

Michele Vaz Pinheiro

**NEUROGÊNESE PÓS-NATAL E COMPORTAMENTOS
DEFENSIVOS EM POMBOS ADULTOS (*COLUMBA LIVIA*):
INFLUÊNCIA DA COMPLEXIDADE AMBIENTAL**

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito obrigatório para obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Cilene Lino de Oliveira.

Florianópolis
2015

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

Vaz Pinheiro, Michele

Neurogênese pós-natal e comportamentos defensivos em pombos adultos (*Columba livia*): influência da complexidade ambiental / Michele Vaz Pinheiro ; orientador, José Marino Neto ; coorientador, Cilene Lino de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2015.

104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Pombos. 3. Neurogênese em Adultos. 4. Comportamentos Defensivos. 5. Complexidade Ambiental. I. Marino Neto, José . II. Lino de Oliveira, Cilene . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

MICHELE VAZ PINHEIRO

**“NEUROGÊNESE PÓS-NATAL E COMPORTAMENTOS
DEFENSIVOS EM POMBOS ADULTOS (*Columba livia*):
INFLUÊNCIA DA COMPLEXIDADE AMBIENTAL”**

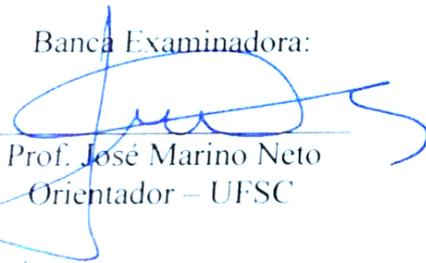
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 26 de junho de 2015.



Prof. Rodrigo Bairy Leal
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:



Prof. José Marino Neto
Orientador – UFSC



Prof. Ana Lucia S. Rodrigues
Membro - UFSC



Dra. Eloisa Pavesi
Membro - UFSC



Prof. Dra. Fernanda B. de Lima Christian
Membro - UFSC

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente, ao meu orientador Dr. José Marino Neto, pela disponibilidade, dedicação ao meu trabalho e principalmente por dar o exemplo, em ser sempre o primeiro a chegar ao laboratório e o último a sair, levarei esse ensinamento e tantos outros comigo para sempre.

À minha co-orientadora Dra. Cilene Lino Oliveira, obrigada por todo o apoio, tempo despendido a mim e ao meu trabalho e pelo “empurrão” na minha primeira imunoistoquímica.

Um agradecimento especial vai ao meu “segundo co-orientador” M.e. Fernando Melleu, por ter passado grande parte dos seus dias me explicando o funcionamento do sistema nervoso e as técnicas.

Aos professores, responsáveis pela minha formação, muito obrigada pelo incentivo à busca pelo conhecimento, pelas discussões e disponibilidade.

Ao pessoal do biotério central: Jô, Dudu, Junior, veterinária Ana Cristina e Emerson. É impressionante a dedicação ao trabalho de todos vocês e só tenho a agradecer todo respeito e ajuda.

Aos amigos e colegas todo meu carinho, meu mestrado foi muito mais feliz com vocês: Myla, Tiaguinho, Fernanda, Natália, Juliane, Wiliam (Mexicano), Gaby, Yukari, Marcela, Tati, Afrânio, Melleu, Camila e Edgar (hermanos), Marina, Amanda (secretária), Nivaldo (secretário), dona Vilma e “seu Carlos”.

À minha família, por me ensinar e não deixar esquecer, o verdadeiro sentido da vida. Ao meu marido Ângeluz por ser sempre meu “anjo de luz” me dando proteção, incentivo e muito amor.

À minha querida psicóloga e amiga Carla, você foi fundamental nesse momento de minha vida.

À CAPES, pelo apoio financeiro e por tornar possível esse trabalho.

Aos animais desse trabalho, toda minha gratidão, respeito e amor.

RESUMO

A neurogênese pós-natal (NPN) parece ser conservada filogeneticamente em todo reino animal. Em pombos e em outras aves adultas não-oscinas, neurônios imaturos podem ser vistos em diversas regiões prosencefálicas, o que sugere que a neurogênese pode participar do controle de diferentes comportamentos. Os mecanismos que controlam a neurogênese e sua relevância para os comportamentos defensivos em aves não-oscinas ainda não estão claros. Assim, a influência do ambiente sobre um indicador de neurogênese e indicadores de comportamentos defensivos foi investigada em pombos adultos. Pombos adultos (*Columba livia*, n=14/grupo) foram alojados em ambiente padrão de laboratório (AP) ou em ambiente enriquecido (AE) por 40 dias. Após esse período os pombos foram expostos ao teste de Hipofagia Induzida por Novidade (HIN) e foram realizadas gravações em vídeo, para posterior registro dos comportamentos pré-prandiais, prandiais, latência para primeira bicada além da quantidade de ração ingerida. Vinte e quatro horas depois do HIN, os pombos foram submetidos ao teste de imobilidade tônica (IT) quando foram registrados o número de tentativas e a duração da imobilidade. Os pombos foram perfundidos com PFA 4%. A seguir, os cérebros foram preparados para a detecção imunistoquímica da Doublecortina (DCX), uma proteína expressa em neurônios imaturos cujo número pode ser usado como índice de neurogênese no cérebro de aves. A influência do ambiente sobre o índice de NPN no Hyperpallium Apicale, Nidopallium Caudolaterale, Hipocampo, Estriado Medial e Estriado Lateral foi avaliada. O alojamento por 40 dias em ambiente enriquecido alterou os comportamentos defensivos pré-prandiais e prandiais e não alterou a latência para primeira bicada no HIN, também não verificamos alterações em respostas ao teste de IT. O ambiente enriquecido alterou a neurogênese prosencefálica na lâmina medial do hipocampo de maneira discreta, sem alterações nas demais áreas. Nossos resultados sugerem que os mecanismos envolvidos em respostas comportamentais são independentes dos mecanismos de alteração da neurogênese prosencefálica e que o contato visual entre os animais parece ser um elemento relevante para mudanças na neurogênese prosencefálica, causadas pelo aumento da complexidade ambiental. Os presentes dados, juntamente com os dados futuros e as descrições de alterações cerebrais induzidas pela complexidade ambiental nesta espécie, podem auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos à sua flexibilidade

comportamental e sua notável capacidade de prosperar em ambientes urbanos.

Palavras-chave: Aves, Complexidade ambiental, Neurogênese em adulto, comportamentos defensivos.

ABSTRACT

Post-natal neurogenesis (NPN) appears to be phylogenetically conserved across the animal kingdom. In pigeons and other adult non-oscine birds, immature neurons are observed in several prosencephalic areas, suggesting that neurogenesis may participate in the control of different behaviors. The mechanisms controlling neurogenesis and its relevance to defensive behaviors in non-oscine birds remain elusive. Herein, the contribution of the environment to adult pigeon neurogenesis and defensive behaviors indicators were investigated. Adult pigeons (*Columba livia*, n = 14/group) were housed in standard (SE) or enriched environment (EE) for 40 days. Following this period, pigeons were exposed to novelty induced hypophagia test (HIN) and video recordings were made for future record of pre-prandial and prandial behavior, latency to the first peck, and amount of ingested feed. Twenty-four hours later the HIN, pigeons were submitted to the tonic immobility test (TI) when number of trials and duration of immobility were recorded. Pigeons were euthanasia 2h after TI. Hereafter, brains were prepared for immunohistochemical detection of Doublecortin (DCX), a protein expressed by immature neurons whose number can be used as an index of neurogenesis in birds brain. The environmental influence over NPN index in the Hyperpallium Apicale, Nidopallium Caudolaterale, Hippocampus, Medial Striate and Lateral Striate was assessed. A 40 days housing period in the enriched environment changed pre-prandial and prandial defensive behaviors and did not changed latency to the first peck in HIN; changes in response to the IT test were not found. Enriched environment subtly changed prosencephalic neurogenesis at hippocampus medial blade, with no changes in other areas. Our outcomes suggest that mechanisms related to behavioral responses are independent of the mechanisms underlying the prosencephalic neurogenesis alterations and that the relevant aspect of the environmental enrichment, capable of provoking changes on adult pigeons prosencephalic neurogenesis, seem to be the visual contact between these animals. The present data, along with future descriptions of brain changes induced by environmental complexity in this specie, can provide valuable clues to the mechanisms underlying their conspicuous behavioral flexibility and triumph as urbanites.

Keywords: Avian, Environmental complexity, Adult Neurogenesis, Defensive behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Correspondente as imagens do alojamento padrão de laboratório...	33
Figura 2 – Correspondente as imagens dos viveiros do biotério central	34
Figura 3 – Sequência temporal utilizada para realização dos testes.....	35
Figura 4 - Representação do teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.....	36
Figura 5 – Representação do teste de Imobilidade Tônica.....	37
Figura 6 – Desenho esquemático de seção do cérebro de pombo	44
Figura 7 – Latência para primeira bicada AP vs AE no teste de Hipofagia induzida por Novidade.....	50
Figura 8 – Efeito dos diferentes ambientes sobre o comportamento de comer .	58
Figura 9 – Efeito dos diferentes ambientes sobre o comportamento de exploração visual no período prandial	59
Figura 10 – Efeito dos diferentes ambientes sobre o comportamento de exploração assoalho/grade no período prandial	60
Figura 11 – Efeito dos diferentes ambientes sobre o comportamento de locomoção no período prandial.....	61
Figura 12 - Efeito do ambiente sobre a Imobilidade Tônica	63
Figura 13 - Efeito das condições de alojamento no número de células DCX+ no hipocampo ventral	64
Figura 14 - Número de células DCX+ na lâmina lateral, Lâmina Medial e Núcleo Triangular do hipocampo ventral	65
Figura 15 – Número de células DCX+ no Hyperpallium Apicale nos grupos AE e AP	66
Figura 16 – Número de células DCX+ no Estriado Medial e Estriado Lateral nos grupos AE e AP	67
Figura 17 – Número de células DCX+ no Nidopallium Caudolaterale nos grupos AE e AP	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Catálogo comportamental utilizado nos registros do teste de Hipofagia Induzida pela Novidade	40
Tabela 2 – Teste da Hipofagia Induzida por Novidade,nos 60 segundos anteriores à primeira bicada.....	51
Tabela 3 – Teste da Hipofagia Induzida por Novidade,nos 300 segundos anteriores à primeira bicada.....	52
Tabela 4 – Teste da Hipofagia Induzida por Novidade, nos 600 segundos anteriores à primeira bicada.....	54
Tabela 5 – Teste de Hipofagia Induzida por Novidade, nos 600 segundos após a primeira bicada	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - Ambiente enriquecido do biotério central
AP – Ambiente padrão de laboratório
A - Arcopallium
Brdu- 5-bromo-2-desoxiuridina
CDL – Area corticoidea dorsolateralis
C-M – Teste de Cox-Mantel
DCX – Doublecortina
DCX+ - Doublecortina positiva
E - Entopallium
EPM – Erro padrão da média
FA – Teste de Friedman ANOVA
FH – Formação hipocampal
Gca - gaiola casa
Gexp – gaiola experimental
GFAP – Proteína Fibrilar Glial Ácida
GP – Globus pallidus
GW – Teste de Gehan's Wilcoxon
HA – Hiperpallium Apicalle
HIN- Teste de Hipofagia Induzida por Novidade
Hp - Hipocampo
IT – Imobilidade Tônica
ll – Lâmina lateral do hipocampo ventral
M – Mesopallium
M-W – Teste de Mann-Whitney
ml – Lâmina medial do hipocampo ventral
NeuN – *Neuronal nuclei*
N - Nidopallium
NCL- Nidopallium Caudolaterale
NPN – Neurogênese pós-natal
SVZ – Zona subventricular
SGR – Zona granular do hipocampo
WM – Teste de Wilcoxon Pareado
Tr – Núcleo Triangular do hipocampo ventral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	DIFERENTES COMPLEXIDADES AMBIENTAIS.....	19
1.2	NEUROGÊNESE PÓS-NATAL.....	20
1.3	OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS EM MAMÍFEROS E AVES.....	26
1.4	OBJETIVOS.....	29
1.4.1	Objetivos Específicos.....	30
2.	METODOLOGIA.....	31
2.1	O ANIMAL.....	31
2.2	AMBIENTES.....	32
2.2.1	Ambiente Padrão de laboratório (AP).....	32
2.2.2	Ambiente Enriquecido (AE) biotério central.....	33
2.3	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	35
2.3.1	Hipofagia induzida pela novidade:.....	35
2.3.2	Imobilidade Tônica.....	36
2.4	REGISTROS COMPORTAMENTAIS.....	37
2.4.1	Os Comportamentos.....	38
2.5	PERFUSÃO E EXPERIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS.....	42
2.6	QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DCX POSITIVOS NO PROSENCÉFALO DE POMBOS ADULTOS.....	43
2.7	ANÁLISE DE DADOS.....	44
3.	RESULTADOS.....	47
3.1	O TESTE DA HIPOFAGIA INDUZIDA POR NOVIDADE: UMA DESCRIÇÃO QUALITATIVA NOS ANIMAIS ALOJADOS INDIVIDUALMENTE E NA GAIOLA COMUNITÁRIA.....	47
3.2	A HIPOFAGIA PROVOCADA POR NOVIDADE: DESCRIÇÃO QUANTITATIVA NOS ANIMAIS ALOJADOS NO LABORATÓRIO E COMPARAÇÃO COM OS ANIMAIS ALOJADOS NA GAIOLA COMUNITÁRIA.....	49
3.2.1	O comportamento pré-prandial.....	49
3.2.2	O Comportamento prandial.....	55
3.3	EFEITOS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO SOBRE A IMOBILIDADE TÔNICA.....	62
3.4	EFEITOS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO SOBRE A EXPRESSÃO DA DOUBLECORTINA (DCX) NO PROSENCÉFALO DE POMBOS.....	63
3.4.1	Quantificação de células DCX + no hipocampo.....	63
3.4.2	Quantificação de células DCX + no Hyperpallium Apicale.....	66
3.4.3	Quantificação de células DCX + no Estriado Medial e Estriado Lateral.....	66
3.4.4	Quantificação de células DCX + no Nidopallium Caudolaterale.....	68
4.	DISCUSSÃO.....	71
5.	CONCLUSÃO.....	81

REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIFERENTES COMPLEXIDADES AMBIENTAIS

Diferentes estímulos sensoriais, físicos e sociais constituem diferentes complexidades ambientais. Quanto maior a complexidade de um ambiente, maior é a interação que ele proporciona. Portanto, a adição de múltiplos itens, físicos, sociais e sensoriais, ou ambos, aumenta a complexidade e cria um ambiente enriquecido (PRAAG *et al.*, 2000; SHUMWAY, 2008; ABOU-ISMAIL, 2010). Em geral, o ambiente enriquecido (AE) é o ambiente onde os animais são mantidos em gaiolas maiores que as gaiolas padrão de laboratório ou em seu habitat natural, ou ainda em grupos possibilitando uma maior interação social. Essas gaiolas com AE ainda podem conter brinquedos, túneis, materiais para a confecção de ninhos, escadas e outros estímulos físicos e/ou sociais e sensoriais. Os protocolos de enriquecimento ambiental variam quanto ao tempo de exposição, idade dos animais, área física e número de estímulos. O AE é modelado para que o animal tenha a oportunidade de realizar níveis de atividade voluntária maiores do que em um ambiente não enriquecido, propiciando um aumento nas atividades exploratórias e cognitivas, na interação social e no exercício físico (SALE *et al.*, 2009).

A complexidade ambiental tem um efeito importante sobre a arquitetura, neuroquímica e fisiologia do sistema nervoso central, bem como sobre a expressão de comportamentos complexos (SALE *et al.*, 2009; PRAAG *et al.*, 2000). Efeitos de diferentes complexidades ambientais, na plasticidade neuronal e influências sobre o comportamento defensivo de animais, foram vistos ao longo dos últimos anos (VAN PRAAG *et al.*, 2000). A primeira evidência de que o ambiente enriquecido poderia influenciar comportamentos, foi descrita por Hebb no final da década de 1940. Ele relatou, informalmente, que os ratos levados para sua casa e criados como animais de estimação tiveram melhor desempenho na resolução de problemas, durante testes, quando comparados aos ratos que permaneceram no laboratório (HEBB, 1947). A atenuação do impacto de novidades visuais pode ser observada em ratos expostos a novos estímulos luminosos e submetidos previamente ao ambiente enriquecido (CAIN *et al.*, 2006). A condição de alojamento em ambiente enriquecido demonstrou em diversas espécies, e principalmente em roedores, aumento na capacidade de aprendizado e de comportamentos exploratórios, redução da perda de memória pela idade e atenuação da ansiedade

(NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006). Desde então, foram relatadas influências de diferentes complexidades ambientais sobre a neurogênese, parâmetros bioquímicos, arborização dendrítica, peso total encefálico de animais e comportamentos (BENNETT *et al.*, 1969; BENNETT 1976; PACTEAU *et al.*, 1989; KEPERMAN *et al.*, 1997).

Índices morfológicos e bioquímicos parecem ficar alterados positivamente em animais expostos ao ambiente enriquecido. Ratos que permaneceram em AE por 12 semanas, apresentaram aumento nos níveis de fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e Neurotrofina-3 no córtex cerebral, na formação hipocampal e região anterior basal do cérebro, quando comparados a ratos alojados em ambiente padrão de laboratório pelo mesmo período de tempo (ICKES *et al.*, 2000). O ambiente enriquecido induziu um aumento da imunorreatividade para CREB, no hipocampo de camundongos, assim como melhoras na memória e aprendizado espacial durante o teste do labirinto aquático de Morris, quando comparados a camundongos do ambiente padrão (WILIAMS *et al.*, 2001).

A exposição à AE mostrou influenciar processos apoptóticos. Redução no número total de células TUNEL positivas (indicativo de redução da apoptose), na zona subgranular do hipocampo, foram vistas em ratos adultos expostos a ambientes enriquecidos, quando comparados ao grupo exposto ao ambiente padrão de laboratório (YOUNG *et al.*, 1999). Camundongos adolescentes, expostos cronicamente a tolueno (substância volátil que provoca prejuízo da neurogênese e aumento da morte neuronal) e submetidos a ambientes enriquecidos, mostraram significativa neurogênese e diminuição da morte neuronal no hipocampo, quando comparados a camundongos também expostos cronicamente a tolueno e submetidos ao ambiente padrão de laboratório (PAEZ-MARTINEZ *et al.*, 2013).

1.2 NEUROGÊNESE PÓS-NATAL

O ambiente físico e social no qual os animais vivem parece ter especial importância na regulação da neurogênese de animais adultos. Roedores adultos expostos a ambientes enriquecidos apresentam maior número de células novas no giro denteado do hipocampo, quando comparados aos animais controle alojados em ambientes padrões de laboratório (KEMPERMANN *et al.*, 1997; LLORENS-MARTÍN *et al.*, 2007). O AE também aumentou o número de células Brdu positivas (marcador de proliferação celular), no giro denteado de ratos adultos

corredores alojados em grupos, quando comparados ao grupo de corredores em isolamento, ou seja, com a mesma oportunidade de atividade física, porém em condições prévias de isolamento social (STRANAHAN *et al.*, 2006). Aves que capturam e escondem alimentos livres na natureza (AE) apresentam maior número de células novas no hipocampo, quando comparadas à mesma espécie, criadas em cativeiro, com oportunidades de experiências de captura e armazenamento de alimentos (LADAGE *et al.*, 2009). Também animais invertebrados parecem sofrer influência de ambientes enriquecidos. Lagostins criados em grandes cativeiros e em grupos, apresentam maior quantidade de células Brdu positivas encefálicas, quando comparados a lagostins criados em isolamento e em cativeiros menores (SANDERMAN e SANDERMAN, 2000).

O primeiro relato da ocorrência de NPN foi feito por Altman, na década de 60, no giro denteado do hipocampo de ratos adultos (ALTMAN, 1962). Nos anos seguintes, com o avanço tecnológico e o surgimento da microscopia eletrônica, muitos estudos foram publicados mostrando novos neurônios no hipocampo e bulbo olfatório de ratos adultos (KAPLAN e HINDS, 1977; PRAAG *et al.*, 1999). Em mamíferos, como os roedores, são conhecidas duas regiões que abrigam essas células proliferativas: a zona subventricular (SVZ) e a zona granular do hipocampo (SGR) (ALTMAN., 1962; GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 2002; KAPLAN e HINDS., 1977). Em humanos (pós-morte), sítios de proliferação na SVZ e no giro denteado do hipocampo também foram identificados (VESCOVI *et al.*, 2006).

A ocorrência NPN já foi observada em diversos estudos com animais vertebrados e invertebrados, sendo mais investigada em mamíferos (LINDSEY e TROPEPE, 2006). A NPN é um processo que envolve a divisão celular, migração e diferenciação de células progenitoras ou tronco-neurais (BOHLEN UND HALBACH, 2007; CHAERKADY *et al.*, 2009). As células progenitoras 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; KRIEGSTEIN E ALVAREZ – BUYLLA., 2009). Estas células progenitoras, independente de sua localização encefálica, apresentam como característica uma proliferação mais lenta e rara que os demais tecidos auto-regenerativos (MACAS *et al.*, 2006). De fato, essas células multipotentes podem gerar tanto neurônios quanto células gliais (AHMED, 2009; DUAN *et al.*, 2008). Os neurônios recém-formados passam por um processo de maturação, migrando então para sua posição

final no cérebro. As células formadas na SVZ, em mamíferos, migram através da via de migração rostral (*rostral migratory stream* ou RMS) até o bulbo olfatório onde são incorporadas (RAMIREZ-AMAYA *et al.*, 2006; IMAYOSHI *et al.*, 2008), já as células geradas na SGR do hipocampo têm sua posição final na camada granular do giro dentado (MALBERG *et al.*, 2000; GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 2002). Grande parte das células recém-nascidas no giro dentado adulto parecem se diferenciar em neurônios (CAMERON *et al.*, 1993).

Na década de 80 Nottebohm observou, pela primeira vez em aves, um aumento nos núcleos encefálicos relacionados ao canto, em canários machos adultos. Esses núcleos aumentavam em determinadas estações do ano, como no final de outubro início da primavera (época de acasalamento), e com a maturidade sexual, pelo aumento dos níveis de testosterona (NOTTEBOHM, 1989; NOTTEBOHM *et al.*, 1976). A descoberta da neurogênese em aves canoras auxiliou no acréscimo de credibilidade da existência de NPN, e assim, muitos novos neurônios foram vistos sendo gerados continuamente em todas as classes de vertebrados (NOTTEBOHM *et al.*, 1976). Nos diferentes grupos de vertebrados, foram vistas variações nas regiões que abrigam as células progenitoras, assim como o posicionamento final das células “nascidas”, esta forma de plasticidade cerebral parece específica de determinadas regiões cerebrais e estas regiões podem diferir entre os diferentes grupos de vertebrados (LINDSEY e TROPEPE, 2006; CAYRE *et al.*, 2002; ABROUS *et al.*, 2005).

Marcadores de proliferação celular como 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), ³H-timidina, Ki-67 e de novos neurônios como a Doublecortina (DCX) já foram utilizados em estudos da neurogênese (BROWN *et al.*, 2003; ALTMAN, 1962; ABROUS *et al.*, 2005). Algumas proteínas podem ser observadas em diferentes fases do processo neurogênico e servir de marcadores no estudo da formação de novos neurônios. Esses marcadores se correlacionam com as etapas de diferenciação, ao longo da via mitótica a partir de uma célula progenitora de forma específica, aparecem em um determinado curso de tempo e na fase pós-mitótica, assim permitem a investigação da neurogênese adulta (HALBACH, 2007; CHENG *et al.* 2009). Dentre estas proteínas, a DCX aparece na fase de diferenciação onde a célula já possui o fenótipo de neuroblasto. Ela é uma proteína associada aos microtúbulos que tem forte expressão em células pós-mitóticas em diferenciação e é crítica para a sua migração radial, controlando o processo de polimerização e estabilização do citoesqueleto, desempenhando um papel chave no posicionamento final dos neurônios

novos (BOSERET *et al.*, 2007; CAIA *et al.*, 2009; HALBACH, 2007). A DCX possui, em mamíferos, uma expressão persistente 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).

Nosso laboratório identificou recentemente os “hot-spots” neurogênicos e a localização de neurônios novos em diversos distritos prosencefálicos em pombos domésticos adultos (*Columba livia*), por meio de estudos imunistoquímicos para o Brdu, NeuN e DCX (MELLEU *et al.* 2013). Os experimentos imunistoquímicos com DCX mostraram uma distribuição de células e fibras imunorreativas à doublecortina, abundante em todo prosencéfalo de pombos com vias migratórias distintas a de mamíferos (MELLEU *et al.* 2013). Dupla-marcação da DCX com outros marcadores como NeuN e GFAP e administração de 5-bromo-2-desoxiuridina (Brdu), já foram realizadas para excluir a possibilidade da DCX em pombos ser expressa por neurônios maduros, ou astrócitos ou em outros tipos celulares. Resultados mostraram que nenhuma célula imunorreativa ao Brdu ou ao GFAP apresentou expressão de DCX (MELLEU *et al.* 2013). Da mesma maneira, não foi observada co-localização entre a DCX e um marcador de neurônios maduros (NeuN), o que sugeriu que de fato essas células presentes no encéfalo de pombos adultos, e que expressavam a proteína doublecortina, são neurônios novos (MELLEU *et al.* 2013).

Neste estudo, os animais foram alojados em dois ambientes distintos em laboratório. O primeiro grupo em ambiente enriquecido e um segundo grupo em ambiente sem enriquecimento, onde os animais estavam isolados visualmente dos demais (MELLEU *et al.*, 2015). Os resultados mostraram que os animais alojados em ambiente enriquecido em laboratório, apresentaram aumento no número de células DCX positivas no hipocampo e diminuição no estriado lateral quando comparados a animais alojados em ambiente padrão também em laboratório, e isolados visualmente (MELLEU *et al.*, 2015).

No entanto, Melleu *et al.*, 2013, relataram a presença de neurônios DCX positivos nas zonas proliferativas e também em regiões como Hyperpallium Apicale, Nidopallium, Estriado Medial e Estriado Lateral e Hipocampo, algumas dessas regiões ainda não investigadas. Ainda não estão claros quais são os fatores de enriquecimento capazes de provocar mudanças na neurogênese prosencefálica de pombos, quais são as características do não enriquecimento (isolamento social, isolamento visual ou adição de itens) que poderiam interferir nesse processo. Sendo assim, buscamos avaliar dois ambientes de complexidades diferentes e

extremas e seus efeitos sobre a neurogênese prosencefálica no hipocampo e nas demais regiões ainda não estudadas, e também, seus efeitos sobre os comportamentos defensivos desses animais, para uma melhor compreensão da regulação destes fenômenos.

A formação hipocampal (FH) de aves, assim como o de mamíferos, está relacionada funções de navegação, memória espacial e aprendizado (REINER *et al.*, 2005). Lesões hipocampais em *Parusatricapillus* (Passeriformes) acarretam perda severa da memória e capacidade de localização (HAMPTON e SHETTLEWORTH, 1996). Em pombos-correio, a formação hipocampal parece responsável pela memória e localização de pontos de referência no terreno, o que permite o retorno do animal ao local de criação (GAGLIARDO *et al.*, 1999). Também em pombos, verificou-se que o hipocampo está associado à memória aversiva condicionada (REIS *et al.*, 1999). A NPN hipocampal em aves foi observada em diversos grupos de passeriformes (PRAVOSUDOV, 2007; LAW *et al.*, 2010; ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 1994; TARR *et al.*, 2009), correlacionando-se com memória e procura de alimentos.

Em aves, de maneira similar a mamíferos, o estriado tem um papel relevante no processamento neural para aprendizagem adaptativa, tomada de decisão, motivação e comportamento, comparáveis ao caudado e putâmen de mamíferos, e com intensa marcação DCX (FEE e GOLDBERG, 2011; LUO *et al.*, 2001). O Nidopallium de aves parece estar envolvido com funções cognitivas superiores (área associativa), pois possui características anatômicas e neuroquímicas comparáveis ao córtex pré-frontal de mamíferos (KRONER e GUNTURKUN, 1999). O Hyperpallium Apicalle (wulst) apresenta características à área visual primária, em regiões mais caudais homólogas de mamíferos, e somatossensorial locomotora em regiões mais rostrais (BARON *et al.*, 2007; MEDINA e REINER, 2000). Ainda não está claro de que forma essas áreas atuam sobre os comportamentos defensivos não condicionados em aves. O estudo da regulação ambiental sobre a neurogênese em aves não passeriformes, bem como seu papel nas funções comportamentais defensivas, pode ter grande impacto nos fatores envolvidos da flexibilidade ambiental que estes animais apresentam em ambientes em constantes mudanças, como ambientes urbanos.

A geração contínua de novos neurônios no cérebro adulto parece vir acompanhada de células apoptóticas em áreas neurogênicas, contribuindo para o mecanismo de auto regulação cerebral (BIEBL *et al.*, 2000). Alterações em proteínas reguladoras do ciclo celular, essenciais

para produção de novos neurônios, e modificações em fatores de transcrição gênica, parecem interferir negativamente na proliferação de novos neurônios (MEHLER e GOKHAN 1999; ABROUS *et al.*, 2005).

Situações potencialmente estressoras parecem alterar a neurogênese hipocampal e relacionar-se com mudanças comportamentais em mamíferos. Aumento nos níveis de glicocorticóides no giro denteado do hipocampo de ratos, em situações potencialmente estressoras, mostrou inibir a neurogênese dessa região (GOULD e TANAPAT, 1999; LEHMANN *et al.*, 2013). O isolamento social parece exacerbar esses efeitos negativos do estresse e aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona, ele também interfere em mudanças comportamentais prejudicando, em longo prazo, o armazenamento de memórias sociais em camundongos (STRANAHAM *et al.*, 2006; GUSMÃO *et al.*, 2012).

No entanto, ambientes enriquecidos parecem produzir efeitos ansiolíticos e antidepressivos em diversos modelos animais, sugerindo um possível efeito “protetor” no desenvolvimento cerebral e formação de comportamentos (FOX *et al.*, 2006; BRENE *et al.*, 2009). Ratos expostos ao ambiente enriquecido apresentaram aumento no número de novos neurônios no giro denteado do hipocampo, em comparação aos ratos alojados em ambiente padrão de laboratório (KEMPERMANN *et al.*, 1997). Um efeito parecido mostrou que camundongos tratados cronicamente com antidepressivo, e com um aumento de células Brdu positivas, no giro denteado do hipocampo (SANTARELLI, *et al.*, 2003). Diferentes complexidades ambientais parecem ter influência na expressão de comportamentos em mamíferos. Animais alojados em ambiente enriquecido mostraram uma diminuição do tempo de imobilidade, durante o teste do nado forçado, que foi proporcionalmente menor ao aumento do número de células DCX positivas no hipocampo desses camundongos (LLORENS-MARTÍN *et al.*, 2007; SALE, *et al.*, 2009).

O efeito negativo do estresse sobre a neurogênese parece comum entre as espécies (BARNEA E PRAVOSUDOV, 2011). Aumento de níveis plasmáticos de corticosterona já foi observado em codornas japonesas, após uma hora de isolamento social (MILLS *et al.*, 1993). Em outra ave, tentilhões-zebra, submetidos a isolamento social, mostraram uma diminuição de neurogênese no hipocampo e nidopallium caudale, quando comparados aos animais colocados em grandes aviários ao ar livre (AE) (BARNEA *et al.*, 2006).

Aves apresentam NPN de forma exuberante. Esse fenômeno foi bem estudado em relação aos circuitos de canto em aves canoras

(Oscinos), e no armazenamento e localização de alimentos em aves que armazenam alimentos (BARNEA *et al.*, 2006; CLAYTON e KREBS, 1994). Estes animais muito provavelmente não são representativos para a Classe das Aves como um todo. A neurogênese em Oscinos está concentrada em áreas relevantes para o controle do canto, ou seja, um caráter taxa - específico presente apenas nessa família. É de consenso entre taxonomistas, que os Passeriformes em geral representam a ordem mais recente, derivada e apomórfica de Neornithes (aves modernas) (LIVEZEY e ZUSI, 2007). Assim, a investigação de caracteres regulatórios da NPN que sejam conservados filogeneticamente (e relevantes para a classe em particular ou para os vertebrados em geral) deve ser realizada em ordens menos derivadas de aves. Também em aves, ainda não está claro de que forma as diferentes complexidades ambientais, influenciam a neurogênese pós-natal e a expressão de comportamentos defensivos.

1.3 OS COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS EM MAMÍFEROS E AVES

Comportamentos defensivos são atitudes, frente a um potencial estressor desestabilizador da homeostase (HOMBERG, 2013). Testes comportamentais e análise de comportamentos defensivos são frequentemente realizados em mamíferos, como os roedores (HOMBERG, 2013). Em geral, os testes exigem percepção de um estímulo ambiental que pode ser gratificante ou aversivo (HOMBERG, 2013). Quando uma ameaça iminente é detectada, o animal realiza um processamento cognitivo de análise de risco e possíveis experiências prévias, o que pode gerar alterações comportamentais como aumento na vigilância, alerta, excitação, atenção, dentre outros (KLOET *et al.*, 2005; GROSS e CANTERAS, 2012). Em roedores, a exposição a situações inevitáveis de estresse como a inclusão de um intruso a gaiola, a separação materna ou o odor do predador, resulta em uma diminuição da neurogênese que é acompanhada por alterações comportamentais (NEWTON e DUMAN, 2004). O alojamento em ambiente enriquecido, por um curto período de tempo, proporciona mudanças positivas nos efeitos do estresse sobre os comportamentos de roedores e provoca mudanças plásticas prosencefálicas (MITRA e SAPOLSKY, 2012).

Aves apresentam padrões de comportamentos defensivos aparentemente semelhantes aos de mamíferos quando expostas a predadores ou novidades visuais, ambientes desconhecidos ou separadas de seu grupo familiar (JONES e ROPER, 1997; JONES, 1986;

HAZARD *et al.*, 2008). Em nosso laboratório, observamos que pombos separados de seus co-específicos e expostos a um ambiente não-familiar apresentam intensos movimentos balísticos de cabeça (Peeping) que, com o tempo, se tornam movimentos angulares cada vez menos amplos até atingir a imobilidade (SOUZA *et al.*, 2009). Também em nosso laboratório, observamos que pombos expostos ao ambiente enriquecido e com aumento no número de células DCX positivas hipocampais, não apresentaram alterações significantes na frequência e duração de comportamentos durante um teste de exposição a um ambiente desconhecido e apresentação de um objeto novo. Já, em outro teste, a imobilidade tônica, os mesmos animais alojados em ambiente enriquecido apresentaram aumentos significantes no tempo de permanência em imobilidade (MELLEU *et al.*, 2015). Assim, as relações entre a complexidade ambiental e as respostas comportamentais ao estresse em pombos precisam ser melhor esclarecidas.

A inibição da alimentação produzida pela novidade tem sido utilizada em diversos modelos animais, como ferramenta de avaliação de mecanismos neurobiológicos de respostas ao estresse agudo (DULAWA e HEN, 2005; BARFIELD *et al.*, 2013). Os primeiros relatos ocorreram na década de 80, quando a latência para comer foi observada em ratos expostos a um campo aberto, com acesso a comida localizada no centro do campo. Este teste auxiliou a observação dos efeitos de diferentes fármacos ansiogênicos (BRITTON e BRITTON, 1981). O teste de hipofagia induzida por novidade (HIN) introduz um conflito entre o medo imposto pelo ambiente desconhecido, e um fator motivacional de resolução do conflito, uma comida palatável (STENDENFELD *et al.*, 2011). De modo geral, os animais são privados de alimento antes do teste ou adaptados previamente a comidas palatáveis (DULAWA e HEN, 2005). Quando camundongos são expostos a um ambiente desconhecido, a latência de aproximação ao alimento é significativamente mais prolongada e a ingestão de alimento palatável diminuída (MERALI, *et al.*, 2003). Roedores tratados com ansiolíticos demonstraram diminuição na latência para comer e aumento na ingestão, quando expostos a um ambiente novo (DULAWA e HEN, 2005).

O HIN também é utilizado como um teste de ansiedade de fácil reprodução em aves (KELLY *et al.*, 2011; BIONDI *et al.*, 2010). Em nosso laboratório, dados em andamento, mostram que pombos adultos (machos e fêmeas) expostos ao HIN apresentam um aumento da latência para primeira bicada na primeira exposição, quando comparada a exposições subsequentes. A latência parece diminuir progressivamente

nas demais exposições ao teste, e assim, parece sofrer uma habituação (dados informados pessoalmente). Porém, apesar do teste ser facilmente reproduzido em aves, ainda há poucos relatos da reprodução do teste de HIN em aves e especialmente em pombos.

Também em aves, observamos um comportamento defensivo particularmente extremo, presente em diversos vertebrados que é a imobilidade tônica (IT). A IT é uma resposta defensiva inata caracterizada por um estado reversível de profunda inibição comportamental, acompanhada de alterações cardiovasculares, hormonais e de temperatura corporal (GALLUP e RAGER, 1996; VIEIRA *et al.*, 2011). Esse comportamento parece fazer parte do repertório defensivo em resposta a uma ameaça inescapável e pode ser observados em muitas espécies de vertebrados e invertebrados, incluindo insetos, crustáceos, peixes, aves e mamíferos (GALLUP e RAGER, 1996).

A imobilidade ou inibição comportamental defensiva inclui a imobilidade (ou “freezing”), observada em roedores como resposta inicial a estímulo (predador) distante, detectado pela presa antes que a mesma tenha sido detectada. Ratos (*Rattus norvegicus*) expostos ao gato (*Felis catus*) aumentam o freezing (CANTERAS e GOTO, 1999; BLANCHARD *et al.*, 1977). Ao contrário do freezing, onde o tônus muscular é mantido, a IT ocorre com a perda gradual do tônus muscular, que pode culminar com a total perda do mesmo (KLEMM, 1990). O registro mais antigo desse comportamento data de 1646 por Kircher (GILMAN *et al.*, 1960) e desde então têm sido observado em diferentes ambientes naturais. Este comportamento aumentaria as chances de sobrevivência de um animal quando o encontro com o predador fosse inescapável, muitos predadores tendem a perder o interesse em presas imóveis e sem tônus muscular (FRANCQ, 1969; MISSLIN, 2003). Aves apresentam imobilidade tônica. Por exemplo, galinhas (*Gallus gallus*) contidas manualmente apresentam episódios de IT de até uma hora de duração (HICKS, 1976). Dados do nosso laboratório mostraram que pombos adultos submetidos à contenção manual também apresentam IT (MELLEU *et al.* 2013). Portanto, a IT é mais um teste comportamental defensivo que pode ser utilizado em aves e que pode auxiliara análise dos efeitos ambientais sobre os comportamentos defensivos.

As aves também apresentam expressiva NPN, de forma mais ampla em quantidade, com variações das vias migratórias e posicionamento final dos neurônios (BARNEA E PRAVOSUDOV, 2011; GARCÍA-VERDUGO *et al.*, 2002; BOSERET, *et al.*, 2007, MELLEU *et al.*, 2013). Além disso, aves parecem ser especialmente

sensíveis à regulação da neurogênese pelo ambiente, com modificações na quantidade de células formadas, em resposta às tarefas impostas pelo ambiente (ex: procurar e esconder alimentos e navegação) e a sazonalidade (SANDANANDA, 2004).

Portanto, aves parecem um bom modelo para investigar as relações entre diferentes complexidades ambientais e a neurogênese adulta. Os pombos podem ser bons modelos para esse tipo de estudo, uma vez que não sofreram tanta ação de seleção artificial (em direção a engorda ou oviposição) quanto Galiformes, e nem são tão especializados quanto Oscinos. Pombos são animais comuns de laboratório e habitantes urbanos numerosos, eles parecem habituar-se bem aos mais variados e numerosos estímulos estressores urbanos. Pombos prosperam em cidades, que são ambientes complexos em constante mudança e potencialmente estressores. A habilidade de aves prosperarem em ambientes urbanos parece ter relação com o tamanho do cérebro desses animais. Estudos mostram que espécies com cérebros grandes apresentam maior sobrevivência do que espécies de cérebro pequeno quando introduzidos em locais não nativos, esses animais tendem a ser mais bem sucedidos em sua aclimação a um novo ambiente (SOL, *et al.*, 2005; MARINO, L. 2005)

Porém, os mecanismos relacionados ao controle de comportamentos defensivos, não-condicionados em aves em geral, e também em pombos, são pouco conhecidos. Ainda não há evidências de como a complexidade ambiental pode afetar a neurogênese prosencefálica e modificar comportamentos defensivos em aves. Assim, a investigação da influência das diferentes condições ambientais sobre o número de células imunorreativas à DCX no hipocampo e demais áreas onde estas células ocorrem, e suas possíveis associações com os comportamentos defensivos nos pombos, pode contribuir para um melhor entendimento dos processos de controle da NPN em vertebrados não mamíferos.

1.4 OBJETIVOS

Este trabalho orientou-se pela hipótese de que uma maior complexidade ambiental (enriquecimento físico e social) aumenta a neurogênese prosencefálica e diminui as respostas comportamentais ao estresse agudo em pombos adultos, alojados em ambientes de alta complexidade.

O objetivo deste trabalho foi examinar a neurogênese pós-natal no prosencéfalo de pombos (*Columba livia*) adultos e a influência deste processo pelo ambiente.

1.4.1 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, este estudo avaliou os efeitos do enriquecimento ambiental:

- a) Na neurogênese pós-natal nas seguintes áreas: Hyperpallium Apicale, Nidopallium Caudolaterale, Hipocampo, Estriado Medial e Estriado Lateral, utilizando como marcador a doublecortina.
- b) Nos comportamentos defensivos (respostas desencadeadas pelo teste de hipofagia induzida pela novidade e imobilidade tônica).

2. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais 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. Neste trabalho foram utilizados 28 pombos *Columba livia* adultos (10-12 meses de idade), de ambos os sexos. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e tiveram como peso médio $448,33 \pm 10,9g$. Estes animais foram alojados em dois ambientes distintos: Ambiente padrão de laboratório no Laboratório de Neurofisiologia Comparada do Departamento de Ciências Fisiológicas-CCB (AP) e Ambiente enriquecido em viveiros do biotério central (AE) (ver descrição adiante). Os experimentos foram realizados em duas etapas, a primeira nos meses de setembro a outubro de 2013 (n=16, AP=8 e AE=8) e a segunda nos meses de março a abril de 2014 (n= 12, AP=6 e AE=6). No AP foram alojados seis fêmeas e sete machos, no AE foram alojados sete fêmeas e sete machos. Um animal do grupo AP morreu durante o período de aclimação (causa da morte desconhecida) anteriormente aos testes e seu sexo não foi verificado. O sexo de todos os demais animais foi determinado, após a perfusão, através da inspeção das gônadas.

2.1 O ANIMAL

Pombos são aves selvagens, domesticados, que aparecem junto ao homem desde relatos muito antigos. Já foram cruciais comunicadores em guerras, ajudaram a apoiar a teoria da evolução de Charles Darwin, já foram adorados como deusas da fertilidade, e hoje, no entanto, são muitas vezes apontados como os “ratos de asas”. Esses animais são assim chamados por estarem espalhados em grande quantidade e por todo o mundo, eles podem ser vistos em lugares bastante divergentes, entre outros fatores, em temperatura, alimentação disponível e ambiente. É impressionante a capacidade de aclimatização desses animais em lugares tão diferentes. Sua alimentação, em geral, é constituída principalmente de sementes e frutas, mas alguns animais de ambientes urbanos e em lugares frios alimentam-se de sementes e outros alimentos com maior teor de gordura. Pombos parecem ser muito tolerantes a presença humana com quem, muitas vezes, compartilham suas casas (PATENT E MUÑOZ, 1997; BLECHMAN, 2006).

O macho corteja a fêmea e uma vez o casal formado eles seguem juntos por toda a vida. Em geral, fazem ninhos frágeis e procuram lugares como rochas. (PATENT E MUÑOZ, 1997; BLECHMAN, 2006).

Seu maior predador são aves de rapina como falcão. Pombos apresentam uma grande flexibilidade comportamental, capazes de prosperar e reproduzir em ambientes urbanos hostis, assim como, em zoológicos ao ar livre na África e lugares frios como norte da Europa (PATENT E MUÑOZ, 1997; BLECHMAN, 2006).

2.2 AMBIENTES

2.2.1 Ambiente Padrão de laboratório (AP)

Os animais mantidos em AP (n=13) foram alojados no biotério setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada (temperatura entre 22-25°C e ciclo claro-escuro de 12:12 horas-luzes ligadas às 7:00h) em gaiolas individuais (50cm x 50cm x 50cm) com contato visual entre seus vizinhos (Figura 1). As gaiolas tinham um poleiro, assoalho forrado com jornal, água filtrada, areia com farinha de casca de ostra e alimento granulado para aves (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda., Itajaí, SC) *ad libitum*. Três vezes por semana as gaiolas foram limpas, e os forros de jornal trocados. Também três vezes por semana os bebedouros e comedouros foram lavados e repostos com água e ração. Os animais foram aclimatizados ao laboratório setorial por 40 dias, e durante este tempo também foram expostos, uma vez por semana, a uma ração palatável que consistia em uma mistura de sementes de aveia (*Avena sativa*), painço branco (*Panicum millaceum*) e sementes de girassol (*Helianthus annuus*), esta mistura de sementes já demonstrou ser bastante apreciada por estes animais em experimentos anteriores em nosso laboratório (SPUDEIT *et al*, 2013). A ração palatável foi disponibilizada a todos os animais individualmente (120g) através de um comedouro feito de garrafa plástica (500ml) com um orifício em seu terço médio, que era levado pelo cuidador e colocado ao lado da ração comum durante a manutenção da gaiola, a ração comum também era disponibilizada em um pote plástico similar. A água foi oferecida em bebedouros plásticos padrão para aves.



Figura 1 – Alojamento Padrão de Laboratório. A) condições de alojamento padrão, visão individual B) condições de alojamento padrão de laboratório, visão interna do biotério.

2.2.2 Ambiente Enriquecido (AE) biotério central

Os animais mantidos no grupo AE (n=14) foram alojados nos viveiros de criação do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes animais permaneceram desde seu nascimento até o final dos experimentos nos viveiros do biotério central. O biotério central dispõe de três viveiros (4m x 2m x 2m) de alvenaria cobertos e com uma das faces fechadas por uma grade dando visão para a área externa ao biotério. Em cada um desses viveiros existia um grande número de poleiros e podiam alojar até 25 pombos, de ambos os sexos, e em idade adulta. A área dos viveiros permitia pequenos vôos e interações sociais entre os animais (Figura 2). O ciclo claro/escuro e temperatura não foram regulados artificialmente estando disposto às condições naturais do ambiente externo. Segundo dados fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão rural de Santa Catarina (EPAGRI), na primeira fase do experimento (n=8), que aconteceu nos meses de setembro e outubro de 2013, a temperatura média ficou em 20,15°C (Tmin°C= 16,2; Tmx°C 24,11) e o total de chuvas foi 307,6mm. Na segunda fase dos experimentos (n=6), realizada nos meses de março e abril de 2014, a temperatura média foi de 23,97°C (Tmin°C= 19,86; Tmx°C= 28,08) e o total de chuvas foi 221,3mm. Nas duas fases experimentais o céu permaneceu com bastante nebulosidade, com registro de apenas um dia claro em ambas as fases.

Aos animais foram fornecidos água e alimento granulado para aves (formulação para aves em crescimento, da SUPRA Ltda., Itajaí, SC) *ad libitum*. Três vezes por semana os viveiros foram limpos e era realizada a reposição da água e ração oferecida aos animais, a ração palatável, assim como nos animais alojados em ambiente padrão de laboratório, foi disponibilizada uma vez por semana a todos os animais do mesmo viveiro através de um recipiente em forma de cumbuca feito de barro contendo 500g da ração, a ração palatável era disponibilizada junto a ração comum no chão ao centro do viveiro. Todos os procedimentos de manutenção e cuidado dos animais foram de responsabilidade dos funcionários do biotério central, sendo que os pombos desse experimento eram tratados sempre pelo mesmo cuidador.



Figura 2 – Viveiros do Biotério Central. A) Visão anterior dos viveiros. B) visão lateral dos viveiros. C) visão anterior interna dos viveiros. D) visão interna do viveiro.

2.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

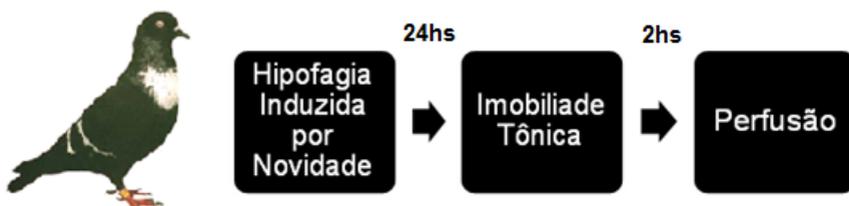


Figura 3 – Sequência temporal utilizada para realização dos testes.

2.3.1 Hipofagia induzida pela novidade:

Após 40 dias de ambientação os animais do AP (n=13) e os animais do AE (n=14), foram individualmente retirados da gaiola-casa (Gca) pelo experimentador, que usava luvas de látex, e transportados até uma sala de experimentos iluminada artificialmente por luz branca. A sala de experimentos no biotério central era uma sala anexa aos viveiros a qual era utilizada para guardar os materiais de uso rotineiro. A mesma gaiola experimental era transportada até esta sala no dia do teste. Os animais não estavam em jejum e o teste era realizado sempre no mesmo horário nos dois ambientes. O animal era posicionado dentro da gaiola experimental (Gexp), que consistia em uma gaiola de 70 cmx 70cm x 40cm com assoalho de PVC branco e teto coberto com vidro. O animal era então posicionado pelo experimentador no canto inferior direito da arena, a entrada da gaiola era cuidadosamente fechada, o experimentador retirava-se da sala e a porta da mesma era cuidadosamente encostada. No quadrante oposto ao animal era colocado um recipiente contendo 50 a 80g de ração palatável, pesado previamente e ao final do teste juntamente com a ração restante no recipiente e os grãos que eventualmente caíam do comedouro durante o teste (Figura 4). No período de realização do teste não havia água disponível ao animal. O animal foi filmado com uma câmera posicionada superiormente ao centro da gaiola. Foram observados os comportamentos antecedentes a primeira bicada (com tempo máximo de duração de 60 minutos) e os comportamentos após a primeira bicada com duração de 10 minutos. O volume de ração palatável ingerida foi registrado como volume ingerido/100 g de peso corporal. Também foi registrada a latência para primeira bicada em segundos. Ao final de cada

teste a arena era limpa com álcool 70% e toalhas de papel, preparando a arena para um novo teste com o animal seguinte.

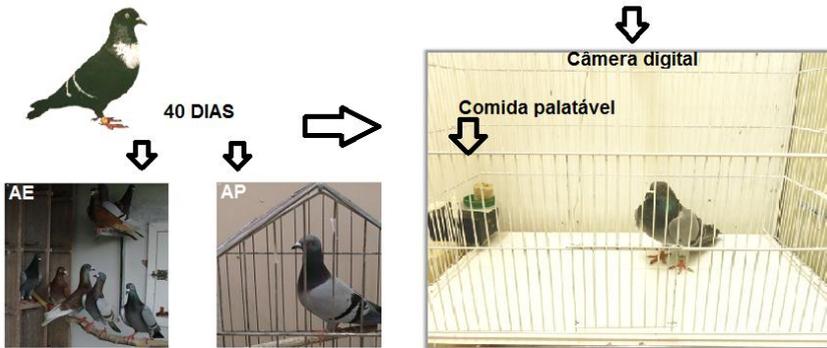


Figura 4 - Teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.

2.3.2 Imobilidade Tônica

Após 40 dias de alojamento nos diferentes ambientes e 24 horas depois do teste de Hipofagia Induzida pela Novidade, os animais do AP (n=13) e os animais do AE (n=14), foram retirados individualmente de sua Gca, pelo experimentador, que utilizava luvas de látex, e levados a uma sala iluminada artificialmente por luz branca, no biotério central novamente utilizamos a sala anexa aos viveiros, e a mesma arena teste era transportada até o biotério central nos dias de experimento. O animal era posicionado em decúbito dorsal sobre um suporte em formato de quilha, localizado em uma arena cilíndrica (80cm de altura por 30cm de diâmetro). Em decúbito dorsal os animais eram contidos manualmente, sendo suas asas imobilizadas levemente e sua cabeça coberta pelas mãos do experimentador, esta contenção durava aproximadamente 30 segundos e após esse período os animais eram lentamente liberados. O tempo de imobilidade de cada animal foi quantificado quanto a sua duração em segundos e número de contenções necessárias para desencadear a resposta. Testes prévios de imobilidade tônica foram realizados em todos os animais como critério de inclusão ao experimento, apenas os animais que respondiam ao teste de imobilidade tônica que permaneceram por 5 minutos foram selecionados.

O tempo máximo de duração da imobilidade permitido durante o teste foi de 30 minutos. Cada animal era submetido ao máximo de três contenções (tentativas) para obter a imobilidade tônica. Os animais que

não apresentavam imobilidade após essas três tentativas eram considerados refratários ao teste, nenhum animal foi refratário ao teste. Ao final de cada teste, a arena era limpa com álcool 70% e toalhas de papel, preparando a arena para um novo teste com o animal seguinte.

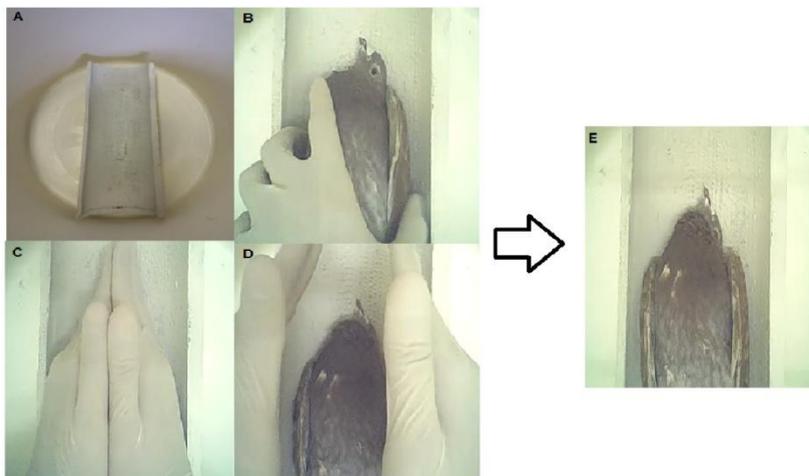


Figura 5 – Teste de Imobilidade Tônica. A) Arena com suporte em quilha ao centro. B) Posicionamento do animal, em decúbito dorsal, no suporte em quilha. C) Contenção manual do animal. D) Liberação lenta das mãos. E) Animal em imobilidade tônica.

2.4 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Os registros em vídeo captados durante o teste de Hipofagia Induzida pela novidade e Imobilidade Tônica foram feitos por uma câmera digital conectada a um microcomputador, sendo os registros de vídeo armazenados em discos ópticos. Os vídeos captados durante os experimentos foram posteriormente avaliados através de um software produzido em nosso laboratório (Ethowatcher®, CRISPIM *et al.*, 2011) que permite o exame quadro a quadro do arquivo de vídeo e a inserção dos códigos relativos aos comportamentos, oferecendo um relatório (em arquivo texto) final da sequência comportamental completa e da latência para primeira bicada. Também, este software, oferece ao final frequência e duração (totais e segmentadas por unidade de tempo) de cada categoria.

A descrição dos comportamentos (Ver tabela 1) desencadeados pelo teste de Hipofagia Induzida pela novidade no período pré-prandial e prandial foram segmentados de 1 minuto ao longo de todo o período de registro, visando aumentar a resolução temporal da descrição dos eventos.

2.4.1 Os Comportamentos

O catálogo comportamental utilizado neste estudo para o teste de Hipofagia Induzida por Novidade foi adaptado do catálogo de SOUZA *et al.*, 2009. Análises qualitativas prévias de testes pilotos nos possibilitaram a inclusão de categorias comportamentais, visando uma análise mais detalhada dos comportamentos pré e prandiais.

Com relação aos comportamentos apresentados pelos animais quando posicionados na Gexp podemos descrever:

a) Comportamentos Exploratórios

Exploração Visual (“peeping”): O animal está de olhos abertos, com uma ou duas patas fixas ao assoalho, apresenta movimentos balísticos lineares da cabeça (sem tocar objetos com o bico).

Exploração Angular: O animal, de olhos abertos, com uma ou duas patas fixas do assoalho, apresenta rotações da cabeça no eixo latero lateral ou rostro caudal, sem nenhuma alteração da angulação do pescoço (sem tocar em objetos com o bico).

Exploração do Assoalho/ Grade: O animal apresenta-se com a cabeça voltada para a superfície a ser explorada, tocando o bico no assoalho ou nas grades, podendo estar com uma ou duas patas fixas ao chão, ou retirando uma por vez do contato com o chão.

b) Comportamentos de locomoção

Locomoção: O animal retira uma pata por vez do contato com o assoalho da gaiola ou pode pular do assoalho para o poleiro (com ou sem auxílio do movimento de bater asas).

Imobilidade Alerta: O animal fica com uma ou duas patas fixas ao assoalho, com a postura totalmente ereta, com os olhos totalmente abertos ou piscando rapidamente e sem executar qualquer movimento com a cabeça.

c) Comportamento ingestivo

Comer: O animal introduz o bico no recipiente de ração ou direciona ao chão, podendo apenas bicar a ração, comer ou segurar com a ajuda do bico e deglutir.

d) Comportamentos de manutenção

Auto-limpeza: O animal toca as próprias penas com o bico ou patas, fazendo movimentos repetitivos de puxar, separar, coçar ou bicar as penas.

Defecar: É notada a presença de fezes no assoalho da arena.

Arrepiar penas: O animal altera a configuração normal das penas em relação à pele, deixando-as longe do contato com o corpo, eriçando-as. Através desse comportamento, o corpo do animal adquire um aspecto mais volumoso.

Espreguiçar: O animal abre as asas, mantendo-as dessa forma para depois retorná-las junto ao corpo.

Bater asas: O animal, com as patas fixas ao assoalho, realiza a extensão das asas e em seguida movimentos para cima e para baixo das mesmas, bate as asas.

Sono: Com os olhos piscando lentamente ou totalmente fechados, o animal fica com o corpo e cabeça imóveis uma ou duas patas fixas ao assoalho, ou pode retrair as patas a ponto de o corpo tocar o assoalho. Pode ou não apresentar retração do pescoço com o bico orientado ao ou tocando o peito; pode estar acompanhado do eriçamento das penas peitorais.

e) Comportamentos Defensivos:

Imobilidade tônica: O animal fica completamente deitado e imóvel, permanecendo na postura e no local onde foi posicionado no momento da sua introdução no ambiente de registro. Pode apresentar movimentos angulares lentos e discretos com a cabeça.

Pular: O animal retira as duas patas do assoalho da arena, batendo as asas intensamente.

Os comportamentos estão resumidos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Catálogo comportamental utilizado nos registros do teste de Hipofagia Induzida pela Novidade.

Comportamentos	Abreviaturas	Descrição
AUTO-LIMPEZA	AL	O animal toca as próprias penas com o bico ou patas, fazendo movimentos repetitivos de puxar, separar, coçar ou bicar as penas. Considerar o evento com duração e frequência.
ARREPIAR AS PENAS	AP	O animal altera a configuração normal das penas em relação à pele, deixando-as longe do contato com o corpo, eriçando-as. Através desse comportamento, o corpo do animal adquire um aspecto mais volumoso. Considerar o evento em duração e frequência.
BATER DE ASAS	BA	O animal, com as patas fixas ao assoalho, realiza a extensão das asas e em seguida movimentos para cima e para baixo das mesmas, bate as asas. Considerar o evento em duração e frequência.
COMER	C	O animal introduz o bico no recipiente de ração ou direciona ao chão, podendo apenas bicar a ração, comer ou segurar com a ajuda do bico e deglutir. Considerar o evento com duração e frequência.
COMPORTAMENTO INESPECÍFICO 1, 2, 3	CII, CI2, CI3	Itens sem definição, incluídos no catálogo do Ethowatcher para permitir o registro e a contagem de eventos inesperados (ocorrências como ruídos no ambiente, vocalizações, comportamentos que não figuram no catálogo ou variantes dos comportamentos que já estão no catálogo).
DEFECAR	D	É notada a presença de fezes no assoalho da arena. Considerar apenas frequência.
ESPREGUIÇAR	ES	O animal abre as asas, mantendo-as dessa forma para depois retorná-las junto ao corpo. Considerar o evento com duração e frequência.
EXPLORAÇÃO DE ASSOALHO/GRADE	XA	O animal apresenta-se com a cabeça voltada para a superfície a ser explorada, tocando o bico no assoalho ou nas grades, podendo estar com uma ou duas patas fixas ao chão,

		ou retirando uma por vez do contato com o chão. Considerar o evento com duração e frequência.
EXPLORAÇÃO VISUAL (“peeping”)	XP	O animal está de olhos abertos, com uma ou duas patas fixas ao assoalho, apresenta movimentos balísticos lineares da cabeça (sem tocar objetos com o bico). Considerar o evento com duração e frequência.
EXPLORAÇÃO VISUAL ANGULAR	XV	O animal, de olhos abertos, com uma ou duas patas fixas do assoalho, apresenta rotações da cabeça no eixo latero lateral ou rostro caudal, sem nenhuma alteração da angulação do pescoço (sem tocar em objetos com o bico). Considerar o evento com duração e frequência.
IMOBILIDADE ALERTA	IA	O animal fica com uma ou duas patas fixas ao assoalho, com a postura totalmente ereta, com os olhos totalmente abertos ou piscando rapidamente e sem executar qualquer movimento com a cabeça. Considerar o evento com duração superior à 3 segundos e frequência
IMOBILIDADE TÔNICA	IT	O animal fica completamente deitado e imóvel, permanecendo na postura e no local onde foi posicionado no momento da sua introdução no ambiente de registro. Pode apresentar movimentos angulares lentos e discretos com a cabeça.
LOCOMOÇÃO	LC	O animal retira uma pata por vez do contato com o assoalho da gaiola ou pode pular do assoalho para o poleiro (com ou sem auxílio do movimento de bater asas). Considerar o evento com duração e frequência.
PULAR	PU	O animal retira as duas patas do assoalho da arena, batendo as asas intensamente. Considerar o evento com duração e frequência.
SONO	SO	Com os olhos piscando lentamente ou totalmente fechados, o animal fica com o corpo e cabeça imóveis uma ou duas patas fixas ao assoalho, ou pode retrain as patas a ponto de o corpo tocar o assoalho. Pode ou não apresentar retração do pescoço com o

		bico orientado ao ou tocando o peito; pode estar acompanhado do eriçamento das penas peitorais.
--	--	---

2.5 PERFUSÃO E EXPERIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Duas horas após o teste de Imobilidade Tônica, era realizada a perfusão dos animais, o processo de perfusão de todas as aves foi realizado no laboratório de Neurofisiologia Comparada. As aves alojadas no biotério central foram transportadas em caixa transporte apropriada, cedida pelo biotério central, logo após o teste de imobilidade tônica. Os pombos foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (0,05 mg /100g de peso corporal) e Cetamina (0,15 mg /100g de peso corporal) intraperitoneal e perfundidos transcordialmente com 300ml de solução de sacarose (9,25% a 37°C, contendo heparina), seguida 300ml de solução de paraformaldeído (4% em Tampão Fosfato pH 7,4). Os encéfalos foram dissecados da caixa craniana, blocados, pós-fixados em paraformaldeído (4 % em Tampão Fosfato, a 4 °C) por 24 h e transferidos para uma solução de PBS 0,01M pH 7,2 por pelo menos 12 horas. Os blocos foram cortados em vibrátomo (Vibratome 1150 Sectioning System), no plano frontal com uma espessura de 50µm e coletados em PBS 0,01M, pH 7,2 em 5 compartimentos seriados, estes compartimentos contendo seções foram armazenados a -24°C em solução anti congelante (PB 0,02M 18,23%, H₂O destilada 21,87%, propilenoglicol 34,9%, 25% sacarose).

Na imunoistoquímica para DCX os cortes foram lavados em PBS 0,1M + Triton 0,15% (3 x 5 min) em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 0,3% por 30 minutos, seguido de lavagem em PBS 0,1M + Triton a 15% (3 x 5 min). Após esse processo as seções foram incubadas por 60 min em solução de PBST + soroalbumina bovina 1% (BSA, Sigma Chemical, St. Louis). Então, os cortes foram incubados com o anticorpo primário a uma diluição de 1:1000 por 24h a 4°C. No dia seguinte os cortes foram lavados em PBS 0,01M + Triton 15% (3x 5 min) e então incubados com o anticorpo secundário 1:500 (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs.) por 90min. Após este período, os cortes foram lavados em PBS 0,1M + Triton 15% (3 x 5 min.) e incubados com ABC 1:125 (PBST. + avidina + peroxidase biotilada) por 2 h, seguidos por lavagens em PBS 0,1M + Triton 15% (3 x 5 min). Após esse processo as seções foram incubadas TBS 0,1M pH 7,4 + DAB 20 mg + 3 µl H₂O₂

30% por 10 min e então lavadas com TBS 0,25M pH 7,4 por 3 vezes de 5 minutos cada. Finalmente, os cortes foram lavados com água destilada, montados sobre lâminas gelatinizadas com alúmen de cromo, desidratadas (secas ao ar livre por 48 horas), diafanizados (com uma série etanol-xilólica ascendente), cobertos com lamínula com DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO). As secções foram então levadas a um microscópio (Olympus BH2) acoplado a uma câmera digital (PixeLink® PL-B623) para identificação dos corpos celulares e fibras imunorreativas positivas à DCX, e realização da documentação fotográfica do material.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DCX POSITIVOS NO PROSENCÉFALO DE POMBOS ADULTOS

As regiões cerebrais (Figura 6) foram identificadas e nomeadas de acordo com o atlas estereotáxico do cérebro do pombo (KARTEN e HODOS, 1967) e da revisão de nomenclatura do cérebro de ave (REINER *et al.*, 2004). Os subnúcleos do hipocampo foram nomeados e delimitados por Atoji e Wild (2007, 2005, Figura 6 B). Foram contadas células DCX+em 3 cortes não adjacentes do hipocampo (níveis estereotáxicos A.5.00 a A.7.00) na regiões da Camada lateral (ll), Camada medial (ml) e Núcleo triangular (Tr) (Figura 6, B). No estriado medial e lateral foram contados 3 cortes não adjacentes (níveis estereotáxicos A.7.50 a A.9.50) (Figura 6, A), no Hiperpallium Apicalle foram contados 3 cortes não adjacentes (níveis estereotáxicos A.7.50 a A.8.50) (Figura 6 A) e no Nidopallium Caudolaterale foram contados 2 cortes não adjacentes (níveis estereotáxicos A. 5.00 a A.6.75), (Figura 6 B).

Várias imagens digitais foram realizadas em cada uma dessas secções nas regiões de interesse, usando um campo de uma área conhecida, em um aumento de 100x. Utilizando o programa Image J, a área anatômica a ser quantificada foi incluída em um polígono e as células dentro dessa área eram contadas, assim como, a área do polígono calculada. Então, para cada foto foi obtido um valor de células DCX+/mm². Dois tipos celulares foram quantificados, células bipolares e multipolares. Apenas as células que apresentavam citoplasma e processos corados pela reação foram contadas (Figura 6 A e B).

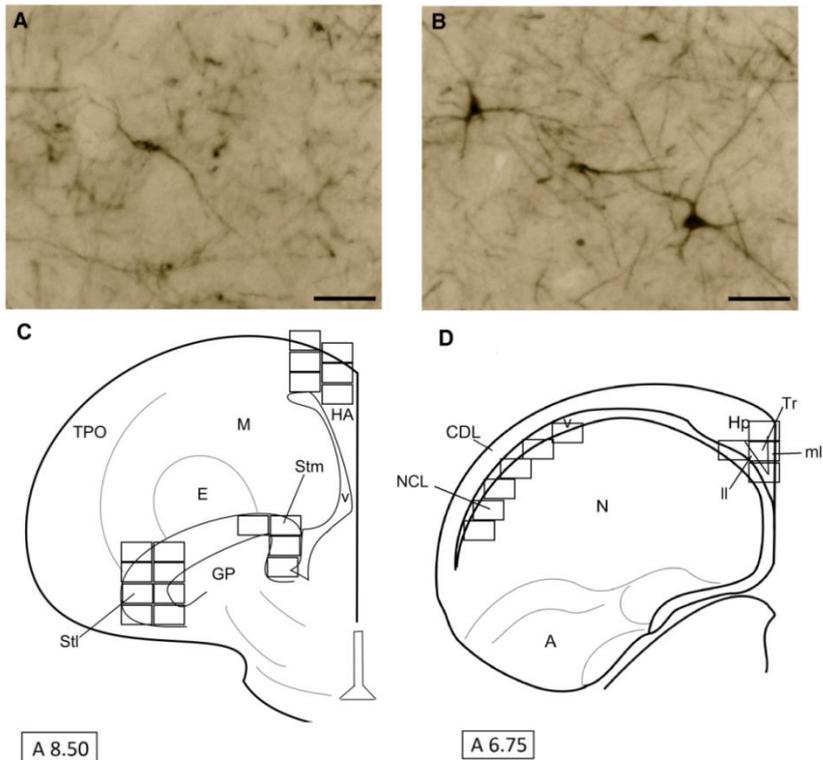


Figura 6 – Desenho esquemático de seção do cérebro de pombo. A) exemplo de célula bipolar DCX+ (barra de escala 50µm), (MELLEU *et al.*, 2015). B) exemplo de célula multipolar DCX+ (barra de escala 50µm), (MELLEU *et al.*, 2015). C) Mostrando Hiperpallium Apicale (HA), Estriado medial (Stm) e Estriado Lateral (Stl) (nível estereotático A.8.50, KARTEN e HODOS, 1967). D) hipocampo (Hp) e subdivisões (Lâmina lateral (ll), Lâmina medial (ml) e núcleo triangular (Tr) e Nidopallium Caudolaterale (NCL) (nível estereotático A. 6.75, KARTEN e HODOS, 1967). Os campos quadrados sobrepostos representam as fotomicrografias utilizadas para contagem de células (C e D).

2.7 ANÁLISE DE DADOS

Todos os dados foram analisados quanto a sua normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnoff, e homocedasticidade, estabelecida pelo teste estatístico de Levene. Os resultados destes testes foram utilizados na seleção dos testes estatísticos a serem utilizados na comparação entre os grupos experimentais.

Os dados comportamentais pré e prandiais do teste de Hipofagia Induzida por Novidade foram analisados utilizando teste não-paramétrico de Mann-Whitney (AP versus AE) e estão representados graficamente na forma de média±erro padrão da média. A latência para comer durante este mesmo teste foi analisada, através do teste não paramétrico de Mann-Whitney (AP versus AE) e também através da análise de sobrevivência. O tempo de imobilidade tônica foi analisado através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney (AP versus AE) e também por análise de sobrevivência.

As quantidades de células DCX+ observadas em animais alojados em ambientes de laboratório (AP) ou no ambientes do biotério central (AE) foram comparadas utilizando o Teste-t de Student (AP versus AE). O nível de significância adotado nesses procedimentos foi $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software “Statistica 8.0” (Statsoft).

3. RESULTADOS

3.1 O TESTE DA HIPOFAGIA INDUZIDA POR NOVIDADE: UMA DESCRIÇÃO QUALITATIVA NOS ANIMAIS ALOJADOS INDIVIDUALMENTE E NA GAIOLA COMUNITÁRIA

Os animais do ambiente padrão de laboratório foram transportados até o Laboratório de Neurofisiologia Comparada, em caixa transporte, e imediatamente posicionados em gaiolas individuais.

Logo após serem alojados em suas Gca, os animais alojados em AP, permaneceram, na presença do cuidador, com as duas patas fixas no chão e os olhos abertos sem realizar movimentos de locomoção. Eles ficaram a maior parte do tempo imóveis e realizaram rotações lentas da cabeça no eixo látero-lateral e rostro-caudal (exploração visual angular) sem alterações angulares do pescoço. Por vezes, bateram asas ou pularam para longe do cuidador mostrando comportamentos de fuga. Com o passar dos dias, de forma progressiva e lenta, os movimentos exploratórios e a locomoção apareceram durante a presença do cuidador no biotério, no período de manutenção do mesmo.

Os comportamentos de fuga perante a aproximação do cuidador foram observados com menos frequência, ao passar dos dias. Um aumento progressivo dos comportamentos exploratórios da mão do cuidador e sobre o alimento que o mesmo oferecia, começou a ser observado ao longo dos dias. Alguns animais começaram a comer antes mesmo do adequado posicionamento do pote de comida na gaiola, isto é, antes que o cuidador largasse o pote de sua mão. Este tipo de comportamento era muito mais intenso quando a comida palatável era oferecida.

Na primeira exposição à comida palatável, os animais comportaram-se da mesma forma que quando oferecida a ração comum, ou seja, movimentos exploratórios com a cabeça e pescoço e aproximação lenta (exploração visual angular, exploração visual ou “peeping” e locomoção). Nas exposições seguintes, apenas a visualização do pote de ração palatável em aproximação a gaiola, já provocaram um aumento dos comportamentos exploratórios, locomoção e aproximação rápida à mão do cuidador, que segurava o pote. Os animais, em geral, iniciaram a ingestão da ração palatável antes mesmo do posicionamento final do pote de ração, com a gaiola ainda em manutenção, e permaneceram comendo somente no pote da comida palatável por todo tempo em que o cuidador estava no biotério, período de manutenção. Apresentaram uma ingestão contínua sem interrupções e

não apresentaram locomoção ou comportamentos exploratórios concomitante com a ingestão da ração palatável.

Os animais alojados em AP, quando posicionados na gaiola experimental, inicialmente permaneceram imóveis realizando movimentos rotacionais lentos com a cabeça, seguidas de movimentos balísticos do pescoço de forma lenta e progressiva (exploração visual angular e peeping). O tempo de imobilidade, ao serem posicionados na Gexp, era variável entre os animais. Em geral, os animais do AP iniciaram uma lenta locomoção em direção a comida palatável, disponibilizada no canto direito da Gexp, mais precocemente que os animais AE.

Uma vez iniciada, essa locomoção era acompanhada de freqüentes paradas associadas a comportamentos exploratórios da cabeça e pescoço. A aproximação da comida palatável ocorria de forma lenta, e o animal freqüentemente aproximava-se em uma locomoção lateral, ou seja, com a cabeça e o bico orientados para frente na Gexp e não em direção a comida. Após estar próximo ao recipiente contendo a comida palatável o animal locomovia-se ao redor do recipiente e em seguida realizava uma locomoção horizontal de um lado para o outro da gaiola, de forma mais rápida e associada a movimentos exploratórios de cabeça e pescoço. Após a primeira bicada, os animais não ingeriam o alimento da mesma forma como na Gca, a ingestão era acompanhada de interrupções constantes com movimentos exploratórios de cabeça e pescoço e locomoções rápidas em pequenas distâncias. Foi observada diminuição destas interrupções com o aumento da permanência na Gexp, porém elas não desapareceram por completo até o final do experimento, ou seja, 10 minutos após a primeira bicada.

O comportamento de defecar raramente era observado no período após a primeira bicada do teste. Os comportamentos de manutenção como auto-limpeza -onde o animal toca as próprias penas com o bico ou patas, fazendo movimentos de puxar, separar, coçar ou bicar as penas- foram observados com maior freqüência em momentos finais do teste. Os demais comportamentos como sono, espreguiçar e arrepiar penas foram vistos raramente. Comportamentos de fuga, como pular e bater asas apresentaram-se em menor freqüência nos animais AP quando comparado aos animais alojados em AE.

Os animais alojados em AE quando expostos a Gexp, inicialmente ficaram totalmente imóveis com os olhos bem abertos sem movimentos exploratórios, eles pareciam permanecer por mais tempo neste comportamento do que os animais do biotério setorial, aos poucos, suaves movimentos rotacionais com a cabeça eram realizados e

iniciavam os movimentos exploratórios. Movimentos exploratórios com angulação do pescoço (peeping) demoraram mais a aparecer e foram realizados de forma mais lenta que nos animais AP, eles eram muitas vezes associados com movimentos de exploração visual angular, e foram observadas alternâncias entre movimentos rotacionais da cabeça e balísticos do pescoço.

Locomoção, de um modo geral, foi um comportamento que apareceu mais tardiamente e era realizada de forma muito similar ao grupo do biotério padrão, ou seja, aproximação lenta, locomoção horizontal de um lado para o outro da gaiola e ao redor do comedouro com velocidade progressivamente aumentada ao longo do tempo, arriscando maiores distâncias ao final do teste.

Freqüentemente os animais AE, pularam sobre a comida, se locomoveram sobre a mesma e não a bicaram ou ingeriram, ou ainda, aparentemente demoraram mais em fazê-lo quando comparados aos animais AP. Pareciam utilizar o comedouro como um poleiro e apresentaram uma maior freqüência de comportamentos de fuga como pular e bater asas. Os demais comportamentos também foram observados de forma esporádica.

Após a primeira bicada, a freqüência e duração de movimentos exploratórios durante a ingestão pareciam muito aumentadas em comparação aos animais AP, assim também aconteceu com a locomoção que parecia mais intensa. Os comportamentos de manutenção como auto-limpeza apareceram com menos freqüência. Os comportamentos de fuga continuaram após a primeira bicada, e em alguns animais pareciam aumentar ao longo do teste.

3.2 A HIPOFAGIA PROVOCADA POR NOVIDADE: DESCRIÇÃO QUANTITATIVA NOS ANIMAIS ALOJADOS NO LABORATÓRIO E COMPARAÇÃO COM OS ANIMAIS ALOJADOS NA GAIOLA COMUNITÁRIA

3.2.1 O comportamento pré-prandial

No momento dos testes, os animais AP (n= 13) apresentaram peso= $448,33 \pm 10,98$ g, desses animais seis eram fêmeas (peso= $428,7 \pm 19,66$ g) e sete animais eram machos (peso= $465,11 \pm 8,37$ g). No grupo alojado em AE (n=14), o peso médio foi $452,63 \pm 10,16$ g, sendo que sete animais eram fêmeas (peso= $451,50 \pm 13,50$ g) e outros sete animais eram machos (peso = $453,77 \pm 16,28$ g). Os animais de ambos os grupos apresentaram pesos corporais estatisticamente similares.

A latência para primeira bicada no teste de hipofagia induzida por novidade não demonstrou diferença significativa entre os grupos AP e AE (teste de Mann-Whitney (M-W) $p=0,11$) e também através dos testes de sobrevivência, (teste de Gehan's Wilcoxon (GW) $p= 0,89$; teste de Cox-Mantel (C-M) $U=0,846$ $p= 0,70$), (Figura 7). Estas variáveis têm distribuições diferentes da Gaussiana (ou normal), e algumas não têm homocedasticidade. Logo, usamos testes não paramétricos para estudá-las.

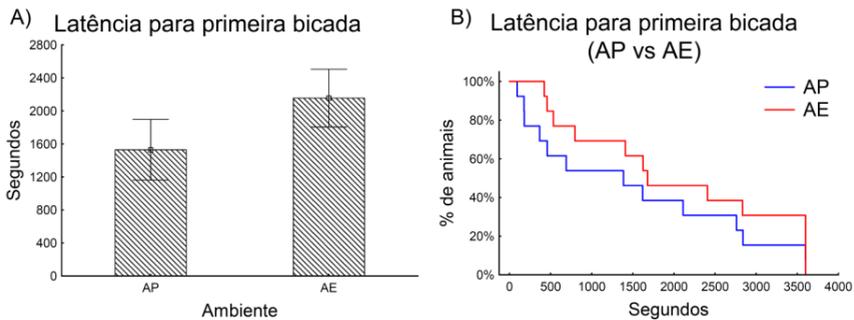


Figura 7 – Latência para primeira bicada AP vs AE no teste de Hipofagia induzida por Novidade. A) Latência em segundos para a primeira bicada (média \pm EPM), teste de Mann-Whitney. B) Porcentagem de animais que permanecem no teste de Hipofagia Induzida por Novidade, ao longo do tempo, até a primeira bicada AP vs AE, teste de Gehan's Wilcoxon e teste de Cox-Mantel. AP (ambiente padrão, N= 12 vs AE (Ambiente enriquecido, N= 13).

O repertório comportamental apresentado pelos animais, durante o teste de Hipofagia Induzida por Novidade foi consistente com o catálogo utilizado para análise comportamental, catálogo adaptado de SOUZA *et al.*, 2009.

Na análise dos comportamentos pré-prandiais, prandiais e na latência para primeira bicada, dois animais foram excluídos. Um animal pertencente ao grupo AP foi excluído por ser um animal “outlier”, ou seja, seus dados de frequência e duração de comportamentos exploratórios eram maiores ou menores que a média, respectivamente, mais duas vezes o desvio padrão. Este animal quando posicionado na Gexp, permaneceu imóvel por 22 minutos, realizou um breve locomoção e permaneceu imóvel novamente até o final do experimento (tempo máximo de 60 minutos). Outro animal do grupo AP morreu durante o período de aclimação. Portanto, os testes de comportamentos pré-prandiais foram realizados com $n=12$ no grupo AP.

Um segundo animal pertencente ao grupo AE, ao ser posicionado na Gexp, permaneceu imóvel durante 30 minutos. Seus dados de frequência e duração de comportamentos exploratórios também foram maiores que a média \pm , respectivamente mais duas vezes o desvio padrão, e este animal foi excluído do teste, por ser um animal outlier. Portanto, o grupo AE foi analisado com $n=13$.

Foram realizadas comparações estatísticas (M-W), entre as durações e frequências totais de cada comportamento entre os grupos AP e AE, no primeiro minuto antes da primeira bicada, nos cinco últimos minutos antes da primeira bicada e nos dez últimos minutos antes da primeira bicada. Os comportamentos analisados no primeiro minuto antes da primeira bicada estão listados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 – Teste da Hipofagia Induzida por Novidade, nos **60 segundos anteriores à primeira bicada**. Número de animais (N), médias \pm EPM de duração e frequência dos comportamentos observados no teste. seg= segundos. AP= ambiente padrão de laboratório (N=12), AE= ambiente enriquecido (N=13), Ex.=exploração, ns= não significante, p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p<0,05$.

Comportamentos	AP	AE	P
Auto limpeza			
Duração (s)	1,64 \pm 1,16	0,27 \pm 0,27	ns
Frequência	0,25 \pm 0,17	0,15 \pm 0,15	ns
Arrepiar Penas			
Duração (s)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	ns
Frequência	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	ns
Bater Asas			
Duração (s)	0,00 \pm 0,00	1,58 \pm 1,58	ns
Frequência	0,00 \pm 0,00	0,15 \pm 0,15	ns
Espreguiçar			
Duração (s)	0,00 \pm 0,00	0,37 \pm 0,37	ns
Frequência	0,00 \pm 0,00	0,07 \pm 0,07	ns
Exploração de Assoalho/grade			
Duração (s)	3,67 \pm 1,67	0,84 \pm 0,84	ns
Frequência	0,66 \pm 0,30	0,15 \pm 0,15	ns
Exploração Visual (peeping)			
Duração (s)	29,99 \pm 4,22	26,13 \pm 5,82	ns
Frequência	3,00 \pm 0,36	2,30 \pm 0,47	ns

Exploração Visual				
Angular				
Duração (s)	1,81 ± 1,81	7,40 ± 4,44		ns
Frequência	0,16 ± 0,16	0,61 ± 0,31		ns
Imobilidade Alerta				
Duração (s)	0,76 ± 0,76	0,57 ± 0,57		ns
Frequência	0,08 ± 0,08	0,07 ± 0,07		ns
Locomoção				
Duração(s)	11,80 ± 2,64	5,86 ± 2,34		teste M-W,
Frequência	2,33 ± 0,28	1,69 ± 0,53		p=0,038
				ns
Pular				
Duração(s)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		ns
Frequência	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		ns

No primeiro minuto antes da primeira bicada, a duração de locomoção no grupo AP foi significativamente maior que quando comparado a duração de locomoção do grupo AE (M-W p=0,038), a frequência deste mesmo comportamento não demonstrou diferença significativa entre os grupos. Nenhuma diferença estatística foi encontrada na duração e frequência de outros comportamentos, nos 60 segundos antes da primeira bicada, que são eles: auto-limpeza, arrepiar penas, bater asas, espreguiçar, exploração assoalho/grade, exploração visual, exploração visual angular, imobilidade alerta e pular.

As durações e frequências de cada comportamento foram comparadas entre os grupos AP e AE, nos cinco últimos minutos antes da primeira bicada e estão listados na tabela 3 abaixo:

Tabela 3 – Teste da Hipofagia Induzida por Novidade, nos 300 segundos anteriores à primeira bicada. Número de animais (N), médias ± EPM de duração e frequência dos comportamentos observados no teste. seg= segundos. AP= ambiente padrão de laboratório (N=12), AE= ambiente enriquecido (N=13), Ex.=exploração, ns= não significativa, p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05.

Comportamentos	AP	AE	P
Auto limpeza			
Duração (s)	18,59 ± 7,29	3,31 ± 1,57	ns
Frequência	3,33 ± 1,35	1,30 ± 0,63	ns
Arrepiar Penas			
Duração (s)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns
Frequência	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	ns

Bater Asas			
Duração (s)	1,08 ± 0,72	5,80 ± 3,91	ns
Frequência	0,33 ± 0,23	1,15 ± 0,47	ns
Espreguiçar			
Duração (s)	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,37	ns
Frequência	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,07	ns
Exploração de Assoalho/grade			
Duração (s)	9,00 ± 3,73	1,53 ± 1,53	teste M-W, p=0,02
Frequência	2,11 ± 0,77	0,38 ± 0,38	teste M-W, p=0,008
Exploração Visual (peeping)			
Duração (s)	204,23 ± 15,46	192,70 ± 21,44	ns
Frequência	18,11 ± 2,03	13,30 ± 1,80	ns
Exploração Visual Angular			
Duração (s)	15,91 ± 14,03	38,88 ± 20,33	ns
Frequência	1,22 ± 0,75	2,84 ± 0,99	ns
Imobilidade Alerta			
Duração (s)	2,36 ± 2,36	6,30 ± 4,17	ns
Frequência	0,22 ± 0,22	0,76 ± 0,42	ns
Locomoção			
Duração(s)	40,76 ± 13,09	32,08 ± 11,65	ns
Frequência	9,44 ± 1,95	6,30 ± 1,98	ns
Pular			
Duração(s)	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,28	ns
Frequência	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,16	ns

Nos últimos 300 segundos antes da primeira bicada, a duração do comportamento de exploração do assoalho/grade (M-W p= 0,02) e a frequência de exploração do assoalho grade (M-W p=0,008) no grupo AP foi significativamente maior que quando comparado a duração e frequência do mesmo comportamento no grupo AE, os animais alojados em AE praticamente não realizaram exploração do assoalho grade quando comparados ao grupo AP. Nenhuma diferença estatística foi encontrada na duração e frequência de outros comportamentos, nos últimos cinco minutos antes da primeira bicada, que são eles: autolimpeza, arrepiar penas, bater asas, espreguiçar, locomoção, exploração visual, exploração visual angular, imobilidade alerta e pular.

As durações e frequências de cada comportamento também foram comparadas entre os grupos AP e AE, nos últimos dez minutos antes da primeira bicada e estão listados na tabela 4 abaixo:

Tabela 4 – Teste da Hipofagia Induzida por Novidade, **nos 600 segundos anteriores à primeira bicada**. Número de animais (N), médias \pm EPM de duração e frequência dos comportamentos observados no teste. seg= segundos. AP= ambiente padrão de laboratório (N=12), AE= ambiente enriquecido (N=13), Ex.=exploração, ns= não significante, p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Comportamentos	AP	AE	P
Auto limpeza			
Duração (s)	22,72 \pm 9,59	5,94 \pm 2,35	ns
Frequência	3,42 \pm 0,92	1,70 \pm 0,61	ns
Arrepiar Penas			
Duração (s)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	ns
Frequência	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	ns
Bater Asas			
Duração (s)	1,79 \pm 1,22	8,06 \pm 4,98	ns
Frequência	0,57 \pm 0,42	1,00 \pm 0,59	ns
Espreguiçar			
Duração (s)	0,00 \pm 0,00	0,37 \pm 0,37	ns
Frequência	0,00 \pm 0,00	0,07 \pm 0,07	ns
Exploração de Assoalho/grade			
Duração (s)	10,01 \pm 3,97	3,07 \pm 2,82	ns
Frequência	2,14 \pm 0,82	0,80 \pm 0,69	ns
Exploração Visual (peeping)			
Duração (s)	362,19 \pm 59,04	437,25 \pm 34,19	ns
Frequência	22,00 \pm 3,86	22,90 \pm 2,37	ns
Exploração Visual Angular			
Duração (s)	40,66 \pm 20,85	49,99 \pm 30,77	ns
Frequência	3,14 \pm 1,24	4,40 \pm 1,45	ns
Imobilidade Alerta			
Duração (s)	77,63 \pm 47,43	7,43 \pm 5,48	ns
Frequência	2,00 \pm 1,15	0,90 \pm 0,52	ns
Locomoção			
Duração(s)	72,96 \pm 38,70	61,79 \pm 21,74	ns
Frequência	13,85 \pm 4,97	12,50 \pm 3,09	ns

Pular	0,00 ± 0,00	2,04 ± 1,93	ns
Duração(s)	0,00 ± 0,00	0,90 ± 0,79	ns
Frequência			

Nos últimos 600 segundo antes da primeira bicada, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos AP e AE, nos comportamentos apresentados durante o teste de Hipofagia Induzida por Novidade.

Em resumo, não foram observadas diferenças significantes na latência para primeira bicada entre os grupos. No período pré-prandial, observamos diferenças estatisticamente significantes de comportamentos, entre os grupos, a partir dos 300 segundos antes da primeira bicada. Os animais do grupo AP apresentaram duração do comportamento de locomoção significativamente maior que os animais do grupo AE no último minuto antes da primeira bicada, ou seja, eles permaneceram por mais tempo locomovendo-se neste período. Esses mesmos animais exploraram o assoalho/grade da Gexp por mais tempo e com maior frequência, nos últimos 300 segundos antes da primeira bicada, quando comparados ao grupo AE que praticamente não apresentavam este comportamento.

3.2.2 O Comportamento prandial

Na análise dos comportamentos prandiais, os animais “outliers” descritos anteriormente também foram excluídos, assim, o grupo AP n=12 e o grupo AE n=13. Destes animais, no grupo AP os 12 animais bicaram a comida durante o teste HIN e no grupo AE 8 animais. Foram realizadas comparações estatísticas, entre as durações e frequências totais de cada comportamento entre os grupos AP e AE. Os comportamentos analisados estão listados na tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Teste de Hipofagia Induzida por Novidade, **nos 600 segundos após a primeira bicada**. Número de animais (N), médias \pm EPM de duração e frequência dos comportamentos observados no teste. seg= segundos. AP= ambiente padrão de laboratório (N=12), AE= ambiente enriquecido (N=8), Ex.=exploração, ns= não significante, p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Comportamentos	AP	AE	P
Comer Duração Frequência	270,98 \pm 37,72 24,33 \pm 1,97	68,84 \pm 38,49 10,75 \pm 4,84	teste M-W, p=0,007 teste M-W, p= 0,04
Ex. Visual (peeping) Duração Frequência	145,35 \pm 16,39 34,25 \pm 3,29	359,03 \pm 42,53 29,00 \pm 2,71	teste M-W, p=0,0004 ns
Locomoção Duração Frequência	111,71 \pm 27,08 22,25 \pm 3,91	124,54 \pm 30,22 21,75 \pm 4,06	ns ns
Imobilidade Alerta Duração Frequência	0,00 \pm 0,00 0,00 \pm 0,00	29,75 \pm 29,42 0,87 \pm 0,74	ns ns
Ex. Angular Visual Duração Frequência	3,26 \pm 3,26 0,41 \pm 0,41	12,28 \pm 5,16 1,37 \pm 0,53	ns ns
Ex. Assoalho/grade Duração Frequência	45,08 \pm 12,32 7,08 \pm 1,36	3,95 \pm 1,98 1,00 \pm 0,53	teste M-W, p=0,003 teste M-W, p=0,004
Bater Asas Duração Frequência	1,82 \pm 0,84 0,66 \pm 0,25	14,68 \pm 7,25 2,50 \pm 1,14	ns ns
Pular Duração Frequência	0,00 \pm 0,00 0,00 \pm 0,00	5,04 \pm 2,24 2,00 \pm 0,92	teste M-W, p=0,02 teste M-W, p=0,02
Auto Limpeza Duração Frequência	8,12 \pm 3,11 1,33 \pm 0,44	7,70 \pm 2,80 2,50 \pm 0,80	ns ns

Arrepiar Penas			
Duração	1,13 ± 0,84	0,00 ± 0,00	ns
Frequência	0,25 ± 0,17	0,00 ± 0,00	ns
Espreguiçar			
Duração	0,16 ± 0,16	0,00 ± 0,00	ns
Frequência	0,08 ± 0,08	0,00 ± 0,00	ns
Defecar			
Frequência	0,16 ± 0,11	0,12 ± 0,12	ns

A frequência (M-W $p=0,04$) e duração (M-W, $p=0,007$) do comportamento de comer foram significativamente menores nos animais do AE quando comparados aos animais do grupo AP (figura 8, C e D e tabela 1, apêndice A). A duração (Friedman ANOVA (FA) (N = 12, df = 4) = 5,46 $p=0,2$) e a frequência do comportamento de comer (FA (N = 12, df = 4) = 8,71 $p=0,06$) nos animais alojados em AP nos diferentes períodos do teste (1-5) após a primeira bicada, não apresentam diferenças significantes. Já os animais alojados em AE apresentaram uma redução da duração do comportamento de comer mais precoce (FA (N = 8, df = 4) = 10,89 $p=0,02$; 1-5WilcoxonMatched Pareado (WM) $p=0,01$), a ingestão nesses animais foi diminuindo ao longo dos períodos (1-5). A frequência com que os animais do grupo AE apresentavam o comportamento de comer também foi significativamente menor entre o períodos ao longo do tempo (FA (N=8, df =4) = 13,66 $p=0,008$), 1-5 WM $p=0,007$) (figura 8, A e B).

Analisamos também a duração média deste mesmo comportamento de comer, ou seja, a duração total desse comportamento de cada animal dividida pelo total de frequências em que esse comportamento aparece. Neste caso, os animais alojados em AE apresentaram uma duração média do comportamento de comer significativamente menor (M-W, $p=0,007$) quando comparados aos animais alojados em AP (figura 8, C), ou seja, uma vez que esses animais começavam a comer, eles permaneciam em média menos tempo comendo quando comparados ao grupo AP.

O volume de ração palatável ingerido foi registrado como volume ingerido/100g de peso corporal. O volume ingerido durante o teste, foi significativamente menor nos animais alojados em AE (n=9) (M-W, $p=0,003$) quando comparado aos animais alojados em AP (n=12). Um

animal do AP e cinco animais do AE não participaram da análise de volume ingerido, por uma dificuldade no adequado registro da quantidade de ração remanescente após o teste (figura 8, D).

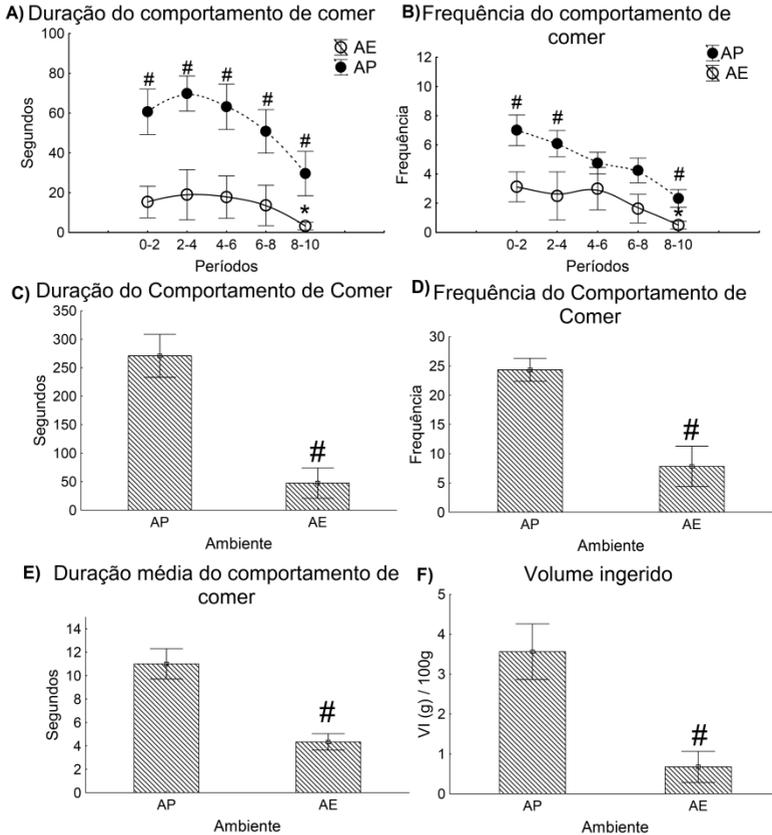


Figura 8 –Efeito dos diferentes ambientes sobre a duração (A) e frequência (B), do comportamento de comer, nos períodos de 1 a 5, após a primeira bicada. (C) Duração do comportamento de comer (Médias \pm EPM). (D) Frequência do comportamento de comer (Médias \pm EPM). (E) duração média (Médias \pm EPM) do comportamento de comer AP vs AE. (F) volume ingerido por 100 gramas de peso corporal (Médias \pm EPM) AP vs AE. AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido, seg= segundos, (#)p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$ quando comparado aos 2 primeiros minutos após o início da ingestão. (#) $p < 0,05$ quando comparado ao AP no mesmo período de tempo.

Com relação aos comportamentos exploratórios, a duração do comportamento de exploração visual (peeping) foi significativamente maior nos animais alojados em AE (M-W, $p= 0,0004$) quando comparados aos animais alojados em AP, no período prandial (Figura 9, C). A duração de peeping não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os períodos (1-5) (Figura 9, A; tabela 2, Apêndice A). Também não houve diferença estatística significativa na frequência desse comportamento entre os dois grupos, mas a frequência diminuiu significativamente entre os períodos (1-5) nos animais alojados em AE (FA (N = 8, df = 4) = 13,589 $p = 0,008$; WM, $p_{1-2} p=0,02$, $p_{1-4} p=0,01$, $p_{1-5} p=0,01$) (figura 9, B e D; tabela 2, Apêndice A).

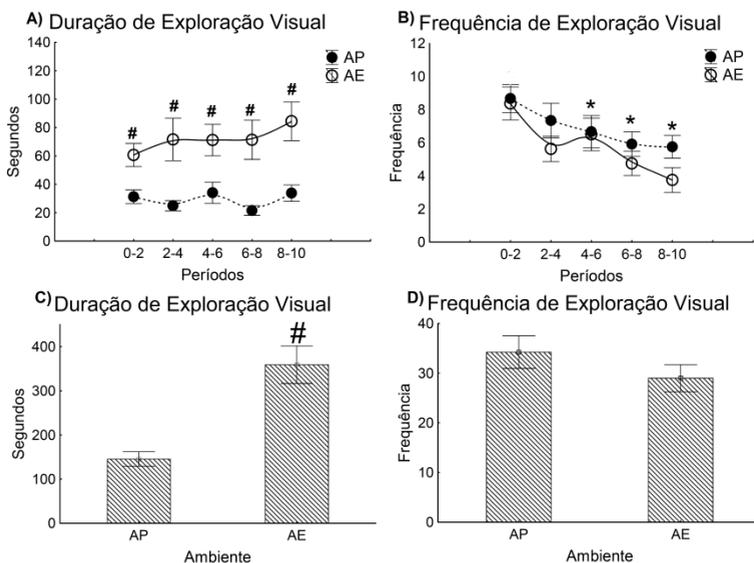


Figura 9 –(A) duração do comportamento de exploração visual AP vs AE nos períodos de 1-5. (B) Frequência do comportamento de exploração visual AP vs AE nos períodos de 1-5. (C) Duração total (600 segundos, Médias \pm EPM) do comportamento exploração visual prandial, AP vs AE. (D) Frequência total (600 segundos Médias \pm EPM) do comportamento de exploração visual pós prandial, AP vs AE. . AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido. , (#) $p=$ valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$. (*) $p < 0,05$ quando comparado aos 2 primeiros minutos após o início da ingestão. (#) $p < 0,05$ quando comparado ao AP no mesmo período de tempo.

A exploração do assoalho/grade da Gexp durante o teste mostrou diferenças significantes entre os grupos. Nesse comportamento tanto a duração (M-W, $p=0,003$), quanto a frequência (M-W $p=0,004$) foram significativamente maiores nos animais alojados em AP (Figura 10, C e D). Não houve diferença estatística significante na frequência e duração da exploração assoalho/grade, entre os períodos (1-5) em ambos os grupos (Figura 10, A e B). A duração da exploração assoalho/grade dos animais AP foi maior nos períodos 1, 3, 4 e 5 quando comparados aos animais AE (Figura 10, A; tabela 3, Apêndice A). A frequência do mesmo comportamento, foi maior nos animais AP nos períodos 1, 4 e 5 quando comparados aos animais AE no mesmo período (Figura 10, B; tabela 3, Apêndice A).

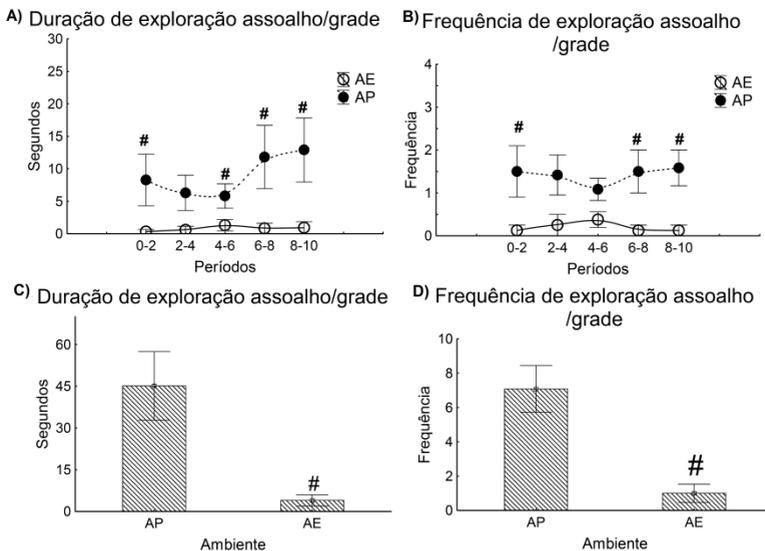


Figura 10 – (A) duração do comportamento de exploração assoalho/grade AP vs AE nos períodos de 1-5. (B) Frequência do comportamento de exploração assoalho/grade AP vs AE nos períodos de 1-5. (C) Duração total (600 segundos, Médias \pm EPM) do comportamento exploração assoalho/grade prandial, AP vs AE. (D) Frequência total (600 segundos, Médias \pm EPM) do comportamento de exploração assoalho/grade pós prandial, AP vs AE. .AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido. , (*) p = valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.(*) $p < 0,05$ quando comparado aos 2 primeiros minutos após o início da ingestão. (#) $p < 0,05$ quando comparado ao AP no mesmo período de tempo.

No comportamento de locomoção, não encontramos diferenças significantes nas durações e freqüências totais desse comportamento (Figura 11, C e D), porém, observou-se um aumento da duração da locomoção ao final do teste, nos últimos períodos (1-5), nos animais alojados no AP (FA (N = 12, df = 4) = 10,555 p = 0,03; WM, p3-p4 p=0,02, p3-p5 p=0,009). A freqüência do comportamento de locomoção permanece sem alterações significantes entre os períodos nos diferentes grupos (Figura 11, A e B). No último período do teste (p5) observamos diferença na duração e freqüência entre os grupos no mesmo período (figura 11, A e B; tabela 4, Apêndice A).

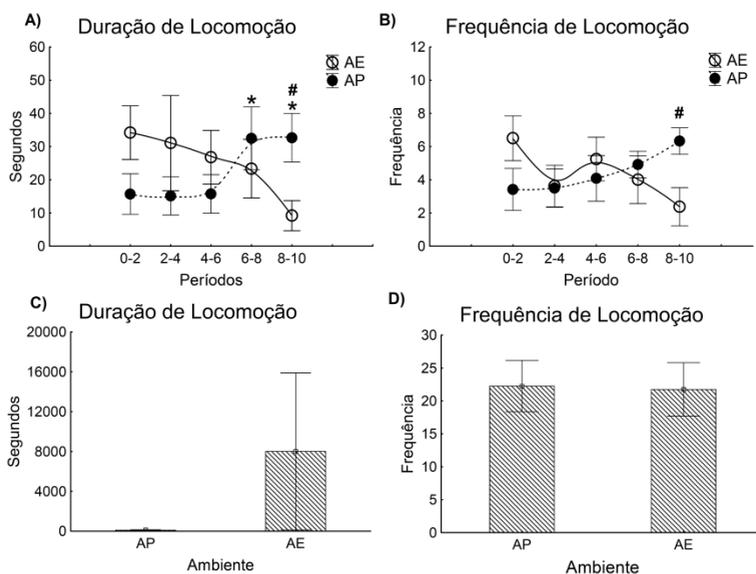


Figura 11 –(A) duração do comportamento de Locomoção AP vs AE nos períodos de 1-5. (B) Freqüência do comportamento de locomoção AP vs AE nos períodos de 1-5. (C) Duração total (600 segundos, Médias \pm EPM) do comportamento locomoção pós prandial, AP vs AE. (D) Freqüência total (600 segundos, Médias \pm EPM) do comportamento de locomoção pós prandial, AP vs AE. . AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido. , (*) p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, p<0,05..(*) p < 0,05 quando comparado aos 2 primeiros minutos após o início da ingestão. (#) p<0,05 quando comparado ao AP no mesmo período de tempo.

Com relação aos comportamentos de fuga, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos no comportamento de

bater asas. Já, o comportamento de pular, apresentou duração (M-W $p=0,02$) e frequência (M-W $p=0,02$) significativamente maiores nos animais alojados em AE, essa diferença aparece por esse comportamento de pular aparecer exclusivamente nos animais alojados em AE. Entre os períodos não houve diferença significativa na duração e frequência desse comportamento.

Outros comportamentos foram observados mais raramente, que são eles: auto-limpeza, imobilidade alerta, espreguiçar, arrepiar penas e defecar. Nenhuma diferença estatística pode ser encontrada, na frequência e duração destes comportamentos entre os grupos.

Em resumo: Os animais do ambiente AE não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo AP na latência para primeira bicada, porém, observamos diferenças comportamentais no modo de comer nesses animais. Eles apresentaram uma duração média do comportamento de comer menor que o grupo AP, o volume ingerido também foi menor significativamente e eles permaneceram por mais tempo em exploração visual durante a ingestão, assim como, demonstraram comportamentos de fuga como pular. Já os animais AP apresentaram duração e frequência do comportamento de comer significativamente maior que o grupo AE, esses animais exploraram assoalho e grade com maior duração e frequência e permaneceram mais tempo em locomoção nos períodos finais do teste.

3.3 EFEITOS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO SOBRE A IMOBILIDADE TÔNICA

Foram registradas e avaliadas, a duração em segundos da imobilidade tônica e o número de contenções necessárias para desencadear esse comportamento. Não foram observados animais outliers com relação à duração de IT e também ao número de contenções necessárias para desencadear a mesma. Portanto, as análises foram realizadas com AP $n=13$ e AE $n=14$. O grupo AP com um animal a menos, por este morrer durante o período de aclimação no laboratório.

O tempo de imobilidade tônica foi variável entre os animais do mesmo grupo e de grupos diferentes. Em geral, os animais entraram em imobilidade tônica na primeira tentativa, um animal do ambiente AP e dois do AE entraram em IT após duas tentativas. Os resultados foram analisados através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney comprando o grupo AP vs AE. A duração total de Imobilidade tônica não mostrou diferenças significantes entre os grupos (M-W $p=0,77$) (Figura 12, B). Também não houve diferenças significantes no número

de contenções necessárias para desencadear a IT nos diferentes grupos (M-W $p=0,62$) (Figura 12, C). A análise de duração total de IT também foi realizada através do teste de sobrevivência (teste de GW $p=1,00$; teste de C-M $U=0,269$ $p=0,90$) e não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos (Figura 12, A). As médias e erro padrão do tempo de imobilidade tônica e o número de tentativas, também podem ser observadas na tabela 1 do anexo1.

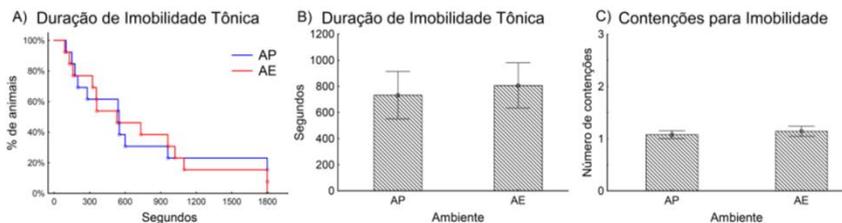


Figura 12. (A) Porcentagem de animais que permanecem em Imobilidade tônica, ao longo do tempo, AP vs AE. (B) Efeito do ambiente sobre a duração de imobilidade tônica. (C) Efeito do ambiente sobre o número de contenções necessárias para desencadear a imobilidade tônica. AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido. Nenhuma diferença estatística pode ser encontrada pelo teste de Mann-Whitney entre os grupos.

3.4 EFEITOS DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO SOBRE A EXPRESSÃO DA DOUBLECORTINA (DCX) NO PROSENCÉFALO DE POMBOS.

3.4.1 Quantificação de células DCX + no hipocampo

Foram contados os corpos celulares DCX+ nas regiões da Lâmina lateral (ll), Lâmina medial (ml) e Núcleo triangular (Tr) do hipocampo ventral em seções entre os níveis A 7.25 e A 5.00 segundo o atlas do cérebro do pombo (KARTEN e HODOS, 1967). As quantidades de células DCX+ observadas em animais alojados em AP e AE foram comparadas utilizando o Teste-t de Student, foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Para facilitar a visualização dos dados, as médias \pm erro padrão da média, estão representados graficamente na tabela 6 do apêndice A.

Foram comparados o número total de células DCX+ por mm^2 de cada animal, na lâmina lateral do hipocampo ventral, AP vs AE (Figura 13, A e B). Quando comparado o número de células multipolares (Test t $p=0,3$) (figura 14, A), bipolares (Test $p=0,2$) (Figura 14, A) e

multipolares + bipolares (Test t $p= 0,4$) (Figura 14, B) não verificamos diferenças significantes entre os grupos.

Na lâmina medial do hipocampo ventral também não verificamos diferenças significantes entre os grupos na análise de células multipolares (Test t $p= 0,1$) (figura 14, C) e bipolares (Test t $p= 0,1$) (figura 13, C). Quando comparadas a soma das células multipolares+bipolares o grupo AP apresentou estatisticamente um maior número total de células DCX+ na região (Test t $p= 0,01$) (figura 14, D).

No núcleo triangular do hipocampo ventral não foram vistas diferenças estatísticas significantes entre os grupos AE e AP no número de células multipolares (Test t $p= 0,09$) (figura 14, E), bipolares (Test t $p= 0,8$) (figura 14, E) e multipolares+bipolares (Test t $p= 0,1$) (figura 14, F).

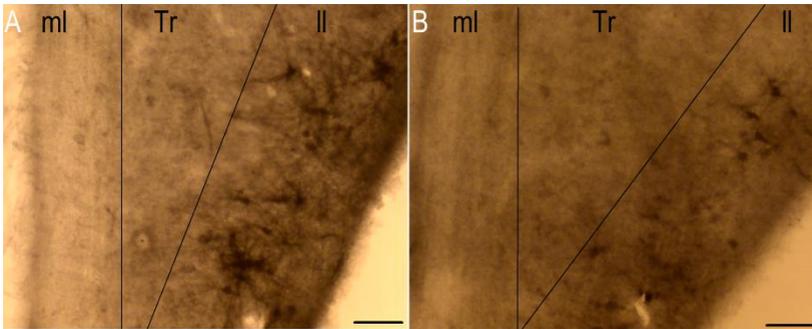


Figura 13. Efeito das condições de alojamento no número de células DCX+ no hipocampo ventral. Fotomicrografia (escala de barra 50 μ m) do hipocampo de pombos adultos (A) alojados em AP e em (B) alojados em AE por 40 dias, distribuição de células e fibras DCX+.

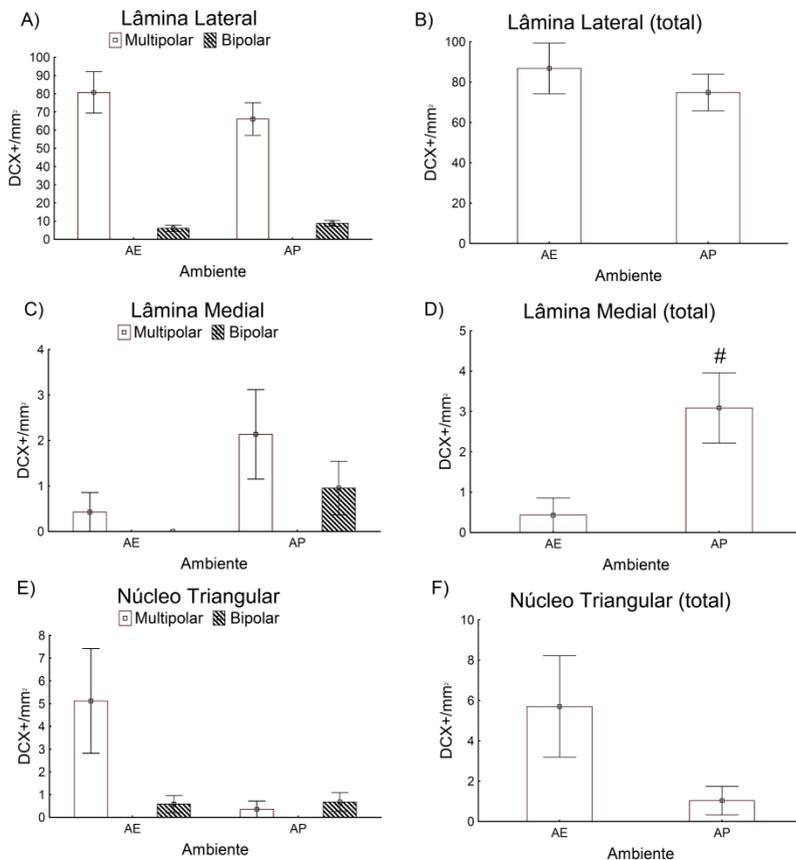


Figura 14. Número de células DCX+ na Lâmina Lateral, Lâmina Medial e Núcleo Triangular do hipocampo ventral. (A) número de células multipolares e bipolares na lâmina lateral do hipocampo ventral. (B) número total de células multipolares + bipolares na lâmina lateral do hipocampo ventral. (C) número de células multipolares e bipolares na lâmina medial do hipocampo ventral. (D) número total de células multipolares + bipolares na lâmina medial do hipocampo ventral. (E) número de células multipolares e bipolares no núcleo triangular do hipocampo ventral. (F) número total de células multipolares + bipolares no núcleo triangular do hipocampo ventral. AE= ambiente enriquecido, AP= ambiente padrão de laboratório, DCX+= células doublecortina positivas. Teste *t* Student entre os grupos AP vs AE (#) $p < 0,05$ quando comparado ao AE no número total de células bipolares + multipolares.

3.4.2 Quantificação de células DCX + no Hyperpallium Apicale

Foram contados os corpos celulares DCX+ no Hyperpallium Apicale em secções entre os níveis A 7.50 e A 8.50 segundo o atlas do cérebro do pombo (KARTEN e HODOS, 1967).

As quantidades de células DCX+ observadas no Hyperpallium Apicale em animais alojados em AP e AE foram comparadas utilizando o Teste-t de Student, foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Os dados, as médias \pm erro padrão da média, estão representados graficamente na tabela 7 apêndice A.

Quando comparado o número de células multipolares (Test t $p = 0,6$) (figura 15, A), bipolares (Test t $p = 0,7$) (figura 15, A) e multipolares+ bipolares (Test t $p = 0,7$) (figura 15, B) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos.

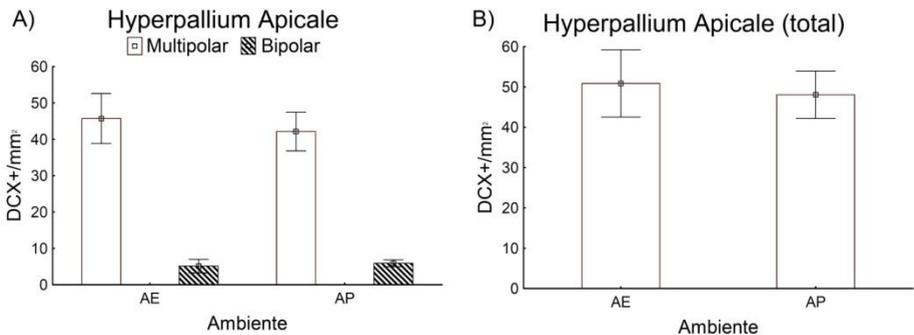


Figura 15 –Número de células DCX+ no Hyperpallium Apicale nos grupos AE e AP, dados representados por média \pm EPM. (A) número de células multipolares e bipolares no Hyperpallium Apicale AE vs AP. (B) número total de células bipolares + multipolares no Hyperpallium Apicale AE vs AP. AE= ambiente enriquecido, AP= ambiente padrão de laboratório, DCX+= células doublecortina positivas. Teste t Student entre os grupos AE e AP, sem diferenças significantes, $p > 0,05$.

3.4.3 Quantificação de células DCX + no Estriado Medial e Estriado Lateral.

Foram contados os corpos celulares DCX+ no Estriado medial e Estriado lateral em secções entre os níveis A 9.50 e A 7.50 segundo o atlas do cérebro do pombo (KARTEN e HODOS, 1967).

As quantidades de células DCX+ observadas no Estriado Medial e Estriado Lateral, em animais alojados em AP e AE, foram comparadas

utilizando o Teste-t de Student, foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Os dados, as médias \pm erro padrão da média, estão representados graficamente na tabela 8 apêndice A.

Quando comparado o número de células multipolares (Teste t $p = 0,7$) (figura 16, A), bipolares (Teste t $p = 0,6$) (figura 16, A) e multipolares + bipolares (Teste t $p = 0,7$) (figura 16, B) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos na região do Estriado Medial.

Na região do Estriado Lateral, também não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos, quando comparado o número de células multipolares (Teste t $p = 0,9$) (figura 16, C), bipolares (Teste t $p = 0,7$) (figura 16, C) e multipolares + bipolares (Teste t $p = 0,9$) (figura 16, D).

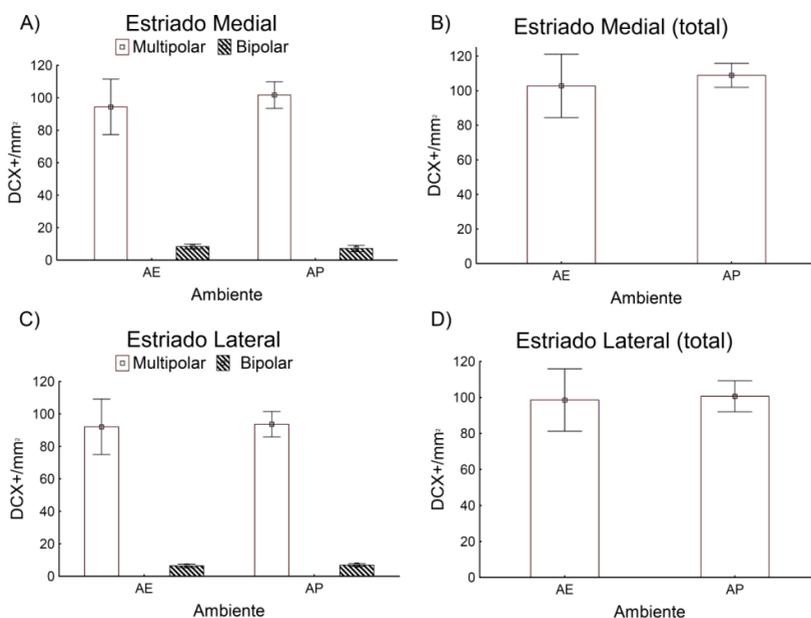


Figura 16 – Número de células DCX+ no Estriado Medial e Estriado Lateral nos grupos AE e AP, dados representados por média \pm EPM. (A) número de células multipolares e bipolares DCX+ no Estriado Medial AE vs AP. (B) número total de células multipolares + bipolares DCX+ no Estriado Medial AE vs AP. (C) número de células multipolares e bipolares DCX+ no Estriado Lateral. (D) número total de células DCX+ multipolares + bipolares no Estriado Lateral. AE= ambiente enriquecido, AP= ambiente padrão de laboratório, DCX+= células doublecortina positivas. Teste t Student entre os grupos AE e AP, sem diferenças significantes, $p > 0,05$.

3.4.4 Quantificação de células DCX + no Nidopallium Caudolaterale.

Foram contados os corpos celulares DCX+ no Nidopallium Caudolaterale em secções entre os níveis A 6.75 e A 5.00 segundo o atlas do cérebro do pombo (KARTEN e HODOS, 1967).

Os totais de células DCX+ observadas no Nidopallium Caudolaterale, em animais alojados em AP e AE, foram comparadas utilizando o Teste-t de Student, foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Os dados, as médias \pm erro padrão da média, estão representados graficamente na tabela 9 apêndice A.

Quando comparado o número de células multipolares (Test t $p = 0,9$) (figura 17, A), bipolares (Test t $p = 0,7$) (figura 17, A) e multipolares + bipolares (Test t $p = 0,9$) (figura 17, B) não foram observadas diferenças significantes entre os grupos na região do Nidopallium Caudolaterale.

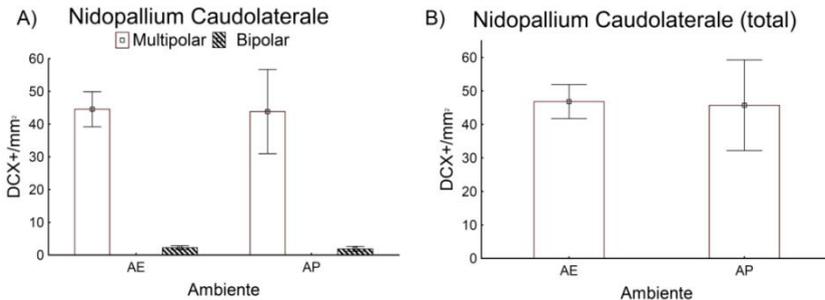


Figura 17 – Número de células DCX+ no Nidopallium Caudolaterale nos grupos AE e AP, dados representados por média \pm EPM. (A) número de células multipolares e bipolares DCX+ no Nidopallium Caudolaterale AE vs AP. (B) número total de células bipolares +multipolares DCX+ no Nidopallium Caudolaterale AE vs AP. AE= ambiente enriquecido, AP= ambiente padrão de laboratório, DCX+= células doublecortina positivas. Teste t Student entre os grupos AE e AP, sem diferenças significantes, $p > 0,05$.

Em resumo:

Verificamos influência ambiental na NPN prosencefálica de pombos, quando observado o número total de células DCX+ na região da lâmina medial do hipocampo ventral, nos animais alojados em AP. A maior complexidade ambiental mostrou influência nos comportamentos

defensivos dos animais, porém, com discreta alteração na neurogênese prosencefálica, em um período de 40 dias alojamento.

4. DISCUSSÃO

Nossos dados indicam que ambientes com diferentes complexidades físicas e sociais modificam os comportamentos defensivos. Animais expostos ao AE diminuíram a locomoção e exploração do assoalho e da grade da gaiola experimental, no período pré-prandial, quando comparados aos animais mantidos em condições de laboratório (AP). Em roedores expostos a ambientes novos, em testes de campo aberto, um aumento da imobilidade e diminuição da exploração podem ser observados (SHERIF e ORELAND, 1994; SAENZ *et al.*, 2006).

Durante testes de HIN a atividade exploratória e locomotora parece diminuir com a aversividade do ambiente, em roedores (COLEMAN, 2008; DULAWA e HEN, 2005). Já o tratamento crônico com ansiolíticos, aumenta o comportamento exploratório e diminui a latência para comer durante este mesmo teste (DULAWA e HEN, 2005). O ambiente enriquecido parece ter um efeito similar ao causado por tratamentos crônicos com antidepressivos e diminui a latência para comer em animais alojados nestes ambientes de alta complexidade durante o teste de HIN (MESHI *et al.*, 2006). Porém, em nosso estudo, os animais AP parecem perceber a gaiola experimental como menos aversiva do que é percebida pelos animais do AE. Estes animais alojados em AP estavam mais móveis e exploravam mais a gaiola experimental no período pré-prandial quando comparados aos animais alojados em AE. Talvez, isso se deva ao fato da gaiola experimental não divergir muito em aspectos físicos da gaiola em que esses animais foram expostos ao ambiente padrão de laboratório.

Neste estudo, não observamos diferença na latência para comer, no HIN, entre os grupos (AP vs AE). Neste teste de HIN, a latência para comer e quantidade de ração ingerida são dados comumente utilizados como uma medida de ansiedade (DULAWA e HEN, 2005; MERALI *et al.*, 2003; KELLY *et al.*, 2011). Nossos resultados indicam que a medida da latência para comer, pode não ser o melhor indicador de alterações comportamentais causadas pelo ambiente. Já a análise mais detalhada dos comportamentos pré e também prandiais nos mostrou detalhes que talvez pudessem passar despercebidos.

Observamos mudanças comportamentais não somente no período pré-prandial do teste, mas também no período prandial. Nesse momento da ingestão verificamos que a complexidade ambiental afeta intensamente o modo como os animais comem e exploram o ambiente em que estão comendo. A análise dos comportamentos durante o teste,

ainda não foi realizada por outros estudos em roedores e aves e pode ser capaz de detectar aspectos importantes dos efeitos de diferentes complexidades ambientais sobre o comportamento animal.

Os animais alojados em AE apresentaram um aumento na duração e frequência de exploração visual (“peeping”) que foi significativa no período prandial, isto é, esses animais mostraram um padrão ingestivo com inúmeras interrupções por comportamentos exploratórios. De acordo com estudos anteriores, independente das condições de alojamento, pombos adultos separados de membros da mesma espécie e expostos a um ambiente novo, mostram um aumento de peeping que desaparece ao longo do tempo (DE SOUZA *et al.*, 2009). Peeping também foi observado como uma resposta a situações ameaçadoras, como a exposição a sons de baixa frequência (FERRARI *et al.*, 1999), ambientes desconhecidos (DE SOUZA *et al.*, 2009) e antecipação de estímulos nocivos (ZIMMERMANN *et al.*, 2011). Apesar desses fatos (FERRARI *et al.*, 1999; DE SOUZA *et al.*, 2009; ZIMMERMANN *et al.*, 2011), peeping não parece ser motivado pelo medo, porque o ansiolítico diazepam não conseguiu reduzir sua incidência (DE SOUZA *et al.*, 2009). Além disso, o peeping aumentou à expectativa de um estímulo positivo (ZIMMERMANN *et al.*, 2011).

O peeping parece representar uma antecipação de qualquer estímulo possível proveniente de um ambiente desconhecido, indicando que poderia ser uma expressão de exploração desse ambiente ou “expectativa”. Os animais alojados em ambiente AP de nosso estudo mostraram um aumento da exploração do assoalho e grade da Gexp, talvez por este ambiente (Gexp) não divergir tanto da Gca (gaiola de dimensões pequenas e isolamento social) quanto o alojamento em viveiros dos animais AE (viveiros do biotério central, grande, possibilitando convívio social, pequenos vôos). Esses animais alojados em AE praticamente não apresentaram este comportamento de exploração do assoalho e grade da Gexp e apresentaram comportamentos relacionados à fuga como o de pular, comportamento este, não visto em animais AP. Aves selvagens (AE), quando capturadas e alojadas em cativieiro apresentam aumento de comportamentos de fuga quando comparadas a aves de ambiente alojadas em padrão de laboratório (FEENDER e BATESON, 2012).

A locomoção aumentou nos períodos finais do teste nos animais alojados em AP e de modo geral ela estava associada aos comportamentos exploratórios e também aumentava com o tempo de permanência na Gexp. Em alguns estudos, quando um objeto novo é

apresentado o peeping declina mais rapidamente enquanto a imobilidade aumenta abruptamente. Assim, a imobilidade após a apresentação a um objeto novo ou a um ambiente novo pode representar um sobressalto a um estímulo inesperado, como a imobilidade apresentada por roedores expostos a um campo aberto (BRONSTEIN e HIRSCH, 1976; RICHARD *et al.*, 2010; BLANCHARD *et al.*, 2001). A redução gradual da imobilidade e o estímulo à locomoção pode ser estimulado pela ausência do estímulo “espera” com o passar do tempo.

Além do aumento de comportamentos exploratórios, os animais alojados em AE modificaram seu comportamento ingestivo de maneira que permanecem, em média, menos tempo comendo, e realizam a ingestão de alimentos com menor frequência quando comparados aos animais AP. A quantidade total de ração palatável ingerida, durante o teste de HIN, também foi menor nesses animais alojados em AE. Roedores alojados em ambientes enriquecidos modificam sua resposta ao estresse, em geral, de forma positiva (MLYNARIK *et al.*, 2004). Pombos alojados em ambiente enriquecidos mostraram arriscar-se mais em situações onde pode ou não ser oferecidas recompensas (PATTISON *et al.*, 2013). Roedores expostos ao teste de HIN e tratados cronicamente com antidepressivo (fluoxetina), diminuem a latência para comer e aumentam a quantidade de ração palatável ingerida (DULAWA e HEN, 2005). Portanto, novamente, é possível que a magnitude da mudança das condições ambientais, quando os pombos deste estudo foram removidos de seus viveiros de alojamento para a Gexp, foi maior para as aves alojadas em AE do que aquelas alojadas em AP. De fato, o contraste negativo entre as condições ambientais podem representar uma situação estressante (LATHAMA e MASON, 2010) que poderia favorecer as estratégias passivas de enfrentamento nesses pombos alojados em enriquecimento.

Os animais AE de nosso estudo nasciam nos viveiros do biotério central e lá permaneciam até a realização dos testes comportamentais. O convívio social destes animais, e que foi retirado dos animais alojados em AP, pode ser um fator potencialmente estressor para esses animais (AE), já que eles disputam por comida com os demais, estabelecem relações hierárquicas e sexuais. Em nosso estudo, não conseguimos registrar dados de quantidade de ração ingerida na Gca dos animais por uma dificuldade de registro nos viveiros do biotério central, portanto não sabemos o quanto o comportamento apresentado durante o teste de HIN difere do comportamento de ingestão dos animais em seus alojamentos.

Os animais AP que foram retirados dos viveiros e alojados individualmente, tinham disponibilidade de água e comida, contato visual com os demais, porém não tinham contato físico, o que pode ser um fator potencialmente “menos estressor” para esses animais e talvez esse fator somado a menor discrepância entre os dois ambientes Gca dos animais alojados em AP e Gexp, levou a estratégias de enfrentamento mais ativas nesse grupo alojado em AP.

Dentro dos nossos grupos experimentais, não vimos diferenças sexuais. Grandes partes dos estudos que utilizam o teste HIN, testam em animais machos, poucos estudos avaliam machos e fêmeas e destes, em alguns casos, foram encontradas diferenças na latência para comer entre os sexos (DULAWA e HEN, 2005). Ratas parecem sofrer influências de flutuações hormonais durante o ciclo estral nos comportamentos defensivos, alguns estudos mostram esses animais mais responsivos a testes de estresse em fases finais do ciclo, quando comparada as demais fases (DEVALL *et al.*, 2011). Mulheres são mais propensas ao desenvolvimento de transtornos de ansiedade e humor. O transtorno do pânico aparece duas vezes mais comumente em mulheres e a susceptibilidade aumenta durante a fase lútea do ciclo menstrual, quando a secreção de progesterona sofre um declínio (DULAWA e HEN, 2005; LOVICK, 2014; ANDRÉEN *et al.*, 2009). Em pombos, não observamos dimorfismo sexual nas respostas de defesa. Também não encontramos estudos prévios que relatam estas possíveis diferenças sexuais nos comportamentos defensivos destes animais.

Outra resposta de defesa, esta mais intensa, típica de resposta á predação (GALLUP, 1979; JONES, 1986), que não foi modificada pelo ambiente em nosso estudo e que também não apresentou dimorfismo sexual, é a imobilidade tônica. Pombos apresentam imobilidade tônica, como observado em outras aves não oscinas, em condições mais ameaçadoras como a restrição do corpo inteiro na posição supina, feita pelo experimentador (SALZEN, 1963; ROVEE e LUCIANO, 1973; JONES, 1984). Estímulos potencialmente ameaçadores induzem a imobilidade ou imobilidade tônica em aves (GALLUP, 1979; JONES, 1986; HAZARD *et al.*, 2008; presente estudo), assim, a inibição do comportamento pode estar associada com o aumento do estado defensivo, ansiedade ou medo nestas espécies.

Curiosamente, Melleu *et al* 2015 observaram que a imobilidade como resposta a ameaças em potenciais, tais como isolamento, novidade e contenção, foram menos intensa em pombos alojados em ambiente padrão de laboratório quando comparados aos animais alojados em ambientes enriquecidos. Estes resultados parecem contradizer trabalhos

anteriores sugerindo que os ambientes mais complexos tendem a atenuar comportamentos defensivos em ambas as espécies de aves e mamíferos (CAIN *et al.*, 2006.; JONES e WADDINGTON, 1992; MEEHAN e MENCH, 2002). No entanto, é importante notar que o alojamento em isolamento social diminuiu significativamente a duração de imobilidade tônica em galinhas (KUIJIYAT *et al.*, 1983; CRAIG *et al.*, 1986), e o alojamento em isolamento social também pode aumentar o comportamento de imobilidade, com a novidade (JONES, 1984). Ainda não há evidências suficientes sobre quais os mecanismos envolvidos e a influência de diferentes complexidades ambientais sobre esse comportamento extremo, de estresse agudo, por uma situação inescapável.

Em nosso trabalho não observamos diferenças significantes no tempo de imobilidade e no número de contenções necessárias para que os animais entrassem nesse comportamento, nos diferentes grupos. Mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesses comportamentos defensivos ao estresse agudo. Aparentemente, estas mudanças ambientais só são capazes de afetar respostas de defesa a estímulos estressores de menor intensidade (como ambientes novos). Assim, parece que respostas comportamentais ao estresse intenso como no teste de IT, em uma situação inescapável, são pouco vulneráveis a influências ambientais. Também em nosso estudo, os animais mantinham o contato visual com os demais, o que pode ser outro fator que contribuiu para a ausência de diferenças entre os grupos.

Melleu *et al.* 2015, ao comparar dois alojamentos em laboratório um em isolamento social e visual e o segundo em ambiente enriquecido também em laboratório, mostrou que os animais alojados em ambiente enriquecido apresentaram maior imobilidade no teste de ambiente desconhecido e apresentação de um objeto novo (ADON) e permaneceram mais tempo em imobilidade tônica. Estes mesmo animais apresentaram mais células DCX positivas no hipocampo quando comparados aos animais alojados em AP. Esses dados estão em consonância com a literatura onde um aumento da neurogênese é observado em cérebros de animais adultos alojados em ambiente enriquecido (VAN PRAAG *et al.*, 1999; BRUEL-JUNGERMAN *et al.*, 2005; MESHİ *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2014; LINDSEY e TROPE, 2014). Apesar de Melleu *et al.* 2015, ter encontrado mudanças substanciais na neurogênese do HP, nosso estudo mostrou mudanças discretas da neurogênese na mesma região.

A maior diferença entre os estudos reside no fato de que no presente estudo, os animais alojados em AP estavam isolados socialmente, porém não visualmente, nossos animais mantinham o contato visual com os demais vizinhos. Roedores e primatas em isolamento social e visual apresentam uma diminuição da neurogênese no hipocampo (STRANAHAN *et al.*, 2006; CININI *et al.*, 2014). Aves são animais sociais, sensíveis ao isolamento visual, para algumas, o contato visual e social são cruciais para o aprendizado vocal, assim como para o desenvolvimento da área auditiva central que também pode ser prejudicada pelo isolamento (COUSILLAS *et al.*; 2006; PERRET *et al.*, 2015). Aves têm habilidades visuais comparáveis a de primatas e que parecem interferir no seu comportamento social e reprodutivo (SHIMIZU *et al.*, 2010). Em pombos o fator de enriquecimento ambiental que parece provocar mudanças na neurogênese prosencefálica desses animais, parece ser o contato visual com seus co-específicos, visto que, animais expostos a AP apresentaram um aumento discreto de células DCX+ no hipocampo quando comparados aos animais AE, e não mostraram alterações na neurogênese nas demais regiões prosencefálicas estudadas, diferente do estudo de Melleu *et al.*, 2015 onde os animais alojados em AP estavam em isolamento visual e apresentaram diminuição de células DCX+ na mesma região.

Estudos realizados em diferentes condições ambientais têm indicado que o enriquecimento ou aumento de complexidade ambiental, favoreceu a neurogênese prosencefálica em diferentes espécies de aves (SHERRY e HOSHOOLEY, 2010; LADAGE *et al.*, 2011). Em algumas espécies, tais como galinhas e cordizes, os comportamentos são afetados pelo enriquecimento de acordo com a idade, sexo e a formação genética da ave (KUIJIYAT *et al.*, 1983, 1984; JONES e WADDINGTON, 1992, MILLER e MENCH, 2006; NAZAR e MARIN, 2011).

Diferente de mamíferos, aves apresentam células DCX+ em diversas regiões prosencefálicas (BOSERET *et al.*, 2007; MELLEU *et al.*, 2013). O número de células DCX+ pode ser um indicador de NPN, refletindo o número de jovens neurônios no cérebro de aves adultas ou indicando os processos de remodelação dos dendritos (BALTHAZART e BALL, 2014). No prosencéfalo de pombos identificamos duas formas diferentes de células DCX+ classificadas como bipolares e multipolares (MELLEU *et al.*, 2013 e presente estudo). Apesar de ambos os subtipos DCX+ não expressarem GFAP e NeuN, células multipolares podem representar células maduras estabelecidas em circuitos cerebrais em processo de remodelação e células bipolares podem representar células imaturas em migração (MELLEU *et al.*, 2013).

A NPN no hipocampo, estriado medial e lateral, Hyperpallium Apicalle e nidopallio caudolaterale, parecem ter relevância funcional nas habilidades comportamentais e cognitivas em pombos. O hipocampo de pombos tem sido associado a tarefas dependentes de memória, inibição comportamental, processamento espacial e percepção do ambiente (ATOJI e WILD, 2004, 2006; LADAGE *et al.*, 2010, 2011; SHERRY e HOSHOOLEY, 2010; GAGLIARDO *et al.*, 2014; SCARF *et al.*, 2014; LAZAREVA *et al.*, 2014). A presença de neurônios recém-nascidos na camada lateral do hipocampo (MELLEU *et al.*, 2013) e sua regulação pelo ambiente adiciona evidências de que a camada em forma de V do hipocampo de pombo pode ser comparável ao giro denteado de mamíferos (ATOJI e WILD, 2004; 2006). Recentes estudos mostram que diferentes complexidades ambientais, podem influenciar a formação de novos neurônios no hipocampo e seu posicionamento final (OPENDARK e GOULD, 2015). A presença de novos neurônios no giro denteado do hipocampo parece atenuar o estresse causado pela novidade em camundongos (DRANOYSKY e LEONARDO, 2012).

Em nosso estudo, verificamos aumento discreto de células DCX+ na camada medial do hipocampo (quando somado o número total de células bipolares e o total de células bipolares + multipolares) nos animais alojados em AP. Muitas evidências apontam homologia entre o hipocampo de aves e mamíferos (em razão de conexões, embriogênese e funções similares), contudo a citoarquitetura e neuroquímica da formação hipocampal de aves ainda não permite a identificação de subnúcleos ou regiões equivalentes a, por exemplo, os cornos de Ammon em mamíferos (ATOJI e WILD 2006; 2004; COLOMBO e BROADBENT, 2000; REINER *et al.*, 2005). Porém, em nosso estudo, apenas um animal do AE apresentou células DCX+ nessa região e apenas duas células, o que indica um grupo com células DCX+ na lâmina medial do hipocampo (AP) em comparação a um grupo praticamente sem células (AE). Portanto, a diferença da neurogênese nesta região parece não ser causada por um efeito ambiental e sim por restrições de natureza estatística.

No geral, apesar da organização do telencéfalo de aves apresentar-se de forma nucleada e não em camadas como de mamíferos, a conectividade do cérebro aviário segue os mesmos princípios organizacionais de mamíferos (SHANAHAN *et al.*, 2013). Em aves, o estriado medial e lateral são partes de circuitos telencefálicos associados à aprendizagem, memória, controle motor e hedonismo (FEE GOLDBERG, 2011; LUO *et al.*, 2001). A conectividade, os neurotransmissores, e a citoarquitetura dos gânglios da base em aves são

semelhantes à de mamíferos, essa região também funciona como parte associativa sensorio-motora similar a função em mamíferos. (ANDERSON e REINER, 1991; ANDERSON e REINER, 1990; VEENMAN *et al.*, 1994; VEENMAN e REINER, 1994). Evidências apontam que em roedores o estriado medial é crítico para aprendizagem e o estriado lateral está mais relacionado ao desempenho em tarefas (ATALLAH *et al.*, 2007).

O hyperpallium apicalle relaciona-se com o processamento visual em regiões mais caudais que é semelhante a área visual em mamíferos e em regiões mais rostrais faz parte do sistema somatossensorial comparável ao córtex somatossensorial de mamíferos (KARTEN *et al.*, 1973; MEDINA e REINER, 2000).

O nidopallium caudolaterale também está envolvido com o processamento da aprendizagem, memória e percepção (CSILLAG *et al.*, 2008; FEE e GOLDBERG, 2011; KRÖNER e GÜNTÜRKÜN, 1999; MEDINA e REINER, 2000). Ele parece ser equivalente ao córtex pré-frontal de mamíferos e possui uma densa inervação dopaminérgica, recebe aferências do wulst e de todas as modalidades sensoriais auditivas, visuais e somatossensoriais e projeta eferências para os núcleos da base, ele parece integrar todas as aferências sensoriais e exercer controle sobre áreas límbicas e motoras (KRÖNER e GÜNTÜRKÜN, 1999).

Todas essas regiões representam funções essenciais para o reconhecimento das características ambientais, aprendizagem, memória, navegação espacial e flexibilidade comportamental em que os pombos são hábeis (WARANABE, 2005; RAYBURN-REEVES *et al.*, 2013; LAUDE *et al.*, 2014; LAZAREVA *et al.*, 2014). Além disso, pombos expostos a ambientes enriquecidos apresentam mudanças em suas escolhas relacionadas a assumir riscos em tarefas de tomada de decisão, quando comparados a pombos alojados em ambiente padrão de laboratório (PATTISON *et al.*, 2013). Portanto, estudos sugerem que a flexibilidade comportamental de pombos, inclui processos cognitivos superiores, tais como tomada de decisão, e pode contar com remodelação de circuitos prosencefálicos, devido à incorporação de novos neurônios em circuitos adultos. Nas condições atuais, não houve alterações significativas na neurogênese das regiões estudadas, indicando que o enriquecimento afeta a neurogênese e comportamentos por vias distintas ou mecanismos paralelos.

Em resumo, o alojamento por 40 dias em ambiente enriquecido alterou os comportamentos defensivos pré-prandiais e prandiais em pombos no HIN e não alterou a latência para comer no HIN e respostas

ao teste de IT. O ambiente enriquecido alterou a neurogênese prosencefálica de maneira discreta na lâmina medial do hipocampo, sem alterações nas demais áreas. O que sugere que os mecanismos envolvidos em respostas comportamentais são independentes dos mecanismos de alteração da neurogênese prosencefálica. Um elemento que parece relevante para o enriquecimento ambiental, e que pode influenciar neurogênese prosencefálica de pombos adultos, parece ser o contato visual entre esses animais. Porém, esses dados ainda não estão claros e mais estudos são necessários para melhor esclarecimento de quais os fatores do enriquecimento que são capazes de provocar mudanças na neurogênese prosencefálica desses animais, assim como, quais os fatores dos ambientes de alta complexidade que podem ser potencialmente estressores para os animais alojados nessas condições com possibilidade de interação social e sensorial.

5. CONCLUSÃO

O alojamento por 40 dias em ambientes de diferentes complexidades ambientais alterou os comportamentos defensivos de pombos adultos. Essas alterações foram vistas não na latência para a primeira bicada no teste de HIN e sim na análise de comportamentos pré-prandiais e prandiais, onde animais alojados em AE apresentaram diminuição na ingestão com estratégias ativas de enfrentamento e aumento de comportamentos do tipo exploratórios. Alterações comportamentais não foram vistas no teste de IT, teste de ameaça mais intensa, o que sugere que esse tipo de resposta seja pouco vulnerável a mudanças ambientais. Diferente de estudos anteriores, o enriquecimento ambiental não exerceu influência sobre a neurogênese no hipocampo e demais regiões estudadas, e animais alojados em AP apresentaram um discreto aumento de células DCX+ nessa região o que nos permite concluir que a expressão de comportamentos defensivos e a neurogênese hipocampal são eventos dissociados nesta espécie e diferentes de mamíferos. Mais estudos com análises detalhadas de diferentes fatores de enriquecimento ambiental, associados a estudos comportamentais na gaiola casa e durante testes comportamentais poderão contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de regulação da neurogênese prosencefálica e conseqüências comportamentais nestes animais. Os pombos são animais bem-sucedidos em ambientes urbanos complexos e em constante mudança, onde muitas outras espécies de vertebrados não conseguem prosperar, e parecem possuir estratégias de enfrentamento ativas perante situações potencialmente estressoras. Os presentes dados, juntamente com futuras descrições sistemáticas de alterações cerebrais induzidas pela complexidade ambiental nesta espécie, podem fornecer pistas valiosas para os mecanismos subjacentes à sua flexibilidade comportamental e sua notável capacidade de prosperar em ambientes urbanos.

REFERÊNCIAS

ABOU-ISMAIL, U.A.; BURMAN, O.H.; NICOL, C.J.; MENDL, M.; The effects of enhancing cage complexity on the behavior and welfare of laboratory rats. **Behavioural Processes**. 85:172-180. 2010.

ABROUS, D.N.; KOEHL, M.; LE MOAL, M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. **Physiological Reviews**. 85: 523-569, 2005.

ANDERSON, K.D.; REINER, A. Extensive co-occurrence of substance P and dynorphin in striatal projection neurons: an evolutionarily conserved feature of basal ganglia organization. *Journal of Comparative Neurology*, 295: 339–369, 1990.

ANDERSON, K.D.; REINER, A. Immunohistochemical localization of DARPP-32 in striatal projection neurons and striatal interneurons: implications for the localization of D1-like dopamine receptors on different types of striatal neurons. **Brain Research**, 568: 235–243, 1991.

ANDRÉEN, L.; NYBERG, S.; TURKMEN, S.; WINGEN, G.V.; FERNÁNDEZ, G.; BÄCKSTRÖM, T. Sex steroid induced negative mood may be explained by the paradoxical effect mediated by GABAA modulators. **Psychoneuroendocrinology**, 34: 1121-1132, 2009.

AHMED, S. The culture of neural stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, 106:1-6, 2009.

ATALLAH, H.E.; LOPEZ-PANIAQUA, D.; RUDY, J.W.; O'REILLY, R.C. Separate neural substrates for skill learning and performance in the ventral and dorsal striatum. **Nature Neuroscience**, 1: 126-131, 2007.

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

ATOJI, Y.; WILD, M. Fiber connections of the hippocampal formation and septum and subdivisions of the hippocampal formation in the

pigeons as revealed by tract tracing and kainic acid lesions. **The Journal Comparative Neurology**, 475: 426-461, 2004.

ATOJI, Y.; WILD, J.M. Anatomy of the avian hippocampal formation. **Annual Review Neuroscience**. 17: 13-15, 2006.

ATOJI, Y.; WILD, M. Afferent and efferent projections of the mesopallium in the pigeon (*Columba Livia*). **The Journal of Comparative Neurology**, 520:717-741, 2012.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; LING, C.Y.; WEN, S.Y. 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**, 347: 233-248, 1994.

BALTHAZART, J.; BALL, G. Doublecortin is a highly valuable endogenous marker of neurogenesis in canaries. **Brain Behavior and Evolution**, 84: 1-4, 2014.

BARON, J.; PINTO, L.; DIAS OLIVEIRA, M.; LIMA, B.; NEUENSCHWANDER, S. Directional responses of visual wulst neurons to grating and plaid patterns in the awake owl. **European Journal of Neuroscience**, 26: 1950–1968, 2007.

BARFIELD, E.T.; MOSER, V.A.; HAND, A.; GRISEL, J.E. B-endorphin modulates the effect of stress on novelty-suppressed feeding. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 7: 1-7, 2013.

BARNEA, A.; MISHAL, A.; NOTTEBOHM, F. Social and spatial changes induce multiple survival regimes for new neurons in two regions of the adult brain: An anatomical representation of time? **Behavioural Brain Research**, 167:63–74, 2006.

BARNEA, A.; PRAVOSUDOV, V. Birds as a model study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. **European Journal of Neuroscience**. 34-36, 2011.

BENNETT, E.L.; ROSENZWEIG, M.R.; DIAMOND, M.C. Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. **Science**. 21: 825-826, 1969.

BENNETT, E.L.; Neuronal mechanisms of learning and memory (eds Rosenzweig, M.R & Bennett, E.L.). **Neurobiology of Learning and Memory**. MIT Press, Cambridge, Massachusetts 2: 279-287, 1976.

BIEBL, M.; COOPER, C.M.; WINKLER, J.; KUHN, H.G. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. **Neuroscience Letters**. 291:17-20, 2000.

BINGMAN, V.P. Hippocampal lesions impair navigational learning in experienced homing pigeons. **Behavioral Neuroscience**. 106: 229-232, 1992.

BIONDI, L.M.; BÓ, M.S.; VASSALLO, A.I. Inter-individual and age differences in exploration, neophobia and problem-solving ability in a Neotropical raptor (*milvago chimango*). **Animal Cognition**, 13: 701-710, 2010.

BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell Tissue Research**, 329:409-420, 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**, 33:140-154, 2007.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; TAKAHASHI, T.; KELLEY, M.J. Attack and defensive behavior in the albino rat. **Animal Behaviour**. 25: 622-634, 1977.

BLANCHARD, D.C.; HYND, A.L.; MINKE, K.A.; MINEMOTO, T.; BLANCHARD, R.J. Human defensive behaviors to threat scenarios show parallels to fear- and anxiety-related defense patterns of non-human mammals. **Neuroscience & Biobehavioral Review**, 25:761-770, 2001.

BLECHMAN, A.D. Pigeons, the fascinating saga of the world's most and reviled bird. Grove Press, New York, 2006. 244p.

BRENE, J.C.; PADILLA, M.; FORNAGUERA, J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical

antidepressant-like effects in post weaning enriched rats. **Behavioural Brain Research**. 197:125-137, 2009.

BRITTON, D.R.; BRITTON K.T. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 15:577-582, 1981.

BRONSTEIN, P.M.; HIRSCH, S.M. Ontogeny of defensive reactions in Norway rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. 90: 620-629, 1976.

BROWN, J.P.; COUILLARD-DESPRES, S.; COOPER-KUHN, C.M.; WINKLER, J.; AIGNER, L.; KUHN H.G. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, 467: 1–10, 2003.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long term memory following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, 21: 513-521, 2005.

CAIA, 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**, 216:342-356, 2009.

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

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

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, 10: 413-418, 1999.

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**, 132:1-15, 2002.

CININI, S.M.; BARNABE, G.F.; GALVÃO-COELHO, N.; DE MEDEIROS, M.A.; PEREZ-MENDES, P.; SOUSA, M.B.; COVOLAN, L.; MELLO, L.E. Social isolation disrupts hippocampal neurogenesis in Young non-human primates. **Frontiers in Neuroscience**, 8: 1-9, 2014.

COLEMAN, S.W. Mourning dove (*Zenaida macroura*) wing-whistles may contain threat-related information for conspecifics. **Naturwissenschaften**, 95: 981-986, 2008.

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

COUSILLAS, H.; GEORGE, I.; MATHELIER, M.; RICHARD, J.P.; HENRY, L.; HAUSBERGER, M. Social experience influences the development of a central auditory area. **Naturwissenschaften**, 93: 588-596, 2006.

CHANCELLOR, V.L.; ROTH, C.T.; LADAGE, D.L.; PRAVOSUDOV, V.V. The effect of environmental harshness on neurogenesis: a large-scale comparison. **Environmental Harshness and Neurogenesis**. 246-252, 2010.

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**, 8:1315–1326, 2009.

CHENG, L.; PASTRANA, E.; TAVAZOIE, M.; DOETSH, F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. **Nature Neuroscience**, 12: 399-408, 2009.

CSILLAG, A.; BÁLINT, E.; ADÁM, A.; ZACHAR, G. The organization of the basal ganglia in the domestic chick (*Gallus domesticus*): anatomical localization of DARPP-32 in relation to glutamate. **Brain Research Bulletin**, 76: 183-191, 2008.

CLAYTON N.S.; KREBS J.R. Hippocampal growth and attrition in birds affected by experience. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91: 7410-7414, 1994.

CRAIG, J.V.; VARGAS, J.V.; MILLIKEN, G.A. Fearful and associated responses of white leghorn hens: effects of cage environments and genetic stocks. **Poultry Science**, 65: 2199-2207, 1986.

CRISPIM, 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**, 42:257-264, 2012.

DE KLOET, E.R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Review Neuroscience**. 6:463-475, 2005.

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**, 81:26–33, 2009.

DEVALL, A.J.; SANTOS, J.M.; LOVICK, T.A. Estrous cycle stage influences on neuronal responsiveness to repeated anxiogenic stress in female rats. **Behavioural Brain Research**, 225: 334-340, 2011.

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

DULAWA, S.C. & HEN, R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 29:771-783, 2005.

DRANOVSKY, E.; LEONARDO, D. Is there a role for young hippocampal neurons in a adaptation to stress? **Behavioural Brain Research**, 277: 371-375, 2012.

FAN, C.; ZANG, M.; SHANG, L.; CYNTHIA, N.A.; LI, Z.; YANG, Z.; CHEN, D.; HUANG, J.; XIONG, K. Short term environmental enrichment exposure induces proliferation and maturation of doublecortin positive cells in the prefrontal cortex. **Neural Regeneration Research**, 9: 318-328, 2014.

FEE, M.S.; GOLDBERG, J.H. A hypothesis for basal ganglia-dependent reinforcement learning in the songbird. **Neuroscience**, 198:152-170, 2011.

FEENDERS, G.; BATESON, M. The development of stereotypic behavior in caged european starlings, *sturnus vulgaris*. **Developmental Psychobiology**, 54: 773-784, 2012.

FERRARI E.A.; FALEIROS L.; CERUTTI S.M.; OLIVEIRA A.M. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. **Behavioural Brain Research**, 101: 93–103, 1999.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research**, 175: 1-8, 2006.

FRANCQ, E. Behavioural aspects of feigned death in the opossum *Didelphis marsupialis*. **American Midwest Naturalist**, 81: 556–568, 1969.

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**, 13: 620–626, 2003.

GAGLIARDO A.; LOALE, P.; BINGMAN, V. Homing in Pigeons: The Role of the Hippocampal Formation in the Representation of Landmarks Used for Navigation. **The Journal of Neuroscience**, 19: 311–315, 1999.

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

GALLUP, G.G. Tonic immobility as a measure of fear in domestic fowl. **Animal Behaviour**, 27: 316-317, 1979.

GALLUP, G. G.; RAGER, D.R. Tonic immobility as a model of extreme states of behavioral inhibition: Issues of methodology and measurement. Em: Paul R. Sanberg, Motor activity and movement disorders: research issues and applications, **Humana Press**, 57-80, 1996.

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, 6:765-775, 2002.

GILMAN, T.T.; MARCUSE, F.L.; MOORE, A.U. Animal hypnosis: a study of the induction of tonic immobility in chickens. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, 43: 99-111, 1960.

GOULD, E.; TANAPAT, P. Stress and hippocampal neurogenesis. **Biological Psychiatry**. Vol. 46. 11: 1472-1479, 1999.

GUSMÃO, I.D.; MONTEIRO, B.M.M.; CORNÉLIO, G.O.; FONSCCECA, C.S.; MORAES, M.F.D.; PEREIRA, G.S. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behavioural Brain Research**, 228: 440-446, 2012.

GLASPER, R.E; SHOENFELD, T.J.; GOULD, E. Adult neurogenesis: Optimizing hippocampal function the suit the environment. **Behavioral Brain Research**. 227: 380-383, 2012.

GRANDEL, H.; BRAND, M. Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. **Development Genes and Evolution**. 223:131-147, 2012.

GROSS, C.T.; CANTERAS, N.S. The many paths to fear. **Nature Review Neuroscience**. 9: 651-658, 2012.

HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**. 329: 409-420, 2007.

HAMPTON, R.R.; SHETTLEWORTH, S.J. Hippocampal lesions impair memory for location but not color in passerine birds. **Behavioral Neuroscience**. 110: 831-835, 1996.

HAZARD, D.; LECLAIRE, S.; COUTY, M.; GUÉMÉNÉ, 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**, 54: 645–653, 2008.

HEBB, D.O. The effects of early experience on problem solving at maturity. **American Psychologist**. 2: 306-307, 1947.

HICKS, L.E. Effects of anticholinergics on the habituation of tonic immobility in chickens. **Behavioral Biology**, 18:199-209, 1976.

HOMBERG, J.R. Measuring behaviour in rodents: towards translational neuropsychiatric research. **Behavioural Brain Research**, 236: 295-306.

ICKES, B.R.; PHAM, T.M.; SANDERS, L.A.; ALBECK, D.S.; MOHAMMED, A.H.; GRANHOLM, A.C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental Neurology**. 164: 45-52, 2000.

IMAYOSHI, I.; SAKAMOTO, M.; OHTSUKA, T.; TAKAO, K.; MIYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, M.; MORI, K.; IKEDA, T.; ITOHARA, S.; KAGEYAMA, R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. **Nature Neuroscience**, 10: 1153-1161, 2008.

JONES, R.B. Experimental novelty and tonic immobility in chickens (*Gallus domesticus*). **Behavioural Processes**, 9: 255-260, 1984.

JONES, R.B. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: A review. **World's Poultry Science Journal**, 42:82-96, 1986.

JONES, R.B.; ROPER, T.J. Olfaction in the domestic fowl: a critical review. **Physiology and Behavior**, 62:1009-1018, 1997.

JONES, R.B.; WADDINGTON, D.G. Modification of fear in domestic chicks, *Gallus gallus domesticus*, via regular handling and early environmental enrichment. **Animal Behaviour**, 43: 1021-1033, 1992.

KAPLAN, M.S.; HINDS, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscope analysis of light radio autographs. **Science**, 197: 1092-1094, 1977.

KARTEN, H.J.; HODOS, W.; NAUTA, W.J. REVZIN, A.M. Neural connections of the “visual wulst” of the avian telencephalon, experimental studies in the pigeons (*Columba livia*) and owl (*Speotyto cunicularia*). **Journal of Comparative Neurology**, 150: 253-277, 1973.

KELLY, A.M.; KINGSBURY, M.A.; HOFFBUHR, K.; SCHROCK, S.E.; WAXMAN, B.; KABELIK, D.; THOMPSON, R.R.; GOODSON, J.L. Vasotocin neurons and septal V1a-like receptors potently modulate songbirds flocking and responses to novelty. **Hormones and Behavior**. 60: 12-21, 2011.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386:493–495, 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**, 1106: 189–196, 2006.

KUJIVAT, S.K.; CRAIG, J.V.; DAYTON, A.D. Duration of tonic immobility affected by housing environment in white leghorn hens. **Poultry Science**, 62: 2280-2282, 1983.

KLEMM, W. R. Behavioral inhibition. **Brainstem Mechanisms of Behavior**, edited by W. R. Klemm and R. P. Vertes, Wiley & Sons, 497-533, 1990.

KLOET, E.R.; JOELS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. **Nature Review Neuroscience**. 6: 463-475, 2005.

KRIEGSTEIN. A.; ALVAREZ-BUYLLA. A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **The Annual Review of Neuroscience**, 32: 149-184, 2009.

KRÖNER, S.; GUNTURKUN, D. 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**, 407: 228-260, 1999.

LADAGE, L.D.; ROTH II, T.C.; FOX, R.A.; PRAVOSUDOV, V. Ecologically relevant spatial memory use modulates hippocampal neurogenesis. **Proceedings of the Royal Society**, 277: 1071-1079, 2010.

LADAGE, L.D.; ROTH, T.C.; PRAVOSUDOV, V.V. Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behavior in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* sp.). **Proceedings of the Royal Society**, 702: 138-143, 2011.

LATHAM, N.; MASON, G. Frustration and perseveration in stereotypic captive animals: is a taste of enrichment worse than none at all? **Behavioural Brain Research**, 211: 96-104, 2010.

LAUDE, J.R.; STAGNER, J.P.; RAYBURN-REEVES, R.; ZENTALL, T.R. Midsession reversals with pigeons: visual versus spatial discriminations and the intertribal interval. **Learning & Behavior**, 42: 40-46, 2014.

LAW, L.M.; GARDNER, R.D.; ALLEN, T.A.; LEE, D.W. Species-specific injury-induced cell proliferation in the hippocampus and subventricular zone of food-storing and nonstoring wild birds. **Developmental Neurobiology**, 70: 16-27, 2010.

LAZAREVA, O.F. KANDRAY, K.; ACERBO, M.J. Hippocampal lesions and transitive interference: dissociation of interference-based and reinforcement-based strategies in pigeons. **Hippocampus**, 1: 1-8, 2014.

LEHMANN, M.L.; BRACHMAN, R.A.; MARTINOWICH, K.; SCHLOESSER, R.J.; HERKENHAM, M. Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. **The Journal of Neuroscience**, 33: 2961-2972, 2013.

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

LINDSEY, B.W.; TROPEPE, V. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. **Developmental Neurobiology**, 74: 1053-1077, 2014.

LIVEZEY, B.C.; ZUSI, R.L. Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. **Zoological Journal of the Linnean Society**, 149:1–95, 2007.

LUO, M.; DING, L.; PERKEL, D.J. An avian basal ganglia pathway essential for vocal learning forms a closed topographic loop. **The Journal of Neuroscience**, 21:6836-6845, 2001.

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**, 147:631-638, 2007.

LOVICK, T.A. Sex determinants of experimental panic attacks. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 3: 465-471, 2014.

MACAS. J.; NERN. C.; PLATE. K.H.; MOMMA.S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. **The Journal of Neuroscience**, 26: 13114-13119, 2006.

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**, 26: 9104–9110, 2000.

MARINO, L. Big brain do matter in new environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102: 5306-5308, 2005.

MARTINEZ, N.P.; SERRANO, Z.F.; LOPEZ, L.O.; RODRIGUES, G.R. Environmental enrichment increases doublecortin-associated new neurons and decreases neural death without modifying anxiety-like behavior in mice chronically exposed to toluene. **Behavioural Brain Research**, 256: 432-440, 2013.

MEDINA, L.; REINER, A. Do birds possess homologues of mammalian primary visual, somatosensory and motor cortices? **Trends in Neurosciences**, 23: 1-12, 2000.

MEEHAN, C. L., & MENCH, J. A. Environmental enrichment affects the fear and exploratory responses to novelty of young Amazon parrots. **Applied Animal Behaviour Science**, 79: 75-88, 2002.

MEHLHORN, J.; REHKÄMPER, G. Neurobiology of the homing pigeon—a review. **Naturwissenschaften**, 96:1011-1025, 2009.

MEHLER, M.F.; GOKHAN, S. Post-natal cerebral multipotent progenitors: regulatory mechanisms and potential role in the development of novel neural regenerative strategies. **Brain Pathology**, 3: 515-526, 1999.

MELLEU F. **A influência do ambiente sobre a neurogênese pós-natal e comportamento defensivo em pombos (*Columba livia*)**. Florianópolis, 2012. 99f. Dissertação (Mestrado em Neurociências)-Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências. Florianópolis, 2012.

MELLEU F., SANTOS TS, LINO-DE-OLIVEIRA C, MARINO-NETO J. Distribution and characterization of doublecortin-expressing cells and fibers in the brain of the adult pigeon (*Columba livia*) . **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 47: 57–70, 2013.

MELLEU, F.; PINHEIRO, M.V.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO, J. Defensive behaviors and prosencephalic neurogenesis in pigeons (*Columba livia*) are affected by environmental enrichment in adulthood. **Brain Structure & Function**. 1: 1-15, 2015.

MERALI, Z.; LEVAC, C.; ANISMAN, H. Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. **Biological Psychiatry**, 54: 552-565, 2003.

MESHID.; DREW, M.R.; SAXE, M.; ANSORGE, M.S.; DAVID, D.; SANTARELLI, L.; MALAPANI, C.; MOORE, H.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature Neuroscience**, 9: 729-731, 2006.

MILLER, K.A.; MENCH, J.A. Differential effects of 4 types of environmental enrichment on aggressive pecking, feather pecking, feather loss, food wastage and productivity in Japanese quail. **British Poultry Science**, 47: 646-658, 2006.

MILLS, A.D.; JONES, R.B.; FAURE, J.M.; WILLIAMS, J.B. Responses to isolation in Japanese quail genetically selected for high or low sociality. **Physiology and Behavior**, 53: 183-189, 1993.

MLYNARIK, M.; JOHASSON, B.B.; JEZOVA, D. Enriched environment influences adrenocortical response to immune challenge and glutamate receptor gene expression in rats hippocampus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 18: 273-280, 2004.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Neurophysiologie Cliniqué**, 33: 55-66, 2003.

MITRA, R.; SAPOLSKY, R.M. Short-term enrichment makes male rats more attractive, more defensive and alters hypothalamic neurons. **Plos One**, 7: 1-8, 2012.

NAZAR, F.N.; MARIN, R.H. Chronic stress and environmental enrichment as opposite factors affecting the immune response in Japanese quail (*Coturnixcoturnix japonica*). **Stress**, 14: 166-173, 2011.

NOTTEBOHM, F.; STOKES, T.M.; LEONARD, C.M. Central control of song in the canary, *Serinus canaries*. **Journal of Comparative Neurology**, 165: 457-458, 1976.

NOTTEBOHM, F. From birds song to neurogenesis. **Scientific American**, 260: 74-79, 1989.

NILTON, S.S.; DUMAN, R.S. Regulation of neurogenesis and angiogenesis in depression. **Current Neurovascular Research**, 1: 261-267, 2004.

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

OPENDAK, M. GOULD, E. Adult neurogenesis: a substrate for experience-dependent change. **Trends in Cognitive Science**, 19: 151-161, 2015.

PACTEAU, C.; EINON, D.; SINDEN, J. Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. **Behavior Brain Research**, 34:79-96, 1989.

PRAVOSUDOV, V.V. The relationship between environment, corticosterone, food caching, spatial memory, and the hippocampus in chickadees. Em: Otter, K.A. ed., **Ecology and Behavior of Chickadees and Titmice: an Integrated Approach**. Oxford University Press, 2007.

PATTEN, A.R.; SICKMANN, H.; HRYCIW, B.N.; KUSCHARSKY, T.; PARTON, R.; KERNICK, A.; CHRISTIE, B.R. Long-term exercise is needed to enhance synaptic plasticity in the hippocampus. **Learning & Memory**, 20:642-647, 2013.

PATENT, D.H.; MUÑOZ, W. **Pigeons**. Clarion Books, New York. 1997, p. 78.

PATTISON, K.F.; LAUDE, J.R.; ZENTALL, T.R. Environmental enrichment affects suboptimal, risky, gambling-like choice by pigeons. **Animal Cognition**, 16: 429-434, 2013.

PERRET, A.; HENRY, L.; COULON, M.; CAUDAL, J.P.; RICHARD, J.P.; COUSILLAS, H.; HAUSBERGER, M.; GEORGE, I. Social visual contact, a primary “drive” for social animals. **Animal Cognition**, 18: 657-666, 2015.

PRAAG, H.V.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, 2: 266-270, 1999.

PRAAG, H.V.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neuronal consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, 1: 191-198, 2000.

RAYBURN-REEVES, R.M.; STAGNER, J.P.; KIRK, C.R.; ZENTALL, T.R. Reversal learning in rats (*Rattus norvegicus*) and

pigeons (*Columba livia*): qualitative differences in behavioral flexibility. **Journal of Comparative Psychology**, 127: 202-211, 2013.

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**, 26:12237–12241, 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**, 473: 377-414, 2004.

REINER, A.; YAMAMOTO, K.; KARTEN H.J. Organization and evolution of the avian forebrain. **The Anatomical Record**, 287:1080 – 1102, 2005.

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**, 188:1-16, 2006.

REIS, F.; SCHENKA, A.A.; MELO L.L.; FERRARI, E.A.M. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*Columba livia*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32: 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**. 85: 18-23, 2010.

ROVEE, C.K.; LUCIANO, D.P. Rearing influences on tonic immobility in three-day-old chicks (*Gallus gallus*). **Journal of Comparative & Physiological Psychology**, 83: 351-354, 1973.

- SADANANDA, M. Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: implications of the paradigm shift. **Current Science**, 3:297-307, 2004.
- SAEZ, J.C.B.; VILLAGRA, O.R.; TRÍAS, J.F. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. **Behavioural Brain Research**, 169: 57-65, 2006.
- SAIRANEN, M.; LUCAS, G.; ERNFORS, P.; CASTREN, M.; CASTREN, E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience**, 25:1089–1094, 2005.
- SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends In Neurosciences**, 4:233-239, 2009.
- SALZEN, E.A. Imprinting and the immobility reactions of domestic fowls. **Animal Behaviour**, 11: 66-71, 1963.
- SANDERMAN, R.; SANDERMAN, D. “Impoverished” and “enriched” living conditions influence the proliferation and survival of neurons in crayfish brain. **Journal of Neurobiology**, 10: 215-226, 2000.
- SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, 301: 805-809, 2003.
- SOL, D.; DUCAN, R.P.; BLACKBUM, T.M.; CASSEY, P.; LEFEBVRE, L. Big brains, enhanced cognition, and response of birds environments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 102: 5460-5465, 2005.
- 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**, 81:26–33, 2009.

SCARF, D.F.; MILLAR, J.; POW, N.; COLOMBO, M. Inhibition, the final frontier: the impact of hippocampal lesions on behavioral inhibition and spatial processing in pigeons. **Behavioral Neuroscience**, 128: 42.

SHERRY, D.F.; HOSHOOLEY, J.S. Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 365: 933-943, 2010.

SHUMWAY, C.A. Habitat complexity, brain, and behavior. **Brain, Behavior and Evolution**, 72: 123-134, 2008.

SPUDEIT, W.A.; SULZBACH, N.S.; BITTENCOURT, M. A.; DUARTE, A.M.; LIANG, H.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. The behavioral satiety sequence in pigeons (*Columba livia*). Description and development of a method for quantitative analysis. **Physiology & Behavior**, 122: 62-71, 2013.

SHANAHAN, M.; BINGMAN, V.P.; SHIMIZU, M.; GÜNTÜRKÜN, O. Large-scale network organization in the avian forebrain: a connectivity matrix and theoretical analysis. **Frontiers in Computational Neuroscience**, 7: 1-17, 2013.

SHERIF, F.; ORLAND, E. Effects of chronic treatment with the GABA-transaminase vigabatrin on exploratory behaviours in rats. **Behavioural Brain Research**, 63: 11-15, 1994.

SHIMIZU, T.; PATTON, T.B.; HUSBAND, S.A. Avian visual behavior and the organization of telencephalon. **Brain, Behavior and Evolution**, 75: 204-217, 2010.

STENDENFELD, K.A.; CLINTON, S.M.; KERMAN, I.A.; AKIL, H.; WATSON, S.J.; SVED, A.F. Novelty-seeking behavior predicts vulnerability in a rodent model of depression. **Physiology & Behavior**, 103:210-216, 2011.

STRANAHAN, A.M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, 9:526-533, 2006.

TARR, B.A.; RABINOWITZ, J.S.; IMTIAZ, M.A.; DEVOOGD, T.J. Captivity reduces hippocampal volume but not survival of new cells in a food-storing bird. **Developmental Neurobiology**, 69: 972-981, 2009.

THOMPSON C.K.; BRENOWITZ, E.A. Neurogenesis in an Adult Avian Song Nucleus Is Reduced by Decreasing Caspase-Mediated Apoptosis. **The Journal of Neuroscience**, 29:4586-4591, 2009.

WARANABE, S. Lesions in the basal ganglion and hippocampus on performance in a Wisconsin card sorting test-like task in pigeons. **Physiology & Behavior**, 85: 324-332, 2005.

WILLIAMS, B.M.; LUO, Y.; WARD, C.; REDD, K.; GIBSON, R.; KUCZAJ, S.A.; McCOY, J.G. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiology & Behavior**, 73: 649-658, 2001.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; CAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature Neuroscience**, 2: 266-270, 1999.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews: Neuroscience**, 1:191-198, 2000.

VEENMAN, C.L.; REINER, A. The distribution of GABA-containing perikarya, fibers, and terminals in the forebrain and midbrain of pigeons, with particular reference to the basal ganglia and its projection targets. **Journal of Comparative Neurology**, 339:209-250, 1994.

VEENMAN, C.L.; KARLE, E.J.; ANDERSON, K.D.; REINER, A. Thalamostriatal projection neurons in birds utilize LANT6 and neurotensin: a light and electron microscopic double-labeling study. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 9: 1-16, 1995.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B. A Brain tumour stem cells. **Nature Reviews Cancer**, 6- 425-436, 2006.

VIEIRA, EB; 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**, 216: 94-99, 2011.

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

ZIMMERMAN, P.H.; BUIJS, S.A.F.; BOLHUIS, J.E.; KEELING, L.J. Behaviour of domestic fowl in anticipation of positive and negative stimuli. **Animal Behaviour**. 81:569–577, 2011.

APÊNDICE A

Tabela 1. – Teste de Hipofagia Induzida por Novidade, **nos 600 segundos após a primeira bicada, por período**. Médias \pm EPM de duração e frequência do comportamento de comer, observados no teste, por período. seg= segundos, AP= ambiente padrão de laboratório (12), AE= ambiente enriquecido (8), p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, ns= não significante, $p < 0,05$.

Comportamento	Período	AP	AE	p
Comer Duração (seg) Frequência	1	60,62 \pm 11,42 7,00 \pm 1,05	15,30 \pm 7,94 3,12 \pm 1,02	teste M-W p= 0,03 teste M-W p=0,03
Comer Duração (seg) Frequência	2	69,80 \pm 8,80 6,08 \pm 0,89	18,99 \pm 12,61 2,50 \pm 1,64	teste M-W p= 0,008 teste M-W p=0,03
Comer Duração (seg) Frequência	3	63,13 \pm 11,39 4,75 \pm 0,73	17,74 \pm 10,64 3,00 \pm 1,45	teste M-W p= 0,004 ns
Comer Duração (seg) Frequência	4	50,80 \pm 10,93 4,25 \pm 0,85	13,62 \pm 10,16 1,62 \pm 0,98	teste M-W p= 0,03 ns
Comer Duração (seg) Frequência	5	29,60 \pm 11,17 2,33 \pm 0,60	3,18 \pm 1,90 0,50 \pm 0,26	teste M-W p= 0,04 teste M-W p= 0,02

Tabela 2. - Teste de Hipofagia Induzida por Novidade, **nos 600 segundos após a primeira bicada, por período.** Médias \pm EPM de duração e frequência do comportamento de exploração visual, observado no teste, por período. seg= segundos. AP= ambiente padrão de laboratório (12), AE= ambiente enriquecido (8), p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, ns= não significante, $p < 0,05$.

Comportamento	Período	AP	AE	p
Exploração Visual Duração (seg) Frequência	1	31,27 \pm 4,86 8,66 \pm 0,84	60,59 \pm 8,13 8,37 \pm 0,99	teste M-W p= 0,009 ns
Exploração Visual Duração (seg) Frequência	2	24,86 \pm 3,54 7,33 \pm 1,04	71,60 \pm 14,95 5,62 \pm 0,75	teste M-W p= 0,03 ns
Exploração Visual Duração (seg) Frequência	3	34,00 \pm 7,44 6,66 \pm 0,91	71,11 \pm 11,10 6,5 \pm 0,98	teste M-W p= 0,02 ns
Exploração Visual Duração (seg) Frequência	4	21,47 \pm 3,37 5,91 \pm 0,73	71,36 \pm 13,88 4,7 \pm 0,72	teste M-W p= 0,009 ns
Exploração Visual Duração (seg) Frequência	5	33,74 \pm 5,76 5,75 \pm 0,68	84,34 \pm 13,58 3,7 \pm 0,75	teste M-W p= 0,007 ns

Tabela 3. - Teste de Hipofagia Induzida por Novidade, **nos 600 segundos após a primeira bicada, por período**. Médias \pm EPM de duração e frequência do comportamento de exploração assoalho/grade, observado no teste, por período. seg= segundos.AP= ambiente padrão de laboratório (12), AE= ambiente enriquecido (8), p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney,ns= não significante, $p < 0,05$.

Comportamento	Período	AP	AE	p
Exploração assoalho/grade Duração (seg) Frequência	1	8,27 \pm 3,97 1,50 \pm 0,59	0,32 \pm 0,32 0,12 \pm 0,12	teste M-W p= 0,04 teste M-W p=0,03
Exploração assoalho/grade Duração (seg) Frequência	2	6,28 \pm 2,71 1,41 \pm 0,46	0,57 \pm 0,57 0,25 \pm 0,25	ns ns
Exploração assoalho/grade Duração (seg) Frequência	3	5,80 \pm 1,87 1,08 \pm 0,25	1,32 \pm 0,85 0,37 \pm 0,18	teste M-W p= 0,04 ns
Exploração assoalho/grade Duração (seg) Frequência	4	11,81 \pm 4,86 1,50 \pm 0,50	0,80 \pm 0,80 0,12 \pm 0,12	teste M-W p= 0,02 teste M-W p= 0,03
Exploração assoalho/grade Duração (seg) Frequência	5	12,89 \pm 4,93 1,58 \pm 0,41	0,92 \pm 0,92 0,12 \pm 0,12	teste M-W p= 0,01 teste M-W p= 0,007

Tabela 4. - Teste de Hipofagia Induzida por Novidade, **nos 600 segundos após a primeira bicada, por período.** Médias \pm EPM de duração e frequência do comportamento de locomoção, observado no teste, por período. seg= segundos. AP= ambiente padrão de laboratório (12), AE= ambiente enriquecido (8), p= valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney, ns= não significante, $p < 0,05$.

Comportamento	Período	AP	AE	p
Locomoção Duração (seg) Frequência	1	15,70 \pm 6,09 3,41 \pm 1,26	34,19 \pm 8,07 6,50 \pm 1,34	ns ns
Locomoção Duração (seg) Frequência	2	15,14 \pm 5,77 3,50 \pm 1,15	31,05 \pm 14,34 3,62 \pm 1,25	ns ns
Locomoção Duração (seg) Frequência	3	15,73 \pm 5,78 4,08 \pm 1,37	26,77 \pm 8,09 5,25 \pm 1,31	ns ns
Locomoção Duração (seg) Frequência	4	32,48 \pm 9,44 4,91 \pm 0,80	23,33 \pm 8,82 4,00 \pm 1,43	ns ns
Locomoção Duração (seg) Frequência	5	32,65 \pm 7,30 6,33 \pm 0,80	9,18 \pm 4,55 2,37 \pm 1,14	teste M-W p= 0,01 teste M-W p= 0,02

Tabela 5. Médias e erro padrão do tempo de imobilidade Tônica e número de tentativas, no AP e AE.

Variável	N	A.P	N	AE
IT (seg)	13	731,76 \pm 181,1	14	806,07 \pm 173,3
Tentativas (IT)	13	1,07 \pm 0,07	14	1,14 \pm 0,09

Tabela 6. Médias \pm EPM de células multipolares, bipolares e multipolares + bipolares nas regiões: lâmina lateral, lâmina medial e núcleo triangular do hipocampo.

Região do Hipocampo	Tipo de Célula	AP	N	AE	N
Lâmina Lateral	Multipolar	66,07 \pm 8,93	5	80,69 \pm 11,38	6
Lâmina Lateral	Bipolar	8,78 \pm 1,60	5	6,06 \pm 1,79	6
Lâmina Lateral	Multipolar + Bipolar	74,86 \pm 9,11	5	86,76 \pm 12,57	6
Lâmina Medial	Multipolar	2,13 \pm 0,98	5	0,42 \pm 0,42	6
Lâmina Medial	Bipolar	0,95 \pm 0,58	5	0,00 \pm 0,00	6
Lâmina Medial	Multipolar + Bipolar	3,08 \pm 0,86	5	0,42 \pm 0,42	6
Núcleo Triangular	Multipolar	0,35 \pm 0,35	5	5,11 \pm 2,30	6
Núcleo Triangular	Bipolar	0,67 \pm 0,41	5	0,58 \pm 0,37	6
Núcleo Triangular	Multipolar + Bipolar	1,03 \pm 0,70	5	5,70 \pm 2,51	6

AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido, N= número de animais por grupo.

Tabela 7. Médias \pm EPM de células multipolares, bipolares e multipolares + bipolares no Hiperpallium Apicale em animais alojados em AP e AE.

Região	Tipo de Célula	AP	N	AE	N
Hyperpallium Apicale	Multipolar	42,13 \pm 5,32	5	45,71 \pm 6,87	6
Hyperpallium Apicale	Bipolar	5,92 \pm 0,93	5	5,14 \pm 1,86	6
Hyperpallium Apicale	Multipolar + Bipolar	48,05 \pm 5,87	5	50,87 \pm 8,34	6

AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido, N= número de animais por grupo.

Tabela 8. Médias \pm EPM de células multipolares, bipolares e multipolares + bipolares no Estriado Medial e Estriado Lateral em animais alojados em AP e AE.

Região	Tipo de Célula	AP	N	AE	N
Estriado Medial	Multipolar	101,71 \pm 8,16	5	94,38 \pm 17,06	6
Estriado Medial	Bipolar	7,19 \pm 1,98	5	8,38 \pm 1,51	6
Estriado Medial	Multipolar + Bipolar	108,91 \pm 6,96	5	102,77 \pm 18,35	6
Estriado Lateral	Multipolar	93,68 \pm 7,83	5	92,11 \pm 17,06	6
Estriado Lateral	Bipolar	6,95 \pm 0,82	5	6,46 \pm 1,48	6
Estriado Lateral	Multipolar + Bipolar	100,64 \pm 8,59	5	98,58 \pm 17,32	6

AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido, N= número de animais por grupo.

Tabela 9. Médias \pm EPM de células multipolares, bipolares e multipolares + bipolares no Nidopallium Caudolaterale em animais alojados em AP e AE.

Região	Tipo de Célula	AP	N	AE	N
Nidopallium Caudolaterale	Multipolar	43,83 \pm 12,84	5	44,54 \pm 5,33	6
Nidopallium Caudolaterale	Bipolar	1,88 \pm 0,75	5	2,25 \pm 0,61	6
Nidopallium Caudolaterale	Multipolar + Bipolar	45,73 \pm 13,53	5	46,81 \pm 5,05	6

AP= ambiente padrão de laboratório, AE= ambiente enriquecido, N= número de animais por grupo