

Fernando Falkenburger Melleu

A influência do ambiente sobre a neurogênese pós-natal e comportamento defensivo em pombos (*Columba livia*).

Dissertação submetida ao Programa de pós-graduação em neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Neurociências
Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto
Co-orientadora: Prof. Dra. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M525i Melleu, Fernando Falkenburger
A influência do ambiente sobre a neurogênese pós-natal
e comportamento defensivo em pombos (*Columba livia*)
[dissertação] / Fernando Falkenburger Melleu ; orientador,
José Marino Neto. - Florianópolis, SC, 2012.
97 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Pombo - Comportamento. I. Marino
Neto, José. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

CDU 612.82

Dedico esse trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Dr. José Marino Neto e minha co-orientadora Dr^a Cilene Lino de Oliveira por toda a confiança e amizade que demonstraram para mim nesses últimos quatro anos.

Também devo um enorme agradecimento à professora Dr^a. Lucila Leico Kagohara Elias do departamento de ciências fisiológicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela a contribuição indispensável a esse trabalho e pela enorme ajuda com as dosagens hormonais aqui realizadas.

Aos meus colegas e ex-colegas de laboratório, Tiago Souza dos Santos, Fernanda Possamai, Martina Podolan, Juliano dos Santos, Carlos Fernando Crispim, Angeluz da Costa Canena, Natália Saretta Sulzbach e William Spudeit pela ajuda direta ou indireta que me deram no período desse trabalho. Em especial devo agradecer a Viviane de Souza que me ajudou muito com grande parte das análises dos dados comportamentais.

Fica aqui o meu obrigado aos grandes amigos de semi-imaginários: Felipe Zimmermann Homma, Thiago Rocha, Felipe Chiella, Cloé de Haro, Alexandre Schneider, Roberto Ceccato, Arthur Aquino, Bruno Perotti e Diogo Vanoli, que mesmo sem entender direito o que eu faço sempre acharam legal.

À minha família por ter me alojado em um ambiente enriquecido e por ter aturado durante os períodos de altos níveis de cortisol.

Finalmente, para Lucy, que me ajudou muito mais do que ela imagina!

*Reason, or the ratio of all we have already known,
is not the same that it shall be when we know
more. (William Blake, 1788)*

RESUMO

A exposição de roedores adultos a ambientes visualmente ou socialmente enriquecidos é acompanhada por mudanças neuroanatômicas, comportamentais e pelo aumento de neurônios novos formados no giro denteado do hipocampo. Mudanças hipocampais e comportamentais mediadas pelo ambiente também foram observadas em aves passeriformes, porém, em pombos adultos a distribuição de marcadores de neurogênese e as consequências comportamentais da exposição a diferentes ambientes não foi investigada. Vinte e quatro pombos adultos foram alojados em quatro diferentes condições ambientais por 40 dias. Após esse período esses animais foram submetidos ao teste comportamental de exposição a um ambiente desconhecido e apresentação a um objeto novo (ADON). Vinte e quatro horas após esse teste os animais foram submetidos ao teste de imobilidade tônica (IT) e perfundidos com PFA 4% duas horas após. Três pombos alojados em ambiente padrão receberam injeções i.p de BrdU e foram sacrificados 6 horas após. Os encéfalos de todos os animais foram retirados, seccionados e processados por imunistoquímica para a detecção de doublecortina (DCX), BrdU, NeuN e GFAP. Verificamos que a proteína DCX está presente em diversas regiões telencefálicas do pombo, incluindo zonas subventriculares, estriado medial, área septal e hipocampo. Através da análise morfológica, ausência de co-localização com NeuN e GFAP e localização regional de DCX/BrdU concluímos que células DCX+ constituem uma população de novos neurônios no encéfalo de pombos adultos. Pombos alojados em ambientes enriquecidos apresentaram maior número de células DCX+ hipocampais do que os animais alojados em ambientes do tipo padrão com isolamento social. A exposição ao ambiente socialmente enriquecido (AE+) diminuiu os níveis basais de corticosterona nesses animais, porém, acarretou em uma maior resposta hormonal ao teste de IT. Com exceção de um aumento dos parâmetros de imobilidade nos animais alojados em AE+, nenhuma alteração significativa pode ser observada nos comportamentos realizados no teste ADON. A DCX é um marcador válido para o estudo da neurogênese em pombos adultos e a exposição a diferentes ambientes é capaz de promover alterações morfológicas e comportamentais nesses animais.

Palavras-chave: Neurogênese, Comportamento Defensivo, Enriquecimento ambiental, *Columba livia*

ABSTRACT

The lodging of adult rodents in visually or socially enriched environments is accompanied by neuroanatomical and behavioral changes as well as an increase in the number of new neurons formed in the dentate gyrus of the hippocampus. Hippocampal and behavioral changes mediated by the environment were also observed in birds, however, in adult pigeons the distribution of marker of adult neurogenesis and the behavioral consequences of the exposure to different environments was not investigated. Twenty-four adult pigeons were lodged in four different environments for 40 days. After that period the animals were subjected to the behavioral test of exposure to a unknown environment with the presentation of a novel object (ADON). 24 h after ADON the pigeons were subjected to the tonic immobility test (IT) and perfused with PFA 4% two hours after the test. Three pigeons, lodged in standard lab conditions, received injected with BrdU and sacrificed 6h after. Brains from all animals were removed, sectioned and immunohistochemically processed to detect doublecortin (DCX), BrdU, NeuN and GFAP. We verified that the protein DCX is present in several telencephalic regions of the pigeon, including the subventricular zones, medial striatum, septal area and hippocampus. Analyzing the morphology and the absence of co-localization of with NeuN and GFAP and regional localization of BrdU/DCX, we conclude that DCX+ cells constitute a population of new neurons in the adult pigeon's brain. Pigeons lodge in enriched environment presented a higher number of DCX+ cells in the hippocampus when compared to birds in standard environments with social isolation. The exposure to a socially enriched environment (AE+) decreased the base levels of corticosterona in these animals; however, it caused a increase in the hormonal response to IT. With the exception of a increase of immobility in animals lodged in AE+, no significant alteration could be observed in other behaviors in the ADON test. The DCX is a valid marker for the study of neurogenesis in adult pigeons and the exposure to different environments is capable of promoting morphological and behavioral changes in these animals.

Keywords: Neurogenesis, Defensive behavior, Environmental enrichment, *Columba livia*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Condições de alojamento.....	39
Figura 2 - Teste de imobilidade tônica.....	41
Figura 3 - Desenho esquemático no hipocampo de pombos.	46
Figura 4 - Fotomicrografias dos controles positivos e negativos para as reações imunoistoquímicas para a detecção de DCX.....	50
Figura 5 - Desenhos esquemáticos de secções coronais do teléncéfalo de pombos.	53
Figura 6 - Distribuição de fibras e células DCX+ em regiões subventriculares do encéfalo de pombos.....	54
Figura 7- Distribuição de células e fibras DCX+ no bulbo olfativo e telencéfalo rostral.....	55
Figura 8 - Distribuição de células e fibras DCX+ em regiões paliais e hipocampo.....	56
Figura 9 - Imunofluorescência para dupla-marcação de DCX, NeuN e GFAP.....	57
Figura 10 - Imunofluorescência e distribuição de BrdU em animais tratados com injeções 2, 4 e 6 horas antes da perfusão.	60
Figura 11 - Efeito do ambiente sobre duração e frequência de Exploração visual, exploração visual angular, imobilidade e locomoção no teste do ambiente desconhecido.....	63
Figura 12- Efeito do ambiente sobre duração e frequência de Exploração visual, exploração visual angular, imobilidade e locomoção no teste de apresentação do objeto novo.....	66
Figura 13- Efeito do ambiente sobre duração e número de contenções no teste de imobilidade tônica.....	67
Figura 14- Efeito do ambiente sobre os níveis plasmáticos de corticosterona antes e após o teste de imobilidade tônica.....	69
Figura 15- Efeito do ambiente sobre o número médio de células DCX+ hipocampais.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Catálogo de categorias comportamentais registradas durante a exposição ao Ambiente Desconhecido e Objeto Novo (ADON)	42
Tabela 2 - Especificações e diluições dos anticorpos utilizados na imunistoquímica e imunofluorescência.	45
Tabela 3 - Grupo, número de animais, médias e erro padrão de duração e frequência e significância estatística dos comportamentos observados no teste do ambiente desconhecido.	64
Tabela 4 - Grupo experimental, número de animais, médias e erro padrão das médias das durações e frequências de cada uma das categorias comportamentais registradas durante a apresentação do objeto novo.	65
Tabela 5 - Grupo experimental, número de animais, médias e erro padrão das médias das durações de IT e do número de tentativas para se atingir o critério de IT.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AE - Ambiente enriquecido do biotério setorial
AE+ - Ambiente enriquecido do biotério central
ADON – Ambiente desconhecido e objeto novo
AP – Ambiente empobrecido do biotério setorial
AP+ - Ambiente empobrecido do biotério central
BDNF – Fator de neurotrófico derivado de cérebro
BrdU- 5-bromo-2-desoxiuridina
DCX – Doublecortina
EGF – Fator de crescimento epidérmico
FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblastos 2
FH – Formação hipocampal
GFAP – Proteína Fibrilar Glial Ácida
HVC – Núcleo vocal superior
ISRS – Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
IT – Imobilidade Tônica
NeuN – *Neuronal nuclei*
NPN – Neurogênese pós-natal

LISTA ABREVIATURAS NEUROANATÔMICAS

A - Arcopallium	M - Mesopallium
AD - Arcopallium dorsale	MCL – Camada mitral do bulbo olfativo
AI - Arcopallium intermedium	ml – Lâmina medial do “V” hipocampal
Bas - Nucleus basorostralis pallii	MSt - Estriado Medial
BSTL- Parte lateral do núcleo da stria terminalis	N - Nidopallium
CA - Comissura anterior	NCL -Nidopallium caudolaterale
CDL - Area corticoidea dorsolateralis	NCV -Nidopallium caudoventrale
CPi - Córtex piriforme	NFL - Nidopallium frontolaterale
CPP - Córtex prepiriforme	NFM -Nidopallium frontomediale
DL - Região dorsolateral do Hipocampo	NIL - Nidopallium intermedium lateralis
DM- Região dorsomedial do Hipocampo	NIM - Nidopallium intermedium medialis
E - Entopallium	OB - Bulbo olfativo
Ep - Epêndima	OM - Trato occipito-mesencefálico
EpB - Fibras endimárias	ON – Nervo olfativo
EPL – Camada plexiforme externa do bulbo olfativo	PoA - nucleus posterioris amygdalopalli
FPL – Fascículo prosencefálico lateral	psb – feixe de fibras da superfície pial
GL – Camada glomerular do bulbo olfativo	QF - tractus quintofrontalis
GP - Globus pallidus	rms – Via migratória rostral
HA - hyperpallium apicale	SL - Núcleo septal lateral
HD - hyperpallium densocellulare	SM - Núcleo septal medial
Hp - Hipocampo	SVZ1, 2 - Zonas subventriculares 1 e 2
IGrL – Camada glomerular interna do bulbo olfativo	TnA - nucleus taeniae amygdalae
Il – Lâmina lateral do “V” hipocampal	Tr – Núcleo triangular do “V” hipocampal
lms – via migratória lateral	
LSt – Estriado lateral	
VL – Ventrículo lateral	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. OBJETIVOS.....	33
1.1.1. Objetivos Específicos.....	33
1.2. ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. ANIMAIS.....	37
2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS AMBIENTES DE ALOJAMENTO.....	37
2.3. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	39
2.3.1. Exposição ao ambiente desconhecido e objeto novo (ADON).....	39
2.3.2. Imobilidade Tônica (IT).....	40
2.3.3. Dosagem de Corticosterona.....	41
2.4. EXPERIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS PARA LOCALIZAÇÃO DE DCX.....	42
2.4.1. Perfusão.....	42
2.4.2. Reações imunoistoquímicas.....	42
2.4.3. Reações de imunofluorescência.....	43
2.4.4. Ensaio de proliferação.....	44
2.5. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DCX+ HIPOCAMPAIS.....	46
2.6. TESTES ESTATÍSTICOS.....	46
3. RESULTADOS.....	49
3.1. DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DCX+ NO PROSENCÉFALO DE POMBOS ADULTOS.....	49
3.1.1. Controles.....	49
3.1.2. Regiões subventriculares e vias migratórias.....	49
3.1.3. Bulbo olfativo.....	52
3.1.4. Regiões Paliais.....	58
3.1.5. Hipocampo, Córtex piriforme e CDL.....	58
3.1.6. Núcleos da base, Área septal e Arcopallium.....	59
3.1.7. Experimentos de dupla marcação e distribuição de BrdU.....	59
3.2. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS AO ADON E OS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	62
3.2.1. Exposição ao ambiente novo.....	62
3.2.2. Apresentação do objeto novo.....	64
3.3. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS A CONTENÇÃO FÍSICA E OS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.....	67
3.3.1. Imobilidade Tônica.....	67
3.3.2. Níveis de corticosterona.....	68
3.4. OS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO SOBRE A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL.....	70

4. DISCUSSÃO.....	73
4.1. DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS E FIBRAS DCX+.....	73
4.2. EFEITOS DO AMBIENTE SOBRE A DCX+ HIPOCAMPAL, COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E NÍVEIS DE CORTICOSTERONA.....	77
5. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A.....	94

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da estrutura do DNA (WATSON e CRICK, 1953) e dos genes como base fundamental dos mecanismos de herança dos organismos vivos, existe o debate sobre a real contribuição genética no desenvolvimento de certas funções encefálicas e sua consequente importância para a determinação dos comportamentos desses organismos. Isto é, o quanto do repertório comportamental de uma espécie é determinado pela sua “programação” genética e qual a contribuição do ambiente para modular estruturas encefálicas modificando, criando ou suprimindo comportamentos. Em grande parte, o conceito de que a experiência sensorial adquirida do ambiente no qual um organismo está inserido poderia modificar respostas neurofisiológicas foi primeiro postulado por Hebb em 1949, e deu origem ao conceito moderno de plasticidade neural no cérebro pós-natal. Hebb acreditava que quando uma célula excitasse repetidamente outra, eventuais mudanças poderiam ocorrer tornando a comunicação entre essas células mais eficientes (HEBB, 1949). Hebb também foi um dos primeiros a propor um conceito de “enriquecimento ambiental” baseando-se na observação de mudanças comportamentais em camundongos (*Mus musculus*) criados como animais de estimação comparados com camundongos criados em laboratório (HEBB, 1947). Porém, devido às dificuldades existentes para a qualificação e quantificação de mudanças promovidas por fatores ambientais, em um primeiro momento, a contribuição genética foi amplamente aceita como determinante do desenvolvimento encefálico (SALE et al., 2009). Foi apenas na década de 1960 que pesquisas nessa área passaram a considerar que a construção e manutenção dos processos encefálicos poderiam ser dependentes de experiência e da interação do organismo com seu o ambiente e não inteiramente determinada por fatores genéticos e do desenvolvimento embrionário.

Em seus experimentos clássicos, David Hubel e Torsten Wiesel, demonstraram que gatos (*Felis catus*) juvenis submetidos à oclusão de um dos olhos, apresentavam modificações neuroanômicas e eletrofisiológicas no córtex visual primário. Enquanto as células que respondiam ao olho aberto aumentavam em número e potencial de respostas eletrofisiológicas, os autores notaram uma diminuição no número e resposta de células relacionadas ao olho fechado. Todavia, quando gatos adultos eram submetidos ao mesmo experimento essas modificações não podiam ser vistas (HUBEL e WIESEL, 1963). Esse trabalho rendeu aos dois pesquisadores o prêmio Nobel de Fisiologia em

1981 e foi responsável por consolidar a idéia de que dentro de um período crítico, privações sensoriais podem desencadear modificações pós-natais em estruturas encefálicas.

Em contrapartida, em 1966, Rosenzweig e colaboradores introduziram o enriquecimento ambiental como um conceito testável em laboratório. Em seus primeiros estudos com roedores alojados em ambientes com estímulos visuais os autores analisaram parâmetros simples, tais como, peso total do encéfalo, espessura cortical e quantidades totais de enzimas e RNA. Além de demonstrarem alterações desses parâmetros quando comparados com animais vivendo em ambiente padrão de laboratório, esses trabalhos também mostraram que animais alojados em ambientes enriquecidos apresentavam melhora na realização de tarefas cognitivas. (ROSENZWEIG, 1966; ROSENWIEG e BENNET, 1969; ROSENWIEG e BENNET, 1996).

Atualmente, o conceito de enriquecimento ambiental é definido como uma combinação de estimulação visual inanimada, estimulação social e estímulos motores que contribuam para o aumento da atividade física espontânea dos indivíduos. Porém, podem ser encontrados diversos trabalhos na literatura que consideram como enriquecimento ambiental o oferecimento de apenas uma dessas variáveis aos animais (e.g., apenas enriquecimento social). Esses modelos de enriquecimento ambiental podem variar também com relação ao tempo de exposição dos animais a esses ambientes e à idade em que esses animais são introduzidos ao ambiente (Para revisão ver: VAN PRAAG, 2000). Existem diversas dificuldades para se determinar o quanto um ambiente é de fato enriquecido. Não é incorreto pensar que um ambiente enriquecido é apenas um método de eliminar o “empobrecimento” das condições padrão de laboratório às quais esses animais são submetidos. Existem razões lógicas para concluir que nenhum ambiente artificial e relativamente controlado pode ser comparado com a quantidade de estímulos, sejam esses considerados como “bons” ou “nocivos”, proporcionado pelo ambiente natural. Um bom exemplo para esse argumento foram os experimentos realizados com aves capturadas em ambiente natural e que receberam uma dose de ^3H -Timidina. Enquanto algumas dessas aves foram soltas no mesmo ambiente outras foram submetidas às condições padrão de laboratório. Após seis semanas as aves soltas foram recapturadas e foi demonstrado que a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo desses animais era superior àquelas que foram submetidas ao ambiente padrão durante esse período (BARNEA e NOTTEBOHM, 1994). Rosenzweig e colaboradores, também observaram que esquilos (*Spermophilus belding*) capturados em seu

habitat natural apresentavam volumes corticais maiores do que aqueles observados em indivíduos da mesma espécie alojados em ambiente padrão, e até mesmo em ambientes enriquecidos de laboratório (ROSENZWEIG et al., 1979 apud ROSENZWEIG, 2007). Porém, de uma maneira geral diversos trabalhos têm demonstrado com sucesso modificações morfofisiológicas, comportamentais e moleculares em animais alojados em ambientes com algum tipo de estímulo enriquecido.

Utilizando esses modelos, diversos trabalhos em roedores demonstraram que a exposição a ambientes enriquecidos promove alterações anatômicas significativas no encéfalo desses animais. Diamond e colaboradores (1966) verificaram um aumento na espessura cortical e aumento no número de astrócitos em ratos (*Rattus norvegicus*) criados em ambientes enriquecidos. Também puderam ser observados rearranjos sinápticos e aumento de arborização dendrídica no hipocampo de animais expostos a um ambiente com estímulos visuais por um período de 60 dias (GALIMBERTI et al., 2006). A exposição a ambientes visualmente e socialmente enriquecidos também foi capaz de atenuar processos apoptóticos espontâneos e de diminuir episódios convulsivos promovido pela administração central de MPTP, sugerindo um possível efeito neuroprotetor (YOUNG et al., 1999). Todavia, esse efeito neuroprotetor não pode ser observado no hipocampo de ratos expostos a um ambiente enriquecido por seis semanas e submetidos a processos de isquemia cerebral. (GOBBO e O'MARA, 2004). Ainda, camundongos (C57BL6) mantidos em isolamento apresentaram diminuição significativa dos comportamentos exploratórios e aumento dos níveis plasmáticos basais de corticosterona (ARNDT et al., 2009).

Ambientes enriquecidos também parecem apresentar um importante papel na regulação da neurogênese presente no encéfalo de vertebrados adultos.

A neurogênese pós-natal (NPN) foi primeiramente observada por Altman (1962) em experimentos com administração de ³H-timidina em ratos adultos. Altman demonstrou a presença de grânulos marcados pela ³H-timidina no giro denteado do hipocampo desses animais, o que sugeria, ao contrário do que se acreditava até então, que novos neurônios estavam sendo constantemente formados em áreas corticais de mamíferos adultos (ALTMAN, 1962). Esse conceito só foi de fato aceito após a posterior confirmação de que esse era um processo existente também em canários adultos (*Serinus canaria*) (NOTTEBOHM, 1981). Nos anos subsequentes, a NPN foi observada em quase todos os grupos de vertebrados e invertebrados (Para revisão ver: LINDSEY e TROPEPE, 2006) e foi caracterizada como um

processo que envolve: a) divisões simétricas e assimétricas de células progenitoras localizadas em regiões discretas do encéfalo adulto, b) a diferenciação dessas células em neurônios ou células gliais, c) a migração celular, e, no caso de neurônios, d) a incorporação dessas novas células em circuitos funcionais. Essas etapas da NPN estão presentes, e parecem ser um caráter conservado em todos os grupos de vertebrados.

Em peixes teleósteos adultos novos neurônios parecem ser formados em todo o telencéfalo, tecto óptico, hipotálamo e cerebelo (MARCUS et al., 1999; VON KROUGH et al., 2010). Estudos em répteis, e em menor número em anfíbios, observaram a formação de novos neurônios em regiões subventriculares (em ambos os grupos) e em regiões como o epitélio olfativo e tecto óptico (em anfíbios) (LINDSEY e TROPEPE, 2006).

Novos neurônios foram também observados em regiões subventriculares de aves adultas, porém, esses neuroblastos parecem apresentar padrões de migração e distribuição mais ampla estando presente em regiões como o caudado-putâmen, hipocampo e, no caso de Passeriformes Oscinos (Pássaros cantores), em áreas relacionadas ao controle e aprendizado do canto, como o centro vocal superior (HVC) e Área X (NOTTEBOHM, 1981; ALVAREZ-BUYLLA e KIRN, 1997; BOSERET et al., 2007; BALTHAZART et al., 2008). Outra peculiaridade desses passeriformes é que a essa formação e incorporação de novos neurônios em núcleos de controle do canto parece ser dependente do sexo dessas aves e intimamente ligada à sazonalidade reprodutiva (NOTTEBOHM, 1981). Em machos dessas espécies a NPN parece ser um processo necessário para a aquisição e controle de novos padrões de canto durante a época reprodutiva. Níveis de testosterona, ou fatores ambientais como fotoperíodo ou privação sensorial auditiva parecem influenciar no número de novos neurônios que são gerados e incorporados no HVC desses pássaros (BOSERET et al., 2007; PYTTE et al., 2010).

A NPN, de mamíferos parece ser muito menos exuberante do que a observada nos demais vertebrados, estando restrita a duas regiões prosencefálicas: à zona subventricular do ventrículo lateral e à zona granular do giro denteado do hipocampo. Nesse grupo, neurônios formados na zona subventricular migram pela via de migração rostral (rms) e incorporam-se no bulbo olfatório. Os neurônios novos da zona subgranular do giro denteado incorporam-se na zona granular do mesmo. Este mesmo padrão pode ser observado tanto em roedores, como ratos (ALTMAN e DAS, 1965; KUHN et al., 1996;

STRANAHAN et al., 2006) e camundongos (KEMPERMANN et al., 1997; BROWN et al., 2003; SANTARELLI et al., 2003; MASLOV et al., 2004), como em primatas, como macaco rhesus (*macaca mulata*) (KORNACK e RAKIC, 2001) e humanos (BÉDARD e PARENT, 2004). A NPN de mamíferos parece ser sensível a influência do ambiente (e.g., KEMPERMANN, 1997).

Kempermann e cols. observaram um aumento significativo no número de células novas presentes no giro denteado de camundongos adultos expostos a um ambiente enriquecido (KEMPERMANN, 1997). Ainda em roedores, se mostrou que o ambiente enriquecido é capaz de modular comportamentos tipicamente relacionados com a função hipocampal (e.g., aprendizado e memória). Animais alojados em ambiente enriquecido apresentam aumento da capacidade de aprendizado e redução dos déficits de memória causados pela senescência. (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006). A exposição a ambientes enriquecidos, também parece atenuar o impacto causado por novidades visuais (CAIN et al., 2006) e aumentar a duração de comportamentos exploratórios de ratos no teste do campo aberto (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

Em outro estudo, Stranahan e cols. observaram que ratos alojados coletivamente e com acesso a roda para corrida (tendo maiores níveis de atividade física) apresentavam um aumento no número de neurônios novos no giro denteado do hipocampo quando comparados ao controle sem a roda para corrida. Porém, o mesmo efeito não pode ser observado em ratos com acesso a roda para corrida mantidos em isolamento (STRANAHAN et al., 2006). Esses resultados sugerem que diferentes tipos de enriquecimento podem levar a diferentes respostas comportamentais ou morfológicas. Ainda em murédeos (ratos e camundongos), a exposição a ambientes física, ou socialmente enriquecidos, atenua respostas neuroendócrinas e comportamentais ao estresse e promove o aumento da expressão de fatores neurotróficos, como BDNF, EGF e FGF-2, necessários para regulação positiva de células progenitoras nos estágios iniciais da neurogênese hipocampal (CIRULLI et al., 2010; BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004).

O hipocampo de mamíferos está envolvido em uma série de fenômenos como a aprendizagem, a memória, a navegação espacial e o controle de respostas neuroendócrinas a estímulos desafiadores. Estas funções hipocampais, por sua vez, parecem ser afetadas pela NPN e, portanto, pelas consequências do ambiente sobre a mesma. Por exemplo, o hipocampo exerce inibição tônica sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (em uma alça de retroalimentação inibitória que controla os

níveis de corticosteróides), e, portanto, participa do controle das respostas endócrinas e comportamentais ao estresse. O aumento da concentração de glicocorticóides no plasma, desencadeado por estresse prolongado, privação de sono ou inflamações encefálicas provoca intensa morte celular no hipocampo e acarreta na perda de funções cognitivas e modificação de respostas emocionais (SAPOLSKY, 1987; JACOBSON e SAPOLSKY, 1991). Em contrapartida, o aumento das concentrações de corticosteróides plasmáticos provocados por estresse inibem a NPN hipocampal (LUCASSEN et al., 2010; MIRESCU et al., 2004; CAMERON e GOULD, 1994; TANAPAT et al., 2001; MALBERG e DUMAN, 2003; DE KLOET et al., 2005), enquanto a exposição a ambientes enriquecidos aumenta o número de células novas no giro denteado do hipocampo e diminui significativamente a imobilidade no teste do nado forçado, um comportamento sensível a ação de drogas antidepressivas em roedores (LLORENS-MARTÍN, 2007).

De maneira semelhante ao que acontece em animais alojados em ambientes enriquecidos, a administração de drogas antidepressivas como os inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), também são capazes de modificar a expressão de comportamentos e aumentar o número de células novas no hipocampo de roedores (MALBERG et al., , 2000; MANEV et al., 2001; MALBERG e DUMAN, 2003, SANTARELLI et al., 2003). O aumento do número de células novas do hipocampo, seja ele mediado pelo ambiente ou pela administração de fármacos antidepressivos, parece estar relacionado ao efeito destas manipulações sobre o comportamento. Por exemplo, caso a neurogênese pós-natal seja abalada (e.g. por meio de irradiação do DG com raios-X), os efeitos dos antidepressivos sobre determinados comportamentos também deixam de ser observados nesses animais (SANTARELLI et al., 2003).

O efeito do ambiente sobre modificações neuroanatômicas, neuroendócrinas, comportamentais e na neurogênese pós-natal também pode ser observado nos demais grupos de vertebrados. Em peixes (paulistinha, *Danio rerio*) alojados por duas semanas em aquários com enriquecimento visual, quando comparados a animais alojados em ambiente padrão, apresentaram um maior número de neurônios novos em diversas áreas telencefálicas, exibindo também maiores níveis de cortisol após serem submetidos a um estresse agudo (VON KROGH et al., 2010). Em galinhas (Galiformes: *Gallus gallus*), mantidas em dois ambientes sociais, foram encontradas diferenças significativas no número de fibras serotoninérgicas e volume da região dorsomedial do

hipocampo quando em comparação a animais isolados (PATZKE et al., 2009). Em mandarins (Passeriformes:*Taeniopygia guttata*) adultos submetidos ao isolamento social ou à lesão coclear, observou-se diminuição de células novas em núcleos relacionados a comportamentos de canto (e.g., o núcleo vocal superior, HVC), porém, não foram encontradas alterações no número de neurônios novos no hipocampo (BARNEA et al., 2006). Alterações hipocâmpais foram observadas em *Parus palustris*, passeriformes que procuram, escondem e recuperam alimento após períodos prolongados. Animais privados deste comportamento natural apresentaram menor volume hipocâmpal do que animais da mesma espécie alojados em um ambiente propício à procura e armazenamento de alimentos (CLAYTON e KREBS, 1994).

A formação hipocâmpal (FH) de aves, assim como o de mamíferos, parece estar relacionada com funções de navegação, memória espacial e aprendizado (REINER et al., 2005). Deve ser notado que embora a FH de aves seja considerada homóloga à de mamíferos (em razão de conexões, embriogênese e funções similares), a citoarquitetura e neuroquímica observada em aves não permite a identificação de regiões comparáveis, por exemplo, ao giro denteado ou aos cornos de Ammon observados em mamíferos (COLOMBO e BROADBENT, 2000; REINER et al., 2005).

Lesões hipocâmpais em *Parus atricapillus* (Passeriformes) acarretam perda severa da memória e capacidade de localização (HAMPTON e SHETTLEWORTH, 1996). Em pombos-correio, a formação hipocâmpal é responsável pela memória e localização de pontos de referência no terreno o que permite o retorno do animal ao local de criação (*Homing*) (GAGLIARDO et al., 1999). Também em pombos verificou-se que o hipocampo está associado à memória aversiva condicionada (REIS et al., 1999).

O hipocampo desempenha um importante papel na expressão de comportamentos defensivos em mamíferos, e diversas evidências sugerem que alterações nos níveis de corticosterona em aves estejam ligados a alterações das funções hipocâmpais de memória espacial e de estocagem de alimentos (SALDANHA et al., 2000; PRAVOSUDOV, 2003; HODGSON et al., 2007). Porém, ainda não está claro se a FH de aves atua da mesma forma sobre comportamentos defensivos não condicionados. É interessante notar que muitos desses estudos puderam identificar que a ação de glicocorticóides sobre a atividade hipocâmpal parece ser uma curva do tipo U-invertido. Ou seja, doses moderadamente altas de corticosterona acarretam em aumento da capacidade de memória e doses muito elevadas ou muito baixas causam

iminuição da atividade hipocampal (PRAVOSUDOV, 2007). Como em mamíferos, a secreção de adrenocorticóides em aves, parece estar intimamente ligada com as funções hipocampais, porém, pouco se sabe sobre o papel da FH na inibição tônica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal neste grupo.

Levantam-se muitas hipóteses sobre os mecanismos pelos quais fatores ambientais influenciariam modificações neurofisiológicas, neuroquímicas e neuroanatômicas e sobre as possíveis implicações funcionais e evolutivas desses processos. Mecanismos epigenéticos, como metilações e acetilações de DNA mediados por fatores ambientais, vem sendo propostos como responsáveis pelas modificações neurais observadas em animais alojados em ambientes enriquecidos. Esses animais apresentam aumento significativo de fatores neurotróficos, além de aumento da expressão encefálica de histonas H2 e H3, responsáveis pela heterocromatinização do DNA (FISCHER et al., 2007). Outras modificações comportamentais, principalmente associadas à formação de memória, também foram observadas sendo acompanhadas por alterações de padrões de metilação de DNA (KEVERNE e CURLEY, 2008). Também foi observado que os ambientes socialmente enriquecidos favorecem a neurogênese e incorporação de interneurônios no bulbo olfatório de ratos, favorecendo a interação social e reconhecimento dos indivíduos do grupo (GHEUSI et al., 2009; SNYDER et al., 2005). Pelo menos para as observações em roedores, uma possível explicação evolutiva para essa associação ambiente/neuroplasticidade seja que em ambientes estressantes, com alta predação tenha-se elevações de glicocorticóides, diminuindo a neurogênese hipocampal e por sua vez desencadeando comportamentos tipo ansiosos e diminuição de comportamentos exploratórios. O contrário aconteceria em ambientes de “alta recompensa” onde haveria um aumento da neurogênese, e da atividade cognitiva e o favorecimento de comportamentos exploratórios e do tipo ansiolítico (GLASPER et al., 2012).

A expressão comportamental e a neurogênese pós-natal de aves parecem ser especialmente sensíveis à influência ambiental. Alterações na quantidade de células formadas em resposta às tarefas impostas pelo ambiente (e.g., procurar e esconder alimentos e navegação) e à sazonalidade (SANDANANDA, 2004) têm sido observadas. Até onde se pode observar nos grupos de aves estudados, a NPN é mais ampla em quantidade e variada em relação a vias migratórias e posicionamento final de neurônios novos (GARCÍA-VERDUGO et al., 2002; KIM et al., 2006; BOSERET, et al., 2007). Outro ponto importante para o presente

trabalho reside no fato de que a maioria dos estudos sobre a NPN em aves, e sua regulação, está concentrada em Passeriformes Oscinos. Estes animais muito provavelmente não são representativos para a Classe Aves como um todo. A neurogênese em Oscinos está concentrada em áreas relevantes ao controle do canto, ou seja, um caráter taxa-específico presente apenas nessa família. É de consenso entre taxonomistas que, Passeriformes em geral, representam a ordem mais recente, derivada e apomórfica de Neornithes (aves modernas) (LIVEZEY e ZUSI, 2007). A investigação de caracteres regulatórios da NPN que sejam filogeneticamente conservados (e relevantes para a classe em particular ou para os vertebrados em geral) deve, portanto, ser realizada em ordens de Aves menos derivadas.

Pombos domésticos (Columbiformes) são dotados de grande capacidade de memória, navegação espacial, cognição e habilidade de aprendizado, e tem sido investigados por diversos estudos comportamentais, neuroquímicos e neuroanatômicos (BINGMAN et al., 2006; MEHLHORN AND REHKÄMPER, 2009; NAKAMURA et al., 2011; REINER et al., 2004; SOUZA et al., 2009). Ainda, estes animais representam um bom sujeito 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 Passeriformes Oscinos.

Sendo assim, uma investigação dos efeitos ambientais sobre a neurogênese e comportamentos defensivos em pombos pode contribuir para a melhor compreensão dessa regulação, não apenas para as demais ordens de aves, mas também para o melhor entendimento desses processos nos demais vertebrados.

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo examinar a distribuição de neurônios novos no prosencéfalo de pombos adultos (*Columba livia*), sua correlação com os comportamentos defensivos nesta espécie e sua regulação por fatores ambientais.

1.1.1. Objetivos Específicos

- a) Descrever as regiões encefálicas envolvidas no processo de neurogênese em pombos adultos através da distribuição da imunoreatividade à proteína Doublecortina.
- b) Descrever as regiões proliferativas no encéfalo de pombos adultos através de ensaios de proliferação utilizando a administração de BrdU.
- c) Caracterizar e descrever a população de células presentes em regiões neurogênicas do encéfalo de pombos adultos.
- d) Correlacionar a neurogênese do prosencéfalo do pombo adulto com seus comportamentos de defesa.
- e) Verificar a influência do ambiente sobre a regulação da neurogênese, comportamentos defensivos e níveis de corticosterona em pombos adultos.

1.2. ESTRATÉGIA DE AÇÃO

Para a investigação dos efeitos do ambiente sobre comportamentos defensivos e neurogênese hipocampal em aves, vinte e quatro pombos adultos foram alojados em 4 diferentes condições ambientais, sendo duas em ambiente interno de laboratório com luminosidade e temperatura controlados artificialmente e dois ambientes localizados ao ar livre no biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, onde tais parâmetros não eram controlados. Nesses dois grupos, foram criadas situações ambientais enriquecidas e situações ambientais em que os animais eram mantidos isolados. Os animais alojados nos ambientes de laboratório foram retirados dos viveiros do biotério central (BC) e mantidos em condições laboratoriais por 40 dias, enquanto os animais mantidos no BC permaneceram nessa condição desde seu nascimento ou foram isolados também por 40 dias em gaiolas ao ar livre. Para verificar a expressão de comportamentos defensivos e a influência do ambiente sobre estes, após o período de “enriquecimento” ou “empobrecimento” ambiental, os animais foram submetidos ao teste de introdução a um ambiente desconhecido e apresentação de uma novidade visual (objeto novo). Vinte e quatro horas após esses testes, os pombos foram submetidos ao teste de imobilidade tônica e aqueles alojados em ambientes do BC tiveram amostras de plasma retiradas para dosagem de glicocorticóides para avaliação de suas respostas hormonais ao estresse do teste.

Duas horas após o teste de imobilidade tônica os animais foram sacrificados e tiveram seus encéfalos retirados para serem processados por imunistoquímica.

Para avaliar a influencia ambiental sobre a neurogênese, primeiramente, fizemos uma descrição geral da distribuição da proteína Doublecortina (DCX) que 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). 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). Essa distribuição foi fundamental uma vez que não existem na literatura trabalhos demonstrando a presença da DCX no encéfalo de pombos adultos. Realizamos também experimentos imunistoquímicos de dupla-marcação da DCX associada com outros marcadores como o NeuN (marcador de neurônios maduros; MULLEN et al., 1992; WOLF et al., 1996) e GFAP (cuja expressão está limitada a astrócitos; SOFRONIEW e VINTERS, 2010) para excluir a possibilidade da DCX em pombos também se encontrar expressa por neurônios maduros, ou astrócitos ou em células do tipo B (ALVAREZ-BUYLLA, 1998).

Finalmente, administramos 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, incorporado ao DNA durante a fase “S” do ciclo celular, em três animais alojados em ambiente padrão de laboratório. Esses animais foram sacrificados, tiveram seus encéfalos retirados e processados para imunistoquímica para detecção de BrdU, visando confirmar a existência de progenitores e divisão celular no encéfalo de pombos adultos.

Elegemos a região do hipocampo ventral do encéfalo do pombo, para realizar a quantificação desses neurônios novos (DCX+) em animais alojados nos diferentes ambientes, uma vez que em mamíferos o ambiente aparenta influenciar tanto a neurogênese hipocampal quanto comportamentos defensivos (MALBERG e DUMAN, 2003; SANTARELLI et al., 2003)

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

No decorrer deste trabalho foram utilizados pombos adultos de ambos os sexos com peso corporal de 420g a 500g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos 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.

2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS AMBIENTES DE ALOJAMENTO

Para avaliar a influência ambiental sobre os comportamentos defensivos e sobre a neurogênese, os animais utilizados neste trabalho foram alojados por 40 dias em quatro ambientes distintos: Ambiente empobrecido (AP) e Ambiente Enriquecido (AE) no biotério setorial e Ambiente empobrecido (AP+) e Ambiente Enriquecido (AE+) no biotério central.

a) Biotério Setorial: Alojamento em ambiente empobrecido (AP)

Os animais mantidos em AP (n=6) foram alojados no biotério setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada (temperatura entre 22-24°C e ciclo claro-escuro de 12:12 horas-luzes ligadas às 7:00h) em gaiolas individuais (50cm x 50cm x 50cm) sem contato visual entre seus vizinhos. As gaiolas continham 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 eram limpas, e os forros de jornal trocados. Também três vezes por semana os bebedouros e comedouros eram lavados e repostos com água e comida.

b) Biotério setorial: Alojamento em ambiente enriquecido (AE)

Animais mantidos no grupo AE (n=6) foram alojados em gaiolas individuais (70cmX70cmX40cm) com contato visual com seus vizinhos. As gaiolas continham dois poleiros em alturas diferentes, 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*. Dentro de todas as gaiolas foram colocados objetos triangulares e cilíndricos coloridos, bolas de isopor branco e canos de PVC no assoalho, contas plásticas coloridas penduradas. Flores plásticas coloridas foram colocadas próximas aos comedouros presas às grades laterais das gaiolas. Três vezes por semana as gaiolas eram limpas, e os forros de jornal trocados, os bebedouros e comedouros eram lavados e repostos com água e comida. Nos dias de limpeza das gaiolas todos os objetos eram retirados, limpos e devolvidos às mesmas em posições aleatórias.

c) Biotério central: Alojamento em ambiente empobrecido (AP+)

Os animais mantidos em AP+ (n=6) foram alojados em gaiolas de (50cm X 50cm X 50cm) sem contato visual com seus vizinhos. As gaiolas estavam localizadas no andar superior do prédio que abriga os viveiros do biotério central. Cada gaiola contém duas faces de alvenaria e duas fechadas por grades, uma voltada para área interna do prédio e outra para o ambiente externo. O ciclo claro/escuro e temperatura não foram regulados artificialmente estando disposto às condições naturais do ambiente externo. Aos animais eram 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 foi realizada a reposição da água e ração oferecida aos animais. Todos os procedimentos de manutenção e cuidado dos animais foram de responsabilidade dos funcionários do biotério central

d) Biotério central: Alojamento em ambiente enriquecido (AE+)

Os animais mantidos em AE+ (n=6) foram alojados nos viveiros de criação do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. O biotério central dispõe de três viveiros (4m X 2m X 2 m) 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 existe um grande número de poleiros e podem alojar até 15 pombos, de ambos os sexos, e em idade adulta. A área das gaiolas permite pequenos vôos e interações sociais entre os animais. O ciclo claro/escuro e temperatura não são regulados artificialmente estando disposto às condições naturais do ambiente externo. Aos animais eram 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 foi realizada a reposição da água e ração oferecida aos animais.

Todos os procedimentos de manutenção e cuidado dos animais foram de responsabilidade dos funcionários do biotério central.



Figura 1. Condições de alojamento. A) e B) pombos alojados no Biotério Setorial. A) pombo alojado em ambiente empobrecido (AP) e B) pombos alojados em ambiente enriquecido (AE). C) e D) pombos alojados no Biotério Central. C) pombo alojado em ambiente empobrecido (AP+) e D) pombos alojados em ambiente enriquecido (AE+).

2.3. TESTES COMPORTAMENTAIS

2.3.1. Exposição ao Ambiente Desconhecido e Objeto Novo (ADON)

Os animais foram retirados, um a um, de seus respectivos ambientes de alojamento e transportados a uma sala separada, isolada acusticamente e iluminada por luz artificial branca onde estava localizada a arena de testes que consistia de um aquário retangular de vidro (80cmx50cmx30cm), coberta por uma grade na parte superior. Três das paredes da arena, bem como o assoalho, foram pintados com tinta acrílica branca enquanto a parede frontal foi deixada transparente para possibilitar os registros comportamentais a partir de vídeos capturados por uma câmera digital acoplada a um computador posicionada a 60 cm

do ambiente de teste. Os animais foram colocados no centro da arena dando início à primeira parte do teste. Após 15 min. de exposição ao ambiente desconhecido, era introduzido por meio de uma corda, um cilindro de espuma amarela de 20 cm de altura e 8 cm de diâmetro pintado com listras transversais vermelhas, pretas e brancas. Este objeto era mantido na arena por outros 15 min., nos quais os vídeos continuaram a ser capturados. Ao todo, o teste da exposição ao ambiente desconhecido/objeto novo possui 30 minutos de duração. Ao final deste período os animais foram retirados da arena e devolvidos aos seus locais de alojamento. Após a retirada do animal, a arena era limpa com álcool 70% e toalhas de papel, preparando assim a mesma para receber outro animal.

Os vídeos captados durante os experimentos foram posteriormente avaliados através de um software produzido em nosso laboratório (Ethowatcher®; CRISPIM et al., 2012) 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, frequência e duração (totais e segmentadas por unidade de tempo) de cada categoria. Para a descrição dos comportamentos desencadeados pela exposição dos animais ao ambiente desconhecido/Objeto novo foram utilizados o tempo total e a frequência de cada comportamento durante os primeiros 15 min. do teste e os 15 min. subsequentes. O catálogo comportamental utilizado para a análise dos vídeos (adaptado de SOUZA et al., 2009) encontra-se na tabela 1.

2.3.2. Imobilidade tônica (IT)

Um a um, os animais foram retirados de seus respectivos ambientes, cobertos por um pano escuro e transportados até uma sala iluminada artificialmente por uma luz branca. Dentro da sala, o pano foi retirado e o animal foi posicionado em decúbito dorsal sobre um suporte em formato de quilha forrado com tecido, localizado no centro de uma arena cilíndrica (80cm de altura por 30cm de altura). (Fig. 2 A). Ainda em decúbito dorsal, os animais foram contidos manualmente tendo suas asas levemente imobilizadas e suas cabeças cobertas pelas mãos do experimentador (Fig. 2 B). Esta contenção teve a duração de aproximadamente 30 segundos e após esse período os animais foram liberados. A resposta de imobilidade de cada animal foi quantificada quanto a sua duração em segundos e número de contenções necessárias para desencadear a resposta (Fig. 2 C). O tempo máximo de duração da

imobilidade permitido durante o teste foi de 12 minutos e apenas respostas de mais de 10 segundos foram consideradas como válidas para o teste. Cada animal foi submetido ao máximo cinco contenções (tentativas) para obter a imobilidade tônica (superior a 10 segundos). Os animais que não apresentaram imobilidade após essas cinco tentativas foram considerados refratários ao teste. Ao final de cada teste, a arena era limpa com álcool 70% e toalhas de papel, o forro de tecido das quilhas era removido e trocado, preparando a arena para um novo teste com o animal seguinte.



Figura 2. Teste de imobilidade tônica. A) Arena com calha para realização da IT. B) Contenção manual do animal. C) Animal em decúbito dorsal expressando o comportamento de imobilidade tônica.

2.3.3. Dosagem de Corticosterona

Para as dosagens de níveis plasmáticos de corticosterona foram obtidas duas amostras de sangue de cada animal pertencentes aos grupos AP+ (n=6) e AE+ (n=6). As amostras foram coletadas da veia alar esquerda (medida basal) e direita (pós-IT). A primeira amostra foi coletada 3 a 5 min antes da realização do teste de IT para determinar os níveis basais de estresse do animal (ROMERO e WIGFIELD, 2001). A segunda amostra foi coletada imediatamente após o teste da IT. As coletas foram realizadas utilizando agulhas descartáveis (BD insulínica 1ml com agulha BD 0,45 x 13) e armazenas em tubos plásticos heparinizados. As amostras foram centrifugadas (10min; 3000rpm), o plasma retirado e armazenado a -24°C . Os níveis de corticosterona circulante foram determinados por método de radioimunoensaio conforme descrito por Vecsei (1979), utilizando anticorpo anti-corticosterona (Sigma) preparado em coelhos e corticosterona-[1,2-3(H)] (New England Nuclear) como hormônio marcado.

Tabela 1: Catálogo de categorias comportamentais registradas durante a exposição ao Ambiente Desconhecido e Objeto Novo (ADON)

Comportamento	Descrição
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 VISUAL ANGULAR	O animal, de olhos abertos, com uma ou duas patas fixas do assoalho, apresenta rotações da cabeça no eixo laterolateral ou rostro-caudal, sem nenhuma alteração da angulação do pescoço (sem tocas em objetos com o bico).
LOCOMOÇÃO	O animal retira uma pata por vez do contato com o assoalho da arena percorrendo uma distância linear. Também foi considerada locomoção pequenos pulos em uma dada direção.
IMOBILIDADE	O animal fica com uma ou duas patas fixas ao assoalho, com a postura totalmente ereta, com os olhos totalmente abertos e sem executar qualquer movimento com a cabeça.

2.4. EXPERIMENTOS IMUNOISTOQUÍMICOS PARA LOCALIZAÇÃO DA DCX

2.4.1. Perfusão

Os pombos expostos ao ambiente padrão (AP) foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (0,05g/100g de peso corporal) e Cetamina (0,15g/100g de peso corporal) e perfundidos transcordialmente com 300 ml de solução de sacarose (9,25% mantida a 37°C, com heparina) seguida por 300 ml de solução de paraformaldeído (4% em tampão fosfato pH 7,4). Os encéfalos foram retirados, bloqueados e pós-fixados em paraformaldeído (4% em tampão fosfato) a 4°C por 24h, após esse período os blocos foram transferidos para uma solução de sacarose 30%. Os blocos foram cortados em criótomo a uma espessura de 50 µm e coletados em solução tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M em 5 compartimentos seriados. As secções foram transferidas para tubos plásticos de 4ml contendo solução anticongelante e armazenadas em freezer a -24°C até serem processadas nas reações de imunoistoquímica.

2.4.2. Reações imunoistoquímicas

As secções obtidas conforme descrito acima foram lavadas em solução tampão fosfato salina 0,1M + Triton 0,15% (PBST), em 3 banhos de 5 min cada, logo após foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando H₂O₂ 0,3% + metanol por 30 minutos. Novamente,

os cortes foram lavados com PBS 0,1M + Triton 0,15% em 4 banhos de 5min cada. Após esse processo as secções foram incubadas por 60 min em solução de PBST + soroalbumina bovina 1% (BSA, Sigma Chemical, St. Louis). Em seguida os cortes foram lavados em 1 banho de PBST por 5 min e finalmente incubados com o anticorpo primário por um período de 24 h a 4°C. Após o período de incubação do anticorpo primário, as secções foram lavadas em 3 banhos de PBST por 5 min, após os quais, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (Vectastain® Elite ABC kit anti-coelho IgG, fabricado por Vector labs.) por 90min. Os cortes foram novamente submetidos a 3 banhos de PBST por 5 min e então incubados com ABC 1:125 (PBST. + avidina + peroxidase biotinizada) por 2 h. Em seguida, as secções foram lavadas com PBST 3 vezes por 5 min e tampão trizma (TBS) 0,25M pH 7,4 uma vez por 5 minutos. Após esse processo as secções foram incubadas TBS 0,1M pH 7,4 + DAB 10 mg + 3 µl H₂O₂ 30% por 10 min e então lavadas com TBS 0,25M pH7,4 por 3 vezes de 5 min cada. Juntamente com as secções do cérebro de pombo foram colocados alguns cortes de hipocampo de rato para controle positivo da reação. Realizamos também reações de controle negativo, que seguem todo o procedimento exceto a adição do anti-corpo secundário. Finalmente os cortes foram lavados com água destilada, montados sobre lâmina gelatinizadas, desidratados, diafanizados, cobertos com lamínula e levados a um microscópio (Olympus BH2) acoplado a uma câmera digital (PixeLink® PL-B623) para documentação fotográfica do material.

2.4.3. Reações de Imunofluorescência

Em secções obtidas conforme o descrito acima foram realizados ensaios de imunofluorescência para a identificação de uma possível localização de DCX com marcadores gliais (GFAP) e de neurônios maduros (NeuN). As secções foram lavadas por três vezes durante 5 minutos em PBST e em seguida incubadas durante 60 minutos em solução de PBST+BSA 1%. Após esse período as seções foram incubadas em uma mistura dos anticorpos primários Anti-DCX+Anti-NeuN ou Anti-DCX+Anti-GFAP (para especificações e diluições dos anticorpos, ver tabela 2) por 24h à 4°C. Após esse período as secções foram lavadas por três vezes em PBST e incubadas com uma mistura de anticorpos secundários (AlexaFluor® 488 e AlexaFluor® 546 – Invitrogen) por 120 min protegidas da luz. As secções então foram lavadas por três vezes de 5 min em PBST. Finalmente os cortes foram lavados com água destilada, e deixados para secar por 24h protegidos da

luz. Após esse período os cortes foram montados sobre lâmina gelatinizadas e cobertos com lamínula para serem levados ao microscópio epifluorescente (Olympus BX4) acoplado a uma câmera digital (Q-imaging QColor 3C) para documentação fotográfica.

2.4.4. Ensaios de Proliferação

Três pombos alojados em ambiente padrão foram ambientados às condições de laboratório durante sete dias. Após a ambientação, os animais receberam três injeções de 5-Bromo-2-desoxiuridina (BrdU Sigma, 100mg/Kg) em salina 0,9% em intervalos de 2h cada uma. Duas horas após a terceira injeção os animais foram sacrificados por perfusão transcordial com 300 ml de solução de sacarose (9,25% mantida a 37°C, com heparina) seguida por 300 ml de solução de paraformaldeído (4% em tampão fosfato). Os encéfalos foram retirados, blocados e pós-fixados em paraformaldeído (4% em tampão fosfato) a 4°C por 24h. Após esse período os encéfalos foram incluídos em gelatina 10% e seccionados em vibrátomo (Vibratome®) à uma espessura de 50 µm e coletados em PBS 0,01 M em 5 compartimentos seriados. As secções foram transferidas para tubos plásticos de 4 ml contendo solução anticongelante e armazenadas em freezer a -24°C até serem processadas nas reações de imunistoquímica para a detecção do BrdU.

Para da detecção colorimétrica de BrdU as secções foram lavadas em PBST por três vezes de 5 min e então colocadas em HCl 3N por 40 minutos à 37°C para desnaturação do DNA. As secções foram lavadas por três vezes de 5 min em PBST e incubadas em H₂O₂ 0,3% + metanol por 30 min. Novamente, os cortes foram lavados com PBST em 4 banhos de 5min cada. Após esse processo as secções foram incubadas por 60 min em solução de PBST. + BSA 1% . Em seguida os cortes foram lavados em 1 banho de PBST por 5 min , e finalmente incubados com o anticorpo primário por um período de 24 h a 4°C. Após o período de incubação do anticorpo primário, as secções foram lavadas em 3 banhos de PBST por 5 min, após os quais, foi feita a incubação com o anticorpo secundário por 90min. Os cortes foram novamente submetidos a 3 banhos de PBST por 5 min e então incubados com ABC 1:125 (PBST. + avidina + peroxidase biotinilada) por 2h. Em seguida, as secções foram lavadas com PBST 3 vezes por 5 min e TBS 0,25M pH 7,4 uma vez por 5 min. Após esse processo as secções foram incubadas TBS 0,1M pH 7,4 + DAB 10 mg + 3 µl H₂O₂ 30% por 10 minutos e então lavadas com TBS 0,25M pH7,4 por 3 vezes de 5 min cada. Finalmente os cortes foram lavados com água destilada, montados sobre

lâmina gelatinizadas, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula e levadas a um microscópio (Olympus BH2) acoplado a uma câmera digital (PixeLink® PL-B623) para documentação fotográfica do material.

Para a detecção de fluorescência de BrdU e DCX, as secções foram lavadas em PBST por três vezes de 5 minutos e então colocadas em HCl 3N por 40 minutos à 37°C e novamente lavadas com 3 banhos de PBST. Os cortes foram incubados com uma mistura de anticorpos primários Anti-BrdU+Anti-DCX por 24h a 4°C. Após esse período foram novamente lavados com PBST e incubados com uma mistura de Anticorpos secundários (AlexaFluor® 488 e AlexaFluor® 546 – Invitrogen) por 120 min protegidas da luz. As secções então foram lavadas por três vezes de 5 min em PBST. Finalmente os cortes foram lavados com água destilada, e deixados para secar por 24h protegidos da luz. Após esse período os cortes foram montados sobre lâmina gelatinizadas e cobertos com lamínula para serem levadas ao microscópio epifluorescente (Olympus BX4) acoplado a uma câmera digital (Q-imaging QColor 3C) para documentação fotográfica. As regiões encefálicas do pombo observadas foram nomeadas segundo a revisão da nomenclatura neuroanatômica de aves de Reiner e cols. (2004).

Tabela 2: Especificações e diluições dos anticorpos utilizados na imunistoquímica e imunofluorescência.

Marcadores	Anticorpo primário	Anticorpo Secundário
BrdU (proliferação celular)	Monoclonal Anti-BrdU (IgG Camundongo) Sigma-Aldrich® (B2531)– Concentração: 1:1000	Vectastain® <i>Elite ABC kit Standard Anti-IgG</i> , Vector Labs (PK-6100) Concentração: 1:1000
Doublecortina (marcador de novos neurônios)	Policlonal anti-DCX (IgG ¹ , coelho) AbCam® (ab18723) Concentração: 1:2000	Vectastain® <i>Elite ABC kit anti-rabbit IgG</i> . Vector Labs (PK-6101) Concentração: 1:1000 / Invitrogen® Alexa Fluor® 546/488 anti-rabbit
GFAP (Marcador para astrócitos)	Policlonal anti-GFAP bovina (IgG camundongo) Millipore® (MAB3402) Concentração: 1:2000	Vectastain® <i>Elite ABC kit anti-rabbit IgG</i> . Vector Labs (PK-6101) Concentração: 1:1000 / Invitrogen® Alexa Fluor® 546/488 anti-mouse
NeuN (Marcador de neurônios maduros)	Monoclonal anti-NeuN (IgG ¹ , camundongo) Millipore® (MAB377) Concentração: 1:2000	Vectastain® <i>Elite ABC kit Standard Anti-IgG</i> , Vector Labs (PK-6100) Concentração: 1:1000 / Invitrogen® Alexa Fluor® 546/488 anti-mouse

2.5. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DCX+ HIPOCAMPAIS

Foram contadas os corpos celulares DCX+ nas regiões da Lâmina lateral (**ll**), Lâmina meidal (**ml**) e Núcleo triangular (**Tr**) do hipocampo ventral em secções entre os níveis **A 7.25 e A 5.00** segundo o atlas do cérebro do pombo (KARTEN e HODOS, 1967). Apenas as células que apresentavam citoplasma e processos corados pela reação foram contadas. As contagens foram realizadas com auxílio do programa ImageJ utilizando fotomicrografias sequenciais das regiões hipocampais em aumento de 200x (**Figura 3**), sem que o experimentador tivesse conhecimento do grupo experimental.

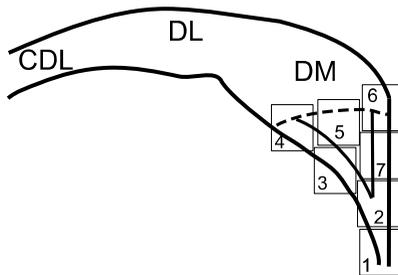


Figura 3: Desenho esquemático indicando a ordem das fotomicrografias utilizadas para a contagem de células no hipocampo de pombos.

2.6. TESTES ESTATÍSTICOS

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 provenientes dos testes de IT e ADON foram analisados utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (AP versus AE, AP+ versus AE+). Apesar de terem sido analisados utilizando testes não-paramétricos, para facilitar a visualização dos dados comportamentais no teste do ADON, estes estão representados graficamente na forma de média \pm erro padrão da média. As quantidades de células DCX+ observadas em animais alojados em ambientes de laboratório ou nos ambientes do biotério central foram

comparadas utilizando o Teste-t de Student. A análise dos dados da quantificação de corticosterona plasmática obtidos antes e após o teste de imobilidade tônica, foi utilizada a Análise de Variância de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Duncan. As correlações estatísticas entre o número de células DCX+ hipocampais e a duração de comportamentos observado no teste de ADON e IT foram realizados pelo teste não-paramétrico de Spearman. Em todas as comparações foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$. Toda a análise estatística foram realizadas com o auxílio do software “Statistica 8.0” (Statsoft).

3. RESULTADOS

3.1. DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DCX+ NO PROSENCÉFALO DE POMBOS ADULTOS

3.1.1. Controles

Secções da formação hipocampal de ratos foram incubadas juntamente com secções prosencefálicas de pombos (criados em ambiente padrão de laboratório), servindo assim como controles positivos para a reação (Figura 4 D-F). Essas secções controle apresentaram um padrão de marcação pela reação imunoistoquímica (DCX) consistente com a descrita na literatura (BALTHAZART et al., 2008; BOSERET et al., 2007). Fibras, geralmente mais intensamente marcadas, e células DCX+ puderam ser encontradas em um grande número de regiões prosencefálicas do pombo. De uma maneira geral, pericários DCX+ apresentam marcação mais intensa em regiões periventriculares do que aquelas que puderam ser observadas em regiões do parênquima. Controles negativos foram realizados seguindo todos os passos da reação imunoistoquímica, suprimindo, porém, a adição do anticorpo primário (anti-DCX). Tais secções, não apresentaram nenhuma marcação inespecífica e estavam quase completamente livres de artefatos ou forte coloração de fundo, mostrando uma boa especificidade e qualidade de nossa preparação (Figura 4 A, D, H). Em secções contra-coradas com azul de toluidina, podemos observar que essas células DCX+ apresentam tamanho e morfologia consistente com as demais células coradas (Figura 4 I). Via de regra, puderam ser observados em todo o prosencéfalo dois tipos distintos de morfologia celular marcados pela DCX: a) células pequenas fusiformes e bipolares e b) células grandes, poligonais e multipolares. (Figura 4 I).

A distribuição geral de fibras e células no prosencéfalo de pombos adultos foi ilustrada de forma esquemática na figura 5.

3.1.2. Regiões subventriculares e vias migratórias

Nos níveis telencefálicos mais caudais, puderam ser observados corpos celulares DCX+ densamente marcados concentrados nas zonas subventriculares laterais (SVZ1) e ventromediais (SVZ2) do ventrículo lateral (Figura 5 F-H). Esses corpos celulares se encontraram presentes de forma persistente em toda região endimária circundando a região lateral do VL. Em regiões intermediárias, a SVZ1 ocupa a porção mais

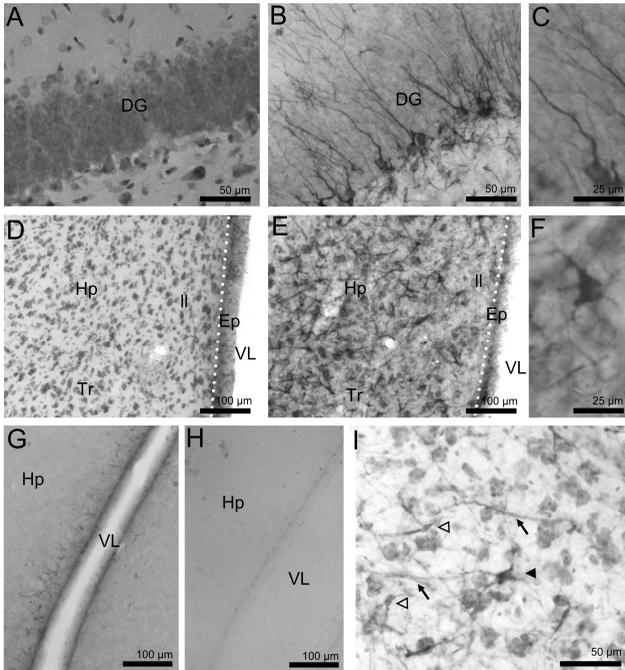


Figura 4: Fotomicrografias dos controles positivos e negativos para as reações imunoistoquímicas para a detecção de DCX. Com exceção de G e H todas as secções controle foram contra-coradas com azul de toluidina (0,2%). A-C) Secções do GD de rato e D-F) Secções do hipocampo ventral de pombos processadas na mesma reação. A) Corte da região do GD de rato processada sem a presença do anticorpo primário. B) Corte do GD de rato processada com a presença do anticorpo primário. C) detalhe de uma célula DCX+ no GD do hipocampo de rato. D) secção coronal do hipocampo ventral de pombo processado sem a presença do anticorpo primário. E) Secção do hipocampo ventral de pombo processada com a presença do anticorpo primário. F) detalhe de célula DCX+ presente no hipocampo de pombo. G) Secção do Hp de pombos, sem contra-coloração mostrando células DCX+ H) Secção do hipocampo de pombo processada sem a presença do anticorpo primário mostrando ausência de sinal de fundo ou marcações inespecíficas. I) Detalhe de células e fibras DCX+ presentes no estriado medial de pombos. Células bipolares (triângulos vazados), Células multipolares (triângulos pretos) e fibras (setas pretas).

dorsolateral do VL (Figura 5 D-E) e a SVZ2, se encontra na porção mais ventrolateral do VL. Essas duas regiões proliferativas parecem se aproximar em secções mais rostrais e no nível do OB não é mais possível fazer distinção entre as duas. Nessas regiões mais rostrais o ventrículo é igualmente marcado pela DCX, apresentando fibras por toda a extensão do epêndima ventricular e corpos celulares marcados, de forma homogênea, em toda região periventricular (Figura 5 A-C, Figura 7).

As células densamente marcadas observados no epêndima na região de ambas SVZs frequentemente apresentam morfologia bipolar com corpos arredondados ou fusiformes. Esses processos, em sua maioria, parecem percorrer tangencialmente o epêndima formando feixes concentrados muito marcados pela reação (figura 6 E,H,L). Outros processos podem ser vistos penetrando no parênquima adjacente formando feixes de fibras orientados lateralmente (Figura 6 E,F). Em meio a essas fibras presentes no parênquima, também podem ser observadas células DCX+ fusiformes e bipolares com processos também orientados lateralmente (Figura 6 I-M). Tanto as fibras quanto células bipolares, aparentemente originadas em toda extensão rostro-caudal da SVZ1, aparentam concentrarem-se, em níveis mais caudais, no interior do Nidopallium caudale (NC), onde formam um feixe pouco denso que pode ser acompanhado até o Mesopallium (M), em níveis intermediários, e até o Hyperpallium dorsale (HD) em níveis mais rostrais (Figura 5 A-H, Figura 7 E-F). Chamamos esse feixe de fibras de orientação caudo-rostral de via migratória rostral (rms). Na região do HD, além da grande concentração de corpos celulares DCX+, podem ser observadas fibras deixando a rms em direção ao Mesopallium e Hyperpallium apicale (HA) enquanto numerosos processos orientados dorsoventralmente parecem se dirigir ao bulbo olfativo (OB, Figura 5 A-C, Figura 7 E-F).

Em níveis caudais, fibras também originadas da SVZ1 puderam ser observadas orientadas dorsalmente em direção a área corticoidea dorsolateral (CDL) e lateralmente para o córtex piriforme (CPI). Em níveis mais rostrais fibras DCX+ partindo da SVZ1 também puderam ser observadas, apresentando uma orientação dorsolateral, e dirigindo-se ao Nidopallium (N). Esses feixes de fibras, permeados por células bipolares densamente marcadas parecem formar uma via migratória lateral (lms).

As células endimárias presentes na SVZ2 são similares àquelas observadas na SVZ1, e também aparentam darem origem a feixes de fibras densamente marcadas, onde frequentemente podem ser

observadas varicosidades (Figura 5, Figura 6 C,I, Figura 8 A), e a fibras que penetram o estriado medial (MSt) em toda sua extensão (Figura 5 B-E Figura 8 A,D).

Outro grupo de células bipolares e fibras DCX+ pode ser observado partindo da parede medial do VL localizada lateral ao hipocampo ventral (Hp) (Figura 5 E-H, figura 8 F-I). A densidade de células subependimárias presentes no Hp é muito inferior aquelas observadas nas SVZs, porém, fibras esparsas também parecem formar feixes intra endimários que se estendem pelas regiões mais ventrais do hilo hipocampal e que parecem dar origem a fibras que penetram o parênquima hipocampal atingindo as regiões mais mediais e dorsais.

3.1.3. Bulbo olfativo

De uma maneira geral, a região do bulbo olfativo foi a que apresentou a marcação mais intensa pela DCX. Fibras imunorreativas se encontram densamente presentes por toda a extensão da região endimária e subependimária do VL, que nessa região extremamente rostral, ocupa grande parte da região central do OB (Figura 5 A-B, Figura 7 B-D). Com exceção da camada glomerular mais externa (Figura 7 D), ausente de marcação, em todas as regiões do OB numerosas células bipolares, fusiformes ou arredondadas, podem ser observadas cercadas por fibras intensamente marcadas (Figura 7 C), de tal modo que não é possível observar as demais subdivisões do OB vistas em coloração de Nissl (Figura 7 A). Uma quantidade notável de fibras DCX+ presentes no HD parecem orientadas ao OB contribuindo assim para essa intensa marcação presente na região (Figura 5 A-B Figura 7 E). Pudemos ainda notar a presença de um feixe de fibras DCX+, aparentemente originadas da região dorsolateral do OB, populando zonas ventrolaterais basais que compreendem a superfície pial do telencéfalo (Figuras 5 A-G, Figura 7 I-J). Esses feixes de fibras densamente DCX+ que percorrem a superfície pial telencefálica (psb) também foram observadas desde regiões laterais do córtex pré-piriforme até a borda ventrolateral do NC. Em níveis caudais, essas fibras parecem ocupar porções mais ventrais do núcleo taenia da amígdala (TnA), estando também presentes na fronteira lateral da porção mais caudal do Arcopallium (A) e parecem finalmente atingir o Córtex piriforme (CPi) caudal.

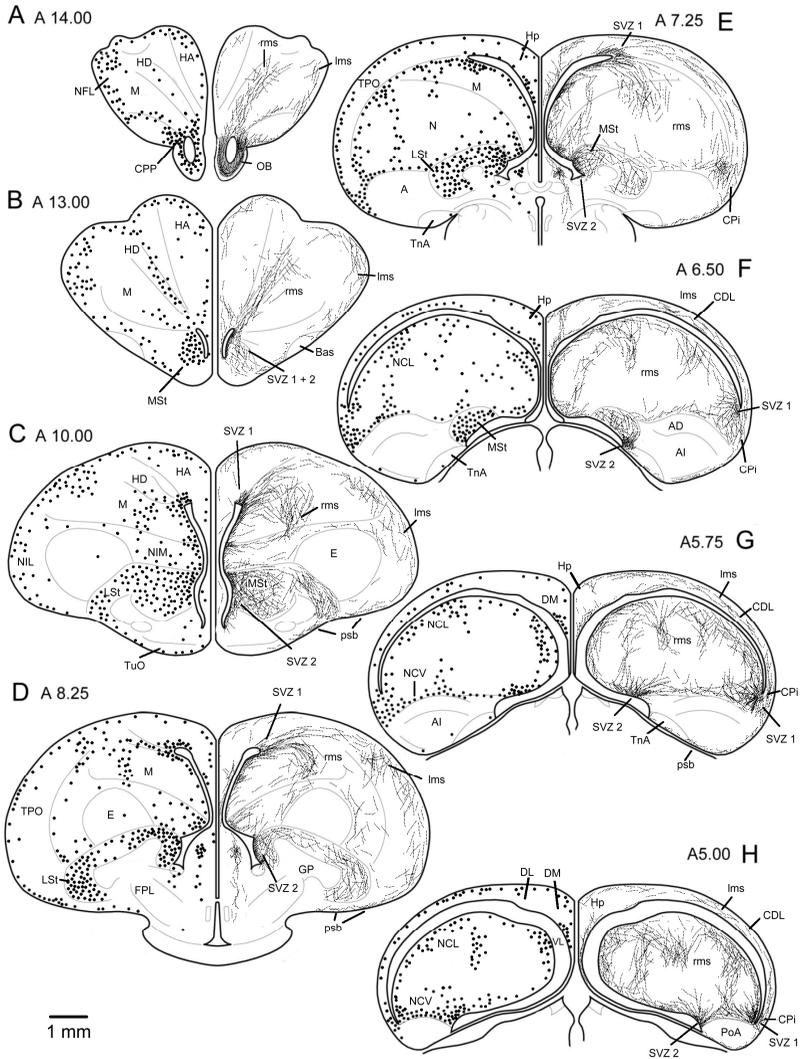


Figura 5: Desenhos esquemáticos de secções coronais do teléncéfalo de pombos (AP). O hemisfério esquerdo de cada secção mostra a localização de pericários DCX+ (pontos pretos) e o hemisfério direito mostra a distribuição das fibras imunorreativas (linhas). Níveis estereotáxicos aproximados segundo o atlas do encéfalo do pombo de Karten e Hodós (1967).

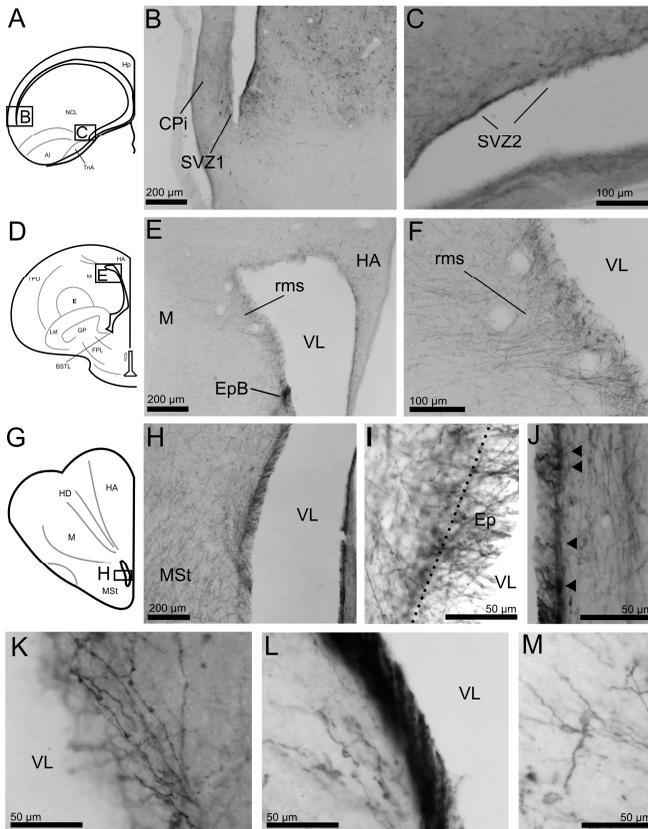


Figura 6: Distribuição de fibras e células DCX+ em regiões subventriculares do encéfalo de pombos (AP). A) Desenho esquemático de secção coronal caudal (A5.75). B) SVZ1 do ventrículo lateral. C) SVZ2 do ventrículo lateral. D) Desenho esquemático de uma secção coronal intermediária (A8.25). E) SVZ1 em regiões intermediárias do telencéfalo, mostrando fibras intra-ependimárias DCX+ intensamente marcadas (EpB). F) Detalhe em maior magnificação de E, mostrando células bipolares e fibras orientadas lateralmente deixando o VL em direção ao mesopallium formando a via migratória rostral (rms). G) Desenho esquemático de secção coronal rostral (A13.00). H) Fibras intra-ependimárias presentes nas paredes laterais e médias do VL. I) Detalhe de fibras intra-ependimárias da parede lateral do VL. J) Detalhe da parede medial do VL em níveis intermediários, mostrando fibras orientadas ventralmente. Flechas apontam para processos densamente marcados pela DCX orientados para dentro da camada ependimária. K) Fibras com varicosidades presente na SVZ2. L) Fibras intra-ependimárias densamente marcadas na SVZ2 adjacente ao MSt. Note as células bipolares presentes na região periventricular. M) Detalhe de célula DCX+ bipolar presente na região periventricular do telencéfalo de pombo. Para abreviações ver lista.

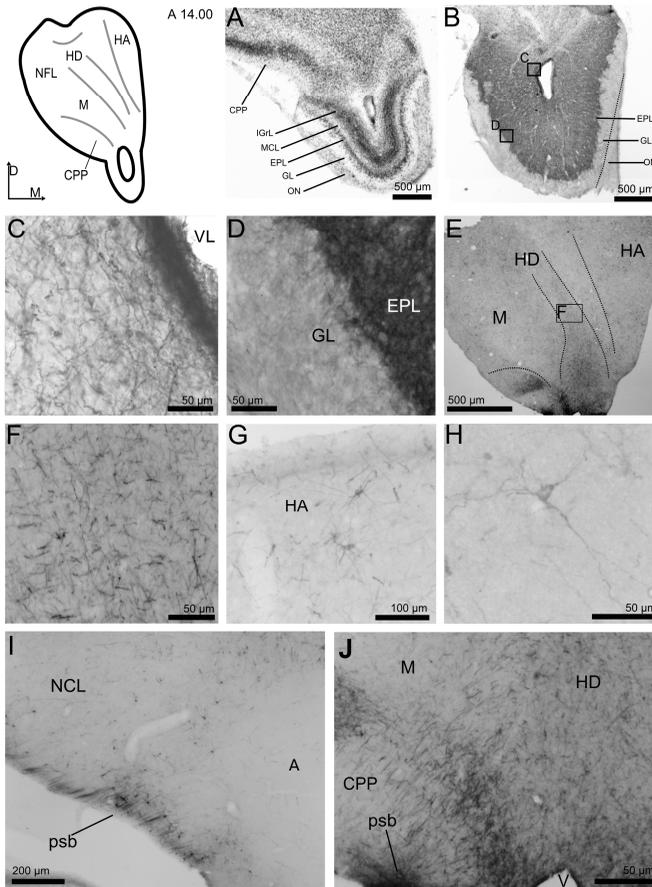


Figura 7: Distribuição de células e fibras DCX+ no bulbo olfativo e telencéfalo rostral de pombos alojados em AP. A) Secção coronal do bulbo olfativo corado com Nissl mostrando as principais subdivisões do OB. B) Distribuição geral de fibras DCX+ no OB. C) Detalhe da região periventricular mostrando fibras intensamente marcadas no epêndima. D) Detalhe da camada plexiforme externa (EPL) intensamente marcada e sua fronteira com a camada glomerular com marcação ausente. E) Distribuição da imunorreatividade à DCX no telencéfalo rostral. F) Detalhe de fibras DCX+ presentes no HD. Notar fibras orientadas ventralmente em direção ao OB. G) Células presentes na região dorsal do HÁ. H) Detalhe de neurônio DCX+ multipolar presente no HÁ. I) Superfície ventrolateral do telencéfalo. Detalhe do feixe de fibras DCX+ da superfície pial percorrendo a região ventral do NCL. J) Distribuição de fibras DCX+ no telencéfalo rostral, imediatamente dorsal ao OB, mostrando as fibras densamente marcadas que dão origem à psb e HD e CPP densamente populados por fibras. Para abreviação ver lista.

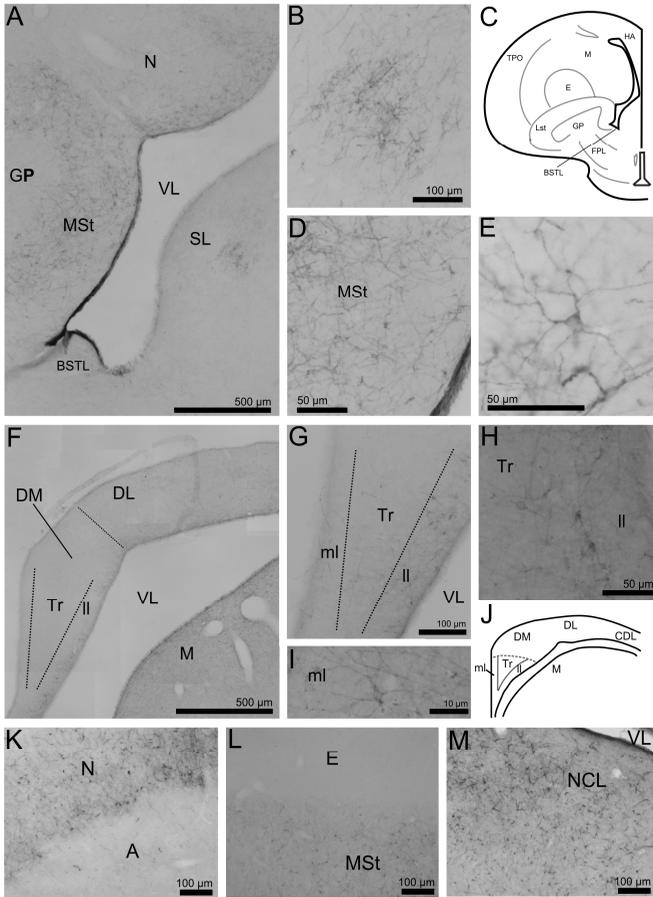


Figura 8: Distribuição de células e fibras DCX+ em regiões paliais e hipocampo de pombos alojados em AP. A) Células e fibras DCX+ presentes no estriado dorsal e área septal. B) Detalhes de fibras presentes no núcleo septal lateral. C) desenho esquemático de secção coronal correspondente ao nível das fotomicrografias. D) Detalhe de células e fibras do MSt. E) Detalhe de D, mostrando uma célula fusiforme pequena e uma célula redonda e multipolar, tipos celulares DCX+ típicos do MSt. F) Distribuição de células e fibras DCX+ no hipocampo. G) Hipocampo ventral, mostrando subdivisões e células DCX+ presentes na camada lateral. H) Detalhe de Células pequenas densamente marcadas no II e células maiores de marcação menos intensa no Tr. I) Detalhe de célula DCX+ multipolar presente no Tr. J) Desenho esquemático de secção coronal do Hp. K) Células e fibras DCX+ no Nidopallium e Arcopallium de marcação ausente. L) Células e Fibras DCX+ no MSt adjacentes ao Entopallium de marcação ausente. M) Região do NCL densamente populada por células e fibras DCX+.

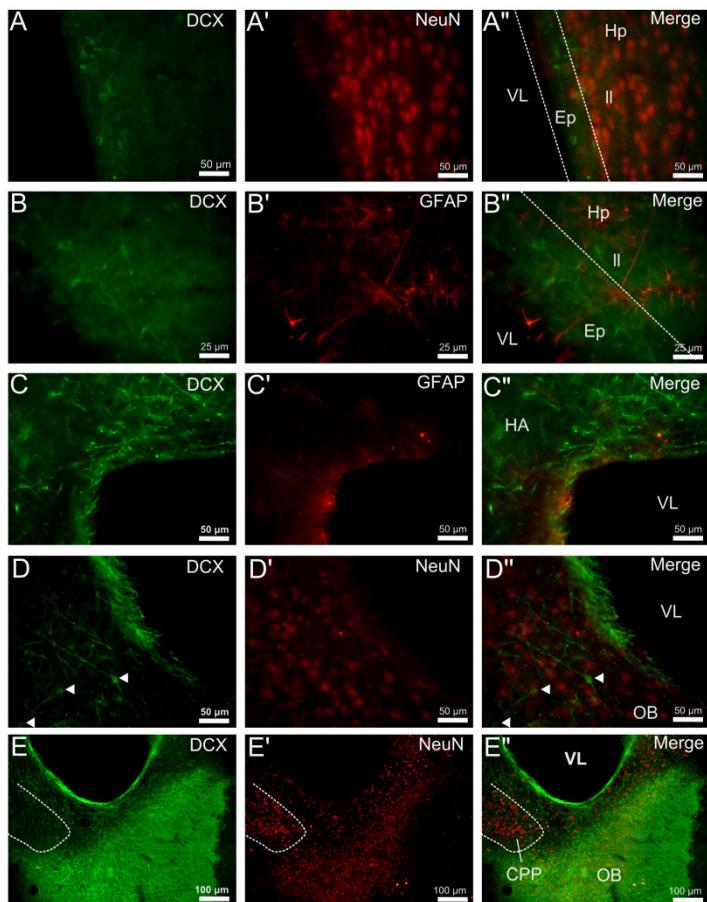


Figura 9: Imunofluorescência para dupla-marcação de DCX, NeuN e GFAP em secções do encéfalo de pombos alojados em AP. A) Células DCX+ no hipocampo ventral. A') Pericários NeuN+ no hipocampo ventral. A'') Sobreposição de DCX e NeuN. B) Células DCX+ no hipocampo ventral. B') Distribuição de GFAP no hipocampo ventral. B'') Sobreposição de DCX e GFAP. C) Distribuição de DCX na região periventricular adjacente à SVZ1. C') Imunorreatividade à GFAP na região da SVZ1. C'') Sobreposição de DCX e GFAP. D) Células e fibras DCX+ na região periventricular a nível do bulbo olfativo. D') Distribuição de NeuN na região periventricular do OB. D'') Sobreposição de DCX e NeuN. Setas apontam para células DCX+ não co-localizadas com o marcador NeuN. E) Distribuição de células e Fibras DCX+ na região do OB. E') Distribuição de NeuN na região do OB. E'') Sobreposição de DCX e NeuN. Note a densidade de pericários NeuN+ e baixa quantidade de células DCX+ na região central do CPP.

3.1.4. Regiões paliais

Células e fibras DCX+ foram observadas em áreas adjacentes a rms no HD. No telencéfalo rostral, além das células bipolares já descritas, as regiões do Mesopallium (M), Nidopallium (N) e Hyperpallium apicale (HA) são populadas por células de maior tamanho, poligonais e multipolares, dotadas de expressiva arborização dendrítica e densamente marcada pela DCX. Essas células possuem uma marcação menos intensa na região do citoplasma e núcleo e parecem mais frequentes nas regiões mais externas do HD, M e N. Células e fibras DCX+ parecem raras nas zonas mais internas do HA e estão quase que completamente ausentes no Entopallium (E; Figura 5 C-D; Figura 8 L) e no campo L do Mesopallium. Células DCX+ também foram encontradas em grande concentração na região dorsolateral em toda extensão rostro-caudal do N. Entretanto, as regiões caudolateral e caudoventral do nidopallium também foram observadas abrigando uma densa concentração de células e fibras marcadas pela DCX (figura 5 A-H; figura 8 K, M).

3.1.5. Hipocampo, córtex piriforme e CDL

Na região do hipocampo ventral, pudemos observar uma quantidade moderada de células DCX+ que parecem mais concentradas na lâmina lateral do Hp (II) (Figura 5 E-H; figura 8 G-I). Essas células, densamente DCX+ presentes no II, apresentam processos orientados lateralmente que parecem atingir o epêndima do VL adjacente ao Hp. Raras fibras e um pequeno número de células maiores, poligonais e menos coradas pela reação, foram observadas no interior do núcleo triangular do Hp (Tr; figura 5 E-H; Figura 8 G- I). No hipocampo dorsal, os subnúcleos lateral (DL) e medial (DM) são quase que completamente desprovidos de células e fibras DCX+. A superfície dorsal dessas regiões apresenta um pequeno número de células fusiformes bipolares e células poligonais multipolares, que aparenta ser uma extensão daquelas observadas no TPO/CDL, pertencendo ao que chamamos de via migratória lateral (Figura 5 H-D). Podemos observar ainda, uma densa população de células e fibras intensamente DCX+ populando toda a extensão rostro-caudal do córtex piriforme. As fibras observadas deixando a SVZ1, e em menor número, as fibras observadas na superfície pial telencefálica parecem contribuir para a formação dessa população de fibras DCX+ presentes no CPP.

3.1.6. Núcleos da base, Área septal e Arcopallium

O Estriado dorsal é densamente populado por células e fibras DCX+, porém, estas parecem mais concentradas nas regiões mediais (MSt) do que nas regiões laterais (LSt, Figura 1 I, figura 2 C-E, figura 5 A-E). Em meio a um emaranhado de fibras DCX+, numerosas células bipolares, redondas ou fusiformes e células maiores e multipolares podem ser observadas no MSt e em menor densidade no Lst. Entretanto, com exceção de raras células pequenas e fibras DCX+, a região do GP não possui nenhuma marcação (Figura 5C-E, Figura 8A). A área septal lateral, em suas porções mais caudais, apresenta um pequeno grupo de fibras e ocasionais células pequenas e bipolares DCX+ (Figura 5D,E; Figura 8A,B). Pudemos também notar, algumas poucas fibras DCX+ de orientação ventral, que parecem deixar esse agrupamento da SL atingindo o núcleo pré-óptico no diencéfalo ventromedial (Figura 5 D). Tanto o complexo amigdalóide (Arcopallium, A) como núcleo taenia não apresentaram nenhuma marcação pela reação para detecção de DCX, todavia, algumas fibras e células DCX+ puderam ser observadas dispersas na superfície pial telencefálica adjacente a essas regiões.

3.1.7. Experimentos de dupla marcação e distribuição de BrdU

Células imunorreativas aos marcadores NeuN (neurônios maduros) e GFAP (Células gliais) foram encontradas em grandes quantidades em todas as regiões telencefálicas examinadas. As células NeuN+ apresentaram marcação restrita ao núcleo, ou nuclear, ou citoplasmática, sem apresentarem processos corados pela reação. De uma maneira geral a morfologia apresentada pelas células imunorreativas à GFAP foi consistente com a esperada para o fenótipo astrocitário. Não pudemos observar aparente co-localização entre os marcadores DCX/NeuN ou DCX/GFAP nos mesmo corpos celulares nas regiões prosencefálicas examinadas (Figura 9). A distribuição da marcação nuclear de BrdU após injeções 6, 4 e 2 horas antes da perfusão dos animais está resumida no esquema presente na figura 10. Uma densa concentração de núcleos BrdU+ foi observada no epêndima que cerca o ventrículo lateral ao nível do OB (Figura 10 A,G). De uma maneira geral, esses núcleos BrdU+ presentes ao nível do OB são encontrados formando grupos de 3 a 6 células que se distribuem de forma homogênea pela parede do ventrículo. Em níveis intermediários, os

núcleos BrdU+ se concentram nas regiões subventriculares (SVZ1 e SVZ2), particularmente na parede lateral do VL (Figura 10 B, C, H). Um pequeno número de células foi observado no epêndima adjacente ao hipocampo ventral (Figura 10 E, F). Experimentos para a detecção de dupla-marcação entre BrdU e DCX, revelaram que apesar de não haver co-localização entre os dois marcadores nos mesmo corpos celulares, regiões subventriculares com maior concentração de DCX abrigam também as maiores concentrações de núcleos BrdU+ (Figura 10 B, C).

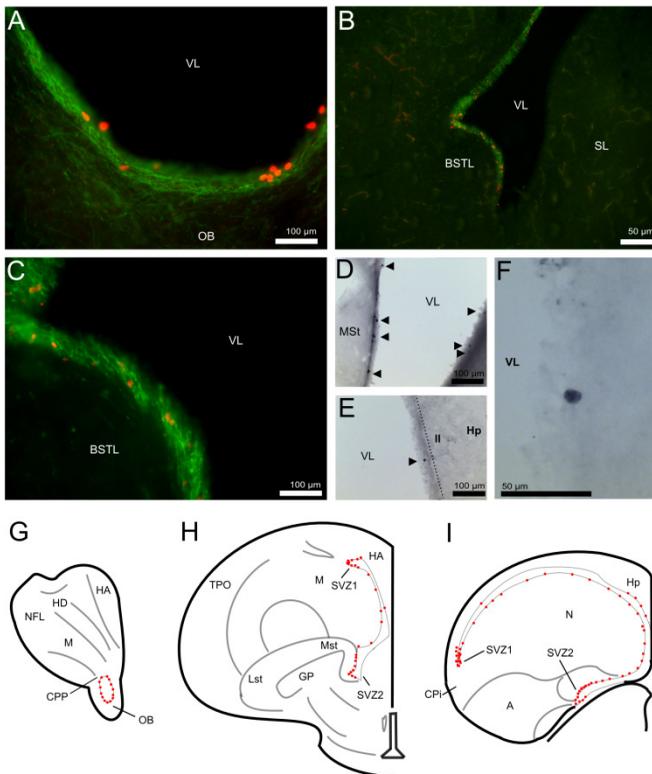


Figura 10. Imunofluorescência e distribuição de BrdU em animais alojados em AP e tratados com injeções 2, 4 e 6 horas antes da perfusão. A) Imunorreatividade à BrdU (Vermelho) e DCX (Verde) no epêndima do ventrículo lateral a nível do OB. B) Imunoreatividade à BrdU e DCX na região da SVZ2 adjacente ao estriado medial. C) Detalhe de B mostrando a falta de co-localização de núcleos BrdU+ e corpos celulares DCX+ no

epêndima da parede lateral do VL D) Distribuição de BrdU nas paredes lateral e medial, do VL a níveis rostrais. Setas apontam para núcleos BrdU+. E) Detalhe da região do hipocampo ventral. seta aponta para núcleo BrdU+ no epêndima adjacente ao Hp. F) Detalhe em maior aumento de E, mostrando núcleo BrdU+ G-I) Desenhos esquemáticos de secções coronais do telencéfalo do pombo, ilustrando a distribuição de BrdU nas regiões subventriculares em nível rostral (G), intermediário (H) e caudal (I).

3.2. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS AO ADON E OS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.

3.2.1. Exposição ao ambiente novo

O padrão comportamental apresentado pelos animais expostos ao ambiente desconhecido por 15 min foi consistente com o catálogo utilizado para a análise comportamental previamente descrito (SOUZA et al., 2009). Foram feitas comparações estatísticas entre as durações e frequências totais destas categorias comportamentais. Além dos comportamentos mais frequentes analisados e listados da tabela 1, foram também observados comportamentos mais raros como auto-limpeza (*preening*), bater de asas, exploração do assoalho da arena e paredes com o bico e defecar. Com relação a esses comportamentos mais raros, nenhuma diferença estatística pode ser encontrada entre os grupos. As médias de duração e frequência desses comportamentos estão apresentadas no apêndice A.

Quanto aos comportamentos de exploração visual e exploração angular não pudemos encontrar nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Todavia, animais alojados em AE+ apresentaram uma tendência ao aumento na duração ($p=0,066$) e um aumento estatisticamente significativo na frequência ($p=0,037$) de imobilidade durante o teste do AD. Não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos com relação à duração e a frequência total de locomoção no teste (Figura 11). Os valores das médias, erros, e valores de “p” encontram-se resumidos na tabela 3.

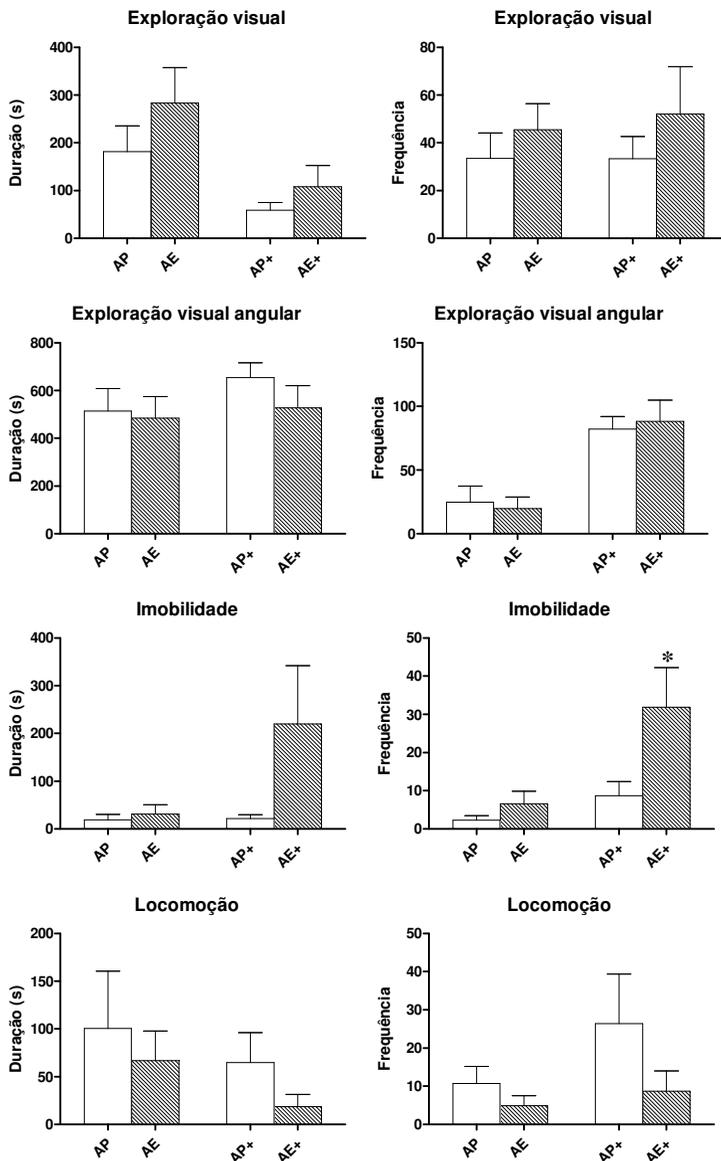


Figura 11. Efeito do ambiente sobre duração e frequência de Exploração visual, exploração visual angular, imobilidade e locomoção no teste do ambiente desconhecido. AP=Ambiente empobrecido, biotério setorial; AE=Ambiente enriquecido, biotério setorial; AP+=Ambiente empobrecido, biotério central; AE+=Ambiente enriquecido, biotério central. “*” representa $p < 0,05$ no teste

não paramétrico de Mann-Whitney entre os grupos AE+ e AP+. Todos os dados são representados por média±EPM.

Tabela 3: Grupo, número de animais, médias e erro padrão de duração e frequência e significância estatística dos comportamentos observados no teste do ambiente desconhecido.

	Grupo (n=6)	Média Dur±EPM	p	Média Freq±EPM	p
Exp. Vis.	AP	181,21±52,80	n.s	33,42±10,71	n.s
	AE	58,78±16,00	n.s	47,57±9,72	n.s
	AE+	108,14±44,12	n.s	52,00±19,81	n.s
	AP+	248,21±71,72	n.s	33,33±9,24	n.s
Exp Ang	AP	517,59±84,43	n.s	24,85±12,64	n.s
	AE	517,59±84,49	n.s	19,85±9,03	n.s
	AP+	653,82±62,25	n.s	82,16±9,86	n.s
	AE+	527,713±92,43	n.s	88,16±16,91	n.s
Imob.	AP	19,26±11,02	n.s	2,28±1,20	n.s
	AE	30,97±19,49	n.s	6,57±3,28	n.s
	AP+	21,54±7,79	n.s	8,66±3,78	n.s
	AE+	219,63±122,26	=0,066	30,83±10,38	=0,037
Loc.	AP	86,09±52,74	n.s	10,71±4,43	n.s
	AE	57,87±27,70	n.s	4,85±2,61	n.s
	AP+	64,73±31,51	n.s	26,33±13,05	n.s
	AE+	18,56 ±12,76	n.s	8,66±5,31	n.s

Dur=Duração em segundos, Freq=Frequência absoluta, Exp.Vis=Exploração visual, Exp.Ang=Exploração visual angular, Imob.=Imobilidade, Loc.=Locomoção, AE+=Ambiente socialmente enriquecido, Ambiente enriquecido, AP+=Ambiente padrão com acesso visual, AP=Ambiente padrão, n=número de animais por grupo, EPM=Erro padrão da média, n.s=não significante. Valores extraídos do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

3.2.2. Apresentação do objeto novo

Após 15 minutos de exposição ao ambiente desconhecido, foi introduzido à arena um cilindro colorido, aqui chamado de objeto novo. De maneira geral, imediatamente após a introdução do objeto novo todos os grupos apresentaram o mesmo padrão comportamental apresentando imobilidade. Alguns animais, dependendo de suas posições na arena no momento da introdução do objeto, afastavam-se do objeto, para logo em seguida também apresentarem imobilidade.

Durante a exposição ao objeto novo também foram analisados, quanto à duração total e frequência, os comportamentos de exploração visual, exploração angular, imobilidade e locomoção. Nenhuma diferença estatisticamente significativa pode ser observada entre os grupos alojados em laboratório ou nas condições de alojamento do biotério central (figura 12). As médias de duração e frequência dos comportamentos então resumidos na tabela 4.

Tabela 4: Grupo experimental, número de animais, médias e erro padrão das médias das durações e frequências de cada uma das categorias comportamentais registradas durante a apresentação do objeto novo.

Grupo		Média Dur±EPM	p	Média Freq±EPM	p
Exp. Vis.	AP (n=6)	8,88±0,74	n.s	6,20±1,03	n.s
	AE (n=6)	21,90±11,99	n.s	12,50±5,83	n.s
	AP+ (n=6)	15,10±4,77	n.s	11,33±3,62	n.s
	AE+ (n=6)	7,20±4,11	n.s	4,16±2,12	n.s
	AP (n=6)	662,01±56,50	n.s	34,00±10,63	n.s
Exp	AE (n=6)	620,01±53,50	n.s	61,75±15,5	n.s
	AP+ (n=6)	610,88±101,63	n.s	64,50±12,08	n.s
	AE+ (n=6)	713,41±65,44	n.s	57,33±5,23	n.s
	AP (n=6)	26,91±22,15	n.s	6,50±5,17	n.s
	Imob.	AE (n=6)	116,02±61,32	n.s	27,75±12,12
AP+ (n=6)		165,88±103,97	n.s	20,83±7,39	n.s
AE+ (n=6)		137,84±67,21	n.s	33,17±7,33	n.s
AP (n=6)		22,73±7,85	n.s	8,50±2,398	n.s
Loc.		AE (n=6)	54,52±48,58	n.s	21,83±13,98
	AP+ (n=6)	71,60±44,53	n.s	17,25±13,63	n.s
	AE+ (n=6)	19,81±7,85	n.s	5,83±1,57	n.s

Dur=Duração em segundos, Freq=Frequência absoluta, Exp.Vis=Exploração visual, Exp.Ang=Exploração visual angular, Imob.=Imobilidade, Loc.=Locomoção, AE+=Ambiente socialmente enriquecido, Ambiente enriquecido, AP+=Ambiente padrão com acesso visual, AP=Ambiente padrão, n=número de animais por grupo, EPM=Erro padrão da média, n.s=não significante.

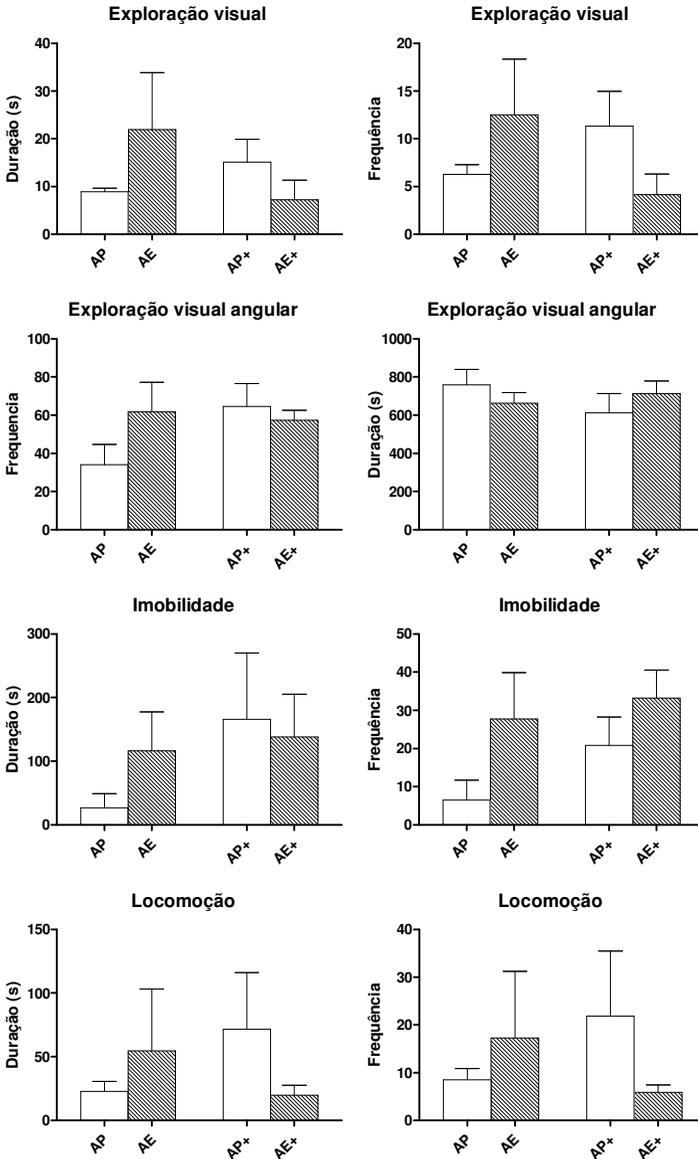


Figura 12: Efeito do ambiente sobre duração e frequência de Exploração visual, exploração visual angular, imobilidade e locomoção no teste de apresentação do objeto novo. AP=Ambiente empobrecido, biotério setorial; AE=Ambiente enriquecido, biotério setorial; AP+=Ambiente empobrecido, biotério central; AE+=Ambiente enriquecido, biotério central. “*” representa $p < 0,05$ no teste

não paramétrico de Mann-Whitney. Todos os dados são representados por $média \pm EPM$.

3.3. RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À CONTENÇÃO FÍSICA E OS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO.

3.3.1. Imobilidade Tônica

Foram avaliadas a duração da imobilidade tônica apresentada pelos animais alojados nos 4 diferentes grupos ($n=6$ por grupo), bem como o número de contenções necessárias para desencadear esse comportamento. De uma maneira geral, tanto o tempo de permanência em imobilidade e o número de contenções apresentaram grande variabilidade dentro de cada um dos grupos. Para análise dos resultados encontrados foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre os pares de grupos (AE+ vs AP+ e AP vs AE). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos quanto à duração ou quanto ao número de contenções.

As médias dos grupos e a dispersão dos dados de duração de IT, bem como os dados do número de contenções estão ilustradas na figura 13 e apresentados sob forma de $média \pm erro$ padrão da média na tabela 5.

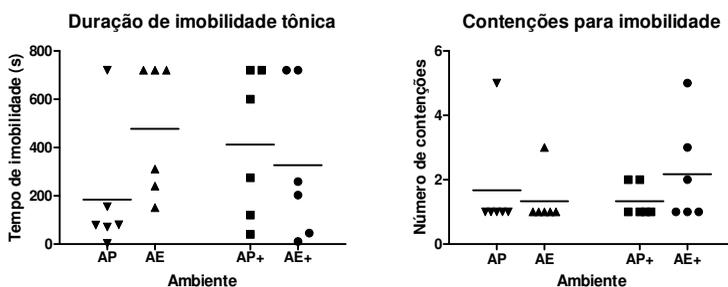


Figura 13: Efeito do ambiente sobre duração e número de contenções no teste de imobilidade tônica. AP=Ambiente empobrecido, biotério setorial; AE=Ambiente enriquecido, biotério setorial; AP+=Ambiente empobrecido, biotério central; AE+=Ambiente enriquecido, biotério central. Nenhuma diferença estatística pode ser encontrada pelo teste de Mann-Whitney entre os

grupos. As linhas representam a média do grupo e os pontos o número real de duração ou contenções de cada indivíduo

Tabela 5: Grupo experimental, número de animais, médias e erro padrão das médias das durações de IT e do numero de tentativas para se atingir o critério de IT.

	Grupo	Média Dur±EPM	p	Média Cont±EPM	p
IT	AP (n=6)	184,2±109,0	n.s	1,667±0,6667	n.s
	AE (n=6)	476,8±124,8	n.s	1,333±0,3333	n.s
	AP+ (n=6)	412,5±110,7	n.s	1,333±0,2108	n.s
	AE+ (n=6)	326,0±130,3	n.s	2,167±0,6540	n.s

IT, Imobilidade Tônica; Duração expressa em segundos. AP=Ambiente empobrecido, biotério setorial; AE=Ambiente enriquecido, biotério setorial; AP+=Ambiente empobrecido, biotério central; AE+=Ambiente enriquecido, biotério central n=número de animais por grupo, EPM=Erro padrão da média, Não houve diferença significativa entre os grupos de acordo o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

3.3.2. Níveis de corticosterona

Para comparar os efeitos das condições de alojamento sobre hormônios relacionados ao estresse, foram medidos os níveis plasmáticos de corticosterona nos animais alojados em AP+ (n=6) e AE+ (n=6). Duas amostras de sangue foram coletadas, sendo a primeira anterior a realização do teste de imobilidade tônica e a segunda logo após o teste. Desse modo permitiu-se verificar não apenas os efeitos ambientais sobre os níveis basais de corticosterona como também a resposta hormonal dos animais à realização do teste de IT.

Os dados obtidos da quantificação plasmática de corticosterona por radioimunoensaio, foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias com teste post-hoc de Duncan para estabelecer a diferença entre os grupos. Os resultados da análise estão representados graficamente na figura 14. Foram encontrados efeitos estatisticamente significantes tanto do ambiente quanto do teste de IT sobre os níveis de corticosterona plasmática.

Quanto aos níveis basais de corticosterona (Pré-IT), pudemos verificar quantidades mais elevadas do hormônio em animais alojados em AP+ (média±EPM: 2,116±0,122) quando comparados aos níveis encontrados no plasma de animais alojados em AE+ (média±EPM: 1,783±0,054). Essa diferença foi considerada estatisticamente significativa pelo teste post-hoc de Duncan (p=0,0318). Essa diferença

entre os grupos não foi observada no plasma obtido após o teste de imobilidade tônica. ($p=0,432$).

Em ambos os grupos pudemos notar um aumento da corticosterona quando comparados seus níveis plasmáticos basais e níveis após o teste de imobilidade tônica. Todavia, apenas a resposta hormonal pós-IT dos animais do grupo AE+ (média±EPM: $2,250\pm0,145$) foi estatisticamente significativa pelo teste post-hoc de Duncan ($p=0,009$) em comparação aos níveis basais obtidos no mesmo grupo.

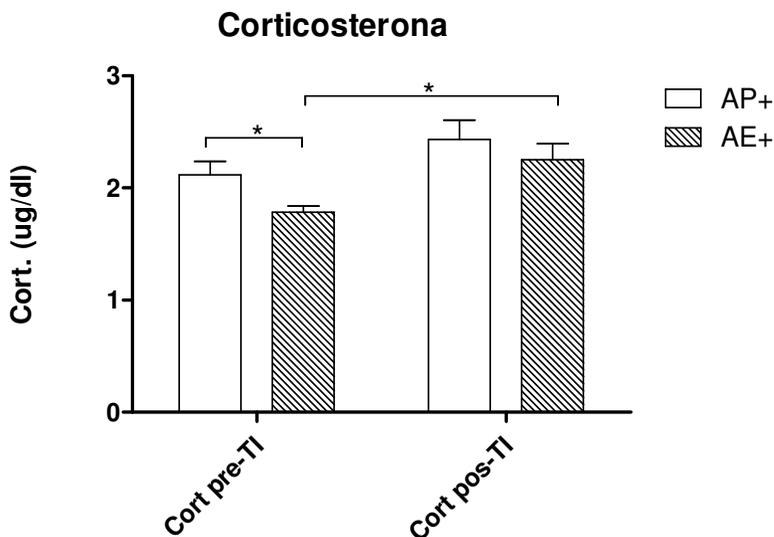


Figura 14: Efeito do ambiente sobre os níveis de corticosterona plasmática antes e após o teste de imobilidade tônica. AP+=Ambiente empobrecido, biotério central; AE+=Ambiente enriquecido, biotério central. “*” representa diferenças estatisticamente significantes pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan. Dados representados por média±EPM.

3.4. OS EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO SOBRE A NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL.

As quantificações de células DCX+ presentes no hipocampo de pombos adultos alojados em diferentes ambientes foram comparadas entre os subgrupos alojados em ambientes de laboratório ou no biotério central. Essas comparações, representadas graficamente na figura 15, foram realizadas através do teste-t de Student e consideradas significantes se obtido o valor de $p < 0,05$.

Pudemos verificar um aumento estatisticamente significativo ($p=0,026$) no número médio de células DCX+ hipocampais presentes nos animais alojados em AE (106.7 ± 17.20) quando comparados com aqueles alojados em ambiente padrão de laboratório (55.28 ± 3.328). De maneira semelhante os animais alojados no biotério central em AE+ (92.85 ± 7.190) apresentaram maior número médio de células DCX+ hipocampais do que seus correlatos alojados em AP+ (54.98 ± 5.900), essa diferença também foi estatisticamente significativa pelo teste-t de student ($p= 0,0066$).

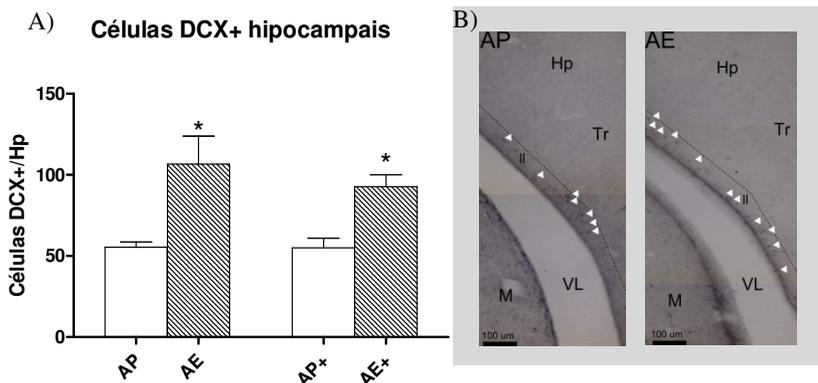


Figura 15: A) Efeito do ambiente sobre o número médio de células DCX+ hipocampais. AP=Ambiente empobrecido, biotério setorial; AE=Ambiente enriquecido, biotério setorial; AP+=Ambiente empobrecido, biotério central; AE+=Ambiente enriquecido, biotério central “*” representa diferenças estatisticamente significantes pelo teste-t de Student entre os grupos enriquecidos e os grupos padrão do mesmo local. Dados representados por média±EPM. B) Fotomicrografias de seções representativas da região do hipocampo ventral de pombos alojados em AP e AE. Setas brancas apontam para células DCX+ quantificadas.

Não pudemos encontrar correlações estatisticamente significantes entre o número de células DCX+ presentes no hipocampo ventral de pombos alojados nas diferentes condições ambientais e a duração dos comportamentos observados nos testes comportamentais de ADON e IT (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de R das correlações entre as durações dos comportamentos avaliados nos testes comportamentais (ADON e IT) com o número de células DCX+ observadas no Hp ventral de pombos adultos

	Exploração visual	Exploração angular	Imobilidade	Locomoção	Imobilidade tônica
Cels. DCX+	-0,00737	-0,09587	-0,04606	-0,14612	-0,05167

Valores extraídos do teste de Spearman. Nenhuma correlação estatisticamente significativa pode ser encontrada entre o número de células DCX+ hipocampais e duração dos comportamentos observados.

4. DISCUSSÃO

4.1. DISTRIBUIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS E FIBRAS DCX+

No presente trabalho, foram observadas células e fibras DCX+ distribuídas através de todo o telencéfalo do pombo. As extremidades do ventrículo lateral (SVZ1 e 2), e de uma maneira mais esparsa, o restante do epêndima ventricular, parecem ser a principal fonte de células DCX+. Essas regiões abrigam pequenas células fusiformes bipolares, de orientação paralela à parede ventricular, que parecem ser comparáveis aos neuroblastos em migração previamente observados na zona ventricular de roedores (células do tipo A; ALVAREZ-BUYLLA et al., 1998). Na zona ventricular de roedores as células do tipo A, derivam de progenitores que expressam GFAP (células do tipo B) ou células do tipo C (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1998; LIM e ALVAREZ-BUYLLA., 1999). No presente trabalho, foi observada a presença tanto de células GFAP+ quanto de células BrdU+ no VL do pombo que poderiam representar células do tipo B ou C, respectivamente. Nenhuma célula imunoreativa ao BrdU ou ao GFAP apresentou expressão de DCX. Da mesma maneira, não pudemos encontrar co-localização entre a DCX e marcadores de neurônios maduros (NeuN). Essas observações sugerem, que semelhante ao observado em mamíferos (COUILLARD-DESPRES et al., 2005), essas células presentes no encéfalo de pombos adultos, e que expressam a proteína doublecortina, são de fato neurônios novos.

Diversos estudos demonstraram que as regiões ventriculares são a principal fonte de células novas no encéfalo de aves e répteis adultos (ALVAREZ-BUYLLA e NOTTEBOHM, 1988; ALVAREZ-BUYLLA et al., 1990; LING et al., 1997; LINDSEY AND TROPEPE, 2006; MARCHIORO et al., 2005). Nossos dados, obtidos através da administração i.p. de BrdU, demonstram que regiões com a maior concentração de células e fibras DCX+ (SVZ1 e 2), também abrigam a maior densidade de núcleos que incorporaram BrdU. Assim podemos concluir que as extremidades do ventrículo lateral podem ser consideradas como “hot-spots” de proliferação celular no encéfalo de pombos adultos.

“hot-spots” também puderam ser observados na região ventricular de canários (e.g., ALVAREZ-BUYLLA et al., 1998; ALVAREZ-BUYLLA et al., 1990; VELLEMA et al., 2010) e *Parus palustris* (passeriformes; Patel et al., 1997) adultos. De maneira

semelhante ao nosso estudo, foi observado que em canários, 24h após a injeção i.p. de BrdU, as extremidades do VL adjacente ao MSt caudal e ao hyperpallium rostromedial, apresentavam altas taxas de incorporação do marcador, sugerindo alta proliferação nessas regiões (VELLEMA et al., 2010). Todavia, é interessante notar que células novas DCX+ parecem ser distribuídas de forma homogênea pela zona ventricular de canários (BALTHAZART et al., 2008; BOSERET et al., 2007) e de galinhas (MEZEY et al., 2012), enquanto em mandarins, o mRNA para DCX tem sua maior expressão apenas na extremidade dorsal do VL em níveis telencefálicos intermediários. Essas observações apontam para a existência de grande variação da arquitetura dessas regiões proliferativas e nichos neurogênicos mesmo dentro da Classe Aves. De fato, em rolinhas adultas (*Streptopalia risoria*), uma distribuição homogênea de células proliferativas, porém sem nenhum “hot-spot” bem definido, foi observada (LING et al., 1997). No pombo, podemos observar duas regiões proliferativas bem definidas. Em regiões caudais a SVZ1 e SVZ2 parecem originar dois grupos de células DCX+ que migrariam através de vias migratórias suprindo diversas regiões telencefálicas com novos neurônios. Em regiões mais rostrais, porém, essas suas zonas parecem se fundir, e as células ali originadas, migrariam distâncias mais curtas suprindo regiões próximas como o bulbo olfativo e córtex pré-pririforme.

O bulbo olfativo (OB), representa a região mais intensamente marcada pela DCX no telencéfalo do pombo, e a região do VL ao nível do bulbo olfativo também mostrou intensa incorporação de BrdU. Nossos dados sugerem que de maneira semelhante ao visto em roedores, o bulbo olfativo é uma região neurogênica ou de grande aporte de células novas. Esses dados refletem as descrições feitas em mamíferos que mostram a incorporação de novos neurônios em circuitos olfatórios e sua possível relevância para o comportamento reprodutivo e social de roedores (GHEUSI et al., 2009; SNYDER et al., 2005). É possível que também exista relevância funcional para essa intensa incorporação de novos neurônios no OB de pombos. Os circuitos olfativos parecem ser críticos para a navegação de pombos durante o “homing” (GAGLIARDO et al., 2011; PATZKE et al., 2010) e para o controle do comportamento social e sexual em codornas (JONES AND ROPER, 1997). Todavia, em outras espécies de aves, como na galinha, a expressão de DCX no OB parece diminuir com a idade (MEZEY et al., 2012), e até onde pudemos verificar na literatura, outros trabalhos não puderam demonstrar a presença de células e fibras DCX+ no bulbo olfativo de passeriformes como canários e mandarins.

Células e fibras DCX+ foram raras ou ausentes em áreas somatosensoriais visuais como, por exemplo, áreas o hyperpallium apicale e entopallium. Uma distribuição similar da DCX em áreas paliais também foi observada em outras aves adultas como canários, mandarins e galinhas (BALTHAZART et al., 2008; BOSERET et al., 2007; KIM et al., 2006; MEZEY et al., 2012). Em canários (BALTHAZART et al., 2008; BOSERET et al., 2007), bem como no pombo (dados aqui apresentados), o HVC, área envolvida com expressão do canto, e o nidopallium caudomedial adjacente são densamente populadas por células DCX+. Em canários e mandarins também foram observadas intensa expressão de DCX em outras áreas relacionadas com o controle vocal como a área X (parte do estriado medial rostral) e núcleo robustus archistriatalis (parte do complexo amigdalóide) (BALTHAZART et al., 2008; BOSERET et al., 2007; KIM et al., 2006). Nossos dados mostram que apesar de observarmos no pombo uma intensa marcação DCX+ no estriado, não pudemos encontrar a mesma marcação no complexo amigdalóide, que é totalmente desprovido de células e fibras DCX+. Essas diferenças parecem apontar para a existência de variações espécie-específicas das regiões que recrutam novos neurônios, possivelmente relacionadas a diferenças comportamentais.

Em aves, o estriado medial e lateral são componentes cruciais de circuitos telencefálicos associados com a memória, aprendizado hedonismo e controle motor (CSILLAG et al., 2008; FEE AND GOLDBERG, 2011; LUO et al., 2001). Os presentes resultados reforçam a idéia de que esses circuitos estão sujeitos a intensa plasticidade e que um remodelamento constante ocorra, pelo menos em parte, pela incorporação de novos neurônios. As estruturas paliais e os núcleos da base no pombo, apresentam células DCX+ que não possuem co-localização com NeuN ou GFAP. Essas células possuem características morfológicas (multipolares, de arborização dendrítica complexa) que também não são consistentes às apresentadas por neuroblastos em migração. A complexidade da arborização dendrítica é uma característica associada com neurônios e função neuronal (PARRISH et al., 2007). Esses dados sugerem que as células DCX+ complexas presentes nessas áreas possam ser interpretadas como neurônios imaturos que estejam sofrendo algum tipo de remodelamento morfológico (COHEN et al., 2008; COUILLARD-DESPRES et al., 2005; FRIOCOURT et al., 2003). Em ratos, também puderam ser observadas células DCX+ de complexidade típica de neurônios

maduros, em regiões como, por exemplo, estriado dorsal (fora da via migratória rostral), área septal e córtex entorrinal (NACHER et al., 2001).

Uma extensa distribuição de células DCX+ bipolares e células DCX+ multipolares também foi observada em coelhos e cobaias (LUZZATI et al., 2009; XIONG et al., 2008), camundongos, (YANG et al., 2004), gatos, macacos rhesus e humanos (CAIA et al., 2009). Esses resultados sugerem que a distribuição por todo o prosencéfalo de células que expressam DCX pode ser um atributo comum a todos os vertebrados, porém, mais exuberante no encéfalo de vertebrados não-mamíferos.

No hipocampo de pombos adultos são encontradas células DCX+ fusiformes bipolares, principalmente nas camadas lateral (ll), medial(ml) e Tr do “V” hipocampal. Também pudemos observar núcleos BrdU+ presentes no epêndima do VL adjacente ao Hp. Proliferação celular na região do hipocampo foi reportada por diversos estudos aves (e.g., LADAGE et al., 2010; LADAGE et al., 2011; LAW et al., 2010; PATEL et al., 1997; SHERRY e HOSHOOLEY, 2010), assim como em mamíferos onde a neurogênese hipocampal constituiu um importante objeto de estudos (e.g., SANTARELLI et al., 2003; KEMPERMANN et al., 1997; BROWN et al., 2003). As células DCX+ formadas no hipocampo de pombos adultos aparecem em menor quantidade quando comparadas as presentes nas SVZs e parecem originar células que migram para o centro do hipocampo ventral (Tr) e para a camada medial. Quando comparadas com a camada lateral, as células presentes em Tr e ml, parecem possuir arborizações dendríticas mais complexas e marcação menos intensa (Figura 8 H-I). É interessante notar que apesar de não termos uma clara subdivisão do hipocampo de aves, quanto comparado ao de mamíferos, ATOJI e WILD (2007) propuseram baseados em evidências embriológicas, neuroquímicas e hodológicas, que as regiões DL e DM do hipocampo seriam comparáveis ao córtex entorrinal e ao subículo/cornos de Amon, respectivamente. Também foi proposto que pelo fato de apresentarem apenas conexões intrínsecas ao hipocampo, as camadas ll e ml seriam homólogas ao giro denteado de mamíferos. Uma vez que pudemos encontrar células novas, principalmente nessas regiões, nossos dados parecem corroborar essa hipótese.

4.2. EFEITOS DO AMBIENTE SOBRE A DCX+ HIPOCAMPAL, COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS E NÍVEIS DE CORTICOSTERONA

Em ratos e camundongos adultos o número de células DCX+ presentes na zona subgranular do hipocampo aumenta em animais alojados em ambientes enriquecidos (e.g., BRUEL-JUNGERMAN et al., 2005, MESHİ et al., 2006) ou diminui após o isolamento (SILVA et al., 2011). De maneira semelhante, nossos dados mostram que tanto os pombos adultos alojados em ambientes com enriquecimento visual (realizado em laboratório), quanto animais alojados em enriquecimento social (no viveiro do biotério) apresentaram maior número de células DCX+ na região do hipocampo ventral do que seus correlatos alojados em ambientes “empobrecidos” e em isolamento. Esses dados confirmam a idéia de que ambientes com múltiplos estímulos sejam eles visuais ou sociais, acarretam em modificações neuroanatômicas também em aves e corroboram com a idéia de que células DCX+, pelo menos no hipocampo ventral, constituam uma população de células novas. A princípio, nossos experimentos não permitiram avaliar se ambientes enriquecidos estimulam a proliferação celular ou aumentam a sobrevivência de progenitores. Ou ainda, se o possível empobrecimento do ambiente aumenta a morte celular, gerando a diferença no número de células observado neste trabalho.

A exposição aos diferentes ambientes não foi capaz de alterar os comportamentos de exploração visual, exploração angular e locomoção nos testes do ambiente desconhecido e objeto novo. Todavia, os animais alojados em AE+ apresentaram no teste do ambiente desconhecido maior duração (não significativa $p=0,06$) e maior frequência (significante $p=0,05$) de imobilidade. Dados do nosso laboratório também mostraram que pombos expostos a um ambiente ,desconhecido após receberem doses de 2.5 e 7,5 mg/kg de diazepam apresentaram aumento significativo da duração da imobilidade quando comparados ao grupo tratado com veículo (SOUZA et al., 2008). Estes dados sugerem que a exposição dos pombos ao ambiente desconhecido tem consequências comportamentais que podem ser impedidas tanto pelo diazepam quanto pelo enriquecimento ambiental. Em galinhas, locomoção e movimentos exploratórios com a cabeça foram associados à antecipação de um estímulo aversivo enquanto que a antecipação de estímulos positivos ou neutros foi associada à redução destes comportamentos (ZIMMERMANN et al., 2010). Estes dados indicam que a inibição comportamental (redução de locomoção ou aumento de imobilidade) poderia representar sensações de conforto ou de indiferença em relação ao estímulo. A aplicação desta interpretação aos dados do presente trabalho permitiria concluir que o alojamento em uma situação social pode ter reduzido a percepção de características

potencialmente ameaçadoras do ambiente desconhecido, como já observado em roedores (GLASPER et al., 2011). Essa possível ansiólise parece estar dissociada da neurogênese hipocampal de pombos, uma vez que pudemos observar aumento do número de células DCX+ nos animais alojados em AE, sem que houvesse alteração da imobilidade. Apesar do aumento no número de células hipocampais observado em pombos alojados em AE e AE+, também não pudemos observar alterações na duração da imobilidade tônica em nenhum dos grupos experimentais.

A IT é descrita como um comportamento inato desencadeado pela contenção física do animal e caracterizado por um estado catatônico (JONES, 1986; MILLS e FAURE, 1991). Este comportamento parece fazer parte do repertório de respostas defensivas à predação (HAZARD et al., 2008) podendo ser um bom indicador de medo ou, ao menos situações que representem uma ameaça para o animal. A IT, em coelhos modificou padrões de EEG no hipocampo e se mostrou suscetível à administração de drogas como a anfetamina e PTZ (KLEM, 1966). De todos os animais dos quatro grupos de alojamento submetidos ao teste, apenas dois animais foram refratários, ou seja, falharam em expressar o comportamento de imobilidade tônica após cinco episódios de contenção. Todavia a dispersão dos dados de duração de imobilidade foi muito grande e não pudemos encontrar efeito da ambiente sobre esse comportamento. Existe grande variação genética sobre a expressão da IT. Codornas puderam ser selecionadas artificialmente em duas linhagens, uma que apresentava grande intensidade de imobilidade tônica e outra que não apresentava o comportamento (MILLS e FAURE, 1991). De uma maneira geral, o perfil genético dos pombos utilizados nesse estudo não é conhecido e não foram feitos testes prévios a fim de selecionar para o estudo apenas os animais que apresentassem imobilidade tônica.

Os níveis basais (Pré-IT) de corticosterona plasmática encontrados no presente trabalho nos animais alojados em AE+ e AP+, refletem estudos prévios, nos quais níveis basais de mesma magnitude puderam ser observados em pombos capturados em ambiente natural (ROMERO e WINGFIELD, 2001). Em outro estudo, utilizando galinhas poedeiras, também alojadas em grupos sociais, níveis semelhantes de corticosterona plasmática puderam ser identificados (BEUVING e VONDER, 1977). Nossos dados sugerem que o alojamento individual dos animais parece estar relacionado com os níveis significativamente maiores de glicocorticóides plasmáticos encontrados nesses animais, podendo ser o isolamento social um fator estressante ao qual os animais

estariam sujeitos. Estes dados também parecem estar de acordo com estudos utilizando paradigma de separação, em que galinhas juvenis separadas do contato com seus co-específicos apresentam níveis significativamente maiores de corticosterona (FELTENSTEINA et al., 2003). Ainda é interessante notar que, em camundongos, podemos observar efeitos contrários do enriquecimento social sobre os níveis de corticosterona plasmática. De uma maneira geral, camundongos alojados em grupo apresentam níveis basais mais elevados de corticosterona plasmática do que aqueles em isolamento (XU et al., 2009; ROCERI et al., 2004; ARNDT et al., 2000). Porém, em animais que são submetidos a estressores como repetidos testes de nado forçado durante 13 dias, os níveis encontrados após os testes são significativamente maiores nos animais isolados e não parecem alterados nos animais alojados em grupo (ROCERI et al., 2004). Argumenta-se que essa elevação de glicocorticóides circulantes observada em ratos alojados em ambientes enriquecidos poderia ser preparatória para um evento estressante, uma vez que o ambiente enriquecido parece “tamponar” a elevação desses hormônios após testes estressantes ao mesmo tempo em que parece aumentar os níveis pré estresse (JACOBSON e SAPOLSKY, 1991; SAPOLSKY et al., 2000; CIRULLI et al., 2010). Todavia, nossos dados juntamente com os encontrados na literatura disponível, sugerem que em aves, tais mecanismos possam ser regulados de outra maneira em resposta a diferentes condições ambientais ou em resposta a eventos estressantes (e.g., imobilidade tônica). Também é interessante notar que os animais alojados em AE+ também apresentaram menores níveis basais de corticosterona, o que também parece contribuir para um aumento do número de células hipocâmpais (PRAVOSUDOV, 2007).

O teste de imobilidade tônica foi capaz de elevar os níveis de corticosterona de maneira significativa nos animais alojados em AE+ mas não em AP+. Os níveis plasmáticos encontrados em ambos os grupos após o teste não foram significativamente diferentes entre si, o que pode sugerir que exista um máximo de resposta hormonal ao teste independente de fatores ambientais. Não pudemos encontrar nenhuma correlação estatística entre o tempo de imobilidade tônica e a intensidade da resposta hormonal dos animais alojados em ambos os grupos. Ainda, estudos realizados com codornas artificialmente selecionadas com relação à propensão de resposta de imobilidade tônica também não foram capazes de encontrar essas correlações ou mesmo diferenças significativas nos níveis de corticosterona circulante em animais dessas diferentes linhagens após serem submetidos a testes de

estresse e medo (RICHARD et al., 2008; CALANDREAU et al., 2011). Ainda, respostas hormonais semelhantes também foram vistas em animais capturados ao ar livre e que foram submetidos à restrição de movimento por 30 min. sem que fosse desencadeado o comportamento de imobilidade tônica (ROMERO e WINGFIELD, 2001), Sugerindo que apesar de que animais alojados em AE+ tenham apresentado uma resposta hormonal ao teste de imobilidade tônica de significância estatística, esta resposta não é fator causal direto do comportamento da imobilidade, mas talvez, uma consequência da contenção.

5. CONCLUSÃO

A distribuição das células e fibras imunoreativas à doublecortina descrita no presente trabalho é consistente com as encontradas por estudos prévios em passeriformes e galiformes. A descrição morfológica das células DCX+ presentes nas regiões subventriculares somada à presença de BrdU e à falta de co-localização com outros marcadores, nos permite concluir que a DCX representa um bom marcador imunistoquímico para identificação de neurônios novos formados no encéfalo de pombos adultos. Diferentes condições ambientais exercem influência sobre as células DCX+ hipocampais, demonstrando assim, que uma regulação da neurogênese pós-natal ocorre em resposta a fatores ambientais de forma semelhante ao que pode ser observado em mamíferos. O ambiente também é capaz de modular os níveis basais de corticosterona e a intensidade da resposta desse hormônio a testes de estresse (e.g., teste de imobilidade tônica). A alteração do número de células DCX+ no hipocampo de pombos adultos, sem modificações significativas na duração e frequência de comportamentos defensivos nos permite concluir que a expressão de comportamentos defensivos e a neurogênese hipocampal são eventos dissociados nesta espécie. A NPN hipocampal em pombos domésticos adultos parece ser sensível a alterações ambientais, e esses animais podem oferecer um bom modelo para o estudo de mecanismos de regulação, bem como, para investigação das consequências comportamentais da mesma.

REFERÊNCIAS

1. ALTMAN, J.; DAS, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **Journal of Comparative Neurology**, n.124 p.319-35, 1965.
2. ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, n. 135, p.1127-1128, 1962.
3. ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J.M.; MATEO, A.S.; MERCHANT-LARIOS, H. Primary Neural Precursors and Intermitotic Nuclear Migration in the Ventricular Zone of Adult Canaries. **The Journal of Neuroscience** n.18, p.1020-1037,1998.
4. ALVAREZ-BUYLLA, A.; KIRN, J.R. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. **Journal of Neurobiology**. n. 33, p.585-601,1997.
5. ALVAREZ-BUYLLA, A.; NOTTEBOHM, F. Migration of young neurons in adult avian brain. **Nature**, n. 335, p. 353-354, 1988.
6. ALVAREZ-BUYLLA, A.; THEELEN, M.; NOTTEBOHM, F. Proliferation “hot spots” in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. **Neuron**, n.5, p.101-109. 1990.
7. ARNDT, S.; LAARAKKER, M.; VAN LITH, H.; VAN DER STAAY, H.; GIELING, E.; SALOMONS, A.; VAN'T KLOOSTER, J.; OHL, F. Individual housing of mice — Impact on behaviour and stress responses. **Physiology & Behavior** n. 97, p. 385-393, 2009
8. ATOJI, Y, WILD, J.M. Limbic system in birds: morphological basis. em: Watanabe, S.; Hofman, M. eds,. **Integration of Comparative Neuroanatomy and Comparative Cognition**, Keio University Press, Tokyo, p. 97-124, 2007.
9. BALTHAZART, J.; BOSERET, G.; KONKLE, A. T. M.; HURLEY, L. L; BALL, G. F. Doublecortin as a marker of adult neuroplasticity in the canary song control nucleus HVC. **European Journal of Neuroscience**, n. 27, p. 801-817. 2008.
10. 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**, n.167, p.63-74, 2006.
11. BARNEA, A.; NOTTEBOHM, F. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, n.91, p.11217-11221, 1994.

12. BÉDARD, A.; PARENT, A. Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. **Developmental Brain Research**, n.151, p.159–168, 2004.
13. BENAROYA-MILSHTEIN, N.; HOLLANDER, N.; APTER, A.; KUKULANSKY, T.; RAZ, N.; WILF, A.; YANIV, I.; PICK, C.G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience**, n. 5, p.1341–1347, 2004.
14. BEUVING, G.; VONDER, G.M.A. Daily rhythm of corticosterone in laying hens and the influence of egg laying. *Journal of. Reproduction and Fertility*. n.51,p.168-173, 1977.
15. BINGMAN, V.P.; SIEGEL, J.J.; GAGLIARDO, A.; ERICHSEN, J.T. Representing the richness of avian spatial cognition: properties of a lateralized homing pigeon hippocampus. **Neuroscience** n.17, p. 17-28, 2006.
16. BOSERET, G.; BALL, G.; BALTHAZART, J. The microtubule-associated protein doublecortin is broadly expressed in the telencephalon of adult canaries. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, n. 33, p.140-154, 2007.
17. 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** n.467, p. 1–10, 2003.
18. 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**, n.21 p.513–521, 2005.
19. 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**, n. 216, p.342-356, 2009.
20. CAIN, M.E.; GREEN, T.A.; BARDO, M.T. Environmental enrichment decreases responding for visual novelty. **Behavioural Processes**, n. 73, p.360-366, 2006.
21. CALANDREAU, L.; FAVREAU-PEIGNÉA, A.; BERTINA, A.; CONSTANTINA, P.; ARNOULDA, C.; LAURENCEE, S.; LUMINEAUE, S.; HOUELIÈRE, C.; RICHARD-YRISE, M.A.; BOISSYF, A.; LETERRIERA, C. Higher inherent fearfulness potentiates the effects of chronic stress in the Japanese quail. **Behavioural Brain Research** n.225 p.505– 510, 2011.
22. CAMERON, H.A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**, n. 61, p.203–209, 1994.

23. CIRULLI, F.; BERRY, A.; BONSIGNORE, L.T.; CAPONE, F.; D'ANDREA, I.; ALOE, L.; BRANCHI, I.; ALLEVA, E. Early life influences on emotional reactivity: Evidence that social enrichment has greater effects than handling on anxiety-like behaviors, neuroendocrine responses to stress and central BDNF levels. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** n. 34 p.808–820, 2010.
24. CLAYTON N.S.; KREBS J.R. Hippocampal growth and attrition in birds affected by experience. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, n.91, p. 7410-7414, 1994.
25. COHEN, D.; SEGAL, M.; REINER, O. Doublecortin supports the development of dendritic arbors in primary hippocampal neurons. **Developmental Neuroscience**, n.30, p.187-199, 2008.
26. COLOMBO, M.; BROADBENT N. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n. 24, p. 465–484, 2000.
27. COUILLARD-DESPRES, S.; WINNER, B.; SCHAUBECK, S.; AIGNER, R.;VROEMEN, M.; WEIDNER, N.; BOGDAHNS, U.; WINKLER, J.; KUHN, H.G.; AIGNER, L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis.**European Journal of Neuroscience**, n. 21, p. 1–14, 2005.
28. 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**, n.42, P.257-264,2012.
29. CSILLAG, A.; BÁLINT, E.; ADÁM, A.; ZACHAR, G. The organisation of the basal ganglia in the domestic chick (*Gallus domesticus*): Anatomical localisation of DARPP-32 in relation to glutamate. **Brain Research Bulletin**, n.76, p.183–191, 2008.
30. DE KLOET E.R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. stress and the brain: from adaptation to disease **Nature Reviews: Neuroscience** n. 6 p.463-475, 2005.
31. DIAMOND, M.C.; LAW, F.; RHODES, H. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. **Journal of Comparative Neurology**, n.128 p.117–126, 1966.
32. FEE, M.S.; GOLDBERG, J.H. A hypothesis for basal ganglia-dependent reinforcement learning in the songbird. **Neuroscience**, n.198, p.152-170, 2011.
33. FELTENSTEINA, M.W.; LAMBDA, L.C.; WEBB, H.E.; WARNICKA, J.E.; KHAN, S.I.; KHAN, I.A.; ACEVEDO, E.O.; SUFKA, K.J. Corticosterone response in the chick separation–stress paradigm. **Physiology & Behavior** n.78, p.489– 493, 2003.

34. FISCHER, A.; SANANBENESI, F.; WANG, X.; DOBBIN, M.; TSAI, L. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodeling. **Nature**, n. 447, p. 178–182, 2007.
35. FRIOCOURT, G.; KOULAKOFF, A.; CHAFEY, P.; BOUCHER, D.; FAUCHEREAU, F.; CHELLY, J.; FRANCIS, F. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. **Cerebral Cortex**, n. 13, p. 620–626, 2003.
36. 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**, n. 19, p.311–315, 1999.
37. GAGLIARDO, A.; FILANNINO, C.; LOALÈ, P.; PECCHIA, T.; WIKELSKI, M.; VALLORTIGARA, G. Olfactory lateralization in homing pigeons: a GPS study on birds released with unilateral olfactory inputs. **Journal of Experimental Biology**, n.214, p.593-598, 2011.
38. GALIMBERTI, I.; GOGOLLA, N.; ALBERI, S.; SANTOS, A.F.; MULLER, D.; CARONI, P. Long-term rearrangements of hippocampal mossy fiber terminal connectivity in the adult regulated by experience. **Neuron**, n.50, p.749–763, 2006.
39. GARCÍA-VERDUGO, J.M.; FERRÓN, S.; FLAMES, N.; COLLADO, L.; DESFILIS,E.; FONT, E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 6, p.765-775, 2002.
40. GHEUSI, G.; ORTEGA-PEREZ, I.; MURRAY, K.; LLEDO, P. A niche for adult neurogenesis in social behavior. **Behavioural Brain Research**, p.1-8, 2009.
41. GLASPER, E.R.; SCHOENFELD, T.J.; GOULD, E.
Adult neurogenesis: Optimizing hippocampal function to suit the environment. **Behavioral Brain Research**. n.227, p.380-383, 2012.
42. GOBBO, O.L.; O'MARA, S.M. Impact of enriched-environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia. **Behavioral Brain Research**, n.152, p.231–241, 2004.
43. HAMPTON, R.R.; SHETTLEWORTH, S.J. Hippocampal Lesions Impair Memory for Location but Not Color in Passerine Birds, **Behavioral Neuroscience**. n. 110, p.831-835, 1996.
44. 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**, n. 54, p.645–653, 2008.

45. HEBB, D. O. The effects of early experience on problem-solving at maturity. **American Psychology** n.2, p.306–307, 1947.
46. HEBB, D. O. **The Organization of Behaviour**. ed. Wiley, Nova iorque, 1949.
47. HODGSON, Z.G.; MEDDLE, S.L.; ROBERTS, M.L.; BUCHANAN, K.L.; EVANS, M.R.; METZDORF, R.; GAHR, M.; HEALY, S.D. Patial ability is impaired and hippocampal mineralocorticoid receptor mRNA expression reduced in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) selected for acute high corticosterone response to stress. **Proceedings of the Royal Society B**, n. 274 p.239-245, 2007.
48. HUBEL, D.H.; WIESEL, T.N. Shape and arrangement of columns in cat's striate cortex. **Journal of Physiology**, n.165 p.559-68, 1963.
49. JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology Reviews**, n. 12 p.118-134, 1991.
50. JONES, R.B. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: A review. **World's Poultry Science Journal**, n.42, p.82-96, 1986.
51. JONES, R.B.; ROPER, T.J. Olfaction in the domestic fowl: a critical review. **Physiology and Behavior**, n.62, p.1009-1018, 1997.
52. KARTEN, H.J.; HODOS, W. **Stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon (*Columba livia*)**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1967.
53. KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, n. 386 p. 493–495, 1997.
54. KEVERNE, E.; CURLEY, J.P. Epigenetics, brain evolution and behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, n. 29, p.398–412, 2008.
55. KIM, Y.; PEREGRINE, J.; ARNOLD, A.P. The distribution of expression of doublecortin (DCX) mRNA and protein in the zebra finch brain. **Brain Research**, n.1106, p. 189 – 196, 2006.
56. KLEM, W.R. Electroencephalographic-Behavioral dissociations during animal hypnosis, **Eletroencephalography and Clinical Neurophysiology**, n.21 p.365:372, 1966.
57. KORNACK, D.R.; RAKIC, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** n. 96, p.5768–5773. 2001
58. KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H.; Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **The Journal Neuroscience**, n. 16, p. 2027–2033, 1996.
59. LADAGE, L.D.; ROTH, T.C.; PRAVOSUDOV, V.V. Hippocampal neurogenesis is associated with migratory behaviour

- in adult but not juvenile sparrows (*Zonotrichia leucophrys* ssp) **Proc Biol Sci**, n.1702 p.138-43, 2011.
60. LADAGE, L.D.; ROTH, T.C.; FOX, R.A.; PRAVOSUDOV, V.V. Ecologically relevant spatial memory use modulates hippocampal neurogenesis **Proc Biol Sci**, n.1684 p.1071-1079, 2010.
 61. 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**, n. 70, p. 16-27, 2010.
 62. LIM, D.A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, n.96 p.7526-7531, 1999.
 63. LINDSEY, B.W.; TROPEPE, V. A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis. **Progress In Neurobiology**, n. 80, p.281-307, 2006.
 64. LING, C.; ZUO, M.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; CHENG, M.F. Neurogenesis in juvenile and adult ring doves *Journal of Comparative Neurology*, n.379 p.300-312. 1997.
 65. 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**, n.149, p.1-95, 2007.
 66. LLORENS-MARTÍN, M.V.; RUEDA, N.; MARTÍNEZ-CUÉ, C.; TORRES-ALEMÁN, I.; FLÓREZ, J.; TREJO, J.L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience** n. 147, p.631-638, 2007.
 67. LUCASSEN, P.J.; MEERLO, P.; NAYLOR, A.S.; VAN DAM, A.M.; DAYER, A.G.; FUCHS, E.; OOMEN, C.A.; CZÉH, B. Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications or depression and antidepressant action. **European Neuropsychopharmacology**, n. 20, p.1-17, 2010.
 68. 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**, n.21:p.6836-6845, 2001.
 69. LUZZATI, F.; BONFANTI, L.; FASOLO, A.; PERETTO, P. DCX and PSA-NCAM Expression Identifies a Population of Neurons Preferentially Distributed in Associative Areas of Different Pallial Derivatives and Vertebrate Species. **Cerebral Cortex**, n.19, p.1028-1041. 2009.
 70. MALBERG, J.E.; DUMAN, R.S. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology**, n. 28, p.1562-1571, 2003.

71. MALBERG, J.E.; EISCH, A. J.; NESTLER, E. J.; DUMAN, R.S. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience**, n. 26, p. 9104–9110, 2000.
72. MANEV, H.; UZ, T.; SMALHEISER, N.R.; MANEV, R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. **European Journal of Pharmacology** n. 411, 67–70, 2001.
73. MARCHIORO, M.; NUNES, J.M.; RAMALHO, A.M.; MOLOWNY, A.; PEREZ-MARTINEZ, E.; PONSODA, X.; LOPEZ-GARCIA, C. Postnatal neurogenesis in the medial cortex of the tropical lizard *Tropidurus hispidus*. **Neuroscience**, n. 134, p. 407-413, 2005.
74. MARCUS, R.C.; DELANEY, C.L.; EASTER, S.S. Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). **Visual Neuroscience**, n.16, p.417-24, 1999.
75. MASLOV, A.Y.; BARONE, T.A.; PLUNKETT, R.J.; PRUITT, S.C. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. , n.24, p.1726-1733, 2004
76. MEHLHORN, J.; REHKÄMPER, G. Neurobiology of the homing pigeon—a review **Naturwissenschaften**, n.96, p.1011-1025, 2009.
77. MESHI, D.; 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**, n. 9, p.729-731, 2006.
78. MEZEY, S.; KRIVOKUCA, D.; BALINT, E.; ADORJAN, A.; ZACHAR, G.; CSILLAG, A. Postnatal Changes in the Distribution and Density of Neuronal Nuclei and Doublecortin Antigens in Domestic Chicks (*Gallus domesticus*) **Journal of Comparative Neurology**, n.520, p.100–116. 2012.
79. MILLS, A.D.; FAURE, J.M. Divergent Selection for Duration of Tonic Immobility and Social Reinstatement Behavior in Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) Chicks. **Journal of Comparative Psychology**, n. 105, p.25-38, 1991
80. MIRESCU, C.; JENNIFER, D.; PETERS, E.; GOULD, E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. **Nature Neuroscience**, n. 8 p.841-846, 2004.
81. MULLEN, R.J.; BUCK, C.R.; SMITH, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development** n.116, p.201-211, 1992.
82. NACHER, J.; CRESPO, C.; MCEWEN, B.S. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. **European Journal of Neuroscience**, n.14, p.629-644, 2001.

83. NAKAMURA, N.; WATANABE, S.; BETSUYAKU, T.; FUJITA, K. Do birds (pigeons and bantams) know how confident they are of their perceptual decisions? **Animal Cognition** n.14, p.83–93, 2011.
84. NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J.. Enriched environments, experiencedependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews: Neuroscience**, n. 7, p.697-709, 2006.
85. NOTTEBOHM, F. A brain for all seasons: Cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. **Science**, n. 214, p.1368-1370, 1981.
86. PARRISH, J.Z.; EMOTO, K.; KIM, M.D.; JAN, Y.N. Mechanisms that regulate establishment maintenance and remodeling of dendritic fields. **Annual Reviews in Neuroscience**, n.30 p.399-423, 2007.
87. PATEL, S.N.; CLAYTON, N.S.; KREBS, J.R. Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain. **Behavior Brain Research**, n. 89, p.115-128. 1997.
88. PATZKE, N.; MANNS, M.; GÜNTÜRKÜN, O.; LOALÈ, P.; GAGLIARDO, A. Navigation-induced ZENK expression in the olfactory system of pigeons (*Columba livia*). **European Journal of Neuroscience**, n. 31, p.2062-1072, 2010.
89. PATZKE, N.; OCKLENBURG S.; VAN DER STAAY, F.J.; GÜNTÜRKÜN, O.;MANNS, M.; Consequences of different housing conditions on brainmorphology in laying hens. **Journal Of Chemical Neuroanatomy**, n. 37, p.141-148, 2009.
90. PRAVOSUDOV, V.V. Long-term moderate elevation of corticosterone facilitates avian food-caching behaviour and enhances spatial memory. **Proc. R. Soc. B**, n. 270 p.2599-2604, 2003.
91. PRAVOSUDOV, V.V. The relationship between environment, corticosterone, foodcaching, 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.
92. PYTTE, C.L.; PARENT, C.; WILDSTEIN, S.; VARGHESE, C.; OBERLANDER, S. Deafening decreases neuronal incorporation in the zebra finch caudomedial nidopallium (NCM). **Behavior Brain Research**, n.211 p.141-147, 2010.
93. 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**, n.473, p.377-414, 2004.
94. REINER, A; YAMAMOTO, K.; KARTEN H.J. Organization and evolution of the avian forebrain. **The Anatomical Record**, n, 287a, p.1080 –1102, 2005.
 95. REINER, O.; COUELLE, 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**, n. 188, p.1-16, 2006
 96. 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 (*C. livia*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. n. 32 p.1127-1131, 1999.
 97. RICHARD, S.; WACRENIER-CER, N.; HAZARD, D.; SAINT-DIZIER, H.; ARNOULD, C.; FAURE, J.M. Behavioural and endocrine fear responses in Japanese quail upon presentation of a novel object in the home cage. **Behavioural Processes**, n.77, p.313–319, 2008.
 98. ROCERI, M.; CIRULLI, F.; PESSINA, C.; PERETTO, P.; RACAGNI, G.; RIVA, M.A.; Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain- derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. **Biological Psychiatry**, .n.55, p.708–714, 2004.
 99. ROMERO, L.M.; WINGFIELD, J.C. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in free-living pigeons. **Journal Comparative Physiology B** n. 171, p.231-235, 2001.
 100. ROSENZWEIG M.R. em: Bermúdez-Rattoni, F. ed., **Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging**. CRC Press, Boca Raton, 2007.
 101. ROSENZWEIG, M.R. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. **American Psychology**, n.21, p.321–332, 1966.
 102. ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice. **Developmental Psychobiology**, n.2, p.87–95, 1969.
 103. ROSENZWEIG, M.R.; BENNETT, E.L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behavioral Brain Research**, n.78, p.57–65, 1996.
 104. SADANANDA, M. Adult neurogenesis in the brain of higher vertebrates: implications of the paradigm shift. **Current Science**, v. 87, n. 3, p.297-307, 2004.
 105. SALDANHA, C.J.; SCHLINGER, B.A.; CLAYTON, N.C. Rapid effects of corticosterone on cache recovery in mountain chickadees (*Parus gambeli*). **Hormones and Behavior**, n. 37, p.109–115, 2000.

106. SALE, A.; BERARDI, N.; MAFFEI, L. Enrich the environment to empower the brain. **Trends In Neurosciences**, v. 32, n. 4, p.233-239, 2009.
107. 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**, n.301, p.805-809, 2003.
108. SAPOLSKY, R.M. Glucocorticoids and hippocampal damage. **Trends in Neuroscience**, n. 10 p.346-349, 1987.
109. SAPOLSKY, R.M., ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrinology Reviews**, n.21, p.55–89, 2000.
110. SHERRY, D.F.; HOSHOOLEY, J.S. Seasonal hippocampal plasticity in food-storing birds. **Phil Trans R Soc B**, n.365 p.933–943. 2010.
111. SILVA,C.F.; DUARTE, F.S.; LIMA, T.C.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. **Behavior Brain Research**, 225 p.85-90, 2011.
112. SNYDER, J.S.; HONG, N.S.; MCDONALD, R.J.; WOJTOWICZ, J.M. A Role For Adult Neurogenesis In Spatial Long-Term Memory. **Neuroscience**, n. 130, p. 843–852, 2005.
113. SOFRONIEW, M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, n.119, p. 7-35, 2010.
114. 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** n. 81 p.26–33, 2009.
115. STRANAHAN, A.M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, n. 9 , p.526-533, 2006.
116. TANAPAT, P.; HASTINGS, N.B.; RYDEL, T.A.; GALEA, L.A.; GOULD, E. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormonedependent mechanism. **Journal of Comparative Neurology**, n. 437, p.496–504, 2001.
117. VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews: Neuroscience**, n.1p.191-198, 2000.
118. VECSEI, P. Glucocorticoids: cortisol, corticosterone and compounds. em: Jaffe, M. ed., **Methods of hormone radioimmunoassay**. Academic Press, 1979, p. 767-792.

119. VELLEMA, M.; VAN DER LINDEN, A.; GAHR, M. Area-Specific Migration and Recruitment of New Neurons in the Adult Songbird Brain. **Journal of Comparative Neurology**, n. 518 p.1442–1459, 2010.
120. VON KROGH, K; SØRENSEN, C.; NILSSON, G.E.; ØVERLI, Ø. Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments. **Physiology and Behavior**, n.101, p.32-39, 2010
121. WATSON, JD; CRICK, FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature** n.171, p.737-738, 1953.
122. WOLF, H.K.; BUSLEI, R.; SCHMIDT-KASTNER, R.; SCHMIDT-KASTNER, P.K.; PIETSCH, T.; WIESTLER, O.D.; BLUMCKE, I. NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, n.44 10, p.1167-1171, 1996.
123. XIONG, K.; LUO, D.W.; PATRYLO, P.R.; LUO, X.G.; STRUBLE, R.G.; CLOUGH, R.W.; YAN, X.X. Doublecortin-expressing cells are present in layer II across the adult guinea pig cerebral cortex: partial colocalization with mature interneuron markers. **Experimental. Neurology** n.211, p.271–282, 2008.
124. XU,Z.; HOU, B.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; WU, Y.; ZHAO, S.; ZHANG, C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. **European Neuropsychopharmacology**, n.19, p.868–875, 2009.
125. YANG, H.K.; SUNDHOLM-PETERS, N.L.; GOINGS, G.E.; WALKER, A.S.; HYLAND, K.; SZELE, G. Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. **Journal of Neuroscience Research**, n.76, p.282-295, 2004.
126. YOUNG, D.; LAWLOR, P.A.; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M.J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature Medicine**, n. 4, p. 448-453, 1999.

APÊNDICE A

Durante o curso dos testes de exposição ao ambiente desconhecido e apresentação do objeto novo, também puderam ser observados outros comportamentos menos frequentes. Abaixo, estão descritos esses comportamentos e as médias de duração e frequência estão representados na tabela aqui apresentada.

Auto-limpeza (AL): O animal toca as próprias penas com o bico, fazendo movimentos de puxar, separar ou bicar as penas

Bater de asas (BA): O animal, com as patas fixas no assoalho, bate as asas.

Exploração com o bico (EB): 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.

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

Defecar(D): Presença de fezes no assoalho da arena.

Tabela A) Frequência e duração dos comportamentos realizados no teste de Ambiente desconhecido

	Grupo (n=6)	Média Dur.	EPM	Média Freq.	EPM
AL	AE+	11,07	4,94	6,66	2,83
	AE	13,14	5,21	19,85	9,03
	AP+	28,28	19,29	8,00	4,40
	AP	18,17	6,90	24,85	12,64
BA	AE+	0,47	0,41	0,33	0,33
	AE	1,00	0,71	0,43	0,24
	AP+	4,41	1,2	1,16	0,60
	AP	4,58	2,80	1,24	0,46
EB	AE+	0,71	0,33	0,50	0,22
	AE	17,32	9,74	2,3	0,67
	AP+	57,38	14,65	19,16	10,4
	AP	3,64	1,34	1,11	0,32
S	AE+	0	-	0	-
	AE	0	-	0	-
	AP+	0	-	0	-
	AP	0	-	0	-
D	AE+	3,09	1,34	1,50	0,50
	AE	1,43	0,76	1,6	0,3
	AP+	1,84	1,18	1,00	0,4
	AP	1,3	0,69	1,7	0,2

Tabela B) Frequência e duração dos comportamentos realizados no teste do Objeto Novo.

	Grupo (n=6)	Média Dur.	EPM	Média Freq.	EPM
AL	AE+	7,16	3,47	4,16	1,95
	AE	16,17	9,80	3,50	0,74
	AP+	14,48	11,74	1,53	0,48
	AP	1,33	0,21	5,50	4,341
BA	AE+	2,12	0,50	1,16	0,30
	AE	2,45	0,54	4,6	0,14
	AP+	3,09	0,12	1,28	
	AP	13,00	9,01	1,87	0,53
EB	AE+	0,92	0,59	0,83	0,54
	AE	23,53	10,32	1,533	1,22
	AP+	7,35	4,31	1,999	0,99
	AP	5,08	2,75	2,32	0,59
S	AE+	0	-	0	-
	AE	0	-	0	-
	AP+	0	-	0	-
	AP	0	-	0	-
D	AE+	1,74	0,55	1,16	0,30
	AE	0,23	0,02	1,6	1,1
	AP+	0,16	0,09	1,2	0,25
	AP	1,16	0,22	1,8	0,8

