigamos alterações do número de núcleos c-Fos+ no núcleo paraventricular de pombos após a imobilidade tônica e após a manipulação. Também realizamos no material histológico, dupla marcação c-Fos/CRH, afim de descrever o envolvimento dos neurônios peptidérgicos produtores de hormônio liberador de corticotrofinas no comportamento de imobilidade tônica em pombos.

De uma maneira geral, o eixo HPA é conservado em vertebrados (DENVER, 2009). O eixo HPA age diretamente sobre o controle da resposta hormonal ao estresse. Dado um estímulo estressor, a resposta

hormonal se inicia através da liberação de CRH pelas células neurosecretoras do PVN parvocelular na circulação porta-pituitária. Por sua vez, o CRH age em receptores CRF1 localizados em células secretoras da pituitária anterior liberando ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) na circulação (HAUGER *et al.*, 2006). O ACTH atua no córtex nas glândulas adrenais liberando, na circulação, hormônios glicocorticóides, como a corticosterona (no caso de répteis, roedores e aves) ou cortisol (no caso de primatas e peixes teleósteos) (DENVER, 2009).

Estressores fisiológicos, como queda da pressão arterial, hipoglicemia ou hipóxia, ativam o PVN e, conseqüentemente, aumentam os níveis plasmáticos de glicocorticóides, via conexões do tronco encefálico com o núcleo paraventricular do hipotálamo (HERMAN e CULLINAN, 1997). Em contrapartida, estímulos estressores que dependem da avaliação do ambiente ou processamento sensorial (e.g. estresse de contenção, exposição ao predador ou choque nas patas), promovem o aumento de glicocorticóides através da ativação de estruturas límbicas (principalmente da amígdala) que por sua vez manda projeções para o PVN (HERMAN e CULLINAN, 1997). Ao mesmo tempo, os neurônios CRH+ do PVN mandam projeções para estas estruturas da amígdala, BSTn e outras estruturas límbicas e corticais (HAUGER *et al.*, 2006; BECKERMAN *et al.*, 2013). Estas conexões do PVN com áreas límbicas também puderam ser observadas em aves (KORF, 1984; BONS *et al.*, 1988).

No presente trabalho, observamos neurônios CRH+ populando a região parvocelular do PVN de pombos. Estas células, fusiformes e bipolares, apresentam uma orientação perpendicular ao terceiro ventrículo e enviam processos em direção à camada ependimal, bem como processos varicosos CRH+ que adentram o parênquima e parecem atingir a eminência mediana, também pudemos observar estas fibras atingindo partes do BSTn. Essa morfologia celular (KORF, 1984), bem como a distribuição de fibras CRH+, são consistentes com observações do PVN de aves publicadas em estudos anteriores realizados em galinhas (WANG e MILLAM, 1999), codornas (YAMADA e MIKAMI, 1985; PANZICA *et al.*, 1986), passeriformes (*Sturnus vulgaris* e *Melospiza melodia*) (BALL, FANS e WINGFIELD, 1989) e pombos (BONS *et al.*, 1988).

Não pudemos observar alterações no número de células c-Fos+ no PVNd ou PVNv após a manipulação ou IT em pombos. Entretanto, detectamos um aumento significativo na expressão de c-Fos em neurônios CRH+ no PVNv após a manipulação, e um menor aumento após a IT em comparação ao grupo não-manipulado. A porcentagem de células CRH+ ativadas, ou seja, a porcentagem de células CRH+ que também expressaram c-Fos, também foi significativamente maior nos grupos manipulados e IT em comparação ao grupo controle, porém sem diferenças entre os grupos manipulado e IT. Essas diferenças também foram observadas apenas para o PVNv, mas não para o PVNd.

Outro trabalho também foi capaz de detectar aumento significativo de células vasotocinérgicas ativadas em galinhas submetidas a estresse de contenção aguda. Esta diferença também pode apenas ser detectada nas regiões ventrais e caudais do PVN (NAGARAJAN *et al.*, 2014). Ainda, a contenção aguda ou crônica é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona em ratos (PITMAN, OTTENWELLER e NATELSON, 1988), bem como, aumentar o número de células c-Fos+ no PVN (LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006). Em codornas e galinhas, tanto a manipulação, quanto a indução de imobilidade tônica acarretaram em um aumento da concentração plasmática de corticosterona em comparação a animais não manipulados (KANNAN e MENCH, 1996; JONES, MARIN e SATTERLEE, 2005). Juntamente com nossos dados, é possível concluir que a ativação do eixo HPA é comum tanto à manipulação quanto à IT, e talvez seja uma consequência da contenção necessária para a indução da imobilidade tônica. É importante mencionar que tanto no procedimento de indução de IT, quanto na manipulação, os animais são isolados de seus co-específicos. Uma vez que pombos são sensíveis ao isolamento, apresentando comportamentos defensivos nestas situações (DE SOUZA *et al.*, 2009), a ativação do PVN nos dois grupos também pode ter sido influenciada por este aspecto do procedimento experimental.

Entretanto, é interessante mencionar que os níveis plasmáticos de corticosterona estão positivamente correlacionados com o tempo de IT em coelhos (CARLI, FARABOLLINI e DI PRISCO, 1979). De maneira semelhante, a infusão de corticosterona prolonga o tempo de IT em galinhas (JONES, BEUVING e BLOKHUIS, 1988) e microinjeções de

corticosterona no núcleo *reticularis pontis oralis* prolonga a IT em ratos (SANDOVAL-HERRERA *et al.*, 2011). Ainda, a seleção artificial de codornas para características de longa ou curta IT provoca diferenças entre linhagens na resposta a estímulos estressantes. A contenção aguda ou crônica provocou um aumento dos níveis de corticosterona em codornas selecionadas para longas ITs em comparação com codornas selecionadas para exibirem ITs curtas (HAZARD *et al.*, 2008; CALANDREAU *et al.*, 2011). Porém, não foram observadas diferenças entre as linhagens nos níveis plasmáticos de corticosterona após a injeção de ACTH (BEUVING, JONES e BLOKHUIS, 1989). Essas evidências, em conjunto com as aqui apresentadas, parecem sugerir que as células CRH+ do PVN são igualmente ativadas durante os estímulos aversivos. No entanto, o caráter modulatório da corticosterona sobre o IT, bem como as diferenças na resposta hormonal ao estresse entre as duas linhagens de codornas, implicam que a corticosterona deve agir em um mecanismo de *feedback* positivo em animais submetidos a IT/em linhagens que expressam longas ITs.

Este é também o primeiro trabalho a explorar a ativação das células CRH+ no PVN de aves submetidas à imobilidade tônica. É possível esperar que, devido a ativação semelhante do PVN entre animais do grupo IT e manipulado, que os níveis plasmáticos de corticosterona sejam semelhantes entre os dois grupos. Contudo, não podemos descartar outros processos centrais (independentes da ativação do PVN) capazes de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona durante a IT.

Atualmente, estamos realizando experimentos para avaliar os níveis de corticosterona em pombos submetidos à imobilidade tônica e a diferentes tempos de manipulação. Com estes experimentos esperamos poder elucidar o papel da ativação do PVN durante a IT e manipulação de pombos.

Além do PVN, também avaliamos o núcleo préptico medial (POM). Em roedores, o POM faz conexões recíprocas com o PVN, área septal lateral, BSTn, PAG e com diversas estruturas do tronco encefálico (CHIBA e MURATA, 1985; RIZVI, ENNIS e SHIPLEY, 1992). Conexões semelhantes do POM também foram observadas em codornas e pombos (BERK e BUTLER, 1981; BALTHAZART *et al.*, 1994) . Em

mamíferos, o POM está envolvido com uma série de processos comportamentais e autonômicos como comportamento maternal (NUMAN, ROSENBLATT e KOMISARUK, 1977), regulação de temperatura (SATINOFF, LIRAN e CLAPMAN, 1982; CRAWSHAW *et al.*, 1985) e controle do ciclo sono-vigília (DATTA *et al.*, 1988). Surpeendentemente, não observamos diferenças estatisticamente significantes na expressão de c-Fos no POM em nenhuma das situações experimentais, apesar de que, à observação qualitativa, tenha nos parecido haver um maior número de células c-Fos+ nos animais submetidos à IT (ver figura 13 G,H). Esta região é considerada como parte importante dos circuitos de controle da temperatura corporal em aves. Em pombos, a lesão do POM levou a um aumento da temperatura (NECKER e GNUSCHKE, 1989) e a ativação de receptores muscarínicos no POM promoveu um aumento da temperatura e aumento da vasoconstricção (KOMAROVA, 2009). Assim, ainda está por ser demonstrado um possível papel desta região no aumento de temperatura observado após a IT e a manipulação observadas neste trabalho Além disso, até onde pudemos verificar em nosso material, outras regiões hipotalâmicas também não apresentaram uma expressão de c-Fos significativa. Esses achados também são relativamente inesperados, em virtude de que POM (além de outras regiões hipotalâmicas, nas quais também não notamos mudanças aparentes na expressão de c-Fos) foi implicado na expressão de respostas defensivas, tanto em aves (GOODSON e KINGSBURY, 2013) quanto em mamíferos (RIZVI, ENNIS e SHIPLEY, 1992; GROSS e CANTERAS, 2012). Possivelmente, estudos utilizando maior número de animais ou metodologias mais sensíveis possam ser realizados, a fim de substanciar as evidências qualitativas do envolvimento do POM no comportamento de IT em pombos apresentadas neste trabalho.

5.3.3. Distritos telencefálicos

5.3.3.1. Área septal

Nossos dados apontam para um aumento da ativação da área septal lateral (mas não da medial), marcada pelo incremento do número de

células c-Fos+ em pombos submetidos a imobilidade tônica, mas não à manipulação. Na literatura, existem poucos estudos que investigaram o papel da área septal no controle da IT. Porém, foi observado que lesões septais aumentaram a duração da IT e diminuíram o número de induções em coelhos (WOODRUFF e LIPPINCOTT, 1976) e, em galinhas e lesões septais bilaterais, não alteraram o tempo de imobilidade tônica (MASER, KLARA e GALLUP, 1973). É interessante mencionar, que ratos expostos a um protocolo de desamparo apendido, promovido por choques inescapáveis, apresentaram menor expressão de c-Fos na área septal lateral quando comparados aos controles sem manipulação (STECIUK *et al.*, 1999). Ainda, a lesão da área septal promoveu o aumento de comportamentos de coping passivo no teste do nado forçado, outra situação inescapável em ratos (SINGEWALD *et al.*, 2011). Estas evidências parecem contradizer os achados do presente trabalho. Todavia, o estresse mediado por estímulos interoceptivos, como privação de álcool em ratos (TIMOFEEVA, 2010) e estímulos dipsogênicos seguidos por privação de água em pombos (DOS SANTOS *et al.*, 2015), promovem o aumento da expressão de c-Fos na área septal lateral destes animais. Portanto, a ativação da área septal lateral observada após a IT pode estar relacionada à estímulos interoceptivos também observados neste trabalho (e.g. aumento da FC ou modificações da temperatura).

A ativação da área septal lateral de pombos submetidos a IT, um estímulo de estresse inescapável, ainda poderia ser fruto de diferenças espécie-específicas das vias septais nestes animais. De fato, foi observado que lesões da área septal lateral promovem efeitos opostos em duas espécies de passeriformes. Em pardais machos (*Spizella pusilla*), animais que exibem comportamento de defesa territorial, estas lesões acarretam no aumento da agressão intra-específica, enquanto em mandarins (*Taenopygia guttata*), animais sociais, lesões semelhantes diminuem comportamentos agressivos entre machos (GOODSON *et al.*, 1998). Estes efeitos opostos foram atribuídos a diferenças espécie-específicas de vias peptidérgicas septais nestas duas espécies (GOODSON, 1998), e podem ser interpretados como adaptações destas vias que permitam com que estes animais exibam estratégias ecológicas diferentes (territorial Vs social.)

Assim como o observado em roedores (MOSKO, LYNCH e COTMAN, 1973; MEIBACH e SIEGEL, 1977; AMARAL e KURZ, 1985), a área septal lateral de aves abriga corpos celulares que enviam projeções massivas (principalmente colinérgicas) para o hipocampo (ATOJI e WILD, 2004; MONTAGNESE *et al.*, 2004). As características hodológicas e neuroquímicas da região septal de aves e mamíferos indicam que as duas estruturas sejam comparáveis nestes grupos (REINER *et al.*, 2004; REINER, YAMAMOTO e KARTEN, 2005). Além de suas importantes conexões hipocampais, a área septal lateral, recebe aferentes do Ai e PoA (MONTAGNESE *et al.*, 2008).

Desta maneira, a SI parece ter características hodológicas que possibilitam seu envolvimento no controle de comportamentos defensivos. Entretanto, a escassez de dados funcionais sobre o papel da SI no controle de comportamentos defensivos e da IT em um maior número de espécies de aves, dificulta a conclusão sobre o caráter espécie específico de vias septais envolvidas no controle da IT. O expressivo aumento de c-Fos, exclusivamente após a IT, na SI de pombos sugere que esta região deva estar implicada em algum aspecto deste comportamento. Contudo, estudos envolvendo lesões desta região em pombos, bem como em outras aves, podem contribuir para elucidar esta questão .

5.3.3.2. Hipocampo

Observamos um aumento significativo da expressão de c-Fos na região dorsolateral ventral (DLv), bem como, uma diminuição no DLd após a indução da IT em pombos. Estas diferenças foram observadas apenas nas porções mais caudais do hipocampo e também não pudemos encontrar uma marcação consistente em regiões ventrais do hipocampo (e.g. núcleo Tr), tanto em níveis rostrais quanto caudais. Até onde pudemos encontrar, este é o primeiro trabalho dedicado a investigar modificações da expressão de c-Fos no hipocampo de aves, ou mesmo o efeito de lesões ou estimulação do hipocampo sobre a expressão da IT em aves.

Contudo, em mamíferos, foi observado que lesões hipocampais aumentam a duração da IT tanto em ratos (WOODRUFF e BAILEY,

1979) quanto em coelhos (WOODRUFF, HATTON e MEYER, 1975). De maneira semelhante, lesões extensas do pálido dorsal (incluindo o hipocampo) de galinhas aumentam de forma significativa a duração da IT (GENTLE, JONES e MAGUIRE, 1985). É importante mencionar que o hipocampo de aves possui características neuroquímicas e hodológicas que permitem concluir que esta estrutura seja homóloga ao hipocampo de mamíferos (COLOMBO e BROADBENT, 2000; ATOJI *et al.*, 2002; ATOJI e WILD, 2006; HEROLD *et al.*, 2014).

Além de seu envolvimento em tarefas de memória espacial e navegação (GAGLIARDO, IOALÉ e BINGMAN, 1999; BINGMAN *et al.*, 2003; SHIMIZU *et al.*, 2004; BINGMAN *et al.*, 2005; GAGLIARDO *et al.*, 2014), o hipocampo das aves também parece ser relevante para a expressão de comportamentos defensivos em testes de condicionamento aversivo clássico (REIS *et al.*, 1999; BRITO, BRITTO e FERRARI, 2006), bem como esquiva aversiva aprendida (ÜNAL *et al.*, 2002; NIKOLAKOPOULOU, DAVIES e STEWART, 2006). Entretanto, seu envolvimento com a expressão de comportamento defensivos não condicionados ainda permanece desconhecido.

O hipocampo de mamíferos está envolvido em fenômenos de aprendizagem, memória, navegação espacial e no controle de respostas neuroendócrinas (SAPOLSKY, KREY e MCEWEN, 1984; SAPOLSKY *et al.*, 1990; SQUIRE, 1992; JARRARD, 1993; EICHENBAUM, 1996; MOSER, KROPFF e MOSER, 2008). Ainda em mamíferos, o hipocampo também tem um papel fundamental na expressão de comportamentos defensivos. Lesões do hipocampo ventral de ratos diminuem comportamentos defensivos tanto não condicionados (exposição ao odor de um predador) quanto condicionados (re-exposição ao contexto) (PENTKOWSKI *et al.*, 2006). Camundongos *knock-out* para receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) no hipocampo ventral (BARKUS *et al.*, 2010), bem como a infusão intra-hipocampal de ácido γ -aminobutírico (GABA) em ratos (ENGIN e TREIT, 2007) diminuem a expressão de comportamentos relacionados a estratégias de enfrentamento passivas (imobilidade) frente a testes preditivos da ação de fármacos ansiolíticos.

Outros trabalhos demonstraram a existência de formação de memória durante a IT em galinhas (GALLUP *et al.*, 1980). Entretanto, no

presente, e em outros trabalhos (EWELL, CULLEN e WOODRUFF, 1981; EDELAAR *et al.*, 2012; BRUST, WUERZ e KRÜGER, 2013; SANTOS *et al.*, 2015), foi mostrado que a IT em si não parece estar sujeita a habituação da resposta. Isso pode ser devido à inibição de algumas das estruturas hipocâmpais que impediriam a formação de memória com relação ao evento da IT propriamente dito.

O DLv e DLd parecem comparáveis a partes do Córtex Entorrinal de mamíferos (ATOJI e WILD, 2006; HEROLD *et al.*, 2014). Tanto o DLv quanto o DLd recebem, principalmente, aferentes originados de regiões telencefálicas sensoriais primárias e associativas como o Hyperpallium apicale, Hyperpallium densocelulare e Nidopallium frontale (ATOJI e WILD, 2004). Ambas as regiões projetam-se principalmente para outras regiões hipocâmpais como o Tr e DMv (ATOJI e WILD, 2004). Foi mostrado que o DLv envia projeções (de natureza desconhecida) para o DLd, porém, o contrário não foi observado (ATOJI e WILD, 2004). Portanto, é possível que as células c-Fos+ observadas no DLv estejam inibindo o DLd, e conseqüentemente inibindo outros distritos hipocâmpais. Uma vez que essas regiões dorsolaterais caudais do hipocampo, parecem ser o principal relé de informações multimodais vindas do telencéfalo para o resto do hipocampo, a inibição destas regiões inibiria o hipocampo como um todo. Outros estudos promovendo a estimulação elétrica ou química do DLd e DLv, ou ainda, a sua ablação, seriam necessários para testar essa hipótese.

Como já mencionado, o hipocampo faz conexões importantes com a área septal. A via septo-hipocâmpal possui um papel crucial em processos de inibição comportamental em mamíferos (HAMILTON, KELSEY e GROSSMAN, 1970; GRAY *et al.*, 1981; GRAEFF, 1994; MCNAUGHTON e CORR, 2004). As projeções colinérgicas da área septal para o hipocampo estão intimamente associadas com a evocação de ondas teta no hipocampo de mamíferos (STEWART e FOX, 1990; LEE *et al.*, 1994). Ainda, lesões hipocâmpais aumentam a duração da IT em ratos (WOODRUFF e BAILEY, 1979) e coelhos (WOODRUFF, HATTON e MEYER, 1975).

Entretanto, é interessante notar que um aumento de ondas teta pode ser observado no hipocampo de coelhos durante a IT (KLEMM,

1971). Ainda, a administração de escopolamina (um antagonista colinérgico), foi capaz de aumentar a duração de IT e abolir o ritmo teta hipocampal observado em coelhos (HATTON, WOODRUFF e MEYER, 1975). As projeções colinérgicas da área septal para o hipocampo estão intimamente associadas com a evocação de ondas teta no hipocampo de mamíferos (STEWART e FOX, 1990; LEE *et al.*, 1994).

Somados aos dados eletrofisiológicos e funcionais, nossos dados sugerem que diferentes regiões hipocampais devem estar envolvidas, pelo menos em alguns aspectos, no comportamento de IT. Nossos dados não permitem determinar claramente qual o papel do hipocampo de pombos no controle da IT. Entretanto, o aumento e diminuição seletivos da atividade de regiões hipocampais parecem implicar em uma circuitaria bem definida, da qual essas regiões são parte, e que estão de alguma forma contribuindo para a expressão da IT em pombos.

5.3.3.3. Arcopallium e amígdala estendida

Em nossa análise quantitativa da expressão de c-Fos do Arcopallium, detectamos aumentos significantes do número de núcleos c-Fos+ nos diferentes grupos experimentais. As regiões do Arcopallium dorsal e Arcopallium intermédio apresentaram aumentos significantes do número de núcleos c-Fos+ em comparação aos grupos não-manipulado e manipulado. Ainda, pudemos encontrar um aumento significativo da expressão de c-Fos+ no núcleo posterior do Arcopallium (PoA), apenas no grupo manipulado em comparação ao demais grupos, bem como, um aumento na expressão de c-Fos no Núcleo taeniae (TnA) em ambos os grupos, IT e manipulado, em comparação ao grupo não-manipulado.

Lesões do Arcopallium intermédio e dorsal provocaram um aumento da duração da IT também em galinhas (MASER, KLARA e GALLUP, 1973). Também em galinhas, a remoção de grande parte do telencéfalo dorsal (deixando intacto o Arcopallium) também aumentou de maneira significativa o tempo de IT (GENTLE, JONES e MAGUIRE, 1985). A lesão do PoA não alterou a duração da imobilidade tônica, porém, modificou outros comportamentos defensivos como imobilidade no teste do campo aberto em codornas (SAINT-DIZIER *et al.*, 2009). É

interessante notar ainda, que galinhas manipuladas cronicamente por 10 dias, apresentavam menor duração de IT e um maior número de contenções para exibirem imobilidade (FLUCK *et al.*, 1997). Estes mesmos animais também apresentavam níveis menores de GABA no Arcopallium intermédio e dorsal (FLUCK *et al.*, 1997). Somados aos nossos resultados, essas evidências sugerem que o Arcopallium tem um papel na modulação da duração da IT em aves.

De uma maneira geral, o Arcopallium tem sido comparado ao complexo amígdaloide dos mamíferos e contém sub-populações heterogêneas de neurônios, fazendo com que apenas partes desta estrutura sejam homólogas à amígdala dos mamíferos (REINER *et al.*, 2004). Regiões laterais e medias do Arcopallium posterior, especificamente o PoA e o TnA, apresentam características hodológicas, embriológicas e neuroquímicas que permitem a conclusão de que estas estruturas são homólogas a partes da amígdala de mamíferos (ZEIER e KARTEN, 1971; VEENMAN, WILD e REINER, 1995; PUELLES *et al.*, 2000; JARVIS *et al.*, 2005).

Outras regiões como o Arcopallium intermédio, medial e dorsal, não parecem ter uma relação clara com a amígdala de mamíferos. Por exemplo, o Arcopallium intermédio (Ai) recebe projeções somáticas e envia eferentes, via trato occipito-mesencefálico, para os gânglios da base, medula espinhal e núcleos pré-motores da formação reticular no tronco encefálico. (ZEIER e KARTEN, 1971; DAVIES *et al.*, 1997; KRÖNER e GÜNTRÜNKÜN, 1999). Também deve ser mencionado que o Ai também possui conexões com o SGPd no mesencéfalo (porém, não para outras lâminas do teto óptico), bem como conexões com a área septal lateral (ZEIER e KARTEN, 1971; MONTAGNESE *et al.*, 2008).

O Arcopallium dorsal (Ad), apresenta características neuroquímicas e citoarquitetura distintas do Ai (SUN e REINER, 2000). Porém, o Ad também exibe características sensoriomotoras, recebendo projeções de regiões paliais sensoriais e enviando eferentes para regiões motoras dos gânglios da base (KRÖNER e GÜNTRÜNKÜN, 1999). Todavia subdivisões destas estruturas podem apresentar algumas características amígdaloídes (REINER *et al.*, 2004). Ao contrário do observado em aves, em lagartos (*Podarvis hispanica*), lesões de estruturas

amigdalóides subpalias foram capazes de reduzir o tempo de IT (DAVIES *et al.*, 2002).

Em mamíferos, estudos farmacológicos mostraram que a inativação da amígdala central (CeA), através de microinjeções locais de mucimol (agonista GABA_A) ou carbacol (agonista colinérgico), reduziu o tempo de imobilidade tônica em cobaias (LEITE-PANISSI, MONASSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999; LEITE-PANISSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002). Ao mesmo tempo, também em cobaias, a ativação do CeA através da administração de CRH aumentou o tempo de IT (DONATTI e LEITE-PANISSI, 2011). De maneira semelhante, microinjeções de carbacol na amígdala basolateral (BLA) provocam uma diminuição significativa do tempo de IT em cobaias (LEITE-PANISSI, MONASSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999). ainda em cobaias, microinjeções de serotonina (5-HT) ou do agonista de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) na amígdala basolateral (BLA) também reduziram o tempo de IT (LEITE-PANISSI *et al.*, 2006). Assim, e de forma surpreendente, a inibição de regiões da amígdala em mamíferos, bem como lesões em regiões amigdalóides de répteis, parecem ter efeitos opostos sobre a IT em relação aos observados nos estudos com lesões de regiões amigdalóides de aves. sugerindo que o papel desta estrutura nos comportamentos defensivos não seja conservado nestes amniotas e que apresentem mecanismos taxa-específicos na regulação da IT.

O Núcleo taeniae do Arcopallium, apresentou um aumento da expressão de c-Fos em comparação ao grupo não manipulado, tanto do grupo manipulado, quanto do grupo IT. Até onde pudemos encontrar, não existem outros estudos relacionando o TnA com a expressão da IT em aves. A lesão do núcleo taeniae aumentou o número de vocalizações em codornas fêmeas expostas a machos agressivos, um comportamento que cessa em animais sem a lesão (CHENG *et al.*, 1999), ou seja, a lesão parece ter eliminado posturas de submissão das fêmeas em resposta a agressão por parte dos machos. Lesões do TnA de estorninhos (*Sturnus vulgaris*), um passeriforme, diminui a distância entre co-específicos do grupo, aumentando o número de encontros agonísticos agressivos (CHENG *et al.*, 1999). Também foi observado um aumento da expressão de EGR-1 no TnA de pombos após a apresentação de um estímulo aversivo (choque nas

patas) (BRITO, BRITTO e FERRARI, 2011). A diminuição da expressão de comportamentos defensivos após a lesão do TnA, somada ao aumento da expressão de c-Fos observada em pombos submetidos à IT ou à manipulação, sugere que o TnA esteja diretamente envolvido na expressão de respostas à situações aversivas em aves.

O TnA é uma estrutura subpalial, adjacente ao Arcopallium medial, que recebe projeções do bulbo olfativo, hipocampo e area septal medial (REINER e KARTEN, 1985; CHENG *et al.*, 1999; ATOJI e WILD, 2004) possuindo eferentes, principalmente GABAérgicos, que dirigem-se a outras estruturas límbicas como, o hipocampo e hipotálamo (CASINI, BINGMAN e BAGNOLI, 1986; CHENG *et al.*, 1999). Conexões semelhantes também podem ser observadas na amígdala medial (MeA) de mamíferos (CANTERAS, SIMERLY e SWANSON, 1995; SWANSON e PETROVICH, 1998; GROSS e CANTERAS, 2012), e essas evidências, somadas a similaridades neuroquímicas (YAMAMOTO *et al.*, 2005), sugerem que essas estruturas sejam comparáveis entre aves e mamíferos (REINER *et al.*, 2004; JARVIS *et al.*, 2005; REINER, YAMAMOTO e KARTEN, 2005).

Em mamíferos, a amígdala medial tem um importante papel na detecção de pistas olfativas ambientais sobre predadores ou co-específicos. Ratos expostos ao odor, ou a um gato, apresentaram um aumento de células c-Fos+ na amígdala medial posterovenral em comparação aos controles (DIELENBERG, HUNT e MCGREGOR, 2001; MARTINEZ *et al.*, 2011). Em outro estudo, a administração do fármaco ansiolítico Midazolam (modulador alostérico positivo de receptores GABA_A) foi capaz de reduzir comportamentos de análise de risco, bem como a expressão de c-Fos no MeA em ratos expostos ao odor de gato, porém, sem afetar o número de células c-Fos+ em outros distritos envolvidos em comportamentos defensivos (*e.g.* PAG e distritos hipotalâmicos) (MCGREGOR *et al.*, 2004). Em contrapartida, hamsters (espécie não reportada) expostos a co-específicos dominantes, adotam posturas de submissão e apresentaram aumento da expressão de mRNA para c-Fos na amígdala medial posterodorsal quando comparado a controles apenas manipulados (KOLLACK-WALKER *et al.*, 1999).

Até onde pudemos encontrar, não existem trabalhos relacionando a amígdala medial de mamíferos ou o TnA das aves especificamente ao comportamento de IT. Contudo, é interessante notar que a contenção manual de ratos aumentou a expressão de c-Fos na MeA (LINO-DE-OLIVEIRA *et al.*, 2001). Esse dado parece estar de acordo com o aumento da expressão de c-Fos observada em pombos após a manipulação, e talvez possa reforçar a idéia de comparabilidade entre estas estruturas em aves e mamíferos quando a seu papel em circuitos defensivos.

De maneira semelhante, não existem trabalhos mostrando o envolvimento de outras regiões da amígdala de mamíferos com a IT. Entretanto, é importante mencionar que a amígdala lateral tem um papel importante para a execução de respostas defensivas, tanto condicionadas quanto não-condicionadas (GRAEFF *et al.*, 1993; LEDOUX, 2003; BLAIR *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2011; GROSS e CANTERAS, 2012). Lesões da amígdala lateral (LA) impediram a aquisição de *freezing* condicionado por choque nas patas em ratos e também atenuaram as respostas ao choque não condicionado (BLAIR *et al.*, 2005). Lesões da LA também foram capazes de diminuir sobressaltos causados por som em ratos (HITCHCOCK e DAVIS, 1987). A amígdala lateral e basolateral parecem ser comparáveis ao núcleo posterior do Arcopallium da aves (PoA) (REINER *et al.*, 2004). Neste sentido, o aumento da expressão de c-Fos observado no PoA após a manipulação, pode fazer parte de circuitos defensivos não condicionados em pombos, comparáveis aos observados em roedores, porém, não envolvidos na expressão da IT em pombos.

Nossos resultados também mostram um aumento do número de células c-Fos+ no núcleo intersticial da estria terminal. Este aumento, apesar de presente na subdivisão lateral do núcleo (BSTn-l), só atingiu significância estatística em sua subdivisão medial (BSTn-m). Em mamíferos, o BSTn-m, recebe projeções dos núcleos da amígdala (com exceção do lateral) e do núcleo acessório do bulbo olfativo, e, por sua vez, envia projeções para o núcleo préóptico medial e hipotálamo (DE OLMOS e INGRAM, 1972; WELLER e SMITH, 1982; SIMERLY e SWANSON, 1986), estando envolvido com comportamentos defensivos condicionados e não condicionados (WALKER, TOUFEXIS e DAVIS, 2003). De uma maneira geral, BSTn é alvo de projeções de neurônios

CRH+ do PVN e tem um papel importante em integrar estruturas límbicas e autonômicas (CHOI *et al.*, 2007), uma vez que também é dotado de eferentes para regiões do tronco encefálico responsáveis pelo controle de funções cardíacas, respiratórias e da pressão arterial (e.g. núcleo do trato solitário, núcleo parabraquial e núcleo motor dorsal do nervo vago) (HOLSTEGE, MEINERS e TAN, 1985; GRAY e MAGNUSON, 1987; MOGA, SAPER e GRAY, 1989), além de projeções para a PAG ventral e lateral (HOLSTEGE, MEINERS e TAN, 1985), também envolvidas com componentes autonômicos das respostas defensivas (WALKER e CARRIVE, 2003).

O BSTn das aves parece ter características embriológicas, neuroquímicas e hodológicas que permitem estabelecer uma homologia com o núcleo intersticial da estria terminal de mamíferos (ASTE *et al.*, 1998; REINER *et al.*, 2004; REAL *et al.*, 2008). Contudo, o envolvimento do BSTn das aves com comportamentos defensivos e respostas autonômicas a estresses externoceptivos não foi investigado.

Em mamíferos, foi mostrado que microinjeções de CRH no BSTn-m causam um aumento da frequência cardíaca de ratos, bem como, um aumento da FC durante a exposição ao choque nas patas (NIJSEN *et al.*, 2001). Em aves, um aumento da expressão de mRNA para c-Fos no BSTn pode ser observado em galinhas submetidas à desafios osmóticos e cardiovasculares acompanhados de aumentos da FC (JACCOBY, KOIKE e CORNETT, 1999). Ainda, estímulos dipsogênicos seguidos pela privação de água em pombos também promoveram um aumento da expressão de c-Fos no BSTn (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Portanto, estresses interceptivos parecem associados à um aumento da atividade c-Fos no BSTn tanto de aves, quanto mamíferos.

Até onde pudemos averiguar na literatura, o presente trabalho é o primeiro a mostrar o aumento da expressão de c-Fos no BSTn desencadeado por comportamentos defensivos ou estresse em aves. Todavia, é possível especular que o incremento de células c-Fos+ observado neste trabalho esteja associado com as respostas cardiovasculares após a IT também apresentadas aqui. O grupo manipulado também apresentou modificações da FC cardíaca, independente da indução da imobilidade tônica. Uma vez que o aumento

de células c-Fos+ pode ser observado apenas no grupo IT, parece improvável que a modulação da FC observada por nós esteja diretamente sob o controle do BSTn. Porém, é importante mencionar que, em roedores em repouso, a estimulação do BSTn aumentou apenas a FC, enquanto a sua estimulação em situações de estresse foi capaz de aumentar a frequência e tônus vagal (aumento do intervalo PQ), sugerindo que as repostas cardiovasculares podem ser diferentemente moduladas pelo BSTn dependendo do contexto ou do estresse envolvido (NIJSEN *et al.*, 2001).

5.3.4. Considerações finais

Em resumo, observamos um aumento da atividade neural, determinada pelo acréscimo da expressão da proteína c-Fos após a manipulação ou indução de imobilidade tônica em diversas regiões do encéfalo do pombo. Ainda, fomos capazes de separar estruturas cuja ativação foi dependente da indução da IT e estruturas que parecem responder à estímulos ameaçadores de uma maneira geral.

A indução da imobilidade tônica provoca um aumento em regiões do complexo CGt/ICo que parece ser particular da resposta de IT. De uma maneira geral, o ICo (lateral e medial), SGPd e MLd apresentam um aumento expressivo de núcleos c-Fos+ que não pode ser observado em pombos apenas manipulados (Fig. 19 B, E). Também particular à indução da IT, foi o expressivo aumento observado em regiões prosencefálicas, especialmente o Arcopallium intermédio, área septal lateral e hipocampo (Fig. 19 A-D).

Com relação aos circuitos defensivos de mamíferos, estas áreas prosencefálicas (especialmente a amígdala), são responsáveis pela avaliação e processamento da informação sobre o contexto e o estímulo ameaçador (predador, agressão etc.), enviando essas informações descendentes para a PAG, responsável pela integração motora e expressão do comportamento defensivo apropriado (GRAEFF *et al.*, 1993; GROSS e CANTERAS, 2012).

Todavia, mesmo em mamíferos, a circuitaria prosencefálica envolvida no controle da IT não é completamente conhecida. Ainda, a IT parece ser um caso especial, pois estudos envolvendo lesões destas áreas

proencefálicas não impedem o aparecimento da IT tanto em aves quanto em mamíferos, mas parecem aumentar sua duração (e.g. MASER, KLARA e GALLUP, 1973; WOODRUFF e BAILEY, 1979). Assim, a expressão da IT parece ser mediada pela ativação de regiões do complexo CGt/ICo, mas a ativação de regiões proencefálicas, bem como do MLd, poderia fazer parte de outros processos envolvidos neste comportamento, tais como, processamento de sinais sensoriais que permitam a avaliação do ambiente durante a IT, ou ainda a processos de desativação neural ou cognitivos associados ao estresse.

O fato da IT ser filogeneticamente conservada em vertebrados, sugere que estes circuitos devam ser, pelo menos em parte, conservados neste grupo. Sua presença desde peixes até mamíferos, parece indicar que pelo menos o arcabouço da circuitaria de inibição comportamental da IT é uma característica plesiomórfica (isto é, primitiva) em vertebrados. Esta possibilidade parece estar de acordo com o princípio da parcimônia, que determina que durante a evolução a hipótese mais simples, ou seja, a que requer o menor número de mudanças evolutivas deva ser a mais provável. Além disto, esta sugestão não exclui a possibilidade da adição, ao longo da evolução, de circuitos modulatórios, apomórficos (ou seja, recentes), e que confeririam características específicas para a IT em diferentes categorias taxonômicas.

Finalmente, a detecção imunoistoquímica de c-Fos, apesar de uma ferramenta interessante para este tipo de estudo, não possui uma resolução temporal adequada para discriminar com acuidade o papel das estruturas encefálicas nas diferentes fases da IT (e.g. indução, duração ou término). Além disso, nossos dados comportamentais e fisiológicos sugerem que a IT de pombos seja um comportamento heterogêneo, ou seja, diversos processos encefálicos devem se modificar ao longo da duração da IT. Apesar de fornecer um mapa preliminar, embora importante, para guiar estudos futuros de estimulação/inibição local de estruturas encefálicas e seus conseqüências para a IT, estudos eletrofisiológicos, com uma maior resolução temporal, seriam necessários para substanciar os achados neuroanatômicos aqui apresentados.

6. CONCLUSÕES

Este estudo fornece um panorama das características comportamentais da imobilidade tônica, bem como, uma descrição da sua distribuição em uma coorte de pombos (*C. livia*). Também apresentamos resultados sobre as modificações térmicas e cardiovasculares que acompanham este comportamento nestas aves e uma avaliação da expressão de c-Fos em áreas encefálicas após a indução da IT em pombos.

A imobilidade tônica é um comportamento complexo, adaptativo e que apresenta diferenças individuais expressivas em pombos. Este comportamento é composto por um continuum de mudanças sensório-motoras, fisiológicas e comportamentais sugestivas de uma gradual desativação de processos centrais.

A IT está associada a mudanças na atividade de regiões do tronco cerebral e do prosencéfalo do pombo comparáveis a regiões que em mamíferos controlam comportamentos defensivos de uma maneira geral, sugerindo algum grau de conservação filogenética destes atributos em vertebrados.

Pombos são extremamente bem adaptados à ambientes estressantes, em constante mudança e com intensa presença de ameaças. A comparação dos circuitos defensivos presentes nesta espécie com os apresentados por espécies menos tolerantes a este tipo de ambiente, pode ajudar a revelar os fundamentos neurais que suportam diferentes estratégias defensivas e que conferem a capacidade de colonização de ambientes urbanos e maior tolerância à situações ameaçadoras.

Além de estudos comparativos, estudos envolvendo estimulação e lesão de regiões encefálicas mapeadas neste trabalho podem fornecer evidências sobre o papel destas estruturas na expressão da IT em pombos. Ainda, registros eletrofisiológicos poderiam ser realizados para esclarecer os processos de aparente desativação neural presente no comportamento de IT.

Tais estudos poderiam ser valiosos para melhorar a compreensão sobre os processos centrais que governam não apenas a IT, mas, de uma maneira geral comportamentos defensivos desta espécie especialmente bem adaptada à vida urbana.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAMS, M. P.; NICHOLAS CARLETON, R.; TAYLOR, S.; ASMUNDSON, G. J. Human tonic immobility: measurement and correlates. **Depression and Anxiety**, v. 26, n. 6, p. 550-556, 2009.
- AKESSON, T.; DE LANEROLLE, N.; CHENG, M.-F. Ascending vocalization pathways in the female ring dove: projections of the nucleus intercollicularis. **Experimental neurology**, v. 95, n. 1, p. 34-43, 1987.
- AMARAL, D.; KURZ, J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 240, n. 1, p. 37-59, 1985.
- ANDREW, R. Changes in visual responsiveness following intercollicular lesions and their effects on avoidance and attack. **Brain, behavior and evolution**, v. 10, n. 4-5, p. 400-424, 1974.
- ASTE, N.; BALTHAZART, J.; ABSIL, P.; GROSSMANN, R.; MÜLHBAUER, E.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; PANZICA, G. Anatomical and neurochemical definition of the nucleus of the stria terminalis in Japanese quail (*Coturnix japonica*). **The Journal of comparative neurology**, v. 396, n. 2, p. 141-157, 1998.
- ATOJI, Y.; SAITO, S.; WILD, J. M. Fiber connections of the compact division of the posterior pallial amygdala and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the pigeon (*Columba livia*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 2, p. 161-182, 2006.
- ATOJI, Y.; WILD, J. M. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the pigeon as revealed by tract tracing and kainic acid lesions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 475, n. 3, p. 426-461, 2004.
- _____. Anatomy of the avian hippocampal formation. **Reviews in the neurosciences**, v. 17, n. 1-2, p. 3-16, 2006.
- ATOJI, Y.; WILD, J. M.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, Y. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 447, n. 2, p. 177-199, 2002.
- ATOJI, Y.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, Y. Distribution of NADPH diaphorase-containing neurons in the pigeon central nervous system. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 21, n. 1, p. 1-22, 2001.
- BALL, G. F.; FANS, P. L.; WINGFIELD, J. C. Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor in selected brain areas of the European starling (*Sturnus vulgaris*) and the song sparrow (*Melospiza melodia*). **Cell and tissue research**, v. 257, n. 1, p. 155-161, 1989.
- BALL, N. J.; AMLANER, C. J. Changing heart rates of herring gulls when approached by humans. 1980.

- BALTHAZART, J.; DUPIEREUX, V.; ASTE, N.; VIGLIETTI-PANZICA, C.; BARRESE, M.; PANZICA, G. Afferent and efferent connections of the sexually dimorphic medial preoptic nucleus of the male quail revealed by in vitro transport of DiI. **Cell and tissue research**, v. 276, n. 3, p. 455-475, 1994.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and the rat. In: (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter**: Springer, 1991. p.175-198. ISBN 1461364531.
- BARKUS, C.; MCHUGH, S. B.; SPRENGEL, R.; SEEBURG, P. H.; RAWLINS, J. N. P.; BANNERMAN, D. M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. **European journal of pharmacology**, v. 626, n. 1, p. 49-56, 2010.
- BECKERMAN, M. A.; VAN KEMPEN, T. A.; JUSTICE, N. J.; MILNER, T. A.; GLASS, M. J. Corticotropin-releasing factor in the mouse central nucleus of the amygdala: Ultrastructural distribution in NMDA-NR1 receptor subunit expressing neurons as well as projection neurons to the bed nucleus of the stria terminalis. **Experimental neurology**, v. 239, p. 120-132, 2013.
- BERGMÜLLER, R.; TABORSKY, M. Animal personality due to social niche specialisation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 9, p. 504-511, 2010.
- BERK, M. L.; BUTLER, A. B. Efferent projections of the medial preoptic nucleus and medial hypothalamus in the pigeon. **Journal of Comparative Neurology**, v. 203, n. 3, p. 379-399, 1981.
- BEUVING, G.; JONES, R.; BLOKHUIS, H. Adrenocortical and heterophil/lymphocyte responses to challenge in hens showing short or long tonic immobility reactions. **British Poultry Science**, v. 30, n. 1, p. 175-184, 1989.
- BICEGO, K. C.; BARROS, R. C.; BRANCO, L. G. Physiology of temperature regulation: comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 616-639, 2007.
- BINGMAN, V. P.; GAGLIARDO, A.; HOUGH, G. E.; IOALÉ, P.; KAHN, M. C.; SIEGEL, J. J. The avian hippocampus, homing in pigeons and the memory representation of large-scale space. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 3, p. 555-564, 2005.
- BINGMAN, V. P.; HOUGH, I.; KAHN, M. C.; SIEGEL, J. J. The homing pigeon hippocampus and space: in search of adaptive specialization. **Brain, behavior and evolution**, v. 62, n. 2, p. 117-127, 2003.
- BITTENCOURT, A.; NAKAMURA-PALACIOS, E.; MAUAD, H.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L. Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the periaqueductal gray matter of the rat. **Neuroscience**, v. 133, n. 4, p. 873-892, 2005.
- BITTENCOURT, M.; MELLEU, F. F.; MARINO-NETO, J. Stress-induced core temperature changes in pigeons (*Columba livia*). **Physiology & behavior**, v. 139, p. 449-458, 2015.

- BLAIR, H. T.; SOTRES-BAYON, F.; MOTTA, M. A. P.; LEDOUX, J. E. The lateral amygdala processes the value of conditioned and unconditioned aversive stimuli. **Neuroscience**, v. 133, n. 2, p. 561-569, 2005.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, n. 1, p. 70, 1989.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; RODGERS, J.; WEISS, S. M. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p. 463-472, 1991.
- BLANCHARD, R. J.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive behaviors of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, n. 2, p. 101, 1986.
- BOISSY, A.; BOUISSOU, M. F. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 46, n. 1-2, p. 17-31, 1995.
- BÓKONY, V.; KULCSÁR, A.; TÓTH, Z.; LIKER, A. Personality traits and behavioral syndromes in differently urbanized populations of house sparrows (*Passer domesticus*). **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36639-e36639, 2012.
- BONIER, F.; MARTIN, P. R.; WINGFIELD, J. C. Urban birds have broader environmental tolerance. **Biology letters**, v. 3, n. 6, p. 670-673, 2007.
- BONS, N.; BOUILLE, C.; TONON, M.-C.; GUILLAUME, V. Topographical distribution of CRF immunoreactivity in the pigeon brain. **Peptides**, v. 9, n. 4, p. 697-707, 1988.
- BRANDÃO, M. L.; BORELLI, K. G.; NOBRE, M. J.; SANTOS, J. M.; ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A. R.; MARTINEZ, R. C. Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1299-1311, 2005.
- BRITO, I.; BRITTO, L.; FERRARI, E. Classical tone-shock conditioning induces zenk expression in the pigeon (*Columba livia*) hippocampus. **Behavioral neuroscience**, v. 120, n. 2, p. 353, 2006.
- _____. Induction of Zenk protein expression within the nucleus taeniae of the amygdala of pigeons following tone and shock stimulation. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 44, n. 8, p. 762-766, 2011.
- BRODIE JR, E. D.; JOHNSON, J. A.; DODD JR, C. K. Immobility as a defensive behavior in salamanders. **Herpetologica**, p. 79-85, 1974.
- BRÜNING, G. Localization of NADPH-diaphorase in the brain of the chicken. **Journal of Comparative Neurology**, v. 334, n. 2, p. 192-208, 1993.
- BRUST, V.; WUERZ, Y.; KRÜGER, O. Behavioural flexibility and personality in zebra finches. **Ethology**, v. 119, n. 7, p. 559-569, 2013.
- BURGHARDT, G. M.; GREENE, H. W. Predator simulation and duration of death feigning in neonate hognose snakes. **Animal Behaviour**, v. 36, n. 6, p. 1842-1844, 1988.

- BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; RESSTEL, L. B.; ELIAS, L. L.; CORREA, F. M. Paraventricular nucleus modulates autonomic and neuroendocrine responses to acute restraint stress in rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 158, n. 1, p. 51-57, 2010.
- BUTLER, A. B.; HODOS, W. **Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation**. John Wiley & Sons, 2005.
- CABANAC, A.; GUILLEMETTE, M. Temperature and heart rate as stress indicators of handled common eider. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 4, p. 475-479, 2001.
- CABANAC, M.; AIZAWA, S. Fever and tachycardia in a bird (*Gallus domesticus*) after simple handling. **Physiology & behavior**, v. 69, n. 4, p. 541-545, 2000.
- CALABRESE, A.; WOOLLEY, S. M. Coding principles of the canonical cortical microcircuit in the avian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. 3517-3522, 2015.
- CALANDREAU, L.; BERTIN, A.; FAVREAU-PEIGNE, A.; RICHARD, S.; CONSTANTIN, P.; LANSADE, L.; ARNOULD, C.; LETERRIER, C. Impact of high and low anxiety trait on object habituation and discrimination: evidence from selected lines of Japanese quail. **Behavioural brain research**, v. 250, p. 299-303, 2013.
- CALANDREAU, L.; FAVREAU-PEIGNE, A.; BERTIN, A.; CONSTANTIN, P.; ARNOULD, C.; LAURENCE, A.; LUMINEAU, S.; HOUDELIER, C.; RICHARD-YRIS, M. A.; BOISSY, A.; LETERRIER, C. Higher inherent fearfulness potentiates the effects of chronic stress in the Japanese quail. **Behavioural brain research**, v. 225, n. 2, p. 505-10, 2011.
- CANTERAS, N.; SIMERLY, R.; SWANSON, L. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 360, n. 2, p. 213-245, 1995.
- CANTERAS, N. S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v. 10, n. 2, p. 413-418, 1999.
- CARLI, G. Sub-cortical mechanisms of rabbit hypnosis. **Archives italiennes de biologie**, v. 109, n. 1, p. 15-26, 1971.
- CARLI, G. Blood pressure and heart rate in the rabbit during animal hypnosis. **Electroencephalography and clinical Neurophysiology**, v. 37, n. 3, p. 231-237, 1974.
- CARLI, G.; FARABOLLINI, F.; DI PRISCO, C. L. Plasma corticosterone and its relation to susceptibility to animal hypnosis in rabbits. **Neuroscience letters**, v. 11, n. 3, p. 271-274, 1979.
- CARRETE, M.; TELLA, J. L. Inter-individual variability in fear of humans and relative brain size of the species are related to contemporary urban invasion in birds. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e18859, 2011.
- CARRIVE, P.; LEUNG, P.; HARRIS, J.; PAXINOS, G. Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 165-177, 1997.

CARRIVE, P.; PAXINOS, G. The supraoculomotor cap: a region revealed by NADPH diaphorase histochemistry. **Neuroreport**, v. 5, n. 17, p. 2257-2260, 1994.

CASINI, G.; BINGMAN, V. P.; BAGNOLI, P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and 3H-proline. **Journal of Comparative Neurology**, v. 245, n. 4, p. 454-470, 1986.

CHENG, M.-F.; AKESSON, T. R.; DE LANEROLLE, N. C. Retrograde HRP demonstration of afferent projections to the midbrain and nest calls in the ring dove. **Brain research bulletin**, v. 18, n. 1, p. 45-48, 1987.

CHENG, M.-F.; CHAIKEN, M.; ZUO, M.; MILLER, H. Nucleus taenia of the amygdala of birds: anatomical and functional studies in ring doves (*Streptopelia risoria*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*). **Brain, behavior and evolution**, v. 53, n. 5-6, p. 243-270, 1999.

CHENG, M.-F.; HAVENS, M. H. Auditory-responsive units in the midbrain vocal nuclei in the ring dove (*Streptopelia risoria*). **Brain research bulletin**, v. 30, n. 5, p. 711-715, 1993.

CHIBA, T.; MURATA, Y. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: A WGA-HRP study. **Brain research bulletin**, v. 14, n. 3, p. 261-272, 1985.

CHOI, D. C.; FURAY, A. R.; EVANSON, N. K.; OSTRANDER, M. M.; ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 8, p. 2025-2034, 2007.

CLERICI, C. A.; VENERONI, L.; ALBASI, C.; FEO, C. **The impossible escape: studies on the tonic immobility in animals from a comparative psychology perspective**. Nova Science Publisher, 2012.

COIMBRA, N.; DE OLIVEIRA, R.; FREITAS, R.; RIBEIRO, S.; BORELLI, K.; PACAGNELLA, R.; MOREIRA, J.; DA SILVA, L.; MELO, L.; LUNARDI, L. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. **Experimental neurology**, v. 197, n. 1, p. 93-112, 2006.

COLOMBO, M.; BROADBENT, N. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 465-484, 2000.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.; CANTERAS, N. S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural brain research**, v. 138, n. 1, p. 17-28, 2003.

CONLEE, J. W.; PARKS, T. N. Origin of ascending auditory projections to the nucleus mesencephalicus lateralis pars dorsalis in the chicken. **Brain research**, v. 367, n. 1, p. 96-113, 1986.

- CRAWSHAW, L.; GRAHN, D.; WOLLMUTH, L.; SIMPSON, L. Central nervous regulation of body temperature in vertebrates: Comparative aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 19-30, 1985.
- CRISPIM JR, C. F.; PEDERIVA, C. N.; BOSE, R. C.; GARCIA, V. A.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in biology and medicine**, v. 42, n. 2, p. 257-264, 2012.
- CROSS, D. J.; MARZLUFF, J. M.; PALMQUIST, I.; MINOSHIMA, S.; SHIMIZU, T.; MIYAOKA, R. Distinct neural circuits underlie assessment of a diversity of natural dangers by American crows. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 280, n. 1765, p. 20131046, 2013.
- CUNHA, R. P.; REINER, A.; TOLEDO, C. A. Involvement of urocortinergic neurons below the midbrain central gray in the physiological response to restraint stress in pigeons. **Brain research**, v. 1147, p. 175-183, 2007.
- DA SILVA, L. F.; COIMBRA, N. C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Rostral ventromedial medulla modulates nociception and tonic immobility behavior through connections with the A7 catecholaminergic region. **Behavioural brain research**, v. 233, n. 2, p. 422-7, 2012.
- DARIO, A. J.; DA COSTA LOPES, P. R.; FREITAS, C. G.; PASCHOALINI, M. A.; MARINO-NETO, J. Electrographic patterns of postprandial sleep after food deprivation or intraventricular adrenaline injections in pigeons. **Brain Res Bull**, v. 39, n. 4, p. 249-254, 1996.
- DATTA, S.; KUMAR, V. M.; CHHINA, G. S.; SINGH, B. Interrelationship of thermal and sleep-wakefulness changes elicited from the medial preoptic area in rats. **Experimental neurology**, v. 100, n. 1, p. 40-50, 1988.
- DAVIE, P. S.; FRANKLIN, C. E.; GRIGG, G. C. Blood pressure and heart rate during tonic immobility in the black tipped reef shark, *Carcharhinus melanoptera*. **Fish physiology and biochemistry**, v. 12, n. 2, p. 95-100, 1993.
- DAVIES, D.; CSILLAG, A.; SZÉKELY, A.; KABAI, P. Efferent connections of the domestic chick archistriatum: a phaseolus lectin anterograde tracing study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 389, n. 4, p. 679-693, 1997.
- DAVIES, D.; MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; LANUZA, E.; NOVEJARQUE, A. Striato-amygdaloid transition area lesions reduce the duration of tonic immobility in the lizard *Podarcis hispanica*. **Brain research bulletin**, v. 57, n. 3, p. 537-541, 2002.
- DE LANEROLLE, N.; ANDREW, R. Midbrain structures controlling vocalization in the domestic chick. **Brain, behavior and evolution**, v. 10, n. 4-5, p. 354-376, 1974.
- DE OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The lateral hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Neuroreport**, v. 8, n. 16, p. 3489-3493, 1997a.
- _____. Participation of the Medial and Anterior Hypothalamus in the Modulation of Tonic Immobility in Guinea Pigs. **Physiology & behavior**, v. 62, n. 5, p. 1171-1178, 1997b.

- DE OLMOS, J. S.; INGRAM, W. R. The projection field of the stria terminalis in the rat brain. An experimental study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 146, n. 3, p. 303-333, 1972.
- DE SOUZA, A. C. B.; AVERBECK, E.; PASCHOALINI, M. A.; FARIA, M. S.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. The peeping response of pigeons (*Columba livia*) to isolation from conspecifics and exposure to a novel environment. **Behavioural processes**, v. 81, n. 1, p. 26-33, 2009.
- DELIUS, J. **Preening and associated comfort behavior in birds**. Bibliothek der Universität Konstanz, 1988.
- DELIUS, J. D. Displacement activities and arousal. 1967.
- _____. Irrelevant behaviour, information processing and arousal homeostasis. **Psychologische Forschung**, v. 33, n. 2, p. 165-188, 1970.
- DENVER, R. J. Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1163, n. 1, p. 1-16, 2009.
- DESJARDIN, J. T.; HOLMES, A. L.; FORCELLI, P. A.; COLE, C. E.; GALE, J. T.; WELLMAN, L. L.; GALE, K.; MALKOVA, L. Defense-like behaviors evoked by pharmacological disinhibition of the superior colliculus in the primate. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 1, p. 150-155, 2013.
- DIAMOND, J. M. Natural selection: rapid evolution of urban birds. **Nature**, v. 324, p. 107-108, 1986.
- DIELENBERG, R. A.; HUNT, G. E.; MCGREGOR, I. S. 'When a rat smells a cat': the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. **Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 1085-1097, 2001.
- DISTEL, H. Behavior and electrical brain stimulation in the green iguana, *Iguana iguana* L. II. Stimulation effects. **Experimental brain research**, v. 31, n. 3, p. 353-367, 1978.
- DONATTI, A. F.; LEITE-PANISSI, C. R. A. Activation of corticotropin-releasing factor receptors from the basolateral or central amygdala increases the tonic immobility response in guinea pigs: An innate fear behavior. **Behavioural brain research**, v. 225, n. 1, p. 23-30, 2011.
- DOS SANTOS, T. S.; KRÜGER, J.; MELLEU, F. F.; HEROLD, C.; ZILLES, K.; POLI, A.; GÜNTÜRKÜN, O.; MARINO-NETO, J. Distribution of serotonin 5-HT_{1A}-binding sites in the brainstem and the hypothalamus, and their roles in 5-HT-induced sleep and ingestive behaviors in rock pigeons (*Columba livia*). **Behavioural brain research**, 2015.
- DOTY, R. L. The effect of environmental movement upon the duration of tonic immobility in bobwhite quail. **Psychonomic Science**, v. 16, n. 1, p. 48-49, 1969.
- DRAGUNOW, M.; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of neuroscience methods**, v. 29, n. 3, p. 261-265, 1989.

- DUBBELDAM, J.; DEN BOER-VISSER, A. The central mesencephalic grey in birds: nucleus intercollicularis and substantia grisea centralis. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 3, p. 349-352, 2002a.
- _____. The central mesencephalic grey in birds: nucleus intercollicularis and substantia grisea centralis. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 3, p. 349-352, 2002b.
- EDDY, T. J.; GALLUP, G. G. Thermal correlates of tonic immobility and social isolation in chickens. **Physiology & behavior**, v. 47, n. 4, p. 641-646, 1990.
- EDELAAR, P.; SERRANO, D.; CARRETE, M.; BLAS, J.; POTTI, J.; TELLA, J. L. Tonic immobility is a measure of boldness toward predators: an application of Bayesian structural equation modeling. **Behavioral Ecology**, v. 23, n. 3, p. 619-626, 2012.
- EDGAR, J.; NICOL, C.; PUGH, C.; PAUL, E. Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. **Physiology & behavior**, v. 119, p. 195-200, 2013.
- EDSON, P. H.; GALLUP, G. G. Tonic immobility as a fear response in lizards *Anolis carolinensis*. **Psychonomic Science**, v. 26, n. 1, p. 27-28, 1972.
- EICHENBAUM, H. Is the rodent hippocampus just for 'place'? **Current opinion in neurobiology**, v. 6, n. 2, p. 187-195, 1996.
- ELLIS, J. M.; RITERS, L. V. Vocal parameters that indicate threat level correlate with FOS immunolabeling in social and vocal control brain regions. **Brain, behavior and evolution**, v. 79, n. 2, p. 128, 2012.
- ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. **Behavioural pharmacology**, v. 18, n. 5-6, p. 365-374, 2007.
- ERHARD, H. W.; MENDEL, M.; CHRISTIANSEN, S. B. Individual differences in tonic immobility may reflect behavioural strategies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 64, n. 1, p. 31-46, 1999.
- EWELL, A. H.; CULLEN, J. M.; WOODRUFF, M. L. Tonic immobility as a predator-defense in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Behavioral and neural biology**, v. 31, n. 4, p. 483-489, 1981.
- EWERT, J.-P. Concepts in vertebrate neuroethology. **Animal Behaviour**, v. 33, n. 1, p. 1-29, 1985.
- FARABOLLINI, F.; DI PRISCO, C. L.; CARLI, G. Neuroendocrine changes following habituation of animal hypnosis in male rabbits. **Behavioural brain research**, v. 2, n. 3, p. 363-372, 1981.
- FEENDERS, G.; KLAUS, K.; BATESON, M. Fear and exploration in European starlings (*Sturnus vulgaris*): a comparison of hand-reared and wild-caught birds. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19074, 2011.
- FERRARI, E.; FALEIROS, L.; CERUTTI, S.; OLIVEIRA, A. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. **Behavioural brain research**, v. 101, n. 1, p. 93-103, 1999.
- FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO, M. L. Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA

of the ventral or dorsal inferior colliculus. **Experimental neurology**, v. 204, n. 2, p. 693-704, 2007.

FERREIRA, M. D.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Opioidergic, GABAergic and serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus modulates tonic immobility in guinea pigs. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 2, p. 109-116, 2012.

FLUCK, E.; HOGG, S.; JONES, R. B.; BOURNE, R.; FILE, S. E. Changes in Tonic Immobility and the GABA–Benzodiazepine System in Response to Handling in the Chick. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 1, p. 269-274, 1997.

FOLEY JR, J. Tonic immobility in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) induced by manipulation, immobilization, and experimental inversion of the visual field. **Journal of Comparative Psychology**, v. 26, n. 3, p. 515, 1938.

FRANCQ, E. N. Behavioral aspects of feigned death in the opossum *Didelphis marsupialis*. **American Midland Naturalist**, p. 556-568, 1969.

FURIGO, I. C.; DE OLIVEIRA, W. F.; DE OLIVEIRA, A. R.; COMOLI, E.; BALDO, M.; MOTA-ORTIZ, S.; CANTERAS, N. The role of the superior colliculus in predatory hunting. **Neuroscience**, v. 165, n. 1, p. 1-15, 2010.

GAGLIARDO, A.; IOALÉ, P.; BINGMAN, V. P. Homing in pigeons: the role of the hippocampal formation in the representation of landmarks used for navigation. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 311-315, 1999.

GAGLIARDO, A.; POLLONARA, E.; COPPOLA, V. J.; SANTOS, C. D.; WIKELSKI, M.; BINGMAN, V. P. Evidence for perceptual neglect of environmental features in hippocampal-lesioned pigeons during homing. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 7, p. 3102-3110, 2014.

GALLUP, G.; CREEKMORE, H. S.; HILL III, W. Shock-enhanced immobility reactions in chickens: Support for the fear hypothesis. **Psychological Record**, v. 20, p. 243-245, 1970.

GALLUP, G. G. Animal hypnosis: factual status of a fictional concept. **Psychological bulletin**, v. 81, n. 11, p. 836, 1974.

GALLUP, G. G.; BOREN, J. L.; SUAREZ, S. D.; WALLNAU, L. B.; GAGLIARDI, G. J. Evidence for the integrity of central processing during tonic immobility. **Physiology & behavior**, v. 25, n. 2, p. 189-194, 1980.

GALLUP, G. G.; NASH, R. F.; ELLISON JR, A. L. Tonic immobility as a reaction to predation: Artificial eyes as a fear stimulus for chickens. **Psychonomic Science**, v. 23, n. 1, p. 79-80, 1971.

GALLUP, G. G.; NASH, R. F.; WAGNER, A. M. The tonic immobility reaction in chickens: Response characteristics and methodology. **Behavior Research Methods & Instrumentation**, v. 3, n. 5, p. 237-239, 1971.

GALLUP, G. G.; RAGER, D. R. Tonic immobility as a model of extreme states of behavioral inhibition. In: (Ed.). **Motor activity and movement disorders**: Springer, 1996. p.57-80. ISBN 1475759150.

- GALLUP, G. G.; ROSEN, T. S.; BROWN, C. W. Effect of conditioned fear on tonic immobility in domestic chickens. **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 78, n. 1, p. 22, 1972.
- GARGAGLIONI, L. H.; PEREIRA, A. S.; HOFFMANN, A. Basal midbrain modulation of tonic immobility in the toad *Bufo paracnemis*. **Physiology & behavior**, v. 72, n. 3, p. 297-303, 2001.
- GENTLE, M. J.; JONES, R. B.; MAGUIRE, S. Telencephalic removal and tonic immobility in the domestic hen (*Gallus domesticus*). **Behavioural processes**, v. 10, n. 3, p. 265-271, 1985.
- GENTLE, M. J.; JONES, R. B.; WOOLLEY, S. C. Physiological changes during tonic immobility in *Gallus gallus* var *domesticus*. **Physiology & behavior**, v. 46, n. 5, p. 843-847, 1989.
- GIANNICO, A. T.; LIMA, L.; LANGE, R. R.; FROES, T. R.; MONTIANI-FERREIRA, F. Proven cardiac changes during death-feigning (tonic immobility) in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 200, n. 4, p. 305-10, 2014.
- GOODSON, J.; EIBACH, R.; SAKATA, J.; ADKINS-REGAN, E. Effect of septal lesions on male song and aggression in the colonial zebra finch (*Taeniopygia guttata* *Spizella pusilla*). **Behav. Brain Res.**, 1998.
- GOODSON, J. L. Territorial aggression and dawn song are modulated by septal vasotocin and vasoactive intestinal polypeptide in male field sparrows (*Spizella pusilla*). **Hormones and behavior**, v. 34, n. 1, p. 67-77, 1998.
- GOODSON, J. L.; KINGSBURY, M. A. What's in a name? Considerations of homologies and nomenclature for vertebrate social behavior networks. **Hormones and behavior**, v. 64, n. 1, p. 103-112, 2013.
- GRAEFF, F. Brain defense systems and anxiety. **Handbook of anxiety**, v. 3, p. 307-354, 1990.
- GRAEFF, F. G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 27, n. 4, p. 811-829, 1994.
- GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C. L.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. W. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1, p. 123-131, 1993.
- GRAY, D. S.; TERLECKI, L. J.; TREIT, D.; PINEL, J. P. Effect of septal lesions on conditioned defensive burying. **Physiology & behavior**, v. 27, n. 6, p. 1051-1056, 1981.
- GRAY, T. S.; MAGNUSON, D. J. Neuropeptide neuronal efferents from the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus to the dorsal vagal complex in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 262, n. 3, p. 365-374, 1987.

- GREGORY, P. T. Bluffing and Waiting: Handling Effects and Post-Release Immobility in a Death-Feigning Snake (*Natrix natrix*). **Ethology**, v. 114, n. 8, p. 768-774, 2008.
- GROENINK, L.; VAN DER GUGTEN, J.; ZETHOF, T.; VAN DER HEYDEN, J.; OLIVIER, B. Stress-induced hyperthermia in mice: hormonal correlates. **Physiology & behavior**, v. 56, n. 4, p. 747-749, 1994.
- GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 9, p. 651-8, 2012.
- HAMILTON, L. W.; KELSEY, J. E.; GROSSMAN, S. P. Variations in behavioral inhibition following different septal lesions in rats. **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 70, n. 1p1, p. 79, 1970.
- HARPER, R. Frequency changes in hippocampal electrical activity during movement and tonic immobility. **Physiology & behavior**, v. 7, n. 1, p. 55-58, 1971.
- HATTON, D. C.; THOMPSON, R. W. Termination of tonic immobility in chickens by auditory stimulation. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 5, n. 1, p. 61-62, 1975.
- HATTON, D. C.; WEBSTER, D.; LANTHORN, T.; MEYER, M. E. Evidence for baroreceptor involvement in the immobility reflex in the rabbit: blood pressure changes during induction and termination. **Behavioral and neural biology**, v. 26, n. 1, p. 89-96, 1979.
- HATTON, D. C.; WOODRUFF, M. L.; MEYER, M. E. Cholinergic modulation of tonic immobility in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 89, n. 9, p. 1053, 1975.
- HAUGER, R. L.; RISBROUGH, V.; BRAUNS, O.; DAUTZENBERG, F. M. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 5, n. 4, p. 453, 2006.
- HAZARD, D.; LECLAIRE, S.; COUTY, M.; GUEMENE, D. Genetic differences in coping strategies in response to prolonged and repeated restraint in Japanese quail divergently selected for long or short tonic immobility. **Hormones and behavior**, v. 54, n. 5, p. 645-53, 2008.
- HEIDT, J. M.; MARX, B. P.; FORSYTH, J. P. Tonic immobility and childhood sexual abuse: a preliminary report evaluating the sequela of rape-induced paralysis. **Behaviour Research and Therapy**, v. 43, n. 9, p. 1157-1171, 2005.
- HELLMANN, B.; GÜNTÜRKÜN, O. Visual-field-specific heterogeneity within the tecto-rotundal projection of the pigeon. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 2635-2650, 1999.
- HENNIG, C. W. Effects of simulated predation on tonic immobility in *Anolis carolinensis*: The role of eye contact. **Bulletin of the Psychonomic Society**, v. 9, n. 4, p. 239-242, 1977.

- HENNINGSSEN, A. D. Tonic immobility in 12 elasmobranchs: use as an aid in captive husbandry. **Zoo Biology**, v. 13, n. 4, p. 325-332, 1994.
- HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78-84, 1997.
- HEROLD, C.; BINGMAN, V. P.; STRÖCKENS, F.; LETZNER, S.; SAUVAGE, M.; PALOMERO-GALLAGHER, N.; ZILLES, K.; GÜNTÜRKÜN, O. Distribution of neurotransmitter receptors and zinc in the pigeon (*Columba livia*) hippocampal formation: A basis for further comparison with the mammalian hippocampus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 11, p. 2553-2575, 2014.
- HERRERA, D. G.; ROBERTSON, H. A. Activation of c-fos in the brain. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 2–3, p. 83-107, 1996.
- HITCHCOCK, J. M.; DAVIS, M. Fear-potentiated startle using an auditory conditioned stimulus: effect of lesions of the amygdala. **Physiology & behavior**, v. 39, n. 3, p. 403-408, 1987.
- HOAGLAND, H. On the mechanism of tonic immobility in vertebrates. **The Journal of general physiology**, v. 11, n. 6, p. 715-741, 1928.
- HOFFMAN, G. E.; LEE, W.-S.; SMITH, M. S.; ABBUD, R.; ROBERTS, M.; ROBINSON, A.; VERBALIS, J. c-Fos and Fos-related antigens as markers for neuronal activity: perspectives from neuroendocrine systems. **NIDA research monograph**, v. 125, p. 117-133, 1992.
- HOFFMANN, A.; BRAZIL ROMERO, S. M.; DE OLIVEIRA, L. M. Agonistic behavior and its cardiovascular components elicited by microinjection of L-glutamic acid into the basal midbrain of the toad *Bufo paracnemis*. **Brain, behavior and evolution**, v. 41, n. 6, p. 316-325, 1993.
- HOHTOLA, E. Tonic immobility and shivering in birds: evolutionary implications. **Physiology & behavior**, v. 27, n. 3, p. 475-480, 1981.
- HOLSTEGE, G. Descending pathways from the periaqueductal gray and adjacent areas. In: (Ed.). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**: Springer, 1991. p.239-265. ISBN 1461364531.
- HOLSTEGE, G.; MEINERS, L.; TAN, K. Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. **Experimental Brain Research**, v. 58, n. 2, p. 379-391, 1985.
- HYDE, P. S.; KNUDSEN, E. I. Topographic projection from the optic tectum to the auditory space map in the inferior colliculus of the barn owl. **Journal of Comparative Neurology**, v. 421, n. 2, p. 146-160, 2000.
- IYILIKCI, O.; BAXTER, S.; BALTHAZART, J.; BALL, G. F. Fos expression in monoaminergic cell groups in response to sociosexual interactions in male and female Japanese quail. **Behavioral neuroscience**, v. 128, n. 1, p. 48, 2014.
- JACCOBY, S.; KOIKE, T. I.; CORNETT, L. E. c-fos expression in the forebrain and brainstem of White Leghorn hens following osmotic and cardiovascular challenges. **Cell and tissue research**, v. 297, n. 2, p. 229-239, 1999.

- JARRARD, L. E. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. **Behavioral and neural biology**, v. 60, n. 1, p. 9-26, 1993.
- JARVIS, E. D.; GÜNTÜRKÜN, O.; BRUCE, L.; CSILLAG, A.; KARTEN, H.; KUENZEL, W.; MEDINA, L.; PAXINOS, G.; PERKEL, D. J.; SHIMIZU, T. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 151-159, 2005.
- JONES, R.; MARIN, R.; SATTERLEE, D. Adrenocortical responses of Japanese quail to a routine weighing procedure and to tonic immobility induction. **Poultry science**, v. 84, n. 11, p. 1675-1677, 2005.
- JONES, R. B. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 42, n. 01, p. 82-96, 1986.
- JONES, R. B.; BEUVING, G.; BLOKHUIS, H. J. Tonic immobility and heterophil/lymphocyte responses of the domestic fowl to corticosterone infusion. **Physiology & behavior**, v. 42, n. 3, p. 249-253, 1988.
- KANNAN, G.; MENCH, J. A. Influence of different handling methods and crating periods on plasma corticosterone concentrations in broilers. **British Poultry Science**, v. 37, n. 1, p. 21-31, 1996.
- KARTEN, H. J. Vertebrate brains and evolutionary connectomics: on the origins of the mammalian 'neocortex'. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 370, n. 1684, p. 20150060, 2015.
- KARTEN, H. J.; HODOS, W. Stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*). 1967.
- KINGSBURY, M. A.; KELLY, A. M.; SCHROCK, S. E.; GOODSON, J. L. Mammal-like organization of the avian midbrain central gray and a reappraisal of the intercollicular nucleus. **PLoS one**, v. 6, n. 6, p. e20720, 2011.
- KIRCHER, A. **Athanasii Kircheri Ars magna lucis et umbrae: in X libros digesta**. Janssonius à Waesberge & Weyerstracht, 1671.
- KLEMM, W. Potentiation of animal "hypnosis" with low levels of electric current. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 4, p. 571-574, 1965.
- _____. Electroencephalographic-behavioral dissociations during animal hypnosis. **Electroencephalography and clinical Neurophysiology**, v. 21, n. 4, p. 365-372, 1966.
- _____. EEG and multiple-unit activity in limbic and motor systems during movement and immobility. **Physiology & behavior**, v. 7, n. 3, p. 337-343, 1971a.
- _____. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). **Neurosciences research**, v. 4, p. 165-212, 1971b.
- _____. Identity of sensory and motor systems that are critical to the immobility reflex ("animal hypnosis"). **Journal of neuroscience research**, v. 2, n. 1, p. 57-69, 1976.
- _____. Drug effects on active immobility responses: what they tell us about neurotransmitter systems and motor functions. **Progress in neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 403-422, 1989.

- _____. Behavioral arrest: in search of the neural control system. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 5, p. 453-471, 2001.
- KOHLHAUSE, S.; HOFFMANN, K.; SCHLUMBOHM, C.; FUCHS, E.; FLÜGGE, G. Nocturnal hyperthermia induced by social stress in male tree shrews: relation to low testosterone and effects of age. **Physiology & behavior**, v. 104, n. 5, p. 786-795, 2011.
- KOLLACK-WALKER, S.; DON, C.; WATSON, S.; AKIL, H. Differential expression of c-fos mRNA within neurocircuits of male hamsters exposed to acute or chronic defeat. **Journal of neuroendocrinology**, 1999.
- KOMAROVA, T. Cholinergic mechanisms of the medial preoptic areas of the hypothalamus in the control of thermoregulation and the states of sleep and waking in pigeons. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 39, n. 6, p. 553-558, 2009.
- KORF, H. W. Neuronal organization of the avian paraventricular nucleus: intrinsic, afferent, and efferent connections. **Journal of Experimental Zoology**, v. 232, n. 3, p. 387-395, 1984.
- KRÖNER, S.; GÜNTRÜNKÜN, O. Afferent and efferent connections of the caudolateral neostriatum in the pigeon (*Columba livia*): a retro-and anterograde pathway tracing study. **The Journal of comparative neurology**, v. 407, p. 228-260, 1999.
- KUENZEL, W. J.; VAN TIENHOVEN, A. Nomenclature and location of avian hypothalamic nuclei and associated circumventricular organs. **Journal of Comparative Neurology**, v. 206, n. 3, p. 293-313, 1982.
- LEDOUX, J. The emotional brain, fear, and the amygdala. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 23, n. 4-5, p. 727-738, 2003.
- LEE, M.; CHROBAK, J.; SIK, A.; WILEY, R.; BUZSAKI, G. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. **Neuroscience**, v. 62, n. 4, p. 1033-1047, 1994.
- LEFEBVRE, L.; SABOURIN, M. Response differences in animal hypnosis: A hypothesis. **The Psychological Record**, 1977.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; FERRARESE, A. A.; TERZIAN, A. L. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. **Brain research bulletin**, v. 69, n. 4, p. 356-364, 2006.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. **Brain Res Bull**, v. 58, n. 1, p. 13-19, 2002.
- LEITE-PANISSI, C. R. A.; MONASSI, C. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of the amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. **Physiology & behavior**, v. 67, n. 5, p. 717-724, 1999.
- LIBERSON, W. Prolonged hypnotic states with "local signs" induced in guinea pigs. **Science**, 1948.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE OLIVEIRA, R. M.; CAROBREZ, A. P.; DE LIMA, T. C.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Antidepressant treatment reduces Fos-like immunoreactivity induced by swim stress in different columns of the periaqueductal gray matter. **Brain research bulletin**, v. 70, n. 4, p. 414-421, 2006.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; SALES, A. J.; DEL BEL, E. A.; SILVEIRA, M. C. L.; GUIMARÃES, F. S. Effects of acute and chronic fluoxetine treatments on restraint stress-induced Fos expression. **Brain research bulletin**, v. 55, n. 6, p. 747-754, 2001.

LOVICK, T. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. **Progress in neurobiology**, v. 40, n. 5, p. 631-644, 1993.

LOWRY, H.; LILL, A.; WONG, B. Behavioural responses of wildlife to urban environments. **Biological reviews**, v. 88, n. 3, p. 537-549, 2013.

MALONEY, S.; GRAY, D. Characteristics of the febrile response in Pekin ducks. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 168, n. 3, p. 177-182, 1998.

MARTINEZ, R. C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; RIBEIRO-BARBOSA, É. R.; BALDO, M. V. C.; CANTERAS, N. S. Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. **Neuroscience**, v. 172, p. 314-328, 2011.

MARX, B. P.; FORSYTH, J. P.; GALLUP, G. G.; FUSÉ, T. Tonic immobility as an evolved predator defense: Implications for sexual assault survivors. **Clinical Psychology: Science and Practice**, v. 15, n. 1, p. 74-90, 2008.

MARZLUFF, J. M.; MIYAOKA, R.; MINOSHIMA, S.; CROSS, D. J. Brain imaging reveals neuronal circuitry underlying the crow's perception of human faces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 39, p. 15912-15917, 2012.

MASER, J. D.; GALLUP, G. G. Tonic immobility and related phenomena: A partially annotated, tricentennial bibliography, 1636-1976. **The Psychological Record**, v. 27, p. 177, 1977.

MASER, J. D.; KLARA, J. W.; GALLUP, G. G. Archistriatal lesions enhance tonic immobility in the chicken (*Gallus gallus*). **Physiology & behavior**, v. 11, n. 5, p. 729-733, 1973.

MCGRAW, C. P.; KLEMM, W. R. Mechanisms of the immobility reflex ("animal hypnosis"): III. Neocortical inhibition in rats. **Communications in Behavioral Biology**, v. 3, p. 53-59, 1969.

MCGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4134-4144, 2004.

MCKINNEY, M. L. Urbanization, Biodiversity, and Conservation The impacts of urbanization on native species are poorly studied, but educating a highly urbanized human population about these impacts can greatly improve species conservation in all ecosystems. **BioScience**, v. 52, n. 10, p. 883-890, 2002.

- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.
- MEIBACH, R. C.; SIEGEL, A. Efferent connections of the septal area in the rat: An analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. **Brain research**, v. 119, n. 1, p. 1-20, 1977.
- MELLEU, F. F., SOUZA, V.D., PODOLAN, M., SANTOS, J., WALBER, T., CENTURION-WENNINGER, C.F., SANTOS, T. S, LINO-DE-OLIVEIRA, C, MARINO-NETO, J. Adult hippocampal neurogenesis, defensive behavior and environmental enrichment in pigeons (*Columba livia*) In: 8th IBRO World Congress Of Neuroscience, 2011, Florença. **Annals of the 8th IBRO World Congress Of Neuroscience**, 2011.
- MELLEU, F.; PINHEIRO, M.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. Defensive behaviors and prosencephalic neurogenesis in pigeons (*Columba livia*) are affected by environmental enrichment in adulthood. **Brain Structure and Function**, p. 1-15, 2015.
- MILLS, A. D.; FAURE, J.-M. Divergent selection for duration of tonic immobility and social reinstatement behavior in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) chicks. **Journal of Comparative Psychology**, v. 105, n. 1, p. 25, 1991.
- MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology**, v. 33, n. 2, p. 55-66, 2003.
- MOE, R. O.; STUBSJØEN, S. M.; BOHLIN, J.; FLØ, A.; BAKKEN, M. Peripheral temperature drop in response to anticipation and consumption of a signaled palatable reward in laying hens (*Gallus domesticus*). **Physiology & behavior**, v. 106, n. 4, p. 527-533, 2012.
- MOGA, M. M.; SAPER, C. B.; GRAY, T. S. Bed nucleus of the stria terminalis: cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 283, n. 3, p. 315-332, 1989.
- MØLLER, A. P. Successful city dwellers: a comparative study of the ecological characteristics of urban birds in the Western Palearctic. **Oecologia**, v. 159, n. 4, p. 849-858, 2009.
- MONTAGNESE, C. M.; SZÉKELY, A. D.; ÁDÁM, Á.; CSILLAG, A. Efferent connections of septal nuclei of the domestic chick (*Gallus domesticus*): an anterograde pathway tracing study with a bearing on functional circuits. **Journal of Comparative Neurology**, v. 469, n. 3, p. 437-456, 2004.
- MONTAGNESE, C. M.; ZACHAR, G.; BALINT, E.; CSILLAG, A. Afferent connections of septal nuclei of the domestic chick (*Gallus domesticus*): a retrograde pathway tracing study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 511, n. 1, p. 109-150, 2008.
- MOSER, E. I.; KROPFF, E.; MOSER, M.-B. Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 31, p. 69-89, 2008.

- MOSKO, S.; LYNCH, G.; COTMAN, C. W. The distribution of septal projections to the hippocampus of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 152, n. 2, p. 163-174, 1973.
- NAGARAJAN, G.; TESSARO, B. A.; KANG, S. W.; KUENZEL, W. J. Identification of arginine vasotocin (AVT) neurons activated by acute and chronic restraint stress in the avian septum and anterior diencephalon. **General and comparative endocrinology**, v. 202, p. 59-68, 2014.
- NASH, R. F.; GALLUP, G. G. Habituation and tonic immobility in domestic chickens. **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 90, n. 9, p. 870, 1976.
- NASH, R. F.; GALLUP, G. G.; CZECH, D. A. Psychophysiological correlates of tonic immobility in the domestic chicken (*Gallus gallus*). **Physiology & behavior**, v. 17, n. 3, p. 413-418, 1976.
- NECKER, R.; GNUSCHKE, H. Effects of hypothalamic lesions on temperature regulation in pigeons. **Brain research bulletin**, v. 22, n. 5, p. 787-791, 1989.
- NIJSEN, M. J.; CROISSET, G.; DIAMANT, M.; DE WIED, D.; WIEGANT, V. M. CRH signalling in the bed nucleus of the stria terminalis is involved in stress-induced cardiac vagal activation in conscious rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2001.
- NIKOLAKOPOULOU, A.; DAVIES, H.; STEWART, M. Passive avoidance training decreases synapse density in the hippocampus of the domestic chick. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1054-1062, 2006.
- NUMAN, M.; ROSENBLATT, J. S.; KOMISARUK, B. R. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 91, n. 1, p. 146, 1977.
- O'CONNELL, L. A.; HOFMANN, H. A. Evolution of a vertebrate social decision-making network. **Science**, v. 336, n. 6085, p. 1154-7, 2012.
- OLSEN, C. K.; HOGG, S.; LAPIZ, M. Tonic immobility in guinea pigs: a behavioural response for detecting an anxiolytic-like effect? **Behavioural pharmacology**, v. 13, n. 4, p. 261-269, 2002.
- OOKAWA, T. Polygraphic recordings during adult hen hypnosis. **Poultry science**, v. 51, n. 3, p. 853-858, 1972.
- PANZICA, G.; KORF, H.-W.; RAMIERI, G.; VIGLIETTI-PANZICA, C. Golgi-type and immunocytochemical studies on the intrinsic organization of the periventricular layer of the avian paraventricular nucleus. **Cell and tissue research**, v. 243, n. 2, p. 317-322, 1986.
- PARKER, W. S. Ecological observations on the regal horned lizard (*Phrynosoma solare*) in Arizona. **Herpetologica**, p. 333-338, 1971.
- PARTECKE, J.; SCHWABL, I.; GWINNER, E. Stress and the city: urbanization and its effects on the stress physiology in European blackbirds. **Ecology**, v. 87, n. 8, p. 1945-1952, 2006.
- PAVLOV, I. P. **Psychopathology and psychiatry**. Transaction Publishers, 1961.

- PENTKOWSKI, N. S.; BLANCHARD, D. C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R. J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 8, p. 2185-2196, 2006.
- PITMAN, D. L.; OTTENWELLER, J. E.; NATELSON, B. H. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: Chronic stress and habituation. **Physiology & behavior**, v. 43, n. 1, p. 47-55, 1988.
- PRESTRUDE, A. A.; CRAWFORD, F. Tonic immobility in the lizard, *Iguana iguana*. **Animal Behaviour**, v. 18, p. 391-395, 1970.
- PUELLES, L.; KUWANA, E.; PUELLES, E.; BULFONE, A.; SHIMAMURA, K.; KELEHER, J.; SMIGA, S.; RUBENSTEIN, J. L. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 424, n. 3, p. 409-438, 2000.
- PUELLES, L.; ROBLES, C.; MARTÍNEZ-DE-LA-TORRE, M.; MARTINEZ, S. New subdivision schema for the avian torus semicircularis: neurochemical maps in the chick. **Journal of Comparative Neurology**, v. 340, n. 1, p. 98-125, 1994.
- RATNER, S. Comparative aspects of hypnosis. In: (Ed.). **Handbook of clinical and experimental hypnosis**: Macmillan New York, 1967. p.550-587.
- RATNER, S. C. Hypnotic reactions of rabbits. **Psychological reports**, v. 4, n. 3, p. 209-210, 1958.
- REAL, M. Á.; PINEDA, D.; DÁVILA, J. C.; GUIRADO, S. Development and adult organization of the lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the chicken. **Brain research bulletin**, v. 75, n. 2, p. 410-413, 2008.
- RÉALE, D.; DINGEMANSE, N. J.; KAZEM, A. J.; WRIGHT, J. Evolutionary and ecological approaches to the study of personality. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1560, p. 3937-3946, 2010.
- RÉALE, D.; READER, S. M.; SOL, D.; MCDOUGALL, P. T.; DINGEMANSE, N. J. Integrating animal temperament within ecology and evolution. **Biological reviews**, v. 82, n. 2, p. 291-318, 2007.
- REINER, A.; KARTEN, H. Comparison of olfactory bulb projections in pigeons and turtles. **Brain, behavior and evolution**, v. 27, n. 1, p. 11-27, 1985.
- REINER, A.; KARTEN, H. J. Laminar distribution of the cells of origin of the descending tectofugal pathways in the pigeon (*Columba livia*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 204, n. 2, p. 165-187, 1982.
- REINER, A.; PERKEL, D. J.; BRUCE, L. L.; BUTLER, A. B.; CSILLAG, A.; KUENZEL, W.; MEDINA, L.; PAXINOS, G.; SHIMIZU, T.; STRIEDTER, G. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. **Journal of Comparative Neurology**, v. 473, n. 3, p. 377-414, 2004.

- REINER, A.; YAMAMOTO, K.; KARTEN, H. J. Organization and evolution of the avian forebrain. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 287, n. 1, p. 1080-1102, 2005.
- REIS, F.; SCHENKA, A.; MELO, L.; FERRARI, E. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 9, p. 1127-1131, 1999.
- RICHARD, S.; LAND, N.; SAINT-DIZIER, H.; LETERRIER, C.; FAURE, J. M. Human handling and presentation of a novel object evoke independent dimensions of fear in Japanese quail. **Behavioural processes**, v. 85, n. 1, p. 18-23, 2010.
- RIZVI, T. A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M. T. Reciprocal connections between the medial preoptic area and the midbrain periaqueductal gray in rat: A WGA-HRP and PHA-L study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 315, n. 1, p. 1-15, 1992.
- ROVEE-COLLIER, C.; KUPERSMIDT, J.; O'BRIEN, L.; COLLIER, G.; TEPPER, V. Behavioral thermoregulation and immobilization: Conflicting demands for survival. **Journal of Comparative Psychology**, v. 105, n. 3, p. 232, 1991.
- ROVEE, C. K.; AGNELLO, A. M.; SMITH, B. Environmental influences on tonic immobility in three-and seven-day-old chicks (*Gallus gallus*). **The Psychological Record**, 1973.
- ROVEE, C. K.; LUCIANO, D. P. Rearing influences on tonic immobility in three-day-old chicks (*Gallus gallus*). **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 83, n. 2, p. 351, 1973.
- SAINT-DIZIER, H.; CONSTANTIN, P.; DAVIES, D. C.; LETERRIER, C.; LÉVY, F.; RICHARD, S. Subdivisions of the arcopallium/posterior pallial amygdala complex are differentially involved in the control of fear behaviour in the Japanese quail. **Brain research bulletin**, v. 79, n. 5, p. 288-295, 2009.
- SALZEN, E. Imprinting and the immobility reactions of domestic fowl. **Animal Behaviour**, v. 11, n. 1, p. 66-71, 1963.
- SANDOVAL-HERRERA, V.; TRUJILLO-FERRARA, J. G.; MIRANDA-PÁEZ, A.; DE LA CRUZ, F.; ZAMUDIO, S. R. Corticosterone microinjected into nucleus pontis oralis increases tonic immobility in rats. **Hormones and behavior**, v. 60, n. 4, p. 448-456, 2011.
- SANTOS, C. D.; CRAMER, J. F.; PÂRÂU, L. G.; MIRANDA, A. C.; WIKELSKI, M.; DECHMANN, D. K. Personality and morphological traits affect pigeon survival from raptor attacks. **Scientific reports**, v. 5, 2015.
- SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 19, p. 6174-6177, 1984.
- SAPOLSKY, R. M.; UNO, H.; REBERT, C. S.; FINCH, C. E. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 2897-2902, 1990.

- SARGEANT, A. B.; EBERHARDT, L. E. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). **American Midland Naturalist**, p. 108-119, 1975.
- SATINOFF, E.; LIRAN, J.; CLAPMAN, R. Aberrations of circadian body temperature rhythms in rats with medial preoptic lesions. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 242, n. 3, p. R352-R357, 1982.
- SATPUTE, A. B.; WAGER, T. D.; COHEN-ADAD, J.; BIANCIARDI, M.; CHOI, J.-K.; BUHLE, J. T.; WALD, L. L.; BARRETT, L. F. Identification of discrete functional subregions of the human periaqueductal gray. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 42, p. 17101-17106, 2013.
- SCHENBERG, L.; PÓVOA, R.; COSTA, A.; CALDELLAS, A.; TUFIK, S.; BITTENCOURT, A. Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1279-1298, 2005.
- SHANAHAN, M.; BINGMAN, V. P.; SHIMIZU, T.; WILD, M.; GÜNTÜRKÜN, O. Large-scale network organization in the avian forebrain: a connectivity matrix and theoretical analysis. **Frontiers in computational neuroscience**, v. 7, 2013.
- SHIMIZU, T.; BOWERS, A. N.; BUDZYNSKI, C. A.; KAHN, M. C.; BINGMAN, V. P. What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? selective examination of ZENK expression. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 4, p. 845, 2004.
- SIEBERT, S.; JÜRGENS, U. Vocalization after periaqueductal grey inactivation with the GABA agonist muscimol in the squirrel monkey. **Neuroscience letters**, v. 340, n. 2, p. 111-114, 2003.
- SILVEIRA, M. C. L.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 56, n. 1, p. 115-118, 1993.
- SIMERLY, R.; SWANSON, L. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 246, n. 3, p. 312-342, 1986.
- SINGEWALD, G. M.; RJABOKON, A.; SINGEWALD, N.; EBNER, K. The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 793-804, 2011.
- SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological review**, v. 99, n. 2, p. 195, 1992.
- STECIUK, M.; KRAM, M.; KRAMER, G. L.; PETTY, F. Decrease in stress-induced c-Fos-like immunoreactivity in the lateral septal nucleus of learned helpless rats. **Brain research**, v. 822, n. 1-2, p. 256-259, 1999.
- STEWART, M.; FOX, S. E. Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? **Trends in neurosciences**, v. 13, n. 5, p. 163-169, 1990.
- SUAREZ, S. D.; GALLUP, G. G. Tonic immobility as a response to rape in humans: A theoretical note. **The Psychological Record**, 1979.

- SUGERMAN, R. A.; DEMSKI, L. S. Agonistic behavior elicited by electrical stimulation of the brain in western collared lizards, *Crotaphytus collaris*. **Brain, behavior and evolution**, v. 15, n. 5-6, p. 446-469, 1978.
- SUN, Z.; REINER, A. Localization of dopamine D1A and D1B receptor mRNAs in the forebrain and midbrain of the domestic chick. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 19, n. 4, p. 211-224, 2000.
- SVORAD, D. Animal Hypnosis (Totstellreflex) as Experimental Model for Psychiatry: Electroencephalographic and Evolutionary Aspect. **AMA Archives of Neurology & Psychiatry**, v. 77, n. 5, p. 533-539, 1957.
- SWANSON, L. W.; PETROVICH, G. D. What is the amygdala? **Trends in neurosciences**, v. 21, n. 8, p. 323-331, 1998.
- THOMPSON, R. K.; FOLTIN, R.; BOYLAN, R.; SWEET, A.; GRAVES, C.; LOWITZ, C. Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. **Animal Learning & Behavior**, v. 9, n. 1, p. 145-149, 1981.
- TIMOFEEVA, E. Yin and yang in regulation of alcohol and sucrose intake by CRF1 and CRF2 receptors. **Can J Addict Med**, v. 1, p. 4-11, 2010.
- TOLEDO, L. F.; SAZIMA, I.; HADDAD, C. F. Is it all death feigning? Case in anurans. **Journal of Natural History**, v. 44, n. 31-32, p. 1979-1988, 2010.
- ÜNAL, B.; BRADLEY, P. M.; SAHIN, B.; CANAN, S.; ASLAN, H.; KAPLAN, S. Estimation of numerical density and mean synaptic height in chick hippocampus 24 and 48 hours after passive avoidance training. **Developmental brain research**, v. 136, n. 2, p. 135-144, 2002.
- VALANCE, D.; DESPRES, G.; RICHARD, S.; CONSTANTIN, P.; MIGNON-GRASTEAU, S.; LEMAN, S.; BOISSY, A.; FAURE, J. M.; LETERRIER, C. Changes in Heart Rate Variability during a tonic immobility test in quail. **Physiology & behavior**, v. 93, n. 3, p. 512-20, 2008.
- VEENMAN, C. L.; WILD, J. M.; REINER, A. Organization of the avian "corticostriatal" projection system: a retrograde and anterograde pathway tracing study in pigeons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 354, n. 1, p. 87-126, 1995.
- VIEIRA, E. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; LEITE-PANISSI, C. R. Functional mapping of the periaqueductal gray matter involved in organizing tonic immobility behavior in guinea pigs. **Behavioural brain research**, v. 216, n. 1, p. 94-9, 2011.
- VINCENT, S.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-784, 1992.
- VINKERS, C. H.; PENNING, R.; HELLHAMMER, J.; VERSTER, J. C.; KLAESSENS, J. H.; OLIVIER, B.; KALKMAN, C. J. The effect of stress on core and peripheral body temperature in humans. **Stress**, v. 16, n. 5, p. 520-530, 2013.
- VOLCHAN, E.; SOUZA, G. G.; FRANKLIN, C. M.; NORTE, C. E.; ROCHA-REGO, V.; OLIVEIRA, J. M.; DAVID, I. A.; MENDLOWICZ, M. V.; COUTINHO, E. S. F.; FISZMAN, A. Is there tonic immobility in humans? Biological evidence from victims of traumatic stress. **Biological psychology**, v. 88, n. 1, p. 13-19, 2011.

- WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 199-216, 2003.
- WALKER, P.; CARRIVE, P. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. **Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 897-912, 2003.
- WANG, R.; MILLAM, J. R. Corticotropin-releasing hormone-immunopositive nerve elements in apposition to chicken gonadotropin-releasing hormone I-containing perikarya in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) brain. **Cell and tissue research**, v. 297, n. 2, p. 223-228, 1999.
- WANG, Y.; BRZOZOWSKA-PRECHTL, A.; KARTEN, H. J. Laminar and columnar auditory cortex in avian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 28, p. 12676-12681, 2010.
- WATANABE, S.; SAKAMOTO, J.; WAKITA, M. PIGEONS'DISCRIMINATION OF PAINTINGS BY MONET AND PICASSO. **Journal of the experimental analysis of behavior**, v. 63, n. 2, p. 165-174, 1995.
- WEBSTER, D. G.; LANTHORN, T. H.; DEWSBURY, D. A.; MEYER, M. E. Tonic immobility and the dorsal immobility response in twelve species of murid rodents. **Behavioral and neural biology**, v. 31, n. 1, p. 32-41, 1981.
- WEI, P.; LIU, N.; ZHANG, Z.; LIU, X.; TANG, Y.; HE, X.; WU, B.; ZHOU, Z.; LIU, Y.; LI, J. Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. **Nature communications**, v. 6, 2015.
- WELLER, K.; SMITH, D. Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain research**, v. 232, n. 2, p. 255-270, 1982.
- WELLS, R. M.; MCNEIL, H.; MACDONALD, J. A. Fish hypnosis: Induction of an atonic immobility reflex. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 38, n. 1, p. 71-78, 2005.
- WILD, J. Functional anatomy of neural pathways contributing to the control of song production in birds. **European journal of morphology**, v. 35, n. 4, p. 303-325, 1997.
- WOODRUFF, M.; LIPPINCOTT, W. Hyperemotionality and enhanced tonic immobility after septal lesions in the rabbit. **Brain, behavior and evolution**, v. 13, n. 1, p. 22-33, 1976.
- WOODRUFF, M. L.; BAILEY, S. D. Hippocampal lesions and immobility responses in the rat. **Physiological Psychology**, v. 7, n. 3, p. 254-258, 1979.
- WOODRUFF, M. L.; HATTON, D. C.; MEYER, M. E. Hippocampal ablation prolongs immobility response in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of comparative and Physiological Psychology**, v. 88, n. 1, p. 329, 1975.
- YAJIMA, Y.; HAYASHI, Y.; YOSHI, N. The midbrain central gray substance as a highly sensitive neural structure for the production of ultrasonic vocalization in the rat. **Brain research**, v. 198, n. 2, p. 446-452, 1980.

YAMADA, S.; MIKAMI, S.-I. Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF)-containing neurons in the hypothalamus of the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. **Cell and tissue research**, v. 239, n. 2, p. 299-304, 1985.

YAMAMOTO, K.; SUN, Z.; WANG, H. B.; REINER, A. Subpallial amygdala and nucleus taeniae in birds resemble extended amygdala and medial amygdala in mammals in their expression of markers of regional identity. **Brain research bulletin**, v. 66, n. 4, p. 341-347, 2005.

YDENBERG, R. C.; DILL, L. M. The economics of fleeing from predators. **Advances in the Study of Behavior**, v. 16, p. 229-249, 1986.

ZEIER, H.; KARTEN, H. J. The archistriatum of the pigeon: organization of afferent and efferent connections. **Brain research**, v. 31, n. 2, p. 313-326, 1971.

ZIMMERMAN, P.; BUIJS, S.; BOLHUIS, J.; KEELING, L. Behaviour of domestic fowl in anticipation of positive and negative stimuli. **Animal Behaviour**, v. 81, n. 3, p. 569-577, 2011.