

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**DISTRIBUIÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE À  
DOUBLECORTINA NO PROSENCÉFALO DE POMBOS  
ADULTOS (*Columba livia*): AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO**

**Fernando Falkenburger Melleu**

Florianópolis, Novembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**DISTRIBUIÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE À  
DOUBLECORTINA NO PROSENCÉFALO DE POMBOS  
ADULTOS (*Columba livia*): AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE  
DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO**

**Fernando Falkenburger Melleu**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Coordenadoria do Curso de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito parcial para a conclusão do  
curso.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cilene Lino de Oliveira  
**Co-orientador:** Prof. Dr. José Marino Neto

Florianópolis, Novembro de 2009

## Resumo

A doublecortina (DCX) é uma proteína associada a microtúbulos crítica para a migração radial e tangencial de neurônios imaturos, tanto no cérebro em desenvolvimento quanto no adulto. No cérebro de mamíferos adultos neurônios recém formados no hipocampo e da zona subventricular (SVZ) são imurreativos à DCX (DCX+). Oito pombos (*Columba livia*, Columbiformes), entre 8 e 10 meses de idade e peso corporal de 380 a 420g, foram alojados em duas diferentes condições ambientais (enriquecida, n=4 e não-enriquecida, n=4). Após um período de 40 dias os animais foram perfundidos (com solução sacarose 9,25% seguida de de 4% paraformaldeído em PBS 0,01 M) sob overdose de anestesia (Cetamina e Xilazina). Os cérebros foram removidos e seccionados em criótomo a uma espessura de 50um. Essas secções foram então submetidas a reações imunohistoquímicas (anticorpo policlonal de coelho Anit-DCX, Abcam, secundário anti-coelho biotilado revelado pelo método ABC, Vector, reação colorimétrica com DAB, Sigma) para marcação da DCX. As secções telencefálicas de quatro animais do ambiente não-enriquecido foram observadas sob microscópio óptico e fotografadas para a descrição da distribuição total de células e fibras imunorreativas à DCX. Secções contendo o hipocampo de todos os animais dos dois grupos experimentais foram, da mesma forma, observadas e fotografadas e as células DCX+ hipocampais foram contadas. Constatamos que doublecortina é amplamente distribuída no telencéfalo de pombos adultos. Observamos células e fibras DCX+ na SVZ, hipocampo, estriado, hyperpallium apicale, arcopallium, mesopallium, nidopallium, área septal e bulbo olfativo. Pudemos descrever também as vias principais de migração celular no prosencéfalo desse animais. Além disso nossos dados indicam que, como em roedores, existe diferença estatisticamente significativa no número de células DCX+ hipocampais entre os dois grupos experimentais.

**Palavras-Chave:** Hipocampo, doublecortina, *Columba livia*, ambiente enriquecido.

## Abstract

Doublecortin (DCX) is a microtubule-associated protein critical for radial and tangential migration of immature neurons in the developing and adult brain. In the adult mammalian brain, newly generated neurons in the hippocampal formation and the subventricular zone (SVZ) are DCX-immunoreactive (DCX+). Eight pigeons (*Columba livia*, Columbiformes), between 8 to 12 month old and body weight between 380 to 420g, were housed in two different environmental conditions (enriched, n=4; standard; n=4). After a period of 40 days these animals were perfused (sucrose 9,25% followed by 4% paraformaldehyde in 0.01 M phosphate buffered saline, under overdose anesthesia (Ketamine and Xylazine). Brains were removed and sectioned through the total rostrocaudal forebrain extent (Criotome, 50  $\mu$ m); these sections were immunostained for DCX (rabbit polyclonal anti-DCX antibody, ab18723, Abcam, anti-rabbit polyclonal secondary and ABC, Vector, DAB-based-chromogenic reaction, Sigma). Telencephalic sections of the four standard allocated pigeons were observed under microscope and photographed to describe the distribution of DCX+ cells and fibers. Sections from all of the animals in the two different experimental groups, sections containing the hippocampus were observed and DCX+ cells were counted. Our data showed that the total distribution of DCX in the adult pigeon's brain is widespread throughout the telencephalon. We were able to observe DCX+ cells and fibers present in the SVZs, hippocampus, striatum, arcopallium, hyperpallium apicale, mesopallium, nidopallium, septal area and in the olfactory bulb. We were also able to identify a rostral and a lateral migratory stream. Furthermore, a statistically significant difference in the number of hippocampal DCX+ cells between animals housed in the enriched and standard environments as has already been described in rodents.

Keywords: Hippocampus, doublecortin, *Columba livia*, Enriched environment.

## **Agradecimentos**

Aos meus Orientadores Cilene Lino de Oliveira e José Marino Neto,  
pela paciência inesgotável e por toda a ajuda que me deram.

Aos Professores Giordano Wosgrau Calloni e Mariana Graciela  
Terenzi pela leitura atenciosa deste trabalho e pelas valiosas correções ao  
mesmo

À Fer, por suportar a minha loucura

À minha família por absolutamente tudo que eu tenho

Ao Tiago, Grande colega de laboratório

Ao colegiado do curso de Ciências Biológicas

À FAPESC pelo apoio financeiro

To the amazing drove crew

*“There is a theory which states that if ever anybody discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable. There is another theory which states that this has already happened.”*

**Douglas Adams (1952 -2001)**

## Sumário

1. Introdução .....	8
2. Metodologia .....	18
2.1. Animais .....	18
2.2. Caracterização dos ambientes .....	19
2.2.1 Ambiente Enriquecido (AE).....	19
2.2.2. Ambiente Não-Enriquecido (AN) .....	19
2.3. Avaliação quantitativa da neurogênese hipocampal.....	20
2.3.1. Perfusão.....	20
2.3.2. Reações imunohistoquímicas .....	20
2.3.3. Caracterização e contagem das células DCX+.....	22
2.3.4. Testes estatísticos .....	22
3. Resultados .....	23
3.1. Distribuição de pericários e fibras DCX+. .....	23
3.1.1. Zonas proliferativas no ventrículo lateral.....	23
3.1.2. Vias migratórias .....	24
3.1.3. Estruturas Límbicas.....	29
3.1.4. Estruturas Paliais .....	32
3.1.5. Os gânglios da base .....	33
3.1.6. O bulbo olfativo e córtex pré-piriforme .....	33
3.2. Efeito da exposição a diferentes ambientes sobre a expressão da DCX no hipocampo de pombos adultos.....	35
4. Discussão.....	38
5. Referências Bibliográficas .....	45

## 1. Introdução

Durante todo o século XIX e grande parte do século XX, existiu dentro da neurociência o paradigma de que novos neurônios não poderiam ser formados no cérebro de indivíduos adultos (Colucci-d'Amato e di Porzio, 2008). Até então, acreditava-se que células altamente diferenciadas e especializadas como neurônios, atuando em circuitos cerebrais bem definidos e com funções específicas sob a expressão comportamental, eram fixas e imutáveis. Isso se deu em grande parte, devido à falta de técnicas consistentes para a identificação de células progenitoras, mas principalmente baseado na idéia de que se neurônios novos fossem formados no córtex de animais adultos isso alteraria comportamentos complexos e outros processos nervosos, tais como, condição emocional, memória, aprendizado, etc. Além disso, existia uma razão clínica para que o paradigma fosse aceito. Pacientes sofrendo de doenças degenerativas do sistema nervoso central como Alzheimer e mal de Parkinson, não apresentavam melhora, isto é, o cérebro continuava a degenerar-se sem que novas células saudáveis fossem incorporadas (Colucci-d'Amato e di Porzio, 2008).

Em 1962 Joseph Altman propôs, em um trabalho utilizando autoradiografia de células marcadas com timidina tritiada, que as células que acumulavam a timidina eram novos neurônios que poderiam ser formados no córtex de ratos adultos. Apesar de dados semelhantes terem sido obtidos em outros experimentos posteriores, como os de Kaplan e colaboradores em 1977, o trabalho de Altman continuou a ser tratado com um considerável ceticismo por grande parte da comunidade científica, tendo causado pouco impacto na área (Cayre *et al.*, 2002; Gould e Gross, 2002). Em 1981 os estudos de Fernando Nottebohn (Nottebohn, 1981) realizados em canários (*Serinus canaria*),

ajudaram a derrubar o paradigma de que neurônios novos não seriam formados no cérebro de animais adultos (Lindsey e Tropepe, 2006; Sadananda, 2004; García-Verdugo *et al.*, 2002; Gheusi *et al.*, 2009). Os trabalhos de Nottebohn demonstram ainda, que a neurogênese em canários adultos dependia da sazonalidade, aumentando na época reprodutiva o que também causava um aumento e mudanças no repertório de canto destes pássaros (Sadananda, 2004).

Apesar dos trabalhos com canários terem verificado com bastante precisão a existência de neurogênese em indivíduos adultos, em mamíferos ela só foi de fato aceita por volta de 1990 com o advento de marcadores moleculares mais precisos, tais como, técnicas imunohistoquímicas aliadas à detecção de análogos de nucleotídeos como a Bromodesoxiuridina (BrdU) (Colucci-d'Amato e di Porzio, 2008; Sadananda, 2004). Munidos destas técnicas mais modernas, diversos trabalhos mostraram a existência da formação de novos neurônios em mamíferos adultos. Diversos estudos em mamíferos confirmaram a neurogênese no giro denteado do hipocampo de roedores adultos (Cameron *et al.*, 1993; Seki e Arai, 1993; Kuhn *et al.*, 1996) e primatas não-humanos e humanos (Gould *et al.*, 1998, Eriksson *et al.*, 1998; Kornack e Rakic, 1999). Atualmente existem inúmeros trabalhos que demonstram a formação de novos neurônios no adulto em quase todos os grupos de vertebrados e, um menor número de estudos, em invertebrados (para revisão, ver Lindsey e Tropepe, 2006). Acredita-se que, embora os compartimentos cerebrais da neurogênese do adulto sejam heterogêneos dentro dos filos, o processo em si seja antigo e conservado evolutivamente. (García-Verdugo *et al.*, 2002; Lindsey e Tropepe, 2006; Sullivan *et al.*, 2007; Sadananda, 2004).

A neurogênese é um processo que envolve divisão celular, migração e diferenciação de células progenitoras ou tronco-neurais (*Neural stem cells* ou NSC's)

(para revisão ver: Bohlen und Halbach, 2007; Chaerkady *et al.*, 2009). Uma característica geral de NSCs, independente de sua localização no cérebro, é que sua proliferação é mais lenta e rara que nos demais tecidos auto-regenerativos (Momma *et al.*, 2000). Essas NSCs são representadas por um tipo especial de células somáticas que possuem capacidade de auto renovação de longo prazo e geram diferentes linhagens celulares. Evidências genéticas, bioquímicas e farmacológicas sugerem que essas células seriam tipos especiais de astrócitos que expressam GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) exibindo certas propriedades de células da glia radial (Duan *et al.*, 2008). As células precursoras dividem-se simetricamente, dando origem a novas células idênticas às células mães, e assimetricamente dando origem a células que irão se diferenciar em neurônios e/ou células da glia (Cayre *et al.*, 2002). De fato, estudos demonstraram que em cultura, essas células multipotentes podem gerar tanto neurônios quanto células gliais (para revisão, ver Ahmed, 2009).

Existe uma “tri-potência” nas NSCs presentes em indivíduos adultos, ou seja, essas células podem dar origem a neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Isso pode dificultar a investigação do destino final dessas células em estudos *in vivo*, pois as propriedades dessas células ainda não estão completamente elucidadas (Gage, 2000; Duan *et al.*, 2008). Outros estudos também demonstraram que astrócitos presentes na parede lateral do ventrículo de ratos (*Rattus norvegicus*) podem apresentar propriedades de células-tronco, gerando novos neurônios (Momma *et al.*, 2000). Os neurônios recém formados pelas células progenitoras passam por um processo de maturação para que então migrem para sua posição final no cérebro. A região cerebral que abriga essas células progenitoras é altamente variável dentro dos grupos de vertebrados, assim como

o posicionamento final das células “nascidas” nessas regiões. (Lindsey e Tropepe, 2006; Cayre *et al.*, 2002).

Em mamíferos existem duas regiões que abrigam essas células proliferativas, a zona subventricular (SVZ) e a zona granular do hipocampo (SGR) (Malberg *et al.*, 2000; García-Verdugo *et al.*, 2002). As células formadas na região subventricular migram através da via de migração rostral (*rostral migratory stream* ou RMS) até o bulbo olfatório onde são incorporadas (Ramirez-Amaya *et al.*, 2006). Já as células geradas na região subgranular do hipocampo tem sua posição final na camada granular do giro denteado (Malberg *et al.*, 2000; García-Verdugo *et al.*, 2002).

A localização dos nichos da neurogênese pós-natal é bastante heterogênea dentro do grupo dos vertebrados. Ainda sim, a proliferação na SVZ parece ser comum a todos os cordados (Lindsey e Tropepe, 2006; Cayre *et al.*, 2002). Durante a fase de desenvolvimento do cérebro de vertebrados, a grande maioria das células é gerada por células multipotentes localizada nas camadas germinais da zona ventricular telencefálica. Esses ventrículos são formados pelo dobramento epitelial da ectoderme durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário. É bem estabelecido que as zonas ventriculares persistem, ainda que com uma grande redução de volume, até a vida adulta. Isso pode explicar porque em todos os grupos de vertebrados estudados apresentam neurogênese na zona ventricular (García-Verdugo *et al.*, 2002). Em répteis e anfíbios as áreas proliferativas existem na região subventricular, mas não estão limitadas a ela. Nesses grupos, uma grande neurogênese foi registrada no epitélio olfatório, órgão vomeronasal e retina. Em peixes teleósteos foram descritas mais de cem zonas proliferativas diferentes, sendo o cerebelo a maior fonte de novos neurônios (para revisão ver. Lindsey e Tropepe, 2006). Em aves, as áreas proliferativas também estão

localizadas na SVZ, contudo, desde o trabalho de Nottebohn tem sido demonstrado um padrão de migração e incorporação neuronal nas aves que é diferente ao de mamíferos. Em passeriformes, o padrão de migração e posicionamento final parece ser mais amplamente distribuído no telencéfalo (Gheusi *et al.*, 2009).

A neurogênese em mamíferos adultos é influenciada por vários fatores. A diminuição dos níveis de serotonina leva a uma diminuição da formação de novos neurônios no hipocampo de ratos, tanto no giro denteado do hipocampo quanto na zona subventricular (Brezun e Daszuta, 1999). A administração crônica de antidepressivos, tais como, a Fluoxetina e Reboxetina, aumentam o número de células novas no giro denteado de ratos adultos (Malberg *et al.*, 2000). Da mesma maneira, a complexidade ambiental é conhecida por afetar a morfologia, neuroquímica e fisiologia do sistema nervoso central. Os ambientes fisicamente enriquecidos podem promover o desenvolvimento cerebral enquanto o empobrecimento ambiental produz efeitos opostos sobre as estruturas neuronais e habilidades cognitivas (Patzke *et al.*, 2009). O enriquecimento de um ambiente combina situações complexas como a oferta variada de objetos inanimados associados a algum tipo de estímulo social.

Ao menos para mamíferos, um paradigma de enriquecimento ambiental (EA) comum é caracterizado pela manutenção dos animais em gaiolas contendo brinquedos, túneis, materiais para a confecção de ninhos, escadas e etc. Nesse modelo de enriquecimento o animal tem oportunidade de realizar níveis de atividade física voluntária maiores do que em um ambiente não-enriquecido. Ou seja, a intenção do experimentador com o enriquecimento do ambiente seria oferecer condições ótimas para que aumentassem as atividades exploratórias, atividades cognitivas, interação social e exercício físico (Sale *et al.*, 2009). Estudos realizados em roedores mostraram que

animais adultos expostos a esse tipo de ambiente apresentaram maior número de células novas no giro denteado que os animais controle (Kempermann *et al.*, 1997; Llorens-martín, 2007). Também foram encontrados dados sugerindo que esta situação de alojamento tem um caráter de neuroproteção, diminuindo convulsões e processos apoptóticos espontâneos em camundongos (Young *et al.*, 1999). Também em camundongos (*Mus musculus*) constatou-se que animais alojados em um ambiente enriquecido apresentam um aumento na capacidade de aprendizado, redução da perda de memória com a idade, diminuição da ansiedade e um aumento de comportamentos exploratórios (Nithianantharajah e Hannan, 2006). Ainda outros estudos mostraram que o EA diminui o impacto de resposta a objetos estranhos e drogas de abuso (Cain *et al.*, 2006).

Em aves não existem muitos estudos relacionando respostas comportamentais e neurogênese associadas ao enriquecimento ambiental. O processo de neurogênese em aves é especialmente sensível às variações ambientais (Patzke *et al.*, 2009) e também é constante durante a vida adulta desses animais. Fatores como a necessidade de buscar comida e evitar predadores parecem ser responsáveis por um aumento do número de neurônios no hipocampo de chapins selvagens (*Parus major*) quando comparados a animais da mesma espécie vivendo em laboratório (Sadananda, 2004).

As regiões proliferativas no cérebro de vertebrados adultos são formadas por uma variedade de tipos celulares (Bohlen und Halbach, 2007). A detecção de neurônios recém formados depende da determinação de suas propriedades imaturas concomitante à exclusão de características de neurônios maduros ou de células gliais. Esta caracterização pode ser feita através da utilização de diversos marcadores moleculares (Bohlen und Halbach, 2007; Komitova *et al.*, 2005). Tais marcadores são normalmente

proteínas expressadas por estas células neurais em diferentes fases de seus desenvolvimentos. A identificação dessas proteínas através de técnicas bioquímicas, moleculares ou de ensaios imunológicos, é então uma ferramenta importante para a caracterização da célula e de seu estágio desenvolvimental. Dentre estes marcadores podemos citar alguns como a nestina (marcador de células multipotentes), Sox-2 (marcador de células progenitoras), Ki67 (marcador de proliferação celular), GFAP (marcador de astrócitos), NeuN (*Neuronal Nuclei* - marcador de neurônios maduros) e doublecortina (marcador de neurônios imaturos) (Duan *et al.*, 2008). Outra técnica que busca a identificação de células recém formadas é a injeção de análogos de nucleotídeos que são incorporados na síntese de novas moléculas de DNA e que possam ser identificados posteriormente, como é o caso da timidina marcada com isótopos radioativos e mais recentemente da Bromodesoxiuridina (BrdU) (Gage, 2000; Temple, 2001).

A doublecortina (DCX) é uma proteína associada aos microtúbulos que tem forte expressão em células pós-mitóticas em diferenciação e é crítica para a migração radial dessas células, controlando o processo de polimerização e estabilização do citoesqueleto, desempenhando assim, um papel chave no posicionamento final dos neurônios novos (Boseret *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2009). A DCX é amplamente conservada tanto em vertebrados como em invertebrados e sua expressão defeituosa acarreta vários problemas como migração neuronal defeituosa, epilepsia e retardo mental (Reiner *et al.*, 2006). Em humanos, existem evidências ligando mutações nos genes LIS-1 e nos genes responsáveis pela expressão da DCX, com a Lisencefalia-Tipo I, uma doença caracterizada pela diminuição ou ausência dos giros e sulcos da superfície cerebral e que causa atrasos psicomotores e retardo mental (Horesh *et al.*,

1999; Friocourt *et al.*, 2003). Durante o desenvolvimento a DCX é amplamente expressa no encéfalo do embrião, sendo bastante reduzida durante os primeiros dias após o nascimento. Contudo, uma expressão reduzida da DCX persiste no encéfalo durante a idade adulta, promovendo, além da migração de novas células, o crescimento de processos e extremidades de neurônios já maduros (Friocourt *et al.*, 2003; Reiner *et al.*, 2006).

A doublecortina é filogeneticamente conservada; Reiner e colaboradores (2006) verificaram grande homologia de subunidades da doublecortina em humanos, roedores, primatas, canídeos, bovídeos e aves. No entanto, a maior parte dos trabalhos tanto sobre neurogênese no adulto, quanto sobre a expressão de DCX em animais adultos estão concentrados em mamíferos, sendo que esses últimos animais apresentam pouca formação pós-natal de células neurais quando comparados com outros vertebrados adultos (Lindsey e Tropepe, 2006). Cai e colaboradores (2009), descreveram a distribuição de células imunorreativas à DCX em gatos (*Felis catus*), macacos rhesus (*Macaca mulatta*) e humanos, e puderam verificar que em sua maioria, neurônios imaturos DCX+ posteriormente desenvolviam-se em neurônios GABAérgicos nestes 3 grupos. Também verificaram que a expressão de DCX estava presente nas zonas proliferativas da SVZ e SGZ. Em roedores também foram encontradas evidências de que a expressão da doublecortina reflete a neurogênese, estando presente nas regiões proliferativas e na via de migração rostral (Couillard-Despres *et al.*, 2005; Nacher *et al.*, 2001).

A expressão da doublecortina também está correlacionada com a migração neural no embrião de galinha (*Gallus gallus*), podendo ser detectada em diversas regiões como o prosencéfalo, cerebelo, teto óptico e medula espinhal, especialmente

durante as fases mais precoces do desenvolvimento (Hannan *et al.*, 1999). A DCX também é amplamente expressa durante o desenvolvimento do telencéfalo de *G. gallus* estando presente em estruturas paliais e subpaliais (Capes-Davis *et al.*, 2005). Existem poucos trabalhos na literatura que tratam sobre o padrão de expressão da doublecortina no encéfalo de aves adultas. Kim e colaboradores (2006) identificaram a presença da proteína em diversas áreas do cérebro de mandarins (*Taeniopygia guttata*), incluindo o mesopallio, estriado medial, nidopallium, tecto óptico e cerebelo. Outro trabalho descreveu, em canários adultos (*Serinus canaria*), a distribuição de células imunorreativas à DCX, verificando também uma expressão ampla neste animal, que inclui áreas paliais e subpaliais do prosencéfalo (Boseret *et al.*, 2007). O interesse em investigar a distribuição da DCX nestes animais deve-se ao intenso processo de neurogênese e de outras formas de plasticidade neural que ocorre sazonalmente em áreas do telencéfalo ligadas à produção e aprendizado do canto, tais como o centro vocal superior (HVC), área X e núcleo robusto do arquiestriado (RA). Os estudos realizados com aves passeriformes mostram uma distribuição de células DCX+ muito mais ampla do que aquela encontrada em mamíferos adultos. Nestes últimos a DCX foi sistematicamente observada apenas nas regiões subventricular, subgranular do hipocampo e no bulbo olfativo, enquanto nos passeriformes investigados até o momento as células DCX+ foram observadas nas áreas subventriculares, mesopallio, nidopallium, estriado medial, no septo medial e cerebelo, além das áreas relacionadas ao canto acima mencionadas.

A formação hipocampal (FH) das aves tem sido considerada homóloga de mamíferos e de répteis em função de características anatômicas e funcionais comuns entre estas espécies. De forma similar ao observado em mamíferos, a lesão da formação

hipocampal em aves em geral (e em pombos em particular) provoca alterações importantes em comportamentos relacionados à orientação espacial (e à navegação de volta para casa), bem como no desempenho em tarefas relacionadas à memória e à aprendizagem (e.g., Colombo e Broadbent, 2000; Szekely, 1999). Como em mamíferos, a FH tem uma organização celular em 3 camadas, está espacialmente relacionada ao ventrículo lateral, e apresenta conexões com o hipotálamo, área septal e áreas paliais do prosencéfalo que lembram as observadas em mamíferos. A FH em mamíferos é organizada em regiões distintas, como os cornos de Ammon, (CAs) e o giro denteado. Nas aves, diversas subdivisões da FH têm sido propostas e recentemente, cresceu o consenso em relação à presença de uma divisão ventromedial (VM) composta por um núcleo triangular (ou n. central), interposto entre as camadas celulares medial e lateral, (ver figura 4), uma divisão dorsomedial (DM) e uma divisão dorsolateral (DL, anteriormente referida como área parahipocampal) (para revisões, ver Rosinha *et al.*, 2009; Kahn *et al.*, 2003; Reiner *et al.*, 2004). Nenhuma destas subdivisões parece ser consistentemente comparável a qualquer grupo específico da FH de mamíferos, embora algumas evidências apontem para semelhanças entre a região VM e DM das aves e os CAs de mamíferos (Szekely, 1999, Erichsen *et al.*, 1991).

É importante discriminar a neurogênese vinculada a aspectos taxa-específicos (com a produção sazonal de canções) dos locais e processos mais fundamentais da neurogênese adulta em aves (possivelmente aqueles associados ao hipocampo). Neste sentido, o exame de uma variedade mais ampla de aves, incluindo espécies em que as emissões sonoras se limitam a chamados simples e não sazonais, pode auxiliar na obtenção de um quadro mais nítido dos aspectos gerais da intensa neurogênese pós-natal nesta classe. O pombo doméstico (*Columba livia*) é um animal comum em

laboratórios de neurociências cuja biologia, comportamento e neuroanatomia são bem documentados, são menos especializados neste aspecto que os passeriformes até aqui examinados. Além disso, estes animais não foram submetidos à seleção artificial direcionada para atributos reprodutivos ou metabólicos (como as codornas, galinhas poedeiras e frangos de corte). Assim, pombos podem representar um bom modelo para o estudo da neurogênese e dos padrões de expressão de doublecortina no cérebro de aves adultas. Assim, os objetivos do presente trabalho foram 1) descrever a distribuição de pericários e fibras DCX+ no prosencéfalo de pombos adultos e 2) examinar o impacto de diferentes condições de alojamento em laboratório sobre a quantidade destas células no hipocampo destes animais.

## **2. Metodologia**

### **2.1. Animais**

Para a realização deste trabalho foram utilizados 8 pombos (*Columba lívia*, adultos em idade reprodutiva de 10 a 14 meses de idade, machos (5) e fêmeas (3), (pesando entre 410 e 470 g), obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos por 40 dias no Biotério Setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada (CFS/UFSC), em gaiolas individuais de diferentes tamanhos dependendo do grupo experimental ao qual pertenciam (ver adiante). A manutenção e limpeza das gaiolas eram realizadas três vezes por semana e a todos os animais foram disponibilizados água e ração *ad libitum*, também repostas três vezes por semana. Os animais estavam sujeitos à iluminação artificial com um fotoperíodo de 12 horas (luzes ligadas das 8:00 às 20:00) e a uma temperatura ambiente de aproximadamente 22°C mantida por condicionamento de ar. Os protocolos

experimentais deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA) sob o protocolo nº PP00220.

## **2.2. Caracterização dos ambientes**

### **2.2.1 Ambiente Enriquecido (AE)**

Os animais selecionados aleatoriamente para o Grupo AE (n=4) foram alojados em gaiolas de 70 cm x 70 cm x 40 cm (altura x largura x profundidade, ver Figura 1 A). Além de poleiros, comedouro e bebedouro padrão, foram adicionados diversos objetos ao interior das gaiolas, Ex: Contas penduradas, pedaços de espuma colorida, bolas de isopor dispostas na base da gaiola, flores artificiais de diversas cores e tubos de PVC. O posicionamento foi feito de forma a permitir com que os animais do grupo tivessem contato visual uns com os outros. A escolha desses objetos foi baseada em trabalhos que empregam esta forma de alojamento para roedores, uma vez que não se encontram disponíveis na literatura, descrições de paradigmas de enriquecimento ambiental para aves.

### **2.2.2. Ambiente Não-Enriquecido (AN)**

Os animais selecionados aleatoriamente para o Grupo AN (n=4) foram alojados em gaiolas de 50 cm x 50 cm x 50 cm (altura x largura x profundidade). Essas gaiolas menores (Figura 1 B) contaram com apenas um poleiro, comedouro e bebedouros padrão. O posicionamento das gaiolas foi feito entre divisórias, de modo que os animais desse grupo não tinham contato visual entre si.

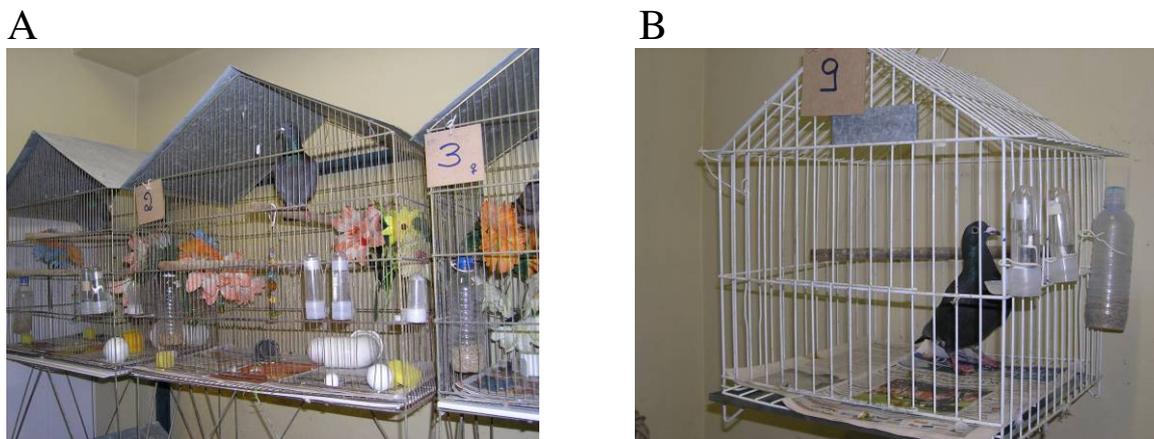


Figura 1 - A) Ambiente Enriquecido e B) Ambiente padrão (não-enriquecido)

### 2.3. Avaliação quantitativa da neurogênese hipocampal

#### 2.3.1. Perfusão

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (0,05g/100g de peso corporal) e Cetamina (0,15g/100g de peso corporal) e perfundidos transcordialmente com 300 ml de solução de sacarose (9,25% mantida a 37°C, com heparina) seguida por 300 ml de solução de paraformaldeído (4% em tampão fosfato). Os encéfalos foram retirados, blocados e pós-fixados em paraformaldeído (4% em tampão fosfato) a 4°C por 24h, após esse período os blocos foram transferidos para uma solução de sacarose 30%. Os blocos foram cortados em criótomo a uma espessura de 50  $\mu\text{m}$  e coletados em PBS 0,01 M em 5 compartimentos seriados.

#### 2.3.2. Reações imunohistoquímicas

As secções obtidas conforme descrito acima foram lavadas com solução de PBS 0,1M + Triton 0,15% (T.A), em 3 banhos de 5 min cada, logo após foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% + metanol por 30 minutos. Novamente,

os cortes foram lavados com PBS 0,1M + Triton 0,15% em 4 banhos de 5min cada. Após esse processo as secções foram incubadas por 60 min em solução de T.A. + soro albumina bovina 2% + soro 5%. Em seguida os cortes foram lavados em 1 banho de T.A por 5 min , e finalmente incubados com o anticorpo primário (Anti-doublecortina policlonal, fabricado por AbCam® cód. ab18723) em diluição 1:2000 por um período de 24 horas. Este anticorpo foi produzido em coelhos tendo como imunogênio um peptídeo sintético derivado de 300 resíduos da cadeia c-terminal de doublecortina humana. Testes realizados pelo fabricante indicam imunorreatividade positiva em humano, camundongo, rato, macaco rhesus, codorna e galinha, utilizando técnicas imunohistoquímicas, imunocitoquímicas, *western-blot* e ELISA.

Após o período de incubação do anticorpo primário, as secções foram lavadas em 3 banhos de T.A por 5 min, após os quais, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs.) por 90min. Os cortes foram novamente submetidos a 3 banhos de T.A por 5 min e então incubados com ABC 1:125 ( T.A. + avidina + peroxidase biotinizada) por 2 horas. Em seguida, as secções foram lavadas com T.A 3 vezes por 5 min e TBS 0,25M pH 7,4 uma vez por 5 minutos. Após esse processo as secções foram incubadas TBS 0,1M pH 7,4 + DAB 10 mg + 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por 10 minutos e então lavadas com TBS 0,25M pH7,4 por 3 vezes de 5 min cada. Juntamente com as secções do cérebro de pombo foram colocados alguns cortes de hipocampo de rato para controle positivo da reação. Realizamos também reações de controle negativo, que seguem todo o procedimento exceto a adição do anti-corpo secundário. Finalmente os cortes foram lavados com água destilada, montados sob lâmina, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula para observação em microscópio.

### **2.3.3. Caracterização e contagem das células DCX+**

A descrição da distribuição das fibras e pericários DCX+ no prosencéfalo do pombo foi realizada em 4 animais (AN; 2 séries de cortes de cada animal separadas entre si por 250  $\mu\text{m}$ ) sob microscópio óptico (Olympus BH2). As contagens foram realizadas para os dois hemisférios, por um observador que desconhecia o grupo experimental a que pertencia a amostra. A delimitação da região considerada como sendo hipocampo foi a descrita por Karten e Hodos (1967). Foram contados apenas os corpos celulares com núcleo visível circundado por citoplasma corado, localizados nas regiões Il, ml e Tr do hipocampo ventral (a marcação é pouco consistente na região DM). Os cortes telencefálicos observados sob microscópio foram documentados (Câmera Digital Pixelink, com magnificações de 25, 250 e 500 x). A nomenclatura das regiões estudadas está de acordo com a recente revisão dos termos de referência para o encéfalo de aves (Reiner *et al.*, 2004).

### **2.3.4. Testes estatísticos**

Os dados obtidos da contagem de células DCX+ no hipocampo foram testados quanto à homogeneidade de suas variâncias pelo teste de Levene, e quanto à normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O Teste-t de Student foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos em relação ao número de células DCX+ no hipocampo.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Distribuição de pericários e fibras imunoreativas à DCX+**

##### **3.1.1. Zonas proliferativas no ventrículo lateral**

Pericários e fibras DCX+ foram observados distribuídos por todo o epêndima e camadas subependimárias do ventrículo lateral, mas estiveram mais intensamente concentrados nos distritos neurogênicos já descritos em aves, localizados nas paredes laterais das extremidades dorsal e ventral do ventrículo lateral. A distribuição destas fibras e corpos celulares está descrita esquematicamente na Figura 2.

Na lâmina ependimal da parede medial do ventrículo lateral (Figuras 2 C-E, Figura 3 C), foram observadas grandes quantidades de dois tipos celulares: 1) células redondas, pouco coradas, multipolares e 2) células fusiformes (Figuras 3D—F, 4D, 6D-E). Em ambos os casos, os corpos celulares são pouco marcados pela DCX e apresentam processos que 1) penetram lateralmente no parênquima adjacente e 2) permanecem no próprio epêndima e neste se projetam ao longo do eixo rostro-caudal do cérebro (Figuras 3 E-F). Esses processos, que seguem pelo epêndima, formam emaranhados de fibras intensamente marcadas pela DCX (Figuras 3A-F). De uma maneira geral as fibras presentes na região subventricular e no parênquima são intensamente marcadas pela reação.

De maneira semelhante, a zona subventricular medial ao hipocampo, localizada na parede medial do ventrículo lateral, apresenta células multipolares com processos orientados para a região medial do hipocampo (figura 4 B-D). À medida que nos afastamos da zona subventricular em direção ao núcleo triangular e à região dorsolateral do hipocampo, observamos que a marcação nos corpos celulares torna-se

gradativamente mais fraca. Ao mesmo tempo, tais corpos celulares fracamente corados apresentam um aumento do tamanho, perdem as características ovais/fusiformes tornando-se poligonais e passam a apresentar mais complexidade e riqueza de arborização dendrítica (figuras 4 C,D) .

### **3.1.2. Vias migratórias**

Observamos dois pontos de origem principais para as vias de migração no telencéfalo de *C. livia*. As fibras DCX+ que estão amplamente distribuídas pelo encéfalo parecem se originar das extremidades dorsal e ventral do ventrículo lateral. Neste trabalho estas zonas de concentração de fibras e somas DCX+ são referidas como SVZ 1 (para a zona subventricular dorsal) e SVZ 2 (para a zona subventricular ventral; Figura 2).

Partindo das secções mais caudais (Figura 2 H), verificamos que fibras e células originadas da SVZ 2 penetram dorsalmente no sentido caudo-rostral em direção à região mais central do nidopallium. Na medida em que nos afastamos da região caudal, também é possível observar que, apesar de parte das fibras continuarem a projetar-se em direção ao nidopallium, surge outro feixe de fibras que segue lateralmente em direção ao estriado medial, e que também penetra através do estriado seguindo pelo eixo rostro-caudal (Figura 2 F). Fibras partindo de toda a extensão lateral da parede ventricular podem ser vistas seguindo lateralmente, todas em direção à região central do nidopallium. Os processos que são originados na SVZ 1 também se projetam em direção ao centro do nidopallium, orientando-se dorsalmente nos cortes mais caudais, e à medida que seguimos em direção aos níveis mais rostrais do prosencéfalo, o espaço

### Lista de abreviações

A	Arcopallium	NCL	Nidopallium caudolaterale
AA	Arcopallium anterius	NCT	Nidopallium caudale, pars trigeminale
AD	Arcopallium dorsale	NCV	Nidopallium caudoventrale
AI	Arcopallium intermedium	NCVI	divisão lateral do NCV
AM	Arcopallium mediale	NFL	Nidopallium frontolaterale
Bas	núcleo basorostral	NFM	Nidopallium frontomediale
BSTL	n. intersticial da estria terminal (p. lateralis)	NIL	Nidopallium intermedium lateralis
CA	Comissura anterior	NIM	Nidopallium intermedium medialis
CDL	Area corticoidea dorsolateralis	OB	bulbo olfativo
CPi	Cortex piriformis	EPL	lam. plexiforme externa do OB
CPP	Cortex prepiriformis	GL	lam. glomerular do OB
E	Entopallium	IGrL	lam. granular internal do OB
Ep	Epêndima	MCL	lam. de células mitrais do OB
EpB	Feixes intra-ependimários	ON	nervo olfativo
FPL	Fasciculus prosencephali lateralis	OM	tractus occipito-mesencephalicus
GP	Globo pálido	PoA	nucleus posterioris amygdalopalli
HA	Hyperpallium apicale	QF	tractus quintofrontalis
HD	Hyperpallium densocellulare	rmsd	Via migratória rostral (dorsal)
Hp	hipocampo	rmsv	Via migratória rostral (ventral)
	DL dorsolateral region do Hp	SL	nucleus septalis lateralis
	DM dorsomedial region do Hp	SM	nucleus septalis medialis
	ll camada lateral do “V” do Hp	SpA	area subpallialis amygdalae
	ml camada medial do “V” do Hp	SuN	subnidopallium
	TR n. triangular do “V” do Hp	SVZ	zonas subventriculares 1, 2
LAD	Lamina arcopallialis dorsalis	TnA	nucleus taeniae amygdalae
lms	Via migratória lateral	TPO	area temporo-parieto-occipitalis
LSt	Estriado lateral	TSM	tractus septomesencephalicus
M	Mesopallium	TuO	tuberculum olfactorium
MSt	Estriado medial	VL	ventriculus lateralis
N	Nidopallium	VP	pallidum ventrale

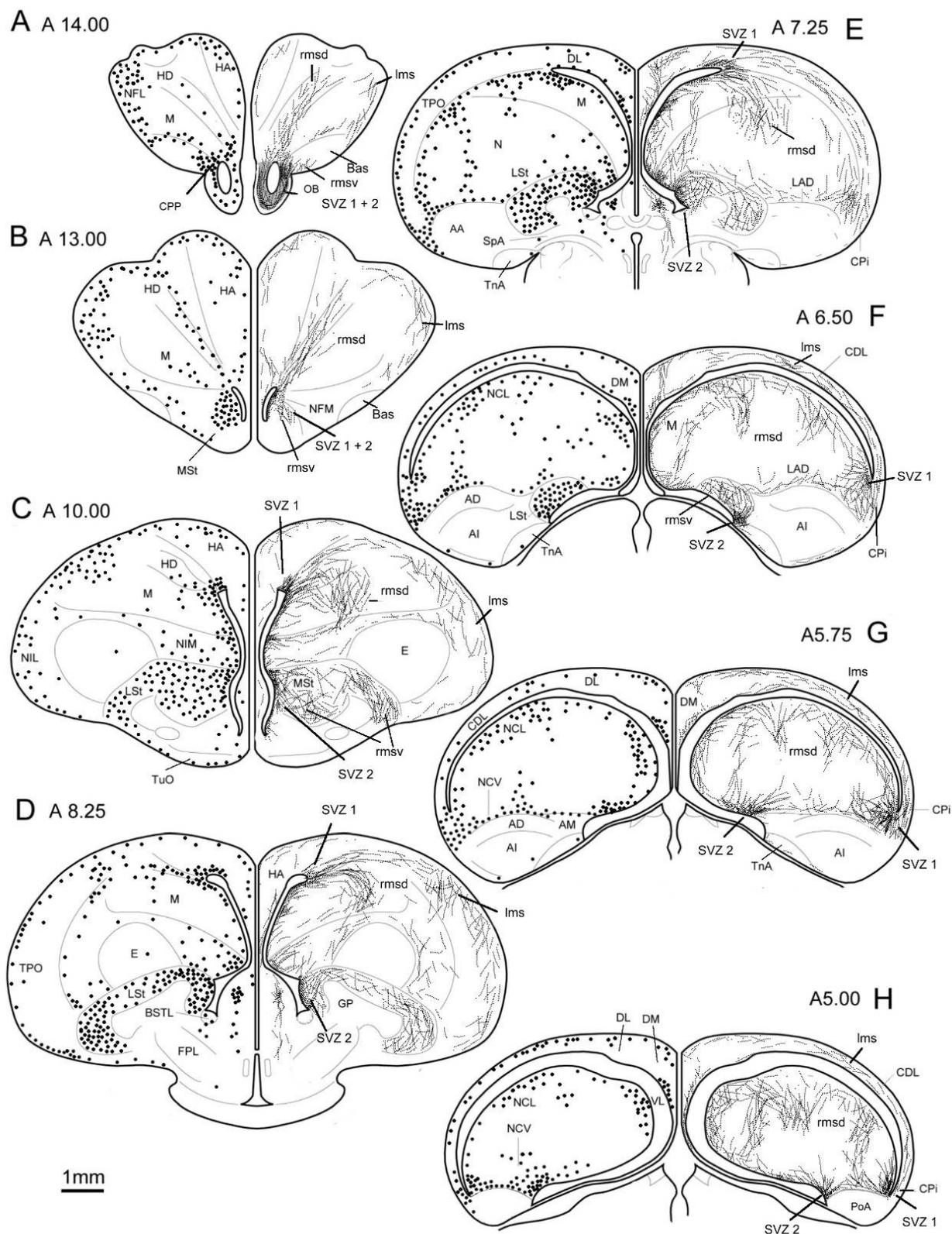


Figura 2 - Figuras semi-esquemáticas de cortes frontais do prosencéfalo do pombo, de níveis rostrais (A) a caudais (H) ilustrando a distribuição de fibras (hemisfério esquerdo) e corpos celulares (hemisfério direito, círculos pretos) imunoreativos à DCX. Os caracteres alfanuméricos acima de cada esquema indicam o nível aproximado do corte em relação ao atlas estereotáxico do cérebro de pombo de Karten e Hodós, 1967. Para abreviações, veja a lista.

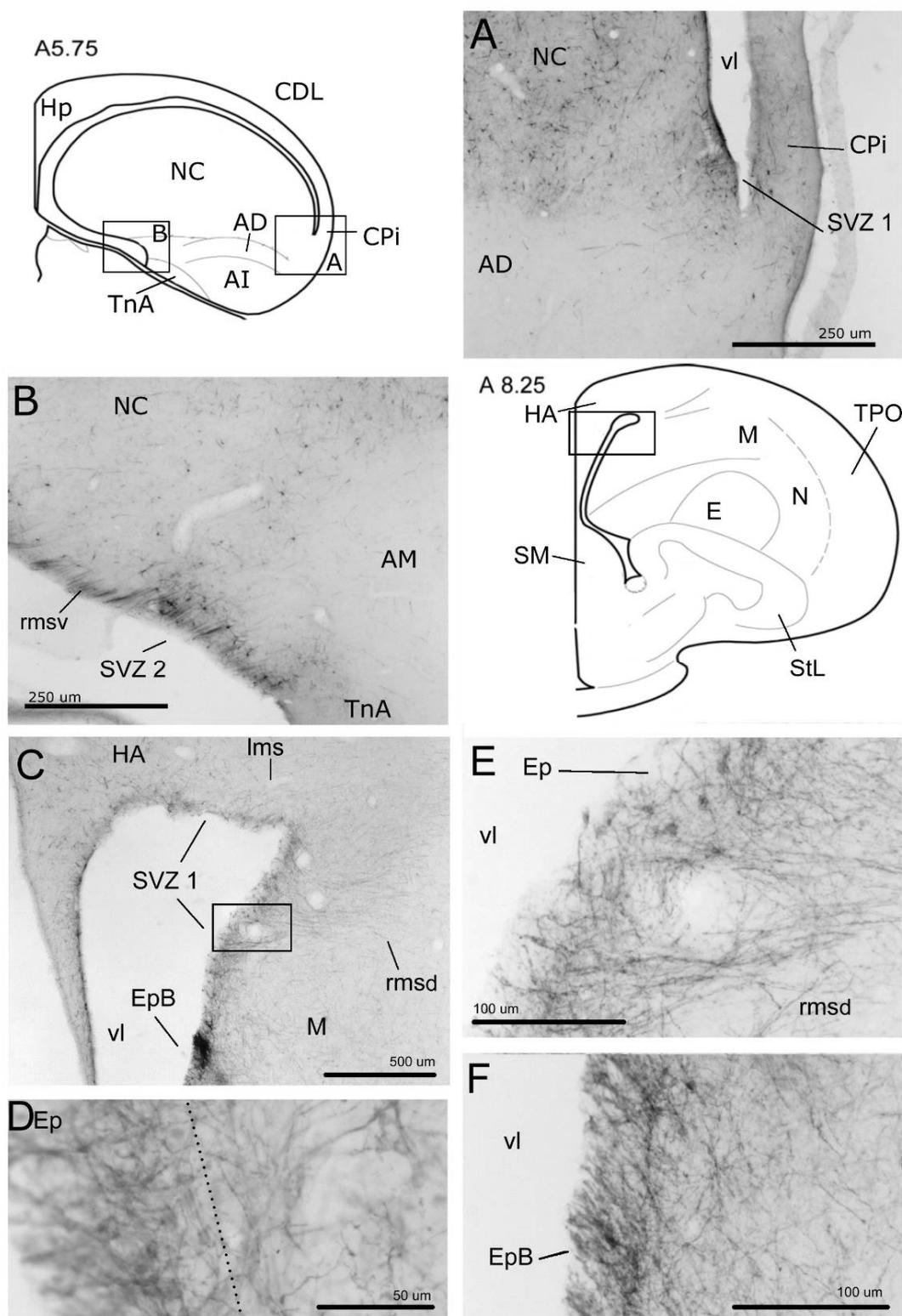


Figure 3 - Localização dos corpos celulares e fibras DCX+ no prosencéfalo caudal do pombo, concentrada nas camadas ependimárias e subependimárias nas extremidades do ventrículo lateral (A e B). Note os densos feixes de fibras intra-ependimárias intensamente marcadas em C, D, E e F. Os caracteres alfanuméricos acima de cada esquema indicam o nível aproximado do corte em relação ao atlas estereotático do cérebro de pombos de Karten e Hodós, 1967. Para abreviações, veja a lista.

ventricular diminui de tamanho. Nestes cortes mais rostrais essas fibras passam a seguir ventralmente, sempre em direção ao centro do nidopallium (Figura 2 E). Também é possível observar que alguns processos e fibras originadas na SVZ 1 seguem pela porção mais lateral do encéfalo em direção à área corticoidea dorsolateralis (CDL) (Figura 2 F). Nas porções mais rostrais do telencéfalo vemos que as fibras penetrando pelo nidopallium passam a seguir ventralmente em direção ao bulbo olfativo (figura 2 B). Essa intensa migração de fibras e células partindo das zonas proliferativas principais através do nidopallium em direção ao bulbo olfativo (OB) parece corresponder à via de migração rostral (RMS) de neuroblastos observada em mamíferos. Neste trabalho esta via é referida como via de migração rostral dorsal (rmsd) (ver figura 2), uma vez que, como descrito adiante, pudemos observar uma segunda via de migração

Os processos e células gerados na SVZ 2 migram lateralmente e alguns processos terminam abruptamente, sugerindo uma súbita flexão. Estes processos fletidos parecem prosseguir ao longo do estriado medial e se concentram na porção ventral deste distrito em níveis mais rostrais (Figura 2 C). Esta via migratória rostral que prossegue ventralmente é aqui denominada via de migração rostral ventral (rmsv). As duas vias de migração encontram-se no final do ventrículo e parecem contribuir com fibras que invadem o bulbo olfativo e aí terminam em um denso plexo de fibras (Figura 2 A).

No entanto, verificamos ainda outra via migratória que parece partir da zona proliferativa hipocampal. Células e fibras DCX+ formadas nesta região orientam-se dorsalmente em direção ao hipocampo dorsomedial, onde parecem terminar. Além disso, observamos fibras que partem da zona proliferativa hipocampal e ventralmente e em direção caudal e se concentram de forma significativa na área septal (Figuras 2 D-E,

Figura 5 A-D). A partir da área septal, fibras foram observadas prosseguindo caudal e ventralmente atingindo a região pré-optica no diencéfalo ventral.

### 3.1.3. Estruturas Límbicas

No hipocampo foram observadas células e fibras densamente marcadas pela DCX nas regiões mais laterais, adjacentes à parede medial do ventrículo, mais concentradas na camada lateral (Il), e um pouco menos numerosas na área triangular (Tr) (Figura 4 B). A densidade da marcação pela DCX diminui em direção às regiões mediais do hipocampo, de forma que não observamos células e fibras marcadas na Camada medial do hipocampo (ml). Essas células adjacentes à parede do ventrículo, redondas e multipolares, apresentam uma marcação mais densa, menor tamanho e menor arborização dendrítica quando comparadas às células mais mediais, que aumentam de complexidade e tamanho em direção ao ml (Figura 4, C-D). As zonas centrais dos subnúcleos dorsomedial (DM) e dorsolateral (DL) do hipocampo são virtualmente desprovidas de fibras ou pericários marcados pela DCX como mostra a Figura 4 (A). No entanto, algumas fibras DCX+ foram observadas deixando a parede medial e dorsal do ventrículo em direção à superfície mais dorsal de DM e DL, onde parecem dar origem a um pequeno contingente de pericários fracamente DCX+. Na área septal, verificamos um feixe de fibras densamente marcado pela DCX, em continuidade com fibras aparentemente provindas do Hp. Estas fibras permeiam um denso agregado de células bipolares e de tamanho pequeno, bem marcadas pela DCX, presentes no centro do núcleo septal lateral (Figura 5 A - C.). É interessante notar que o arcopallium mostrou-se completamente desprovido de células e de fibras DCX+. Esta região, que é comparável anatomicamente ao complexo amigdalóide de mamíferos e faz

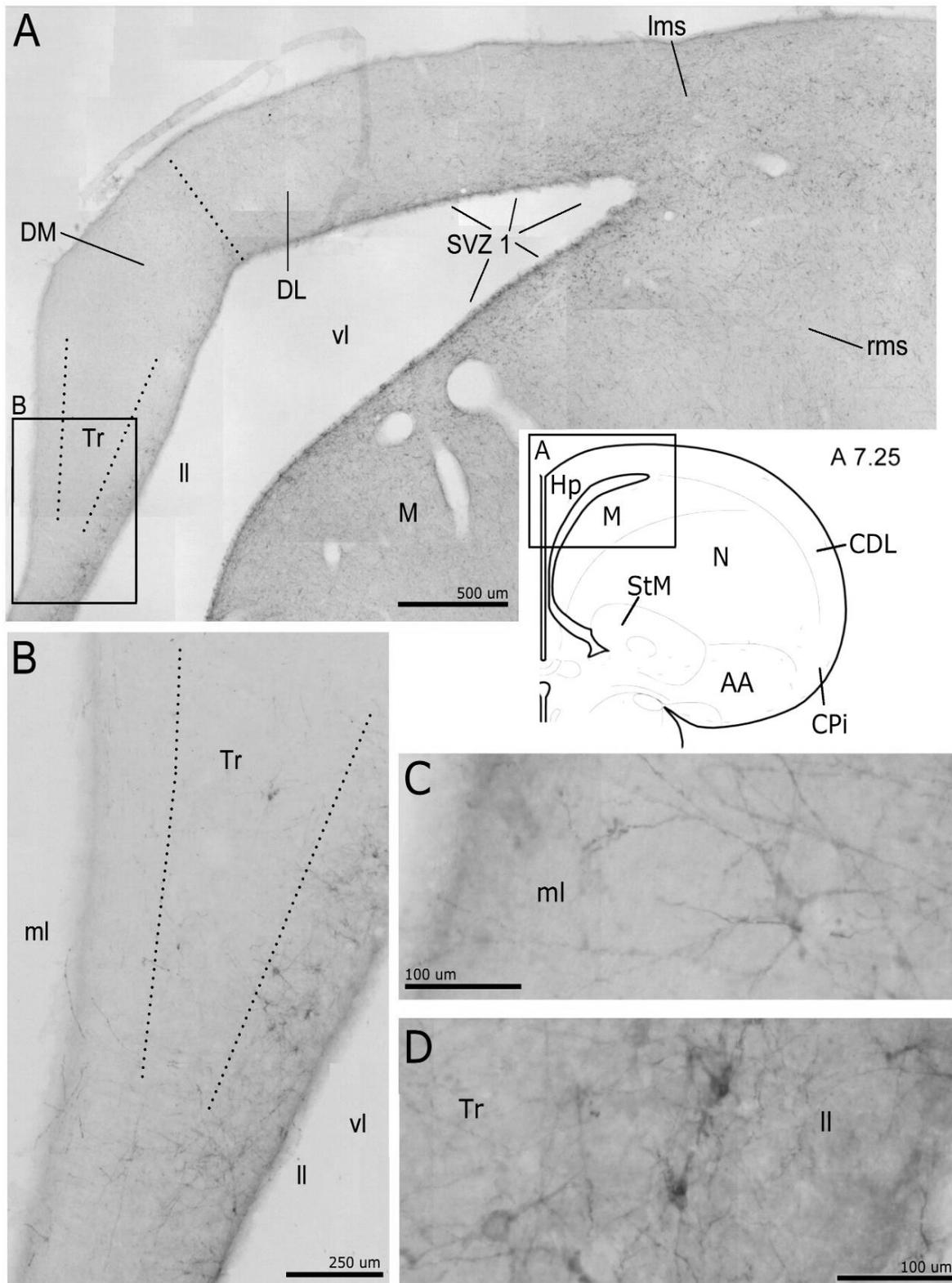


Figura 4 - Localização de corpos celulares e fibras DCX+ no hipocampo do pombo. (A) fotomicrografia em baixa magnificação do hipocampo rostral. (B) Marcação DCX+ no hipocampo ventromedial. (C) Célula redonda multipolar com densa arborização dendrítica. (D) Células da camada endimária comparadas com célula da camada subependimária. Os caracteres alfanuméricos acima de cada esquema indicam o nível aproximado do corte em relação ao atlas estereotáxico do cérebro de pombos de Karten e Hodós, 1967. Para abreviações, veja a lista.

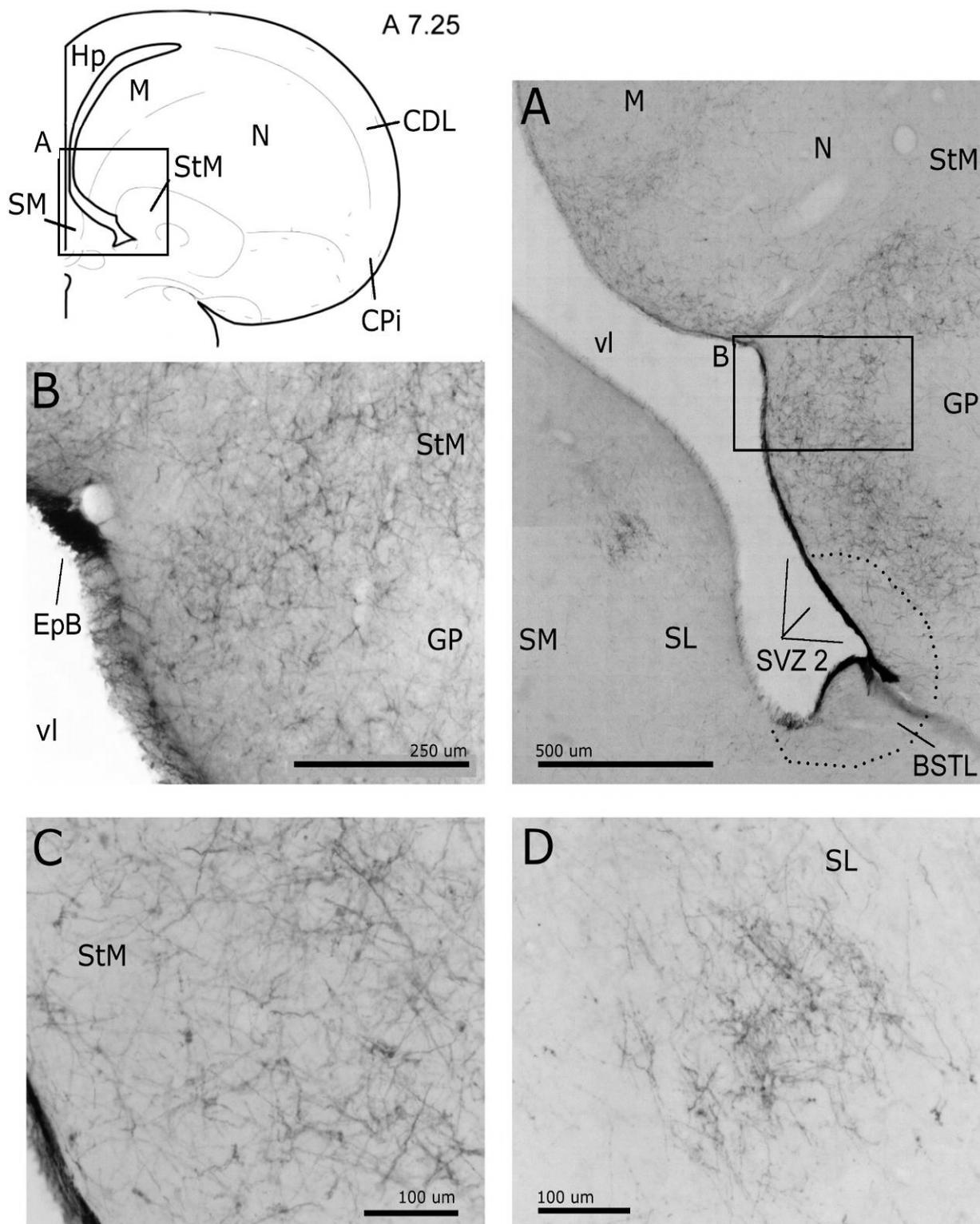


Figura 5 - Localização de corpos celulares e fibras DCX+ no estriado medial e na área septal do pombo. Notar os densos feixes de fibras intraependimárias intensamente marcadas em A, B e C. Os caracteres alfanuméricos acima de cada esquema indicam o nível aproximado do corte em relação ao atlas estereotáxico do cérebro de pombos de Karten e Hodós, 1967. Para abreviações, veja a lista.

parte do circuito envolvido no canto em passeriformes (ver adiante), contém apenas umas poucas fibras marcadas em passagem pela superfície ventral do núcleo.

#### **3.1.4. Estruturas Paliais**

O Hyperpallium é populado por células e fibras mais esparsas e moderadamente marcadas originadas na SVZ 2 e que aparentemente migraram através da via lateral. Podemos identificar corpos celulares multipolares margeando a face mais dorsal do hyperpallium apicale (HA), ao passo que fibras e células estão ausentes nas partes mais centrais do HA (Figura 2 C). As células encontradas são grandes, poligonais e complexamente arborizadas. De maneira semelhante, o Mesopallium (M) apresenta um maior número de células nas zonas mais dorsais. Porém, quando seguimos em direção rostral, podemos acompanhar um aumento de fibras DCX+ e poucas células convergindo para a região central do M (Figura 2 B-D).

O Nidopallium caudolaterale (NCL) apresenta um grande número de células e processos DCX+, que parecem convergir ali, vindas das zonas subventriculares. A camada endimária adjacente ao NCL também contribui com células e processos DCX+ (Figura 2 F-H). É interessante notar que o NCL é comparável ao Centro Vocal Superior (HVC) de passeriformes, e que como alguns trabalhos demonstram é uma área de grande aporte de neurônios novos no cérebro desses animais (ver adiante). O entopallium, situado dorsalmente ao estriado (Figura 2 C) mostrou-se completamente desprovido de processos DCX+ (Figura 2 D). O núcleo basorostral, distrito somatossensorial localizado ventrolateralmente ao nidopallium rostral, é

circundado por fibras e corpos celulares marcados (aparentemente em passagem para o bulbo olfativo), mas ostenta poucos elementos neurais DCX+.

### **3.1.5. Os gânglios da base**

No estriado podemos identificar uma grande quantidade de fibras durante toda a sua extensão (Figura 2 D-E e Figura 4 A) . Os corpos celulares presentes em quantidades moderadas possuem uma densa arborização dendrítica (Figura 4 B-C). Estas células redondas e multipolares tem um tamanho médio de 12  $\mu\text{m}$  a 20  $\mu\text{m}$  (comprimento de seu maior diâmetro). A medida que nos afastamos em direção rostral vemos uma maior densidade de fibras concentradas na região medial do estriado na região mais próxima ao ventrículo (Figura 2 C). As regiões do pálido ventral ao striatum, (Figura 5 A) são completamente desprovidas de células ou processos DCX+ (Figura 2 D).

### **3.1.6. O bulbo olfativo e córtex pré-piriforme**

Observamos um emaranhado de fibras densamente marcadas pela DCX no córtex pré-piriforme (CPP) (Figura 6 C) localizado dorsalmente em relação ao bulbo olfativo (OB). Essas fibras parecem estar orientadas ventralmente em direção à camada granular do bulbo olfativo (figura 6 A), as células existente no CPP tem o citoplasma bem marcado pela DCX e possuem um tamanho de 6 $\mu\text{m}$  a 10 $\mu\text{m}$ . Dorsolateralmente, no núcleo basorrostral (Bas), verificamos a existência de uma marcação menos densa das fibras, que da mesma maneira, estão orientadas para o OB. As células no Bas são mais raras, menos marcadas pela reação e maiores dos que as encontradas no CPP.

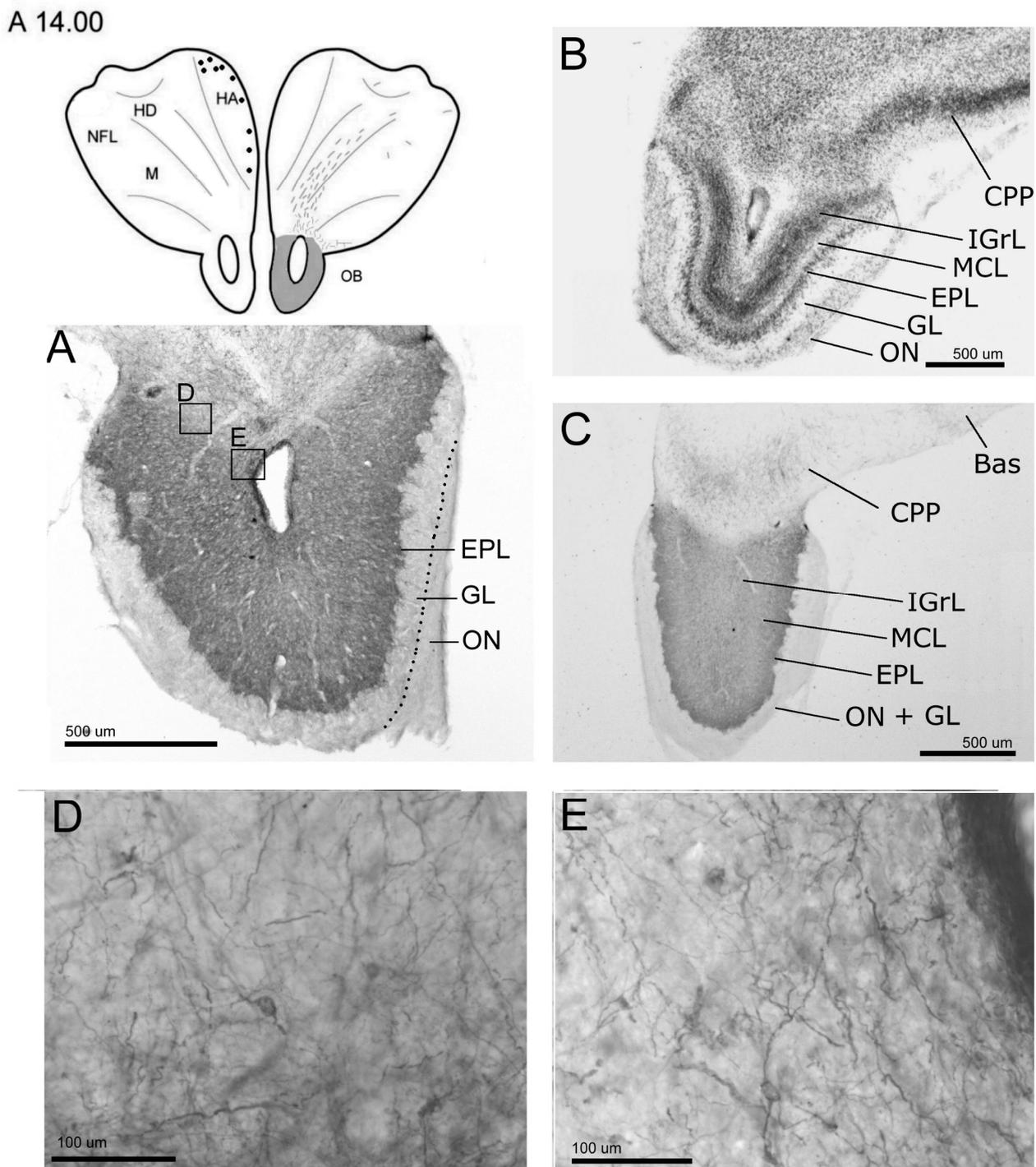


Figura 6 - Localização de corpos celulares e fibras DCX+ no bulbo olfativo e no córtex piriforme adjacente do pombo. Em B, é apresentado um corte corado pelo método de Nissl (Giemsa) em um nível estereotático comparável ao apresentado em (A). Vista geral rostral do BO: Aumento de 4x(C); Células e fibras presentes na camada mitral do BO (D); Células e fibras da camada IgrL do BO (E). Os caracteres alfanuméricos acima de cada esquema indicam o nível aproximado do corte em relação ao atlas estereotático do cérebro de pombos de Karten e Hodós, 1967. Para abreviações, veja a lista .

As subdivisões do bulbo (Figura 6 B) apresentam padrões de marcação DCX+ diferentes. A camada glomerular interna do OB é populada por células e processos densamente marcados. As células fusiformes, pequenas e bipolares (Figura 6 D), são fortemente marcadas. Na camada mitral do OB também observamos corpos celulares bipolares bem marcados, porém em maior número do que na camada glomerular interna (Figura 6 E).

A camada plexiforme é bem delimitada pela reação (Figura 6 A-C), apresentando apenas marcação de processos provenientes de células da camada mitral e que penetram nesta. A parede do ventrículo na região mais dorsal do bulbo olfativo é populada por um grande feixe de fibras fortemente marcadas pela doublecortina, ao passo que não se pode individualizá-las ou verificar se estão presentes células na área.

### **3.2. Efeito da exposição a diferentes ambientes sobre a expressão da DCX no hipocampo de pombos adultos.**

Para comparar os efeitos das condições de alojamento sobre a neurogênese, realizamos a contagem de células DCX+ na região do hipocampo dos pombos alojados no ambiente enriquecido e não-enriquecido. Todas as secções que continham o hipocampo (conforme descrito por Karten & Hodos, 1967) foram observadas e fotografadas para que fosse feita a contagem do número total de células DCX+. Devido às perdas ocorridas durante a microtomia e danos aos tecidos durante as reações imunohistoquímicas, o número total de secções íntegras para cada caso era variável (mínimo de 4 secções para cada cérebro). Por esse motivo, os dados utilizados para as

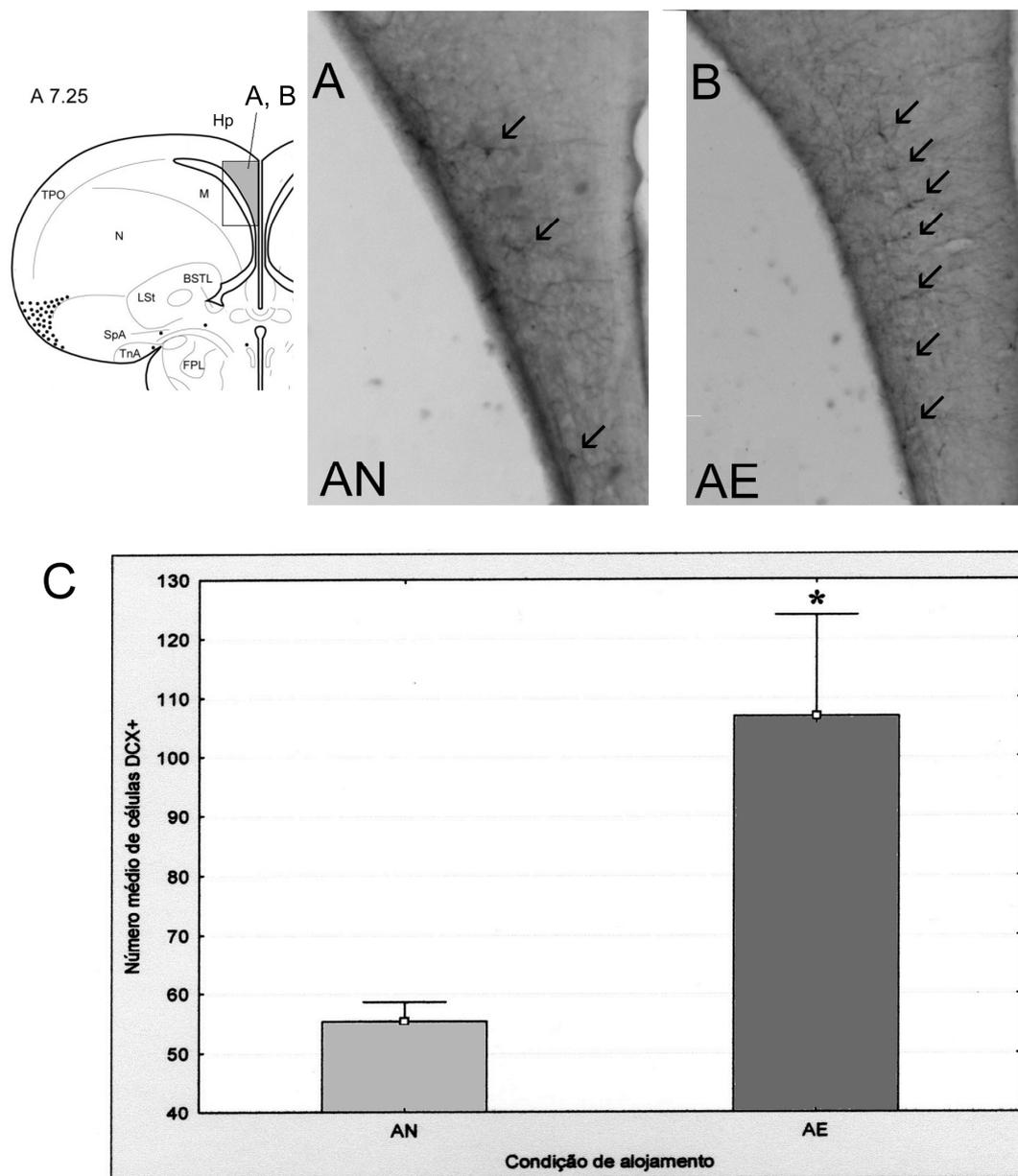


Figura 7 –Secção do hipocampo de um animal do grupo AN (A); Secção do hipocampo de um animal do grupo AE (B) Setas apontando corpos celulares DCX+ (A,B); Número de células DCX+ no hipocampo ventral de pombos alojados em um ambiente padrão (AN) ou em um ambiente enriquecido (AE). (\*) indica diferença significativa com relação ao grupo AN (Teste t de Student,  $p < 0,05$ ) (C).

análises estatísticas foram o resultado do número total de células contadas em cada caso (animal) dividido pelo número de secções de hipocampo em cada caso, ou seja, a média de células por secção hipocampal em cada animal. O número médio de células contadas nos animais dos dois grupos experimentais está descrito na Figura 7. Os valores médios aqui representados seguem a distribuição normal (teste de *Kolmogorov-Smirnov*:  $p > 0,20$ ) e apresentam variâncias homogêneas (Levene:  $p > 0,05$ ), logo, pudemos aplicar o Teste-t de Student. Esta análise mostrou que a quantidade de células DCX+ no hipocampo ventral dos animais alojados por 40 dias no ambiente enriquecido (AE) foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que as observadas nos animais alojados nas gaiolas-padrão, não enriquecidas (AN). Esta diferença foi de aproximadamente 51% no número médio de células hipocampais DCX+ entre os animais alojados no ambiente enriquecido (média=  $106,72 \pm 34,40$ ) e não-enriquecido (média=  $55,27 \pm 6,65$ ).

#### 4. Discussão

Os dados levantados neste estudo sugerem que a expressão da proteína DCX ocorre em corpos celulares espalhados pela maioria das grandes divisões anatômicas do prosencéfalo do pombo. De um lado, estas células DCX+ do pombo estão concentradas em regiões nas quais foi detectada intensa neurogênese em aves adultas (as zonas subventriculares e o hipocampo; Goldman e Nottebohn, 1983; Alvarez-Buylla e Nottebohn, 1988; Alvarez-Buylla *et al.*, 1994), e que são comparáveis às dos demais vertebrados estudados (e.g., Kaslin *et al.*, 2008). Associado ao fato de que a DCX é expressa em células pós-mitóticas em processo de migração e diferenciação, estes dados reforçam a idéia de que sua presença nestas zonas proliferativas e seu papel nos processos ligados à proliferação de células neurais no adulto pode ser um atributo bastante conservado do cérebro dos vertebrados, representando uma característica plesiomórfica (ancestral) para os vertebrados.

No entanto, nossos resultados também apresentam características que diferenciam os padrões de distribuição da DCX nas aves daquele observado em mamíferos, e que também que diferenciam do padrão observado no pombo do de outras aves. Uma diferença notável entre o padrão de distribuição em aves e mamíferos reside na quantidade de células e fibras marcadas nas regiões neurogênicas subventriculares e hipocampais, que indicam que os processos de produção de novas células são bem mais intensos nos primeiros. Se estas diferenças forem apenas quantitativas, mas os mecanismos envolvidos forem semelhantes, então as aves podem representar um modelo interessante e de validade mais geral em relação, e.g., aos amniotas, para estudos sobre a regulação da neurogênese adulta e para a detecção dos fatores que limitam a neurogênese em mamíferos adultos.

A marcação para a DCX nos pombos (resultados presentes) e nos passeriformes estudados (Kim *et al.*, 2006; Boseret *et al.*, 2007) é mais intensa e amplamente distribuída que nos mamíferos também em distritos não-neurogênicos. As vias migratórias rostrais dos roedores e de primatas (incluindo humanos, e.g., Curtis *et al.*, 2009) formam um agrupamento discreto de neuroblastos circundados por um ducto de células gliais e que progride rostralmente pelo prosencéfalo basal em direção ao bulbo olfativo e aí terminam. No pombo, observamos que estas vias migratórias são múltiplas e destinadas a diversas áreas do prosencéfalo. Pode-se discernir, pela marcação pela DCX, uma via migratória rostral dorsal, que progride pelas regiões centrais do parênquima palial (pelo nidopallium e mesopallium) distribuindo neuroblastos para os territórios paliais adjacentes e aparentemente terminando no bulbo olfativo. Além desta, uma via migratória rostral ventral prossegue pelas regiões mediais do estriado (ao qual aparentemente doa neuroblastos), e uma via migratória lateral, que parte da SVZ e alcança o córtex piriforme, foram observadas no pombo. Ambas convergem para o bulbo olfatório e se unem à via migratória rostral dorsal. Além disso, observamos densos feixes de fibras marcadas percorrendo a parede dos ventrículos, com destino que nosso material não permite determinar. Tanto quanto pudemos encontrar na literatura, esta é a primeira descrição destas rotas migratórias em aves.

Além disto, os pombos (nossos resultados) e os canários (Boseret *et al.*, 2007) parecem ter uma vasta quantidade de células DCX+ com características de neurônios maduros ou diferenciados (corpo poligonal dotado de arborização dendrítica ampla e complexa), e residentes no estriado, no hipocampo, e em regiões paliais (nidopallium, hyperpallium, mesopallium) associativas e sensoriais comparáveis ao neocórtex de mamíferos. Deve ser notado que nestes últimos, a presença de um número

comparativamente modesto de células DCX+ não-recentemente geradas, aparentemente residentes, foi detectada nas lâminas II e III do córtex piriforme (uma região filogeneticamente antiga do córtex de vertebrados associada à olfação), e do córtex perirrinal, insular agranular e entorrinal (Luzzati *et al.*, 2009). Estas células não apresentam imunoreatividade à BrdU (estudada em vários períodos de sobrevivência) e também expressam a forma polisialilada da molécula de adesão celular neural, PSA-NCAM (uma molécula também associada à plasticidade estrutural durante a neurogênese), e foram encontradas no cérebro de exemplares adultos de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*), e, em quantidades bem maiores que em mamíferos, também em lagartos (*Podarcis muralis*). Estas células foram também observadas em camundongos (*Mus musculus*) e em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), mas em número muito menor que em coelhos e porquinhos-da-índia. Em répteis, células e fibras DCX+ foram observadas no córtex medial, no bulbo olfativo e nas regiões germinativas dos ventrículos laterais e olfativos (Lopez-Garcia *et al.*, 1988; Font *et al.*, 2001; Kaslin *et al.*, 2008). Estes dados, somados aos do presente trabalho, sugerem que a presença de neurônios maduros e capazes de remodelamento morfológico intenso em áreas neocorticais pode ser um atributo conservado em amniotas, mas expresso com mais intensidade em répteis e aves que em mamíferos.

Contrariamente ao que é observado em mamíferos, nos pombos, e com menor intensidade nos canários, foi notada uma maciça presença destas células no estriado e na área septal. O estriado e a área septal tem sido comparados anatômica e neuroquimicamente às regiões de mesmo nome em mamíferos (Reiner *et al.*, 2004), sugerindo que estas células adultas capazes de mudanças morfológicas podem ocorrer também em regiões límbicas (no caso da área septal) e em regiões envolvidas com o controle do movimento corporal (como o estriado) das aves, mas não de mamíferos. O

padrão geral de distribuição de fibras e células DCX+ que observamos nos pombos corresponde, na maioria dos distritos prosencefálicos, ao que foi descrito para o canário (Boseret *et al.*, 2007) e para o mandarim (Kim *et al.*, 2006). Nestas aves, o canto complexo que emitem é usado para atrair fêmeas e defender territórios, e é controlado por uma rede de áreas cerebrais interconectadas e que sofrem intensa plasticidade funcional e morfológica associada ao aprendizado e estabilização do canto nas diferentes estações do ano. Estas regiões incluem o nidopallium caudolateral dorsal (também conhecido como “centro vocal superior”, ou HVC), a “área X”, que é parte do estriado medial rostral, e o n. robustus arquistriatalis (RA, que faz parte do arcopallium, ou complexo amigdalóide nas aves) (Alvarez-Buylla & Kim, 1997). Como nos canários e mandarins, os pombos apresentam intensa marcação DCX+ no HVC e na área X, mas escassa ou nenhuma marcação no RA. Isto pode sugerir que a plasticidade intensa em HVC e área X que ocorre nas aves canoras pode ocorrer também em uma espécie cujo canto (ou chamados) são bem menos elaborados e não apresentam sazonalidade. Atualmente, desconhecemos eventuais alterações destas regiões associadas a vocalizações em outras aves que não os passeriformes.

Uma diferença significativa na distribuição das fibras e células DCX+ entre o pombo e os passeriformes estudados parece residir no bulbo olfativo. De fato, migração de neuroblastos foi vista apenas nas regiões mais rostrais do estriado (mas não no bulbo olfativo) em canários (Alvarez-Buylla *et al.* 1994) e fibras DCX+ não foram descritas no BO dos passeriformes estudados até agora, mas figuram como as regiões mais densamente marcadas pela DCX+ nos pombos, nos lagartos e nos mamíferos (Garcia-Verdugo *et al.*, 2002). É importante notar que a neurogênese em regiões envolvidas com a discriminação olfativa parece ser uma característica persistente em insetos, crustáceos, roedores e primatas (Sardananda, 2004). A análise de um número maior de famílias de

aves, répteis e de mamíferos pode ajudar a decidir se a maciça presença de neuroblastos no bulbo olfativo representa um atributo plesiomórfico para os amniotas, perdido durante a diferenciação dos passeriformes.

Outro local do cérebro de vertebrados onde ocorre intensa produção e recrutamento de novos neurônios é o hipocampo. Nossos dados sugerem que o hipocampo do pombo é sítio de neurogênese expressiva, que pode contribuir não apenas com neuroblastos para seus próprios subnúcleos, mas também para áreas funcionalmente relacionadas a ele, como a área septal e o hipotálamo. Além disso, nossos dados sugerem que diferentes condições de alojamento podem afetar a quantidade de células DCX+ hipocampais: ambientes mais variados, amplos e coloridos, associados à visão de outros animais da mesma espécie, parecem acarretar um número maior destes corpos celulares no pombo. Estes dados e os resultados obtidos em mamíferos (ver Introdução) sugerem que os efeitos neurogênicos da exposição a ambientes enriquecidos pode ser um atributo comum nestas classes. Se a intensa neurogênese no hipocampo do pombo (comparada com a de roedores) partilhar outros mecanismos com mamíferos, então este animal pode representar um bom modelo para o estudo dos processos que regulam a produção e incorporação de neurônios no amniota adulto.

Aves em situação natural exibem habilidades importantes de memória e de representação espacial, durante comportamentos como a migração a longas distâncias, a recuperação de comida recolhida e guardada em locais escondidos e no retorno para o ninho após a remoção do animal para longas distâncias (o “homing” em pombos). A participação do hipocampo nas habilidades de navegação do pombo está bem documentada (ver Colombo e Broadbent, 2000 para uma revisão). O hipocampo de espécies como *Parus sp.*, que coletam e guardam comida (e que a procura e encontra

após meses da coleta) é maior que o de espécies que não coletam (e diminui nos animais mantidos em cativeiro), enquanto que a incorporação de novos neurônios ao hipocampo aumenta sazonalmente durante os períodos de coleta nestes animais (ver Sardananda, 2004). No entanto, a relação do hipocampo com a expressão de comportamentos defensivos e de respostas a situações desafiadoras (as respostas ao estresse, por exemplo), bastante investigada nos mamíferos (ver introdução), ainda não foi estudada nas aves.

Os pombos são considerados um excelente modelo animal para estudos sobre as funções hipocampais no aprendizado, memória e navegação espacial (ver Colombo e Broadbent, 2000 para uma revisão); de modo similar aos primatas (e de forma aparentemente mais intensa que em roedores), os pombos usam informações visuais e espaciais para tarefas cognitivas e de aprendizagem, nas quais seu desempenho é paralelo ao de primatas e superior ao de roedores. Está em curso no nosso laboratório uma análise mais pormenorizada destes corpos celulares e fibras DCX+ hipocampais, em animais mantidos nestes ambientes e também em animais mantidos em gaiolas coletivas de grandes dimensões. Além disso, estamos investigando uma possível correlação entre estes ambientes, a expressão da DCX no hipocampo e as respostas destes animais em testes que quantificam comportamentos defensivos. Estes estudos podem ajudar a entender os mecanismos pelos quais a neurogênese pode participar da expressão das características anatômicas e funcionais (comportamentais) do hipocampo nas aves.

Em resumo, a expressão da doublecortina é conservada em vertebrados adultos. Nossos dados indicam que a distribuição dessa proteína é mais ampla em aves do que em mamíferos, ainda que esta possa variar dentro de uma mesma classe ou ordem. Dentro desta variabilidade de padrões de expressão, acreditamos que a

expressão da DCX no hipocampo, semelhante aquela encontrada em mamíferos, seja um processo conservado.

## 5. Referências Bibliográficas

AHMED, S. The Culture of Neural Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, n. 106, p.1-6, 2009.

ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, n. 135, p.1127-1128, 1962.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; KIRN, J.R. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. **Journal of Neurobiology**. n. 33, p.585–601, 1997.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; LING, C.Y.; YU, W.S. Contribution of neurons born during embryonic, juvenile, and adult life to the brain of adult canaries: regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei. **Journal of Comparative Neurology**, n. 347, p. 233–248, 1994.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; NOTTEBOHM, F. Migration of young neurons in adult avian brain. **Nature**, n. 335, p. 353–354, 1988.

BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell tissue research**, n. 329, p.409-420, 2007.

BOSERET, G.; BALL, G.; BALTHAZART, J. The microtubule-associated protein doublecortin is broadly expressed in the telencephalon of adult canaries. **Journal Of Chemical Neuroanatomy** Science, n. 33, p.140-154, 2007.

BREZUN, J. M.; DASZUTA, A. Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. **Neuroscience**, n. 4, p. 999–1002, 1999.

CAI, Y.; XIONG, K.; CHU, Y.; LUO, D.; LUO, X.; YUAN, X.; STRUBLE, R.G.; CLOUGH, R.W.; SPENCER, D.D.; WILLIAMSON, A.; KORDOWER, J.H.; PATRYLO, P.R.; YAN, X. Doublecortin expression in adult cat and primate cerebral cortex relates to immature neurons that develop into GABAergic subgroups. **Experimental Neurology**, n. 216, p.342-356, 2009.

CAIN, M.E.; GREEN, T.A.; BARDO, M.T. Environmental enrichment decreases responding for visual novelty. **Behavioural Processes**, n. 73, p.360-366, 2006.

CAMERON, H.A.; WOOLLEY, C.S.; MCEWEN, B.S.; GOULD, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**, n. 56, p. 337–344, 1993.

CAPES-DAVIS, A.; TOLHURST, O.; DUNN, J.M.; JEFFREY, P.L. Expression of doublecortin (DCX) and doublecortin-like kinase (DCLK) within the developing chick brain. **Developmental Dynamics**. n. 232, p. 457–467, 2005.

CAYRE, M.; MALATERRE, J.; SCOTTO-LOMASSESE, S.; STRAMBI, C.; STRAMBI, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 132, p.1-15, 2002.

CHAERKADY, R.; KERR, C.L.; MARIMUTHU, A.; KELKAR, D.S. KASHYAP, M.K.; GUCEK, M.; GEARHART, J.D.; PANDEY, A. Temporal analysis of neural differentiation using quantitative proteomics. **Journal of Proteome Research**, n. 8, p. 1315–1326, 2009.

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

COLUCCI-D'AMATO, L.; di PORZIO U. Neurogenesis in adult CNS: from denial to opportunities and challenges for therapy. **BioEssays**, n. 30, p. 135–145, 2008.

COUILLARD-DESPRES, S.; WINNER, B.; SCHAUBECK, S.; AIGNER, R.; VROEMEN, M.; WEIDNER, N.; BOGDAHN, U.; WINKLER, J.; KUHN, H.G.; AIGNER, L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, n. 21, p. 1–14, 2005.

DUAN, X.; KANG, E.; LIU, C.Y.; MING, G.; SONG, H. Development of neural stem cell in the adult brain. **Current Opinion In Neurobiology**, n. 18, p.108-115, 2008.

ERICHSEN, J.T.; BINGMAN, V.P.; KREBS, J.R. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. **Journal of Comparative Neurology**, n. 314 p. 292–478, 1991.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, n. 4, p. 1313–1317, 1998.

FONT, E.; DESFILIS, E.; PEREZ-CANELLAS, M.M.; GARCIA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. **Brain Behavior Evolution**, n. 58, p. 276–295, 2001.

FRIOCOURT, G.; KOULAKOFF, A.; CHAFEY, P.; BOUCHER, D.; FAUCHEREAU, F.; CHELLY, J.; FRANCIS, F. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. **Cerebral Cortex**, n. 13, p. 620–626, 2003.

GAGE, F.H. M.T. Environmental Mammalian Neural Stem Cells. **Science** n. 187, p.1433-1438, 2000.

GARCÍA-VERDUGO, J.M.; FERRÓN, S.; FLAMES, N.; COLLADO, L.; DESFILIS, E.; FONT, E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 6, p.765-775, 2002.

GHEUSI, G.; ORTEGA-PEREZ, I.; MURRAY, K.; LLEDO, P. A niche for adult neurogenesis in social behavior. **Behavioural Brain Research**, p.1-8, 2009.

GOLDMAN, S. A.; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 80, p. 2390–2394, 1983.

GOULD, E.; GROSS C.G. Neurogenesis in Adult Mammals: Some Progress and Problems. **The Journal of Neuroscience**, n. 22, p. 619–623, 2002.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; MCEWEN, B.S.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 95, p. 3168–3171, 1998.

HANNAN, A. J.; HENKE, R.C.; SEETO, G.S.; CAPES-DAVIS, A.; DUNN, J.; JEFFREY, P.L. Expression of doublecortin correlates with neuronal migration and pattern formation in diverse regions of the developing chick brain. **Journal of Neuroscience Research**, n. 55, p. 650–657, 1999.

HORESH, D.; SAPIR, T.; FRANCIS, F.; WOLF, S.G.; CASPI, M.; ELBAUM, M.; CHELLY, J.; REINER, O. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. **Human Molecular Genetics**, n. 8, p. 1599–1610, 1999.

KAHN, M.C.; HOUGH, G.E.; TEN EYCK, G.R.; BINGMAN, V.P. Internal Connectivity of the Homing Pigeon (*Columba livia*) Hippocampal Formation: An Anterograde and Retrograde Tracer Study . **Journal of Comparative Neurology**, n. 459, p. 127–141, 2003.

KARTEN, H.J.; HODOS, W. Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (*Columba livia*). Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1967.

KASLIN, J.; GANZ, J.; BRAND, M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, n. 363, p. 101–122, 2008.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, n. 386 p. 493–495, 1997.

KIM, Y.; PEREGRINE, J.; ARNOLD, A.P. The distribution of expression of doublecortin (DCX) mRNA and protein in the zebra finch brain. **Brain Research**, n. 1106, p. 189 – 196, 2006.

KOMITOVA, M.; MATTSSON, B.; JOHANSSON, B.B.; ERIKSSON, P.S. Neurogenesis in the Subventricular Zone of Stroke-Lesioned Adult Rats Enriched Environment Increases Neural Stem/Progenitor Cell Proliferation and. **Stroke: Journal of the American heart association**, n. 36, p.1278-1282, 2005.

KORNACK, D.R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 96, p. 5768–5773, 1999.

KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H.; Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **The Journal Neuroscience**, n. 16, p. 2027–2033, 1996.

LINDSEY, B.W.; TROPEPE, V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. **Progress In Neurobiology**, n. 80, p.281-307, 2006.

LLORENS-MARTÍN, M.V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J.L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience** n. 147, p.631-638, 2007.

LOPEZ-GARCIA, C.; MOLOWNY, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M.; FERRER, I. Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. **Brain Research**. n. 471, p. 167—174, 1988.

LUZZATI, F.; BONFANTI, L.; FASOLO, A.; PERETTO, P. DCX and PSA-NCAM Expression Identifies a Population of Neurons Preferentially Distributed in Associative Areas of Different Pallial Derivatives and Vertebrate Species. **Cerebral Cortex**, n. 19, p. 1028—1041, 2009.

MALBERG, J.E.; EISCH, A. J.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, n. 26, p. 9104–9110, 2000.

MOMMA, S.; JOHANSSON, C.B.; FRISÉN, J. Get to know your stem cells. **Current Opinion In Neurobiology**, n. 10, p.45-49, 2000.

NACHER, J.; CRESPO, C.; MCEWEN, B.S. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. **European Journal of Neuroscience**. n. 14, p. 629–644, 2001.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J.. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews: Neuroscience**, n. 7, p.697-709, 2006.

NOTTEBOHM, F. A brain for all seasons: Cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. **Science**, n. 214, p.1368-1370, 1981.

PATZKE, N.; OCKLENBURG S.; VAN DER STAAY, F.J.; GÜNTÜRKÜN, O.; MANN, M.; Consequences of different housing conditions on brain morphology in laying hens. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, n. 37, p.141-148, 2009.

RAMIREZ-AMAYA, V.; MARRONE, D.F.; GAGE, F.H. WORLEY, P.F.; BARNES, C.A. Integration of new neurons into functional neural networks. **The Journal of Neuroscience**, n. 26, p.12237–12241, 2006.

REINER, A.D.; PERKEL, J.; BRUCE, L.; BUTLER, A.; CSILLAG, A.; KUENZEL, W.; MEDINA, L.; PAXINOS, G.; SHIMIZU, T.; STRIEDTER, G.; WILD, M.; BALL, G.F.; DURAND, S.; GÜTÜRKUN, O.; LEE, D.W.; MELLO, C.V.; WHITE, S.A.; HOUGH, G.; KUBIKOVA, L.; SMULDERS, T.V.; WADA, K.; DUGAS-FORD, J.; HUSBAND, S.; YAMAMOTO, K.; YU, J.; SIANG, C.; JARVIS, E.D. Revised Nomenclature for Avian Telencephalon and Some Related Brainstem Nuclei. **Journal Of Comparative Neurology**, v. 3, n. 473, p.377-414, 2004.

REINER, O.; COQUELLE, F.M.; PETER, B.; LEVY, T.; KAPLAN, A.; SAPIR, T.; ORR, I.; BARKAI, N. EICHELE, G.; BERGMANN, S. The evolving doublecortin (DCX) superfamily. **Bmc Genomics**, v. 7, n. 188, p.1-16, 2006.

ROSINHA, M.U.; FERRARI, E.A.M.; TOLEDO, C.A.B. Immunohistochemical distribution of AMPA-type label in the pigeon (*C. livia*) hippocampus. **Neuroscience**, n. 159 p. 438–450, 2009.

SADANANDA, M. Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: implications of the paradigm shift. **Current Science**, v. 87, n. 3, p.297-307, 2004.

SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends In Neurosciences**, v. 32, n. 4, p.233-239, 2009.

SEKI, T.; ARAI, Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. **The Journal Neuroscience**, n. 13, p. 2351–2358, 1993.

SULLIVAN, J. M.; BENTON, J.; SANDEMAN, D. C.; BELTZ, B. S.. Adult Neurogenesis: A Common Strategy Across Diverse Species. **Journal of Comparative neurology**, n. 500, p. 574-584, 2007.

SZEKELY, A.D. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. **Behavioural Brain Research**, n. 98 p. 219–225, 1999.

TEMPLE, S. The development of neural stem cells. **Nature**, n. 414, p. 112-117, 2001.

YOUNG, D.; LAWLOR, P.A.; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M.J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature Medicine**, n. 4, p. 448-453, 1999.