

Gabryela Isabel Huning

Comportamentos defensivos e neurogênese pós-natal no hipocampo de pombos (*Columba livia*): Efeitos do tratamento crônico com fármacos antidepressivos

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação e Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como pré-requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. José Marino Neto
Co-Orientador: Prof. Dra. Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis
2015

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

Huning, Gabryela Isabel

Comportamentos defensivos e neurogênese pós-natal no hipocampo de pombos (*Columba livia*) : Efeitos do tratamento crônico com fármacos antidepressivos. / Gabryela Isabel Huning ; orientador, José Marino Neto ; coorientador, Cilene Lino de Oliveira. - Florianópolis, SC, 2015.

103 p.

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

Inclui referências

1. Neurociências. 2. Neurociências, Pombos, Comportamento, Antidepressivos. 3. Cetamina, Fluoxetina. I. Marino Neto, José. II. Lino de Oliveira, Cilene. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Gabryela Isabel Huning

Comportamentos defensivos e neurogênese pós-natal no hipocampo de pombos (*Columba livia*): Efeitos do tratamento crônico com fármacos antidepressivos.

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Neurociências, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Neurociências.

Florianópolis, 17 de junho de 2015.

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal
Coordenador do Curso

Banca Examinadora

Prof. José Marino Neto
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Cilene Lino de Oliveira
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Alexandre Hoeller
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ana Lúcia Severo Rodrigues
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eloisa Pavesi
Membro da Banca
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha mãe,
minha irmã e meu marido.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer ao meu orientador Prof. José Marino Neto, por todos os ensinamentos destes últimos 3 anos, e a Profa. Cilene Lino de Oliveira por não medirem esforços para me ajudar nesta reta final, e também ao Fernando Melleu que sempre esteve presente para ajudar nas dúvidas desesperadas.

Também devo um enorme agradecimento aos servidores da PPG de Neurociências, em especial ao Nivaldo. Lembrando de agradecer também a equipe do Biotério Central, e em especial ao Dudu, que cuida dos animais com muito zelo. Agradeço a CAPES por financiar a pesquisa.

Agradeço aos colegas de laboratório: Michele, Tatiane e Karol, estas duas últimas são filhas de outro laboratório, mas somos todas da mesma família. Um agradecimento especial a Natália Paludo que foi meu braço direito e esquerdo ao longo dos experimentos.

Agradeço à algumas pessoas especiais externas a UFSC: Roberta, Tatiana, Luciana, Mateus, Airton, Arliones, Florence, Katherine, Nathalia, Larissa, Raphaela, Simone e Deyse por me ajudarem a aliviar a tensão dos dias.

Um agradecimento super especial a Lenice e ao Norberto, meus sogros, a família que a vida me deu de presente: Obrigada por me darem todo o suporte que eu precisei nesta reta final e pelo André.

Agradeço enormemente ao meu marido, pois o apoio dele foi fundamental para tudo, Obrigada André por me dar um lar e por entender o tempo que fiquei ausente para me dedicar à este trabalho.

Agradeço também a minha irmã, por todos os exemplos, e também por estar torcendo por mim, mesmo longe. E por último e mais importante, agradeço a minha amada Mãe, que é minha fonte inspiradora para tudo na vida, foi por ela que eu escolhi estudar neurociências, e com a certeza que fiz uma escolha certa.

*Two roads diverged in a wood, and I...
I took the one less traveled by,
and that has made all difference
(Robert Frost)*

RESUMO

Roedores adultos tratados com drogas antidepressivas apresentaram efeitos em relação à estas drogas em testes que avaliam comportamentos defensivos, estresse e neurogênese. Alterações comportamentais e neurogênicas também foram evidenciadas em aves, porém, em pombos adultos, os comportamentos defensivos diante de situações aversivas e potencialmente ameaçadoras, distribuição de neurônios hipocampais e suas respostas à antidepressivos não foi totalmente investigada. Quarenta e sete pombos adultos foram alojados individualmente em nosso laboratório, após um período de adaptação de 7 dias os animais foram submetidos ao teste ADON (Ambiente Desconhecido Objeto Novo; E1), marcando o primeiro dia de experimento. Dividimos os animais em grupos experimentais de acordo com a droga administrada, para os animais tratados com Fluoxetina (FLX), no 8º dia do experimento os animais receberam uma injeção (subcutânea, sc) de veículo (n=6) ou FLX nas doses de 2,5 mg/kg, n=6, ou 10 mg/kg, n=6) e 30 minutos depois foram testados novamente no ADON (E2), no 9º ao 23º dias cada animal recebeu uma injeção de acordo com o seu grupo experimental. Para os grupos tratados com Cetamina (CET), no 8º dia do experimento os animais receberam injeção (sc) de veículo (n=8), ou CET (nas doses de 2,5 mg/kg, n=8 ou 10 mg/kg, n=8), e 30 minutos testados no ADON (E2). Do 9º ao 15º dia os animais receberam uma injeção de acordo com seu grupo experimental. Em todos os grupos experimentais 24 horas após a última injeção os animais foram expostos ao ADON (E3), e 24 horas após, ao teste de Imobilidade Tônica (IT). Duas horas após a teste de IT, os animais foram perfundidos transcordialmente (PFA 4%) e tiveram os encéfalos retirados e seccionados em Vibrátomo (Vibratome®) e processados para detecção de células DCXir. O material foi então analisado sob microscópio óptico (Olympus BH2) e documentado para a contagem do número de células imunorreativas. Como controle de tempo de manipulação e de injeção um grupo adicional de animais, não-injetados com qualquer droga (CNT, n=8) foram submetidos também aos testes comportamentais. Neste trabalho, observamos que a administração aguda ou crônica de FLX e de CET afetam a expressão de comportamentos defensivos em relação a estímulos estressantes provocados pela separação dos congêneres seguida de exposição ao ADON. O tratamento crônico com FLX, nas duas doses aumentou o comportamento de espiar em relação ao tratamento agudo, sugerindo que a repetição do tratamento com FLX aumento os efeitos desinibitórios sobre os comportamentos defensivos ativos. Em relação à CET, seus efeitos agudos parecem ser essencialmente hipnóticos: diminui a locomoção e as diferenças no espiar antes e após o ON aparentam ter sido provocadas por uma diminuição neste comportamento em resposta ao ON. Os comportamentos defensivos observados no ADON podem ter sido provocados pelo estresse do procedimento experimental de um ambiente desconhecido. O efeito “antidepressivo” retardado da FLX em comparação com a CET pode ter causado as diferenças entre os tratamentos na neurogênese pois observamos um aumento na neurogênese hipocampal dos animais tratados com CET, o que não ocorreu com a FLX.

Palavras-chave: Neurogênese, Comportamento Defensivo, Drogas Antidepressivas, Fluoxetina, Cetamina, *Columba Livia*

ABSTRACT

Adults rodents treated with antidepressant drugs showed neurogenic effects and behavioral changes in tests that evaluate defensive behaviors to stress stimuli. Behavioral and neurogenic changes were also observed in birds, but in adult pigeons, defensive behavior in face of aversive and potentially threatening situations and its response to antidepressants, as well as the effects of the later on hippocampal neurogenesis has not been established. Forty-seven adult pigeons were housed individually and, after an acclimate period of 7 days, were submitted to UE+NO (Environment Unknown-New Object) test (E1). The animals were then separated into groups according to the drug administered, to the animals treated with fluoxetine (FLX) on the 8th day of the experiment the animals received an injection (subcutaneous, SC) vehicle (n = 6) at doses of or FLX 2.5 mg / kg, n = 6, or 10 mg / kg, n = 6) and 30 minutes later were retested in UE+NO (E2), at 9 to 23 days, each animal received an injection in accordance with their group experimental. For groups treated with CET on the 8th day of the experiment the animals were injected (sc) vehicle (n = 8) and CET (in doses of 2.5 mg / kg, n = 8 or 10 mg / kg, n = 8) and 30 minutes later tested in UE+NO (E2). The 9th to the 15th day the animals were injected according to their experimental group. In all experimental groups 24 hours after the last injection the animals were exposed to UE+NO (E3) and 24 hours after, the test of Tonic Immobility (TI). Was carried out two hours after IT test, transcardial perfusion of animals (4% PFA), and their brains were removed and sectioned into vibratome (Vibratome®) and processed for detection of DCXir cells. The material was then analyzed under an optical microscope (Olympus BH2) and documented for counting the number of immunoreactive cells. As time control manipulation and injection an additional group of animals, non-injected with any drug (CNT, n = 8) were also subjected to behavioral tests. In this work, we observed that acute or chronic administration of FLX and CET affected the expression of defensive behaviors in relation to stressful stimuli caused by the separation of congeners followed by exposure to UE+NO. Chronic treatment with FLX, in both doses increased the peeping in relation to acute treatment, suggesting that re-treatment with FLX increased the disinhibitory effects on assets defensive behaviors. Regarding CET acute effects it appears to be essentially hypnotics: decreases the mobility, and differences in peeping before and after the ON appear to have been caused by a decrease in this behavior in response to ON. Defensive behaviors observed in ADON may have been caused by stress of the experimental procedure of an unknown environment. The delayed effect "antidepressant" of FLX compared to the antidepressants effect CET may account for the differences between treatments in neurogenesis because we observed an increase in hippocampal neurogenesis of animals treated with CET, but not with FLX.

Keywords: Neurogenesis, Defensive Behavior, Antidepressant Drugs, Fluoxetine, Ketamine, Columba livia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo experimental usados nos experimentos.....	31
Figura 2 – Imagens do animal em condições experimentais.....	35
Figura 3 – Fotomicrografia e desenho esquemático da região quantificada e fotomicrografia de células bipolares e multipolares.....	37
Figura 4 – Comportamentos durante as exposições (E1, E2 e E3) no grupo experimental CNT.....	39
Figura 5 – Comportamentos no tratamento agudo (E2) ao teste ADON nos grupos experimentais VEI, FLX 2,5 e FLX 10mg/Kg.....	42
Figura 6 – Comportamentos no tratamento crônico (E3) ao teste ADON nos grupos experimentais VEI, FLX 2,5 e 10mg/Kg.....	43
Figura 7 – Duração, número de tentativas e análise de sobrevivência de imobilidade tônica dos grupos FLX.....	45
Figura 8 – Comportamentos no tratamento agudo (E2) ao teste ADON nos grupos experimentais VEI, CET 2,5 e CET 10.....	47
Figura 9 – Comportamentos no tratamento crônico (E3) ao teste ADON nos grupos experimentais VEI, CET 2,5 e CET 10.....	48
Figura 10 – Duração, número de tentativas e análise de sobrevivência de imobilidade tônica dos grupos CET.....	50
Figura 11 – Efeitos do tratamento crônico com FLX sobre o número de células DCX-ir no hipocampo.....	51
Figura 12 – Efeitos do tratamento crônico com CET sobre o número de células DCX-ir no hipocampo.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Catálogo de registros comportamentais.....	33
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- µm – Micromêros
- 5-HT – 5-hidroxitriptamina; serotonina
- 8-OG-DPAT – 8-hidroxi-DPAT
- AD – Ambiente desconhecido
- ADON – Tesde de ambiente desconhecido e objeto novo
- BrDU – 5-bromo-2-desoxiuridina
- CET – Cetamina
- CNT – Controle não-tratado
- DCX – Doublecortina
- DCX-ir – Células DCX imunoreativas
- E1 – Primeira exposição
- E2 – Segunda exposição
- E3 – Terceira exposição
- FLX – Fluoxetina
- GFAP – Proteína Fibrilar Glial Ácida
- HP – Hipocampo
- HVC – *Hyperstriatum Ventrale Pars Caudalis*
- IBRO – Associação mundial dedicada à pesquisa em neurociências
- ICV– Intracerebroventricular
- ISRS – Inibidores seletivos de recaptação de serotonina
- IT – Imobilidade tônica
- LL – Lâmina lateral
- LM – Lâmina medial
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NDR – Núcleo dorsal da rafe
- NeuN – *Neuronal Nuclei*
- NMDA – N-metil-D-Aspartato
- NMR – Núcleo mediano da rafe
- NPN – Neurogênese pós-natal
- ON – Objeto novo
- PAG – Substância cinzenta periaquedutal
- PFA – Paraformaldeído
- SC – Subcutânea
- TR – Área triangular

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VEI – Veículo

ZSG – Zona subgranular

ZSV – Zona subventricular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	HIPÓTESES E OBJETIVOS	34
2.1	Objetivos	34
3	METODOLOGIA	35
3.1	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	35
3.2	TESTES COMPORTAMENTAIS	39
3.2.1	Ambiente desconhecido e apresentação do objeto novo (ADON):	39
3.2.2	O catálogo comportamental e o método de registro e análise no ADON	40
3.2.3	Imobilidade Tônica (IT)	43
3.3	PERFUSÃO E MÉTODOS HISTOLÓGICOS	44
3.4	ANÁLISE DE DADOS	46
4	RESULTADOS	48
4.1	O ADON: Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas.	48
4.2	O ADON: Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas no grupo controle de FLX.....	50
4.3	O ADON: Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas no grupo controle de CET.....	50
4.4	Efeitos da administração aguda de FLX nos comportamentos apresentados no ADON:	51
4.5	A exposição ao ADON: efeitos da administração crônica de FLX	54
4.6	Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX 2,5 mg/Kg.....	55
4.7	Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX 10 mg/Kg.....	55
4.8	A imobilidade tônica: efeitos da administração crônica de FLX.....	55
4.9	A exposição ao ADON: Descrição qualitativa da primeira administração de Cetamina (E2).....	56
4.10	A exposição ao ADON: efeitos da administração aguda (E2) de Cetamina.....	58
4.11	A exposição ao ADON: efeitos da administração crônica por 7 dias (E3) de Cetamina.....	59
4.12	Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da CET 2,5	

mg/Kg.....	62
4.13 Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da CET 10 mg/Kg.....	62
4.14 Imobilidade tônica:efeitos da administração crônica de CET	62
4.15 Neurogênese hipocampal : efeitos da administração crônica de FLX. 63	
4.16 Neurogênese hipocampal: efeitos da administração crônica de Cetamina.....	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

Na década de 1960, Joseph Altman (*apud* WALTON, 2012) foi o primeiro a documentar a neurogênese pós-natal (NPN) no sistema nervoso central de roedores. Contudo, a neurogênese pós-natal foi amplamente aceita apenas duas décadas mais tarde, quando Fernando Nottebohm mostrou a existência de neurogênese no prosencéfalo de aves adultas (WALTON, 2012). Mesmo com a prova da existência de neurogênese em diferentes espécies de aves e mamíferos, passaram-se 15 anos até que a neurogênese pós-natal fosse reconhecida em humanos (ERIKSSON et al, 1998).

Nos mamíferos adultos, a produção de neurônios novos está confinada a duas áreas do cérebro: Zona subventricular (ZSV) e Zona subgranular (ZSG) no giro denteado do hipocampo. Neurônios novos gerados em adultos surgem a partir de células progenitoras da ZSG e migram para as camadas de células granulares onde se diferenciam em neurônios granulares (GOULD et al, 1999; SANTARELLI, 2003). Além disto, estes novos neurônios parecem se diferenciar adquirindo características morfológicas e fisiológicas que são semelhantes às células granulares de adultos. (HASTING e GOULD, 1999; VAN PRAAG et al, 2002, MALBERG e DUMAN, 2003).

Estas células são capazes de se integrar com circuitos funcionais do hipocampo. Este fato foi evidenciado pelas suas respostas à estimulação e a sua capacidade de estender projeções axonais para áreas alvos apropriadas (GOULD e GROSSI, 2002; SANTARELLI, 2003). Em particular, o nascimento e a integração funcional de novos neurônios no giro denteado do hipocampo durante a vida adulta é altamente modulada por fatores intrínsecos e ambientais. A exposição crônica ao estresse e a glicocorticoides prejudica a neurogênese (GOULD et al, 1992; RODRIGUEZ et al, 1998; WETSPHAL et al, 2013) enquanto que o tratamento com antidepressivos a favorece (SANTARELLI, 2003). Estudos mostram que o tratamento crônico com antidepressivos (Fluoxetina) aumenta a neurogênese hipocampal em modelos animais de depressão (MADSEN et al, 2000; SCOTT et al, 2000).

Assim, alguns estudos descobriram que diversos medicamentos que diminuem a depressão e ansiedade também aumentam a neurogênese

(MILLER & HEN, 2015). No entanto, este fato foi desafiado quando vários grupos não conseguiram encontrar um aumento na neurogênese em ratos e camundongos tratados com fluoxetina (HOLICK et al, 2008; HUANG et al, 2008; COWEN et al, 2008). Acompanhando estes estudos, observou-se que a capacidade da fluoxetina para aumentar a neurogênese é dependente do estresse (HUANG & HERBERT, 2006; MILLER et al, 2008; ALAHMED & HERBERT, 2008; DAVID et al, 2009; MILLER & HEN, 2015).

Neurônios recém-nascidos no giro denteado de adulto expressam marcação de *Doublecortina* (DCX) em dendritos, levantando a hipótese de que a expressão de DCX de neurônios em diferenciação está ligada com o desenvolvimento e maturação da árvore dendrítica, que também apóia a sugestão de um possível papel no processo de diferenciação, alongamento e manutenção (COHEN et al, 2008). A DCX é uma proteína associada aos microtúbulos que tem forte expressão em células pós-mitóticas em diferenciação e é importante 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). Durante o desenvolvimento, a DCX é amplamente expressa no encéfalo do embrião e sua expressão é bastante reduzida nos primeiros dias após o nascimento. Contudo, uma expressão reduzida da DCX persiste no encéfalo durante a idade adulta, promovendo, além da migração de novas células, o crescimento de processos e extremidades de neurônios já maduros (FRIOCOURT et al, 2003; REINER et al, 2006).

A neurogênese em mamíferos adultos (especialmente em roedores) parece ser modulada pela atividade de neurônios serotoninérgicos. O sistema serotoninérgico é composto por um pequeno número de neurônios que nascem nas regiões ventrais do cérebro posterior (DENERIS e WYLER, 2012). No sistema nervoso adulto, os neurônios serotoninérgicos (5-HT, 5-hidroxitriptamina) estão localizados no núcleo da rafe e se restringem à placa basal do mesencéfalo, ponte e medula (DAHLSTROM e FUXE, 1964). Neurônios 5-HTérgicos localizados nos núcleos da rafe rostral, tais como o núcleo dorsal da rafe (NDR) e o núcleo mediano da rafe (NMR), dão origem a maioria das fibras ascendentes serotoninérgicas na parte frontal do cérebro, incluindo o córtex

cerebral, o sistema límbico e gânglios basais (JACOBS e AZMITIA, 1992). Os neurônios serotoninérgicos inervam estruturas límbicas do cérebro anterior e podem ser ativados por estímulos condicionados, fatores neuroquímicos e ambientais (DEAKIN E GRAEEF, 1991).

O transportador de 5-HT está localizado tanto na porção terminal do axônio, quanto no corpo do neurônio. A atividade do neurônio serotoninérgico é regulada por alguns receptores e pelo transportador. Para regular a estimulação do neurônio e a liberação da serotonina, vários mecanismos de *feedback* agem (OLIVIER e OORSCHOT, 2005; SILVA e ANDRADE, 2007). Em um destes mecanismos os transportadores serotoninérgicos trazem a serotonina de volta por um mecanismo de captação. Esse processo, denominado recaptção de serotonina, é a forma que a célula utiliza para voltar à sua condição de repouso, tornando-se capaz de ser estimulada de novo, e evitando a super-estimulação dos receptores (DAHL, 2002; OLIVIER e OORSCHOT, 2005; SILVA e ANDRADE, 2007).

Os fármacos conhecidos como Inibidores Seletivos de Recaptção de Serotonina (ISRS) pertencem a uma classe de medicamentos utilizados para o tratamento de uma série de patologias relacionadas à fisiologia do neurotransmissor serotonina (SILVA e ANDRADE, 2007). Os ISRS atuam no neurônio pré-sináptico inibindo a recaptção desse neurotransmissor. (MYCEK e HARVEY, 1998; SERRETTI e ARTIOLI, 2004). Estudos recentes em animais sugerem também que os tratamentos com antidepressivos aumentam a conectividade sináptica no cérebro (SAIRANEN et al, 2006). No rato tratado com ISRS fluoxetina (FLX), a conectividade neuronal no hipocampo e córtex frontal se elevou com o aumento da formação da espinha dendrítica, sinapses e a densidade de axônios serotoninérgicos, respectivamente (HAJSZAN et al, 2005; ZHOU et al, 2006). O tratamento crônico com antidepressivos aumenta a neurogênese na ZGS do giro denteado e na ZSV dos roedores jovens adultos. A administração crônica de FLX aumenta a neurogênese no giro denteado do hipocampo, no hipotálamo e habenula (SACHS E CARON, 2014). Em contraste, o aumento da neurogênese na ZSV de roedores adulto não é observado pelos tratamentos de FLX por 3-4 semanas, mas a administração de FLX por 46 semanas afeta negativamente a neurogênese (OHIRA et al, 2011).

Adicionalmente a FLX inverte o estado de maturidade estabelecido de células granulares no hipocampo adulto (OHIRA et al, 2013). Camundongos nocaute que praticamente não possuem neurogênese, respondem a administração crônica de fluoxetina (JEDYNACK et al, 2014).

A FLX, semelhante a outros ISRS, bloqueia a bomba de captação neuronal da 5HT, causando aumento nos níveis extracelulares de 5-HT no núcleo dorsal da rafe e no córtex frontal. Estes níveis elevados de 5-HT extracelular agem através do receptor 5HT1A e 5HT1B diminuindo a síntese de 5HT, bem como inibindo os disparos de neurônios serotoninérgicos (MALAGIÉ et al, 1995; INVERNIZZI et al, 1996; SPERRY et al, 2003). A FLX tem capacidade de alterar o estado das células granulares do giro denteado do hipocampo. O tratamento crônico pode reverter drasticamente o estado estabelecido de maturação neuronal no hipocampo adulto em um processo chamado dematuração (OHIRA e MIRAKAYA, 2011). Tratamento crônico com antidepressivos aumenta a neurogênese na ZSG do giro denteado e na ZSV de roedores jovens adultos (NASRALLAH et al, 2010; COUILLARD-DESPRES et al, 2009).

Uma outra droga com ação antidepressiva importante é a Cetamina (CET, [2 (-0 clorofenil) -2 (metilamino) ciclo-hexanona]). Ela foi sintetizada em 1962 por Calvin Stevens. É uma droga caracterizada por induzir anestesia na interrupção do fluxo de informações para o córtex sensitivo, deprimindo seletivamente alguns centros cerebrais (BOOTH, 1992; THURMON et al, 1996). Usada para fins anestésicos com efeito hipnótico em animais, é também conhecida como medicamento de uso humano com efeitos psicotrópicos (LANKENAU e CLAATS, 2002, JANSEN, 2001). A CET foi usada primeiramente para fins de anestesia, pois deprime a respiração bem menos que a maioria dos anestésicos disponíveis na época. Nos anos 1970, alguns pacientes começaram a reportar visões involuntárias sob seus efeitos (JANSEN, 2001; WEIL e ROSEN, 1983). A CET também tem uso veterinário, como um anestésico para inúmeras espécies de aves (principalmente as de rapina; SALERNO e VAN THIENHOVEN, 1975; BORZIO, 1973). Geralmente uma dose de 15 a 20 mg/kg administrada por via intramuscular é suficiente para produzir catalepsia em pombos (*Columba livia*), porém injeções de CET

(400 mg/kg) não produziram anestesia (BREE e GROSS, 1969). Entretanto, em periquitos, 10 mg/kg de CET produziu relaxamento muscular e a dose letal foi de 460 mg/kg (MANDELKER, 1973).

Efeitos de diferentes doses de CET (30, 60, 90 e 120 mg/kg) foram verificadas por medidas eletroencefalográficas, eletrocardiograma, de frequência respiratória e do volume corrente em galinhas adultas (SALERMO e VAN THIENHOVEN, 1975) e indicaram que estes animais respondiam a manipulação experimental mesmo após a administração da droga, além de apresentarem leve depressão respiratória, concluindo que a utilização de CET como um anestésico para galinhas é questionável. Bree e Groos (1969) injetaram diferentes doses de pentobarbital e CET em pombos e avaliaram o tempo e os efeitos da associação dessas drogas e concluíram que em pombos, a CET isolada não produz um estado de anestesia, mesmo quando usado em doses de 400 mg/kg. Os resultados destes experimentos confirmam a praticabilidade da injeção parenteral de drogas em combinação para produção de anestesia em pombos (*Columba livia*). O efeito cataléptico produzido por uma grande dose de CET (500mg/kg) não foi suficiente para impedir o movimento indesejável em pombos (BREE e GROSS, 1969). Ao administrar CET com Pentobarbital em pombos (*Columba livia*) para verificar o efeito anestésico da associação dessas drogas, foi demonstrado que a CET é um excelente anestésico em macacos, ao passo que em pombos, as doses de 25-400 mg/kg, produziram apenas catalepsia. Por outro lado a administração de 500 mg/kg de CET produziu efeito letal (BREE e GROSS, 1969).

A fenciclidina e CET têm efeitos semelhantes ao pentobarbital na atenuação do comportamento suprimido, apesar de serem menos eficazes do que pentobarbital (WENGER, 1980; CHAIT e MCMILLIAN, 1979; WENGER, 1974 e CHAIR et al, 1981). Estes compostos podem ser capazes de atenuar a comportamentos produzidos por estímulos elétricos e tem atividade qualitativamente semelhante à de pentobarbital no controle por programação de resposta suprimida pela apresentação de choque elétrico. Pentobarbital, anfetamina e CET, foram administradas em diferentes doses para avaliar o efeito em comportamento punido utilizando-se do teste de intervalo múltiplo em que cada resposta foi punida com choques elétricos, e observou-se que a partir

destes e de outros resultados relatados pode-se concluir que a CET afeta o comportamento controlado de maneiras e características diferentes (BRANDÃO et al, 1980).

A CET é um antagonista não competitivo de receptor de glutamato do subtipo NMDA, que funciona nos canais dependentes de voltagem (HIROTA e LAMBERT, 1996). Estudos clínicos sugerem que a administração aguda de CET melhoram os sintomas depressivos em pacientes que sofrem de depressão maior resistentes aos fármacos antidepressivos normais (ZARATE et al, 2006; BERMAN et al, 2000). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram também que a CET induz efeitos ansiolíticos e do tipo antidepressivo em roedores submetidos a modelos animais de ansiedade e depressão (SILVESTRE et al, 1997; KOS et al, 2006). De acordo com estes resultados, foi demonstrado (ASSIS et al, 2009) que a administração aguda e crônica de cetamina diminuiu o tempo de imobilidade no teste de natação forçada (GARCIA et al, 2008).

A NPN adulta pode estar envolvida em comportamentos relacionados à defesa e pode desempenhar um papel importante na regulação de estados afetivos em ratos transgênicos (REVEST et al, 2009). Comportamentos defensivos são respostas relacionadas à ansiedade, pânico e comportamentos afetivos (ANDRADE et al, 2013). Os primeiros estudos sobre a neurogênese hipocampal também revelaram uma correlação entre a taxa de neurogênese e estado emocional, com o aumento da neurogênese sendo observada em animais tratados com antidepressivo e diminuição da neurogênese em animais submetidos a estímulos estressores (KEMPERMANN et al, 1997). Esta estrutura tem um papel importante na regulação dos estados afetivos e tem sido particularmente associadas com a modulação da ansiedade (MACLEAN, 1949).

Para determinar o nível de relação da neurogênese com estados afetivos, Revest et al (2009) estudaram os comportamentos relacionados com a ansiedade usando vários testes comportamentais (DULAWA et al, 1999; RODGERS e JOHNSON, 1995) mostrando que um déficit de neurogênese aumenta comportamentos relacionados à ansiedade. Em contraste, a inibição da neurogênese não modifica comportamentos que estão relacionados à

depressão. Estes resultados destacam o papel da NPN em adultos nos comportamentos relacionados à ansiedade (REVEST et al, 2009). Em conclusão, o déficit da neurogênese no hipocampo leva ao aumento em comportamentos relacionados com a ansiedade. Estes resultados reforçam a hipótese de que a neurogênese adulta representa um exemplo único da plasticidade estrutural que desempenha um papel fundamental, tanto na fisiologia quanto na fisiopatologia do hipocampo (REVEST et al, 2009).

A NPN em aves foi descrita pela primeira vez no *Hyperstriatum Ventrale Pars Caudalis* (HVC), um núcleo telencefálico do cérebro de canários adultos conhecido por desempenhar um papel na aprendizagem do canto (GOLDMAN e NOTTEBOHM, 1983; NOTTEBOHN, 1976). Relatórios posteriores demonstraram neurogênese adulta em outras espécies de aves: periquitos (*Melopsittacus undulatus*), pombas (*Streptopelia risoria*), codornas (*Coturnix japonica*), e frango (*Gallus domesticus*) (NOTTEBOHN, 1985; NOTTEBOHN 1981). A NPN em aves foi estudada em detalhes em uma espécie de ave canora: o canário (*Serinus canaria*) (ALVAREZ-BUYLLA, 1990; NOTTEBOHN, 1985). Neurônios nascidos na idade adulta podem ser vistos em algumas regiões do telencéfalo, incluindo hiperstriatum, nidopalio, endopalio, estriado medial e o hipocampo. Essas áreas do cérebro apresentam diferenças regionais evidentes em sua capacidade neurogênica. Por exemplo, há um número relativamente grande de novos neurônios no estriado medial e no nidopallium caudolateral, mas relativamente poucos no Nidopallium (MELLEU et al, 2013).

Assim estudar a NPN em aves pode ter relevância também devido à expressiva neurogênese pós-natal presente nesses animais. Até onde se pode observar nos grupos de aves estudadas, a NPN é mais ampla em quantidade e mais variada nas vias migratórias e posicionamento final de neurônios novos (GARCÍA-VERDUGO et al, 2002; KIM et al, 2006; BOSERET et al, 2007). Além disso, aves parecem ser especialmente sensíveis à regulação da neurogênese pelo ambiente, apresentando alterações na quantidade de células formadas em resposta às tarefas impostas pelo ambiente (ex: procurar e esconder alimentos e navegação) e à sazonalidade (SANDANANDA, 2004). Outro motivo importante para estudar NPN e sua regulação está concentrado em

passeriformes Oscinos. A neurogênese em Oscinos é encontrada em áreas relevantes para o controle do canto, ou seja, um caráter taxa-específico presente apenas nessa família. É de consenso entre taxonomistas que os Passeriformes em geral representam a ordem mais recente, derivada e apomórfica de Neornithes (aves modernas; LIVEZEY e ZUSI, 2007). A investigação de caracteres regulatórios da NPN que sejam conservados filogeneticamente (e relevantes para a classe em particular ou para os vertebrados em geral) deve, portanto, ser realizada em ordens menos derivadas de Aves.

A NPN no telencéfalo de aves pode ser um atributo conservado entre espécies aviárias independentes de qualquer outra característica selecionada (LING et al, 1997, apud MELLEU et al, 2013). Além de serem temas comuns nos laboratórios de neurociência, pombos (*Columba livia*) são encontrados em todo o mundo e dotado de excelente vôo, migração, memória de navegação, e aprendizagem e habilidades cognitivas, que têm sido extensivamente estudada a partir de diferentes perspectivas neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais (SOUZA et al, 2009; WATANABE et al, 1995; WALLGRAFF, 2005, MELLEU et al, 2013). Nosso laboratório recentemente identificou os “hot-spots” neurogênicos e a localização de neurônios novos em diversos distritos prosencefálicos em pombos domésticos (*Columba livia*, Columbiformes), por meio de estudos imunoistoquímicos para o BrDU, NeuN e doublecortina (MELLEU et al, 2013). Melleu et al (2013) observaram que algumas regiões do cérebro do pombo continham células predominantemente pequenas, bipolar e fusiforme com marcação de DCX ao passo que outras regiões foram preenchidas com células DCX multipolares, poligonais e grandes, com bastante ramificações, como processos dendríticos.

No estudo de Melleu et al (2013), a zona proliferativa do Hipocampo (Hp), foi muito menos exuberante do que a da zona ventricular e apareceu para dar origem à células migratórias que se instalaram no núcleo (região triangular) e da camada média do Hp. As concentrações mais elevadas de células DCX parenquimatosas e as fibras foram observadas no *striatum dorsal* do pombo seguido pela *nidopallium* caudo lateral. A inspeção cuidadosa para co-localização observada entre DCX e NeuN ou GFAP nestas áreas não revelou

qualquer sobreposição celular. Estes resultados suportam a hipótese de que a "migração" no estriado e estrutura pallial do pombo adulto envolveu neurônios imaturos, possivelmente na rota para a sua localização final. Estes dados reforçam a noção de que a ocorrência de uma intensa remodelação contínua destes circuitos pode basear-se, pelo menos parcialmente, na incorporação de novos neurônios (MELLEU et al, 2013).

Os pombos podem ser bons animais para esse tipo de estudo, uma vez que não sofreram tanta ação de seleção artificial (em direção a engorda ou oviposição) quanto Galiformes, e nem são tão especializados quanto Oscinos. Os comportamentos defensivos dos pombos são pouco estudados, mas existem evidências de que, assim como em outros vertebrados (DEAKIN e GRAEFF, 1991), eles parecem ser modulados por circuitos serotoninérgicos (e.g. GRAEF e SCHOENFELDT, 1970; LEONE et al, 1983; KOEK et al, 1998).

Por exemplo, em um esquema de condicionamento operante, os antagonistas de receptores serotoninérgicos (e.g. metisergida) aumentam o número de repostas dos pombos (bicadas) que eram suprimidas por punição (choques no púbis), mas não o número de repostas não-punidas (e.g. GRAEFF e SCHOENFELDT, 1970). Este trabalho foi um dos primeiros a indicar que a serotonina (5-HT) poderia estar envolvida na regulação do medo e da ansiedade em vertebrados em geral.

Por outro lado, os mecanismos relacionados ao controle de comportamentos defensivos não-condicionados em aves em geral (e em pombos, em particular) são pouco conhecidos. Aves apresentam padrões de comportamentos defensivos aparentemente semelhantes aos de mamíferos quando expostas a predadores ou novidades visuais, ambientes desconhecidos, quando são separadas de seu grupo familiar (JONES e WADDINGTON, 1992; JONES, 1996; HAZARD et al, 2008; CALANDREAU et al, 2011). Em nosso laboratório, observamos que pombos separados de seus co-específicos e expostos a um ambiente não-familiar apresentam intensos movimentos balísticos de cabeça (**Peeping** ou peering) que, com o tempo, se tornam movimentos angulares cada vez menos amplos até atingir a imobilidade (DE SOUZA et al, 2009). Embora guarde semelhança com o comportamento de avaliação de risco apresentado por roedores (e.g. CAROBREZ e BERTOGLIO,

2005), o padrão de comportamento exibido pelos pombos em um ambiente desconhecido não foi afetado pelo diazepam (DE SOUZA et al, 2009). Assim ficou indeterminado se os movimentos balísticos da cabeça do pombo representam uma resposta inata de defesa resistente a benzodiazepínicos.

Neste trabalho, examinamos a participação da 5-HT na regulação destes comportamentos estimulados pela novidade. Além disso, a 5-HT afeta a NPN em paralelo aos comportamentos de defesa e às respostas de estresse em roedores (PETRIK et al, 2012, BLAZEVIC et al, 2012). Sendo assim, uma investigação dos efeitos ambientais sobre a neurogênese e os comportamentos defensivos em pombos pode contribuir para a melhor compreensão da regulação destes fenômenos, não apenas para as aves, mas também para o melhor entendimento desses processos nos demais vertebrados.

Um comportamento defensivo particularmente extremo, presente em diversos vertebrados e relevante para o presente trabalho, é a Imobilidade Tônica (IT). A IT é uma resposta defensiva inata caracterizada por um estado reversível de profunda inibição comportamental, acompanhada de alterações cardiovasculares, hormonais e de temperatura corporal (GALLUP e RAGER, 1996; VIEIRA, 2011). A imobilidade ou inibição comportamental defensiva inclui a imobilidade (ou “freezing”), observada em roedores como resposta inicial, a estímulo (predador) distante, detectado pela presa antes que a mesma tenha sido detectada. Ratos (*Rattus norvegicus*) expostos ao gato (*Felis catus*) exibem uma resposta aumentada de freezing (CANTERAS e GOTO, 1999; BLANCHARD et al, 1977). Em condições de laboratório, a IT pode ser produzida por breve contenção física do animal com o dorso voltado para baixo (GALLUP e RAGER, 1996), e é comumente usada como modelo farmacológico para detecção de drogas ansiolíticas em porquinhos-da-índia (*Caviaporcellos*) e coelhos (*Oryctolagus sp.*) (KLEMM, 1990; OLSEN, 2002). Estudos sobre os mecanismos centrais de controle da IT mostraram que grupos de interneurônios da formação reticular bulbar parecem influenciar neurônios 5-HT (KLEMM, 1971). Da mesma forma que ocorre com o controle de outros comportamentos defensivos, o hipotálamo (CARLI, 1971), a amígdala (GRAEFF, 1990) e principalmente a substância cinzenta periaqueductal (PAG) também parecem ter um papel fundamental no controle desse comportamento

(VIEIRA et al, 2011; COUTINHO e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2010; COUTINHO et al, 2008; MONASSI e MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2004; MONASSI et al, 1999).

Aves apresentam intensa IT. Por exemplo, galinhas (*Gallusgallus*) contidas manualmente apresentam episódios de IT de até uma hora de duração (HICKS, 1976). Mills e Faure (1991) foram capazes de selecionar codornas (*Coturnix coturnix japonica*) artificialmente quanto á duração da IT em duas linhagens, uma com curta duração e outra com longa duração. Efeitos semelhantes de seleção artificial relacionados à IT também foram reportados em galinhas, ratos e camundongos (GALLUP e RAGER, 1996). Além do componente genético, fatores neuroquímicos e hormonais parecem influenciar a IT tanto em mamíferos quanto em aves. Por exemplo, injeções sistêmicas de 8-OH-DPAT (agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}) ou de fenfluramina (aumenta liberação de serotonina) foram capazes de diminuir a duração da imobilidade tônica em cobaias (OLSEN, 2002). O mesmo efeito foi observado em galinhas que receberam injeções ICV de 5-HT (MASER et al, 1975). Em contrapartida, a administração crônica de FLX (inibidor seletivo da recaptação de serotonina) aumenta o comportamento de IT (OLSEN, 2002). Os sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos controlam aspectos motores da IT (KLEMM, 1990). Dados do nosso laboratório mostraram que pombos adultos submetidos à contenção manual apresentam IT (MELLEU et al, 2011a).

Pombos domésticos constituem uma espécie comumente utilizada em laboratórios de neurociências e são objeto de inúmeros estudos comportamentais, neuroquímicos e neuroanatômicos (e.g., BINGMAN et al, 2006; MEHLHORN e REHKÄMPER, 2009; NAKAMURA et al, 2011; REINER et al, 2004; DE SOUZA et al, 2009). Estes animais apresentam uma forte resposta de imobilidade tônica conforme constatado em nosso laboratório (MELLEU et al, 2011a; MELLEU et al, 2011b). Todavia, uma avaliação sistemática da expressão de comportamentos defensivos ainda não foi realizada em pombos, uma espécie muito bem adaptada ao ambiente urbano onde estes animais exibem poucas manifestações aparentes de fuga e esquiva, mesmo com a intensa proximidade de humanos e animais domésticos considerados possíveis predadores. Em face, da sua importância como

potencial ameaça à saúde e patrimônio em ambientes urbanos, inclusive como fator de risco de acidentes aéreos em aeroportos (CLEARY e DOLBEER, 2005), um melhor conhecimento sobre os comportamentos de defesa e de seus circuitos cerebrais subjacentes pode ser importante para compreender o processo evolutivo da espécie. Além disso, a investigação dos circuitos implicados na expressão de comportamentos defensivos inatos em pombos, pode responder diversas perguntas sobre estruturas encefálicas de aves e sobre a evolução dessas estruturas e da própria história natural do comportamento de imobilidade tônica.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Este trabalho examinou a regulação comportamental de pombos (*Columba livia*) adultos, orientando-se pelas hipóteses de que:

- O tratamento agudo e crônico dos animais com fluoxetina e cetamina altera comportamentos defensivos em pombos;
- O tratamento crônico com drogas de ação antidepressiva aumenta a neurogênese pós-natal hipocampal em pombos.

2.1. Objetivos

- Descrever os efeitos agudos e crônicos do tratamento com Fluoxetina (FLX, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina) na expressão de comportamentos defensivos de animais separado de seus congêneres e expostos a um ambiente e um objeto desconhecidos, na imobilidade tônica provocada por contenção breve, e na neurogênese hipocampal.
- Descrever os efeitos agudos e crônicos do tratamento com Cetamina (CET, um antagonista não-competitivo de receptores NMDA) na expressão de comportamentos defensivos de animais separado de seus congêneres e expostos a um ambiente e um objeto desconhecidos, na imobilidade tônica provocada por contenção breve, e na neurogênese hipocampal.

3. METODOLOGIA

Todos os protocolos e procedimentos abaixo descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC (CEUA/UFSC protocolo nº 117/CEUA/PRPe/2008 e nº 23080.037851/2010-41).

3.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Quarenta e sete animais oriundos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (ambos os sexos, em idade reprodutiva e com peso corporal de 350-400g) foram alojados em condições padrão no biotério setorial do Laboratório de Neurofisiologia Comparada (temperatura entre 22-24°C e ciclo claro-escuro de 12:12 horas; luzes acesas às 7 horas) em gaiolas individuais (50 cm x 50 cm x 50 cm) com contato visual entre seus vizinhos, contendo um poleiro, assoalho forrado com jornal e 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 era efetuado a higienização das gaiolas, trocado forro de jornal e reposição de comedouros e bebedouros.

Após, um mínimo de 7 dias de adaptação às condições do laboratório, os animais foram retirados individualmente de seus ambientes e submetidos ao teste comportamental Ambiente Desconhecido Objeto Novo (ADON), para determinação dos valores basais de comportamento exploratório antes do início do tratamento (estabelecido como o primeiro dia do experimento). Os comportamentos medidos no AD não se modificam com a re-exposição (DE SOUZA et al, 2009; resultados do presente trabalho, ver adiante), assim, a tomada de valores basais serve como controle dos valores experimentais de cada animal. Durante a primeira semana após este teste, foi determinado o consumo basal de água e comida de cada um dos animais. Para os animais tratados com Fluoxetina (FLX, Sigma–Aldrich Inc., St Louis, USA), no oitavo dia do experimento os animais receberam uma injeção (subcutânea, sc) de veículo

(grupo VEI; 0.85 % NaCl estéril e livre de pirogênios, n=6) ou FLX nas doses de 2,5 mg/kg (grupo FLX2,5; n=6) ou 10 mg/kg (grupo FLX10; n=6), e 30 minutos depois foram novamente testados no ADON. Do 9º ao 23º dia os animais receberam uma injeção (sc) diária de salina (0.85 % NaCl estéril e livre de pirogênios, nos mesmos 6 animais que receberam salina no experimento agudo), FLX 2,5 mg/kg (n=8), FLX 10 mg/kg (n=8), Vinte quatro horas após a última injeção os animais foram expostos ao ADON (figura 1A), e 24 horas após, ao teste de Imobilidade Tônica (IT). O protocolo de 14 dias de tratamento e reexposições ao teste foi baseado nos estudos de Mezadri et al (2011) que mostram que ratos Wistar apresentaram respostas antidepressivas ao teste de nado forçado, ou seja, duas semanas de tratamento com FLX (2,5mg/Kg) diminuiu o tempo gasto na imobilidade e aumentou o tempo de natação nestes animais somente na reexposição ao teste (MEZADRI et al, 2011). As doses selecionadas nos nossos experimentos (2,5 mg/Kg e 10 mg/Kg) foram avaliadas previamente em nosso laboratório.

Como controle de tempo de manipulação e de injeção um grupo adicional de animais, não-injetados com qualquer droga (n=8) foram submetidos também aos testes comportamentais, grupo naive, denominado de controle não-tratado (CNT). Duas horas após a teste de IT, os animais foram sacrificados por meio de perfusão transcordial (PFA 4%) e tiveram os encéfalos retirados, seccionados e processados por imunohistoquímica para detecção de DCX. Os experimentos com a Fluoxetina foram parcialmente realizados por Fernando Melleu (Doutorando da PGNeurociências, UFSC) e pela Profa. Claudia Centurion, (da Faculdade de Medicina da Universidade do Paraguai), que esteve em estágio no laboratório de setembro a dezembro de 2010, em intercâmbio científico de 3 meses com financiamento IBRO (PROLAB-IBRO-LARC-SupporttoPromoteCollaboration-2010). Estes colaboradores realizaram os testes comportamentais, a perfusão e a microtomia dos cérebros dos animais tratados cronicamente com a FLX. Assim, demos continuidade a este projeto realizando os procedimentos imunohistoquímicos, as descrições/quantificações anatômicas, a decodificação dos comportamentos, a partir dos vídeos dos experimentos e as análises qualitativas e quantitativa dos dados comportamentais e imunohistoquímicos.

Para os animais tratados com Cetamina (CET, Syntec, Cotia, SP), no oitavo dia do experimento os animais receberam injeção (sc) de salina (0.85 % NaCl estéril e livre de pirogênios, n=8), ou CET (nas doses de 2,5 mg/kg (n=8) ou 10 mg/kg (n=8), e 30 minutos depois foram novamente testados no ADON. Do 9º ao 15º dia os animais receberam uma injeção (sc) diária de salina (0.85 % NaCl estéril e livre de pirogênios, nos mesmos 8 animais que receberam salina no experimento agudo), CET 2,5 mg/kg (n=8) ou CET 10 mg/kg (n=8; Figura 1B). Vinte quatro horas após a última injeção os animais foram expostos ao ADON, e 24 horas após, ao teste de IT. As doses escolhidas de CET foram baseadas em experimentos de nado forçado, campo aberto e labirinto em cruz elevado, nos quais após 7 dias de administração de CET, ratos e camundongos apresentaram diminuição da imobilidade (MAENG et al, 2008; CARRIER e KABBAJ, 2013; MANSOUR et al, 2013). Estas doses não causam qualquer catalepsia ou anestesia em pombos (BREE e GROSS, 1969; SALERNO e TIENHOVEN, 1976). Para ter efeitos anestésicos em aves é necessário doses mais elevadas que 32 mg / kg de CET (BREE e GROSS, 1969), especialmente em pombos são necessárias doses superiores a 25 mg / kg para a anestesia (AZIZPOUR e HASSANI, 2012; ATALAN et al, 2002; KAMILOGLU et al, 2008). Duas horas após o teste de IT, os animais foram sacrificados por meio de perfusão transcordial (PFA 4%) e tiveram os encéfalos retirados, seccionados em Vibrátomo (Vibratome®) à 50 µm de espessura. As secções foram coletadas em cinco tubos seriados e armazenadas à -24°C sob crioproteção (propilenoglicol+sacarose), posteriormente foram processadas por imunistoquímica para a detecção de DCX. O material foi então analisado sob microscópio óptico (Olympus BH2) e documentado para a contagem do número de células imunorreativas para a verificação de diferenças na proliferação, sobrevivência e migração neuronal em cada um dos grupos.

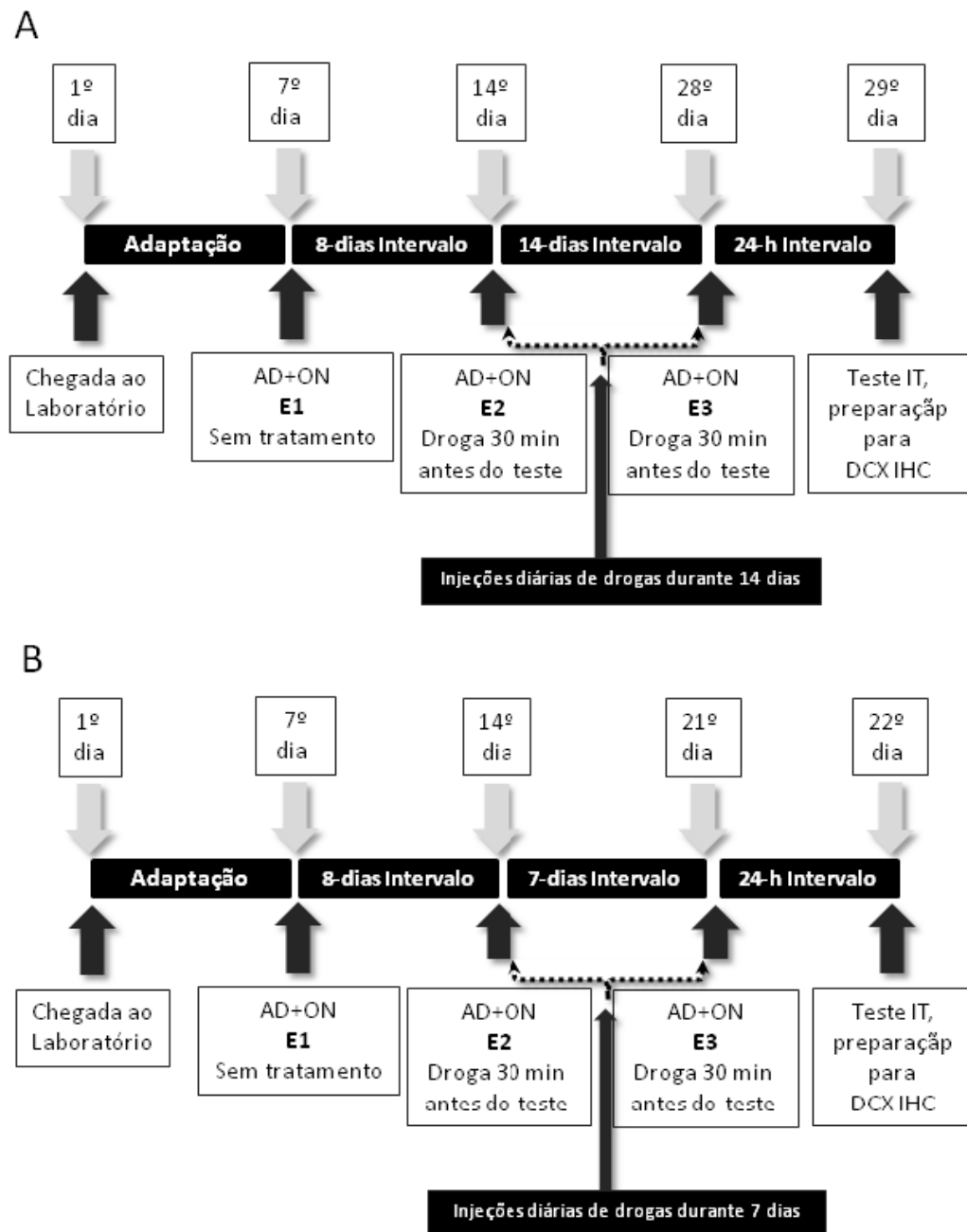


Figura 1. Protocolo experimental usado nos experimentos. A) protocolo aplicado aos grupos experimentais tratados com FLX; B) protocolo aplicado aos grupos experimentais tratados com CET.

3.2. TESTES COMPORTAMENTAIS

3.2.1. Ambiente desconhecido e apresentação do objeto novo (ADON):

Quando separados de seus congêneres e transportados para um ambiente diferente (AD) de sua gaiola-casa (novo, desconhecido ou com o qual teve contato esporádico), pombos exibem movimentos exploratórios com a cabeça e pescoço, mantendo o corpo imóvel que não se modificam com a re-exposição a intervalos de 7 dias (DE SOUZA et al, 2009). Ao serem colocados no centro do AD, os animais em geral permanecem com o corpo imóvel e, simultaneamente exibem intensos movimentos balísticos, de vai-e-vem com a cabeça. Estes movimentos tinham como consequência à exposição dos olhos dos animais a todas as direções da gaiola (com certa predominância inicial para a orientação dos olhos para a parte superior da gaiola). Este comportamento foi denominado “espiar” (e foi descrito em pombos na literatura inglesa como “peeping” ou “peering”; DE SOUZA et al, 2009). Estes movimentos já foram considerados como operacionais durante a exploração visual do ambiente por aves (VALENTINUZZI e FERRARI, 1997; FERRARI et al, 1999; TOLEDO e FERRARI, 1991). Foi possível detectar episódios prolongados deste comportamento por toda a sessão, mesmo quando o animal era exposto ao ON. Gradualmente, os movimentos de “espiar” eram substituídos por movimentos angulares da cabeça (sem mover o corpo e sem distanciar a cabeça do corpo). O movimento angular de cabeça, (DE SOUZA et al, 2009, em estudos do nosso laboratório) foi definido como a imobilidade do corpo associada com a rotação da cabeça do eixo latero-lateral (apontando o bico para cima ou para baixo), no eixo rostro-caudal (apontando o bico para o lado esquerdo ou direito do corpo) ou na inclinação lateral da cabeça, sem mudanças perceptíveis na posição do pescoço ou angulação em relação ao corpo. Em algumas situações esse comportamento era seguido anteriormente ou posteriormente ao espiar. Outro comportamento observado é a imobilidade, que também pode ser seguida de outro comportamento mais raro: o repouso, cujas características são semelhantes aos da imobilidade, apenas se diferenciando pela ausência de movimentos oculares e a presença de movimentos palpebrais lentos (ou com os olhos fechados).

Outro comportamento observado com frequência é a locomoção, caracterizado pelo movimento completo de um passo à frente ou à atrás da pata fixa do chão (DE SOUZA et al, 2009). Além da locomoção, foi observado em alguns caso o pular, onde o animal retira as duas patas do assoalho simultaneamente, por vezes precedente da locomoção, às vezes ocorrendo isoladamente, sempre no momento da introdução de ON. O comportamento de exploração do assoalho, ocorre por vezes em seguida aos comportamentos de espiar e movimento angular de cabeça, e outros momentos de forma isolada. É caracterizada pelo direcionamento do bico do animal as paredes da arena e/ou assoalho, com bicadas ou não, quando ocorridas em direção ao assoalho, aconteciam como ciscadas, principalmente após o episódio de defecação. Este comportamento de defecação ocorre sempre junto a locomoção no momento da inserção do ON ou após isso sem locomoção, porém em estado de imobilidade. Com menor frequência, também é observado o comportamento de bater as asas onde o animal com as patas fixas no assoalho bate as asas em ritmo lento (espreguiçar) ou ritmo rápido, seguido anteriormente ou posteriormente de um pulo. Foi observado também em poucos casos o comportamento de auto-limpeza em que o animal toca as próprias penas com o bico ou com as patas, fazendo movimentos repetitivos de puxar, separar, coçar ou bicar as penas, esse comportamento foi visualizado com pouca frequência e duração pouco depois da inserção do animal na arena.

3.2.2. O catálogo comportamental e o método de registro e análise no ADON

O teste foi previamente estudado em nosso laboratório (DE SOUZA et al, 2009). A análise e catálogo utilizados neste estudo, e a presente descrição do padrão de comportamento exibido pelos pombos na primeira exposição ao ADON (acima) gerou um catálogo comportamental composto dos seguintes itens:

Quadro 1: Catálogo de registros comportamentais

Comportamento	Sigla	Descrição
Exploração Visual Balística (“espiar”)	XP	O animal de olhos abertos, apresentando movimentos balísticos lineares da cabeça para frente e para trás (geralmente precedido por um movimento curto na direção oposta), e termina com retorno à posição inicial), sem tocar objetos com o bico.
Exploração Visual Angular	XV	O animal, de olhos abertos, com o corpo imóvel, associado com a rotação da cabeça no eixo laterolateral (apontando o bico para cima ou para baixo), no eixo rostrocaudal (apontando o bico para o lado esquerdo ou direito do corpo) ou inclinação lateral da cabeça, sem mudanças perceptíveis na posição do pescoço ou angulação em relação ao corpo.
Exploração do Assoalho	XA	O animal apresenta-se com a cabeça voltada para a superfície a ser explorada, tocando com o bico o assoalho ou nas paredes laterais, podendo estar com uma ou duas patas fixas no chão.
Locomoção	LC	O animal retira uma pata por vez do contato com o assoalho da gaiola (com ou sem auxílio de bater asas)
Repouso	RE	Como os olhos piscando lentamente ou totalmente fechados, o animal fica com o corpo e cabeça imóveis, uma ou duas patas fixas ao assoalho, ou pode retrair as patas a ponto de o corpo tocar o assoalho. Pode ou não apresentar retração do pescoço com o bico orientado ou tocando o peito.
Imobilidade Alerta	IA	O animal fica com uma ou duas patas fixas ao assoalho, com a postura totalmente ereta, com os olhos totalmente abertos ou piscando rapidamente e sem executar

		qualquer movimento com a cabeça.
Defecar	DE	É notada a presença de fezes no assoalho da arena
Pular	PU	O animal retira as duas patas o assoalho da arena, batendo as asas.

Os registros em vídeo obtidos durante os 30 minutos de exposição dos animais ao Ambiente Desconhecido/Objeto Novo (ADON) foram feitos por uma câmera digital (Microsoft®, VX80) conectada a um microcomputador, sendo os registros de vídeo armazenados em discos ópticos. Os vídeos obtidos durante os experimentos foram posteriormente avaliados através de um software produzido em nosso laboratório (Ethowatcher®, CRISPIM et al, 2011), 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 (ver tabela 1), foram totalizados e segmentos em 5 minuto ao longo de todo o período de registro, visando aumentar a resolução temporal da descrição dos eventos.

O teste comportamental possui duas partes e se deu da seguinte forma: Primeiramente, o animal era retirado de seu local de alojamento e transportado a uma sala separada, isolada acusticamente e iluminada por luz artificial branca, contendo a arena retangular de vidro de (80cm x 50cm x 30cm, ver figura 2), coberta por uma grade na parte superior e a parede frontal era transparente possibilitando os registros comportamentais. O animal era gentilmente colocado no centro da arena dando inicio ao teste que se seguiu por 15 minutos, durante os quais seu comportamento frente a gaiola nova e vazia foi registrado em vídeo. Na segunda parte do teste, depois de 15 minutos de exposição ao ambiente desconhecido, era introduzido na arena um cilindro de espuma amarela de 20 cm de altura e 8 cm de diâmetro pintado com listras transversais vermelhas, pretas e brancas. O objeto era mantido na arena por mais 15 min, nos quais os comportamentos exploratórios continuaram a ser

registrados. Ao todo o teste da exposição ao ambiente desconhecido/objeto novo teve 30 minutos de duração, ao final dos quais, os animais foram retirados da arena e devolvidos aos seus locais de alojamento.

3.2.3. Imobilidade Tônica (IT)

A Imobilidade tônica foi descrita como um comportamento inato desencadeado pela contenção física do animal, caracterizado por um estado catatônico (JONES, 1986; MILLS e FAURE, 1991). É um comportamento relacionado a ameaça inescapável, como a que ocorre durante a predação (GALLUP et al, 1979; JONES, 1986; JONES, 1987) e pode ser modulada por diferentes classes de antidepressivos (WALLNAU et al, 1980). Pombos e aves em geral apresentam IT diante de situações estressoras e de medo com mecanismos semelhantes aos de mamíferos (HOHTOLA, 1981). Neste estudo o animal era retirado de seu ambiente e coberto por um pano escuro e transportado até uma sala iluminada artificialmente. O pano era retirado e o animal gentilmente colocado em decúbito dorsal sobre um suporte em formato de quilha, no centro de uma arena cilíndrica (50 cm de largura por 30cm de altura). Ainda em decúbito dorsal, o animal era contido manualmente tendo suas asas suavemente imobilizadas e sua cabeça coberta . A contenção teve a duração de 30 segundos. Após esse período, os animais eram liberados e o tempo no qual os mesmos permaneceram imóveis era quantificado. O tempo mínimo para imobilidade foi de 10 segundos após a liberação. Eram feitas no máximo 5 tentativas para que o animal entrasse em imobilidade tônica (superior a 10 segundos). Caso o animal não expressasse o comportamento, o mesmo era considerado refratário ao teste. Ao final de cada teste a arena era limpa com álcool 70% e papel toalha.

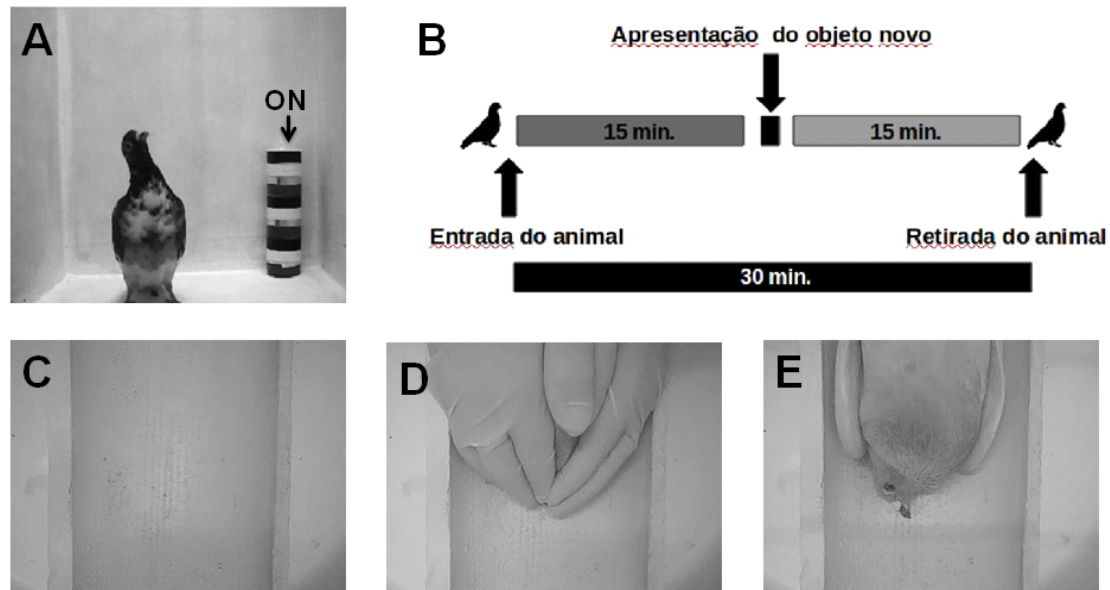


Figura 2. A) Pomba inserido na arena do teste do ambiente desconhecido com apresentação do objeto novo. B) esquema gráfico do teste comportamental. C) arena para realização da IT. D) Contenção manual do animal. E) Animal em decúbito dorsal em IT.

3.3. PERFUSÃO E MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Xilazina (0,05mg/Kg/100g de peso corporal) e Cetamina (0,15mg/Kg/100g de peso corporal) e perfundidos transcordialmente com 300 ml de solução de sacarose (9,25% mantido a 37°C, com heparina) seguido por 300 ml de solução de paraformaldeído (4% em tampão fosfato - PB). Os encéfalos foram retirados e pós-fixados em paraformaldeído (4% PB) a 4°C por 24h, após esse período os encéfalos foram incluídos em gelatina 10%, seccionados em vibrátomo (Vibratome®) a 50µm de espessura. As secções foram coletadas em solução anti-congelante em cinco compartimentos seriados e armazenadas a -20°C.

As secções obtidas conforme descrito acima foram lavadas com solução de PBS 0,1M + Triton 0,15% (T.A), em 3 banhos de 5 min. cada. Logo após foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando H₂O₂ 0,3% + Metanol por 30 minutos. Novamente, os cortes eram lavados com PBS 0,1M + Triton 0,15% em 3 banhos de 5min. cada. Após esse processo as secções foram incubadas por 60 min em solução de T.A. +

soro de albumina bovina 2% + soro 5%, e finalmente incubados com o anticorpo primário por um período de 24 horas. Após o período de incubação do anticorpo primário, as secções foram novamente lavadas em 3 banhos de T.A por 5 min, após os quais, foi feita a incubação com o anticorpo secundário por 120 min. Os cortes foram novamente submetidos a 3 banhos de T.A por 5 min e então incubados com ABC 1:2000 (T.A. + avidina + peroxidase biotinilada) por 2 horas. Em seguida, as secções foram lavadas com T.A 3 vezes por 5 min e TBS 0,25M pH 7,4 uma vez por 5 minutos. Após esse processo as secções foram incubadas TBS 0,1M pH 7,4 + DAB 10mg + 3µl H₂O₂ 30% por 10 minutos e então lavadas mas com TBS 0,25M pH7,4 por 3 vezes de 5 min cada. Os cortes foram lavadas com água destilada, montados sob lâmina, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula para observação em microscópio.

A quantificação de células DCX foram feitas com quatro secções de cada animal nas regiões do hipocampo, dividido em Lâmina Lateral (LL), Lâmina Medial (LM) e Núcleo Triangular (TR; níveis estereotáxico A6.00 e A7.00). Em cada uma das seções várias fotos digitais foram tiradas. A contagem das médias das áreas são expressas em células DCX/mm². Foram quantificadas apenas células que apresentassem citoplasma e processos corados. Para contagem foram utilizados fotomicrografias sequencias da região e o software *ImageJ*. Foram quantificados apenas os corpos celulares visíveis no campo da figura, sendo que corpos celulares cortados pela borda da figura só foram considerados válidos para a quantificação se pelo menos 50% do corpo celular estivesse na área visível da fotografia e apenas os neurônios cortados pela borda inferior e esquerda foram desconsiderados. Foi utilizado ainda o método duplo cego para contagem, de modo que o pesquisador não tinha conhecimento a qual grupo experimental o animal pertencia.

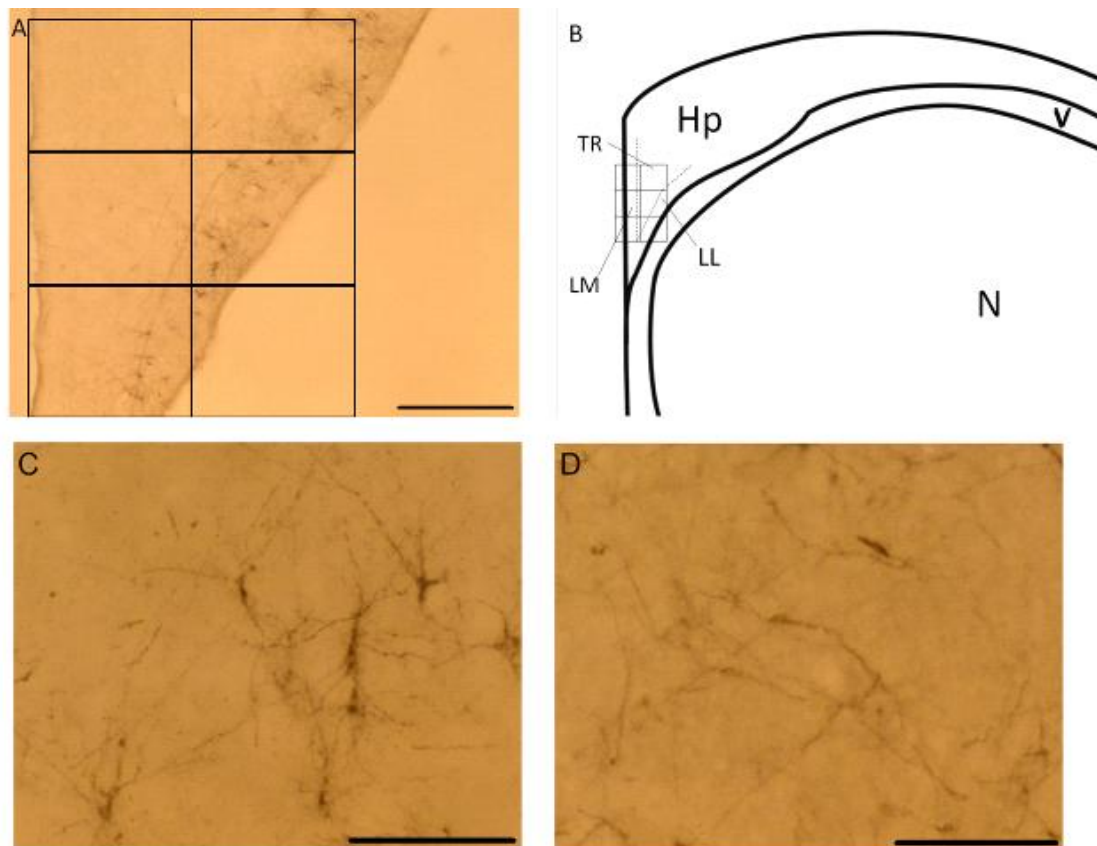


Figura 3. (A,B): Áreas em que a densidade de células imunorreativas à DCX (DCXir) foram quantificadas no hipocampo (Hp) e (C, D): os diferentes tipos de células DCXir nesta região do cérebro do pombo. A- fotomicrografia do Hp de pombos mostrando áreas de quantificação de células, campos quadrados sobrepostos representa área de quantificação (barra de escala= 500um). B- desenho esquemático de secção no plano frontal do Hp (nível esterotáxico A 6.75, Karten e Hodós, 1967) e suas subdivisões (LL, lâmina lateral do Hp em forma de “V”; TR, área triangular do Hp ventral em forma de “V”; LM, lâmina medial do Hp em forma de “V”). C- fotomicrografia do Hp de pombos mostrando células DCXir multipolares típicas com corpo celular e árvore dendrítica (barra de escala= 50um). D- fotomicrografia do Hp de pombos mostrando células bipolares DCXir típicas. (barra de escala= 50um)

3.4. ANÁLISE DE DADOS

Todos os dados foram analisados quanto a sua normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnoff, e homocedasticidade, estabelecida pelo teste estatístico de Levene. Os resultados destes testes foram utilizados na seleção dos testes estatísticos a serem utilizados na comparação entre os grupos experimentais. Os dados provenientes do teste ADON foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis e Friedman ANOVA medidas repetidas para comparar os índices entre as exposições e os tratamentos respectivamente. Teste de Wilcoxon foi usado para comparar os dados dos comportamentos

entre os períodos de AD e ON. Apesar de terem sido analisados utilizando testes não-paramétricos, para facilitar a visualização dos dados comportamentais no teste do ADON, estes estão representados graficamente e em tabelas na forma de média±erro padrão da média. Teste de Kruskal-Wallis foi usado para avaliar diferenças em células de DCX-ir entre os tratamentos. A análise de sobrevivência (Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon) e Teste de Mann-Whitney foram utilizados para determinar as diferenças de TI entre os grupos. Em todas as análises estatísticas foram consideradas significantes os valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software “Statistica 8.0” (Statsoft).

4. RESULTADOS

4.1. O ADON: Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas.

A descrição abaixo foi realizada com os dados obtidos dos animais do grupo experimental controle não-tratado (CNT, n=6), expostos ao ADON aos 7 dias (Exposição 2, E2) e aos 21 dias (terceira exposição, E3) da primeira exposição (E1) ao ambiente de teste.

A frequência do comportamento de movimentos angulares de cabeça após o ON apresentou diferenças significantes (FA: (N = 6, df = 2) = 6,38 p = 0,04; figura 4D) com índices maiores em E2 (W: p=0,04) e E3 (W: p=0,04) quando comparados à primeira exposição (E1). Não houveram diferenças significativas entre E2 e E3. Neste comportamento não encontramos diferenças na duração na primeira e segunda fase do teste (FA: p>0,05, estatísticas ver tabela 2 do material suplementar; figura 4C). A frequência deste comportamento também não foi modificada pela repetição em AD. A duração e frequência do comportamento de espiar (figura 4A e 4B), exploração do assoalho (figura 4E e 4F), locomoção (figura 4G e 4H), repouso (figura 4I e 4J) e imobilidade alerta (figura 4K e 4L; estatística completa na tabela 1 do anexo 1) também não apresentaram diferenças significantes, quer entre as diferentes fase do teste, quer entre as diferentes exposições à situação experimental.

Os índices relativos à indução da IT (duração: 401,80±363,49 e número de tentativas 1,50±0,54) nestes mesmos animais, nos testes de correlação entre os índices de IT e os comportamentos no teste ADON apresentados por este grupo usando o teste de correlação de Spearman não resultaram em correlações significantes entre estas respostas.

Em resumo, a reexposição ao teste apresentou um aumento na frequência dos movimentos angulares de cabeça da fase ON na E2 e E3 em relação a E1, mas sem diferenças em relação ao AD na mesma exposição.

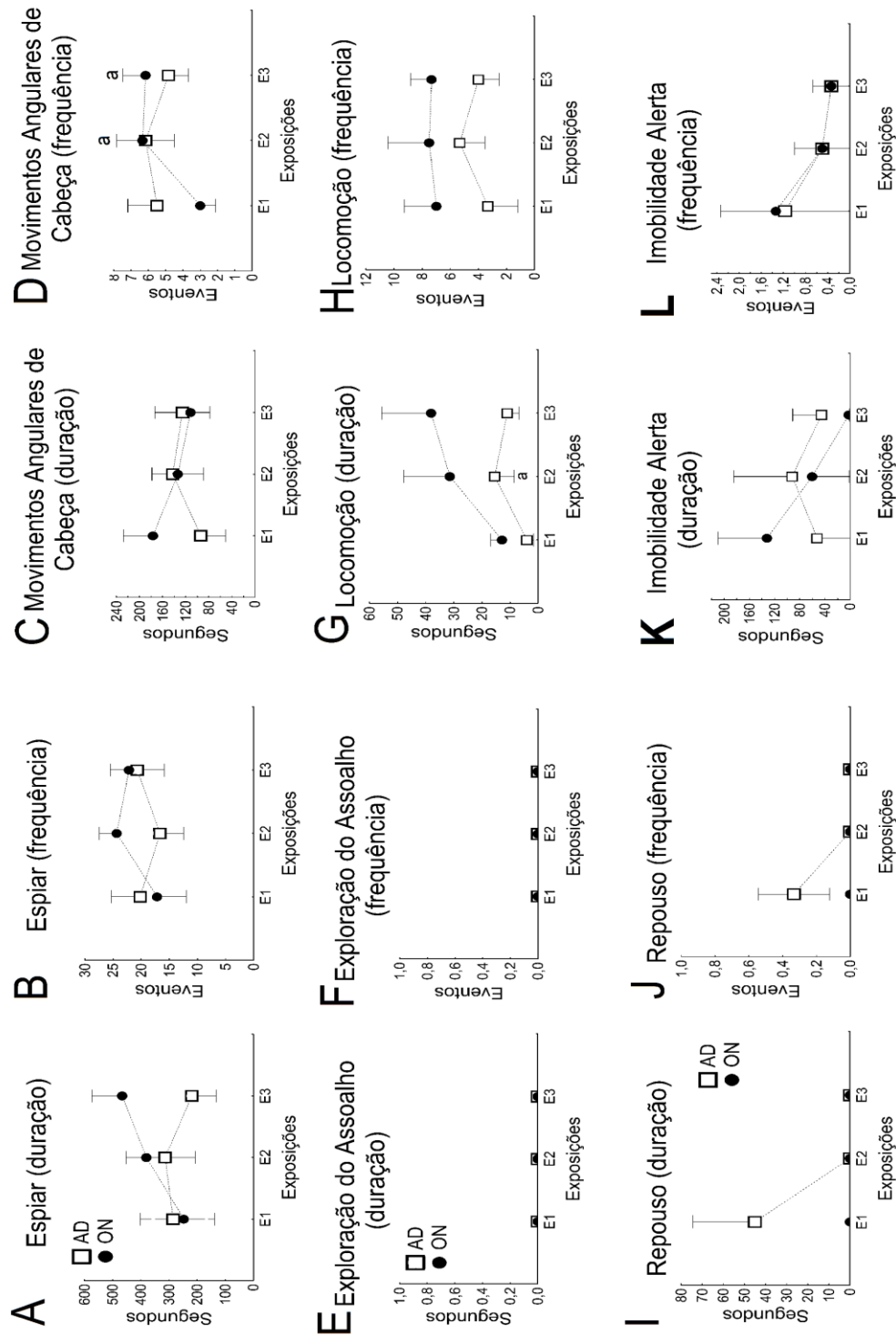


Figura 4. Efeitos da re-exposição ao teste 7 dias (E2) e 21 dias (E3) após a primeira experiência (E1) com o AD seguido por ON. Durações e frequências (totais nos 15 minutos de AD e nos 15 minutos de ON) de espisar (A,B), movimentos angulares de cabeça (C e D), exploração do assoalho (E e F), locomoção (G e H), repouso (I e J) e imobilidade alerta (K e L) nas três exposições ao teste ADON. (a) indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon) em relação a E1. Os dados são representados por média \pm EPM.

4.2. O ADON: Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas no grupo controle de FLX

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais do grupo VEI (controle dos animais tratados com FLX), na segunda e terceira exposições ao teste, utilizamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (W) para analisar as diferenças na duração e frequência de AD e ON na segunda e terceira exposição e observamos que o comportamento de espiar teve maior duração (W: $p=0.04$) após ON em E3 quando comparado ao mesmo período da segunda exposição, mostrando que a duração do comportamento aumenta com a reexposição após o ON. Ao contrário de espiar os movimentos angulares de cabeça tiveram menor duração em ON na terceira exposição ao teste (W: $p=0.04$), este comportamento apresentou menor duração na terceira exposição em AD e ON, porém com diferenças estatísticas somente em ON em relação a E2. A locomoção apresentou um aumento na terceira exposição na primeira fase do teste (W: $p=0,02$; tabela 2 do anexo 1).

4.3. O ADON: Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas no grupo controle de CET

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais do grupo VEI (controle dos animais tratados com CET), na segunda e terceira exposições ao teste, utilizamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (W) para analisar as diferenças na duração e frequência de AD e ON em cada exposição e observamos que a frequência de espiar na primeira fase do teste é menor na segunda exposição (W: $p=0.01$), sugerindo que estes animais diminuem a ocorrência deste comportamento após o ON embora possuam a mesma duração. O mesmo ocorreu para locomoção que teve menores índices de duração (W: $p= 0.04$) e frequência (W: $p= 0.02$) na terceira exposição. O contrário ocorreu para o comportamento de movimentos angulares de cabeça que apresentou um aumento (W: $p=0.04$) na primeira fase do teste em E3 (ver tabela 3 do anexo 1)

Em resumo a reexposição dos animais ao testes ADON com intervalo de 7 e 14 dias modificou a expressão dos comportamentos de espiar, movimentos angulares de cabeça e locomoção.

4.4. Efeitos da administração aguda de FLX nos comportamentos apresentados no ADON:

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais tratados com veículo ou FLX (nas doses de 2,5 mg/Kg ou 10 mg/Kg) na segunda exposição ao teste (E2) utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW) para análise das diferenças entre os tratamentos e, como teste posthoc para estas análises, bem como para examinar as diferenças entre ON e AD, após cada tratamento, usamos o teste de Wilcoxon (W). A duração de espiar aumentou significativamente durante AD no grupo tratado com FLX 10 mg/Kg (KW: H (2, N= 18) =6,24 p =0,04; Figura 5A e 5B). Quando comparamos as diferenças entre o espiar durante o AD e durante o ON após cada tratamento, observamos diferenças na duração deste comportamento nos animais tratados com FLX 2,5 (W: p=0,04) e FLX 10 (W: p=0,02) e também na frequência de espiar nos animais tratados com FLX 2,5 (W: p=0,02). O tratamento com as diferentes doses de FLX não afetou a duração da segunda fase do teste bem como a frequência de espiar na etapa AD e na etapa ON (p>0,05). O aumento de duração de espiar em AD provocado pela FLX parece ter causado o surgimento desta diferença de resposta ao ambiente desconhecido (já que a resposta ao Objeto Novo foi idêntica à dos animais tratados com veículo).

A duração dos movimentos angulares de cabeça não foi modificada pelos tratamentos com a FLX, tanto em AD quanto em ON (p< 0,05, estatística ver tabela 4 do anexo 1; figura 5C). O mesmo ocorreu com a frequência deste comportamento: sem diferenças significantes na primeira etapa do teste e na segunda etapa do teste. No entanto, este comportamento teve maior duração após o ON em relação ao AD nos grupos FLX 2,5 (W: p=0,02) e FLX 10 (W: p=0,02).

Em resumo, a fluoxetina aumentou a duração do comportamento de espiar em AD, tornando-a maior neste período que quando apresentamos o

ON: aparentemente a FLX aumentou esta atividade exploratória durante o ambiente novo e tornou este animal menos reativo ao aparecimento do ON. Por outro lado, a FLX diminuiu a duração de movimentos angulares de cabeça em AD, e aumentou a expressão deste comportamento após a apresentação do ON.

Já a locomoção não apresentou diferenças entre os tratamentos na duração e frequência das duas fases do teste ($p < 0,05$, estatística ver tabela 4 do anexo 1; figura 5E e 5F). No entanto, quando comparamos a duração de locomoção na etapa ON em relação a AD, observamos diferenças significantes do grupo FLX 10 (duração: $W: p = 0,02$; frequência: $W: p = 0,04$) indicando que este comportamento aumentou de incidência e duração na etapa AD, mas não após a apresentação de ON.

O mesmo não ocorreu para os outros comportamentos de exploração do assoalho, repouso e imobilidade alerta também não apresentaram diferenças significativas na duração e frequência na primeira e segunda fase do teste ($p < 0,05$, estatística ver tabela 4 do anexo 1). Estes comportamentos não apresentaram diferenças entre AD e ON após cada tratamento. Deve ser notado, no entanto, que a dose de 10 mg/Kg aboliu a expressão do comportamento de repouso durante o AD.

Em resumo, o tratamento agudo com fluoxetina na dose 10 mg/Kg aumenta o comportamento de espiar quando comparados ao grupo tratado com veículo durante o AD, quando o animal é exposto ao ambiente desconhecido, mas não afeta este comportamento em resposta ao ON. Ambas as doses de FLX aumentaram as diferenças entre o espiar e a locomoção feitos durante o AD e o realizado durante após o ON, acarretadas por aumento nestes comportamentos durante a fase AD. Por outro lado, ambas as doses de FLX diminuíram os movimentos angulares da cabeça em AD quando comparados ao ON (que não foram modificados pelo tratamento).

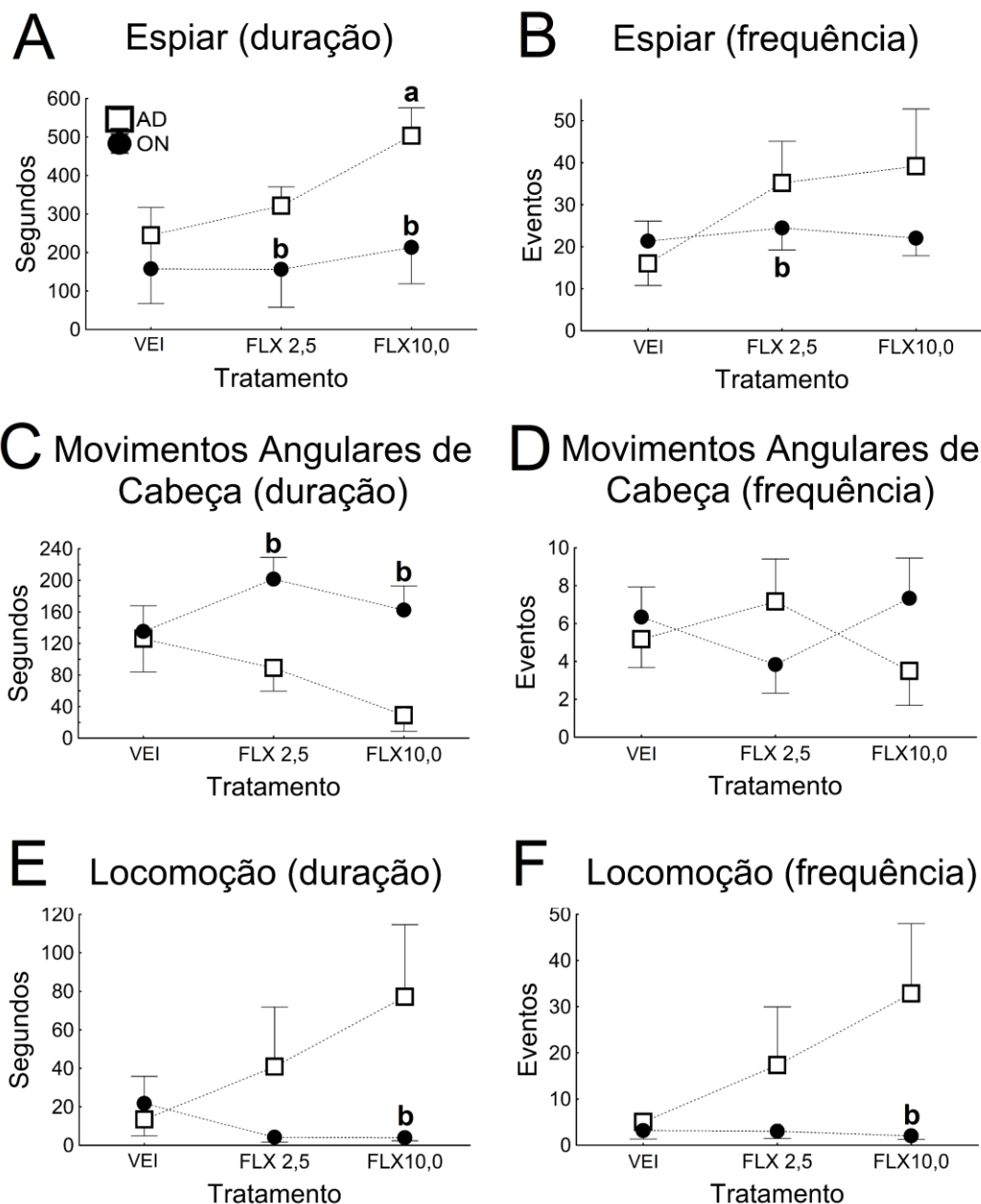


Figura 5. Efeitos da administração aguda de FLX na segunda exposição ao ADON (E2). Durações e frequências (totais nos 15 minutos de AD e nos 15 minutos de ON) de espisar (A,B), movimentos angulares de cabeça (C e D), locomoção (E e F), nos três grupos experimentais. (a) indica diferença significativa ($p < 0.05$, teste de Kruskal-Wallis) em relação ao veículo. (b) indica diferença significativa ($p < 0.05$, teste de Wilcoxon) em relação aos dados da etapa AD frente à mesma dose de FLX. Os dados são representados por média \pm EPM.

4.5. A exposição ao ADON: efeitos da administração crônica de FLX

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais tratados com veículo ou FLX (nas doses de 2,5 mg/Kg ou 10 mg/Kg) na terceira exposição (E3) ao teste. Encontramos diferenças no comportamento de movimentos angulares de cabeça no grupo FLX 10, após a apresentação do ON: a duração deste comportamento foi maior na segunda fase do teste (W: $p=0,04$; figura 6A e 6B). O tratamento crônico com as diferentes doses de FLX não afetou a duração e frequência dos comportamentos exploratórios de espiar, movimentos angulares de cabeça, exploração do assoalho, locomoção, repouso e imobilidade alerta (KW: $p>0,05$, estatística ver tabela 5 do anexo 1). Estes comportamentos analisados não apresentaram diferenças em ON comparado ao AD do mesmo tratamento.

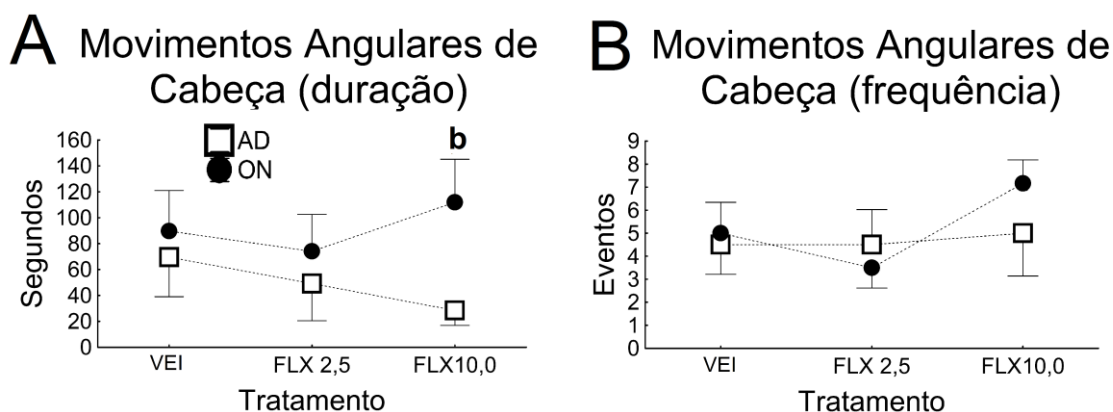


Figura 6. Efeitos da administração crônica de FLX no ADON. Durações e frequências (totais nos 15 minutos de AD e nos 15 minutos de ON) de movimentos angulares de cabeça (A,B) nos três grupos experimentais. (b) indica diferença significativa ($p<0.05$, teste de Wilcoxon) em relação ao dados da etapa AD frente à mesma dose de FLX. Os dados são representados como média \pm EPM.

4.6. Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX 2.5 mg/Kg

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais do grupo FLX 2,5, na segunda e terceira exposições ao teste. Usamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (W) para analisar as diferenças na duração e frequência de AD e ON em cada exposição e observamos que no comportamento de espiar houve um aumento na duração de AD (W: $p= 0,02$) e ON (W: $p= 0,04$) na terceira exposição e também na frequência de AD (W: $p=0,02$) e ON deste comportamento (W: $p= 0,02$). Em movimentos angulares de cabeça ocorreu uma diminuição na duração de ON na terceira exposição (W: $p= 0,04$). Já no comportamento de locomoção ocorreu um aumento na duração (W: $p= 0,02$) e frequência (W: $p=0,02$) na segunda fase do teste da terceira exposição. Houve também uma redução do comportamento de repouso na duração da terceira exposição (W: $p=0,04$) após o ON. Os outros comportamentos analisados não foram alterados pela reexposição no tratamento com FLX 2,5 (para estatística completa ver tabela 6 do anexo 1).

4.7. Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX 10 mg/Kg

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais do grupo FLX 10, na segunda e terceira exposições ao teste. Usamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (W) para analisar as diferenças na duração e frequência de AD e ON em cada exposição e observamos que na terceira exposição o comportamento de espiar foi mais frequente (W: $p= 0,04$) após o ON. A locomoção teve maior duração em AD (W: $p= 0,02$) e em ON (W: $p= 0,04$) na terceira exposição quando comparada a E2, porém foi mais frequente (W: $p= 0,02$) em E3 após o ON. Os outros comportamentos não apresentaram diferenças entre tratamento agudo e crônico (para estatística completa ver tabela 7 do anexo 1).

4.8. A imobilidade tônica: efeitos da administração crônica de FLX

Para a descrição abaixo, foram utilizados os dados dos animais tratados com veículo ou fluoxetina (nas doses de 2,5 mg/kg ou 10 mg/Kg) na terceira

exposição (E3, tratamento crônico) ao teste ADON e a exposição ao teste de imobilidade tônica (tentativas e duração), estes dados foram analisados entre si pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para verificar diferenças entre os tratamentos. Também foram correlacionados usando o teste de Spearman (correlação não-paramétrica, SR) e foi realizada a análise de sobrevivência destes grupos.

Observamos que duração de IT (KW: $H(2, N=18) = 4,35$ $p = 0,11$) e tentativas de IT (KW: $H(2, N=18) = 0,35$ $p = 0,83$) não apresentaram diferenças entre os tratamentos (figura 7A). A análise de sobrevivência também não apresentou diferenças entre os tratamentos (MC: chi square: 2,207; df: 2; $p = 0,33$; figura 7), embora aparentemente, o grupo FLX 2,5 tenha maior duração de IT que VEI, e FLX 10. Não encontramos nenhuma correlação entre duração e número de tentativas de IT com os comportamentos observados no ADON.

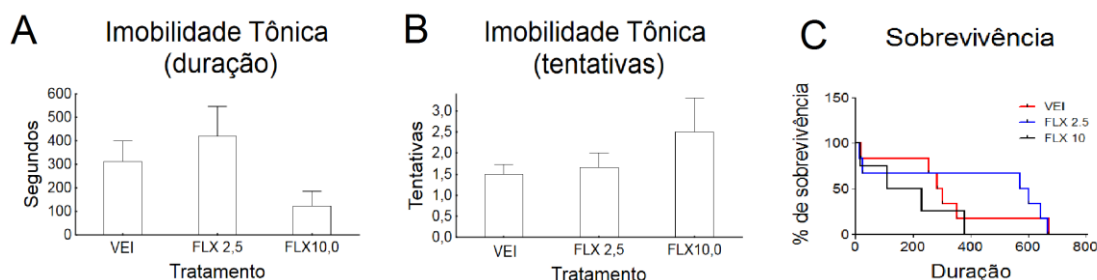


Figura 7: Gráfico de médias \pm EPM de duração de IT e número de tentativas de IT e análise de sobrevivência para duração de IT. A- Duração em segundos da duração de IT nos grupos VEI, FLX 2.5 e FLX 10. B- número de tentativas de indução de IT nos grupos VEI, FLX 2.5 e FLX 10. C- Análise de sobrevivência.

4.9. A exposição ao ADON: Descrição qualitativa da primeira administração de Cetamina (E2).

A CET é uma droga com efeitos anestésicos e antidepressivos. Na literatura não encontramos relatos em pombos tratados com cetamina com administração isolada da droga, somente em associação a outros fármacos, tanto anestésicos quanto antidepressivos. Fizemos uma descrição qualitativa do comportamento dos animais logo após a administração da droga, nas duas

doses selecionadas, antes da exposição ao teste de ADON e verificamos que logo após administração da CET nas duas doses, a maioria dos animais (13 animais de 15) apresentaram um comportamento sonolento. Ao retornar a gaiola-casa ficaram imóveis ou com movimentos vagarosos, com dificuldade para ficar em pé ou com andar atáxico (na maioria dos casos caindo para um lado).

Os animais receberam CET 30 minutos antes do teste ADON, e na dose de 2,5 mg/Kg apresentaram alteração nos seus comportamentos ao retornar para a gaiola-casa. Este grupo de animais levou cerca de 10 a 12 minutos para que sua postura e seus comportamentos retornassem aos padrões normais. Após esse período inicial de retorno para a gaiola-casa, os animais recuperaram os movimentos progressivamente voltando a apresentar primeiramente comportamento de locomoção por toda a área da gaiola (incluindo poleiro (pulo)). Este comportamento era seguido de espiar que também ocorria juntamente com movimentos angulares de cabeça e ao final dos 30 minutos, pouco tempo antes de serem expostos ao teste de ADON os animais apresentaram com bastante frequência comportamento de auto-limpeza. Em apenas 2 animais tratados com a dose 2,5 mg/Kg de CET não pudemos observar alterações comportamentais no período entre a administração da droga e o início do teste ADON.

Os animais que receberam CET na dose 10 mg/Kg apresentaram a mesma reação, após a administração da droga. O retorno a gaiola-casa foi observado também movimentos lentos ou os animais ficaram imóveis na gaiola, dificuldade em ficar em pé, andar atáxico tendendo para apenas um dos lados. Este grupo levou cerca de 5 a 7 minutos para recuperar seus comportamentos, que ocorreu primeiramente neste grupo com a expressão de auto-limpeza, seguido de movimentos angulares de cabeça e espiar. Apenas 1 animal deste grupo apresentou locomoção dentro da gaiola antes do início do teste de ADON.

Em resumo, a administração da CET nas doses 2,5 mg/Kg e 10 mg/Kg, causaram déficits motores, parecidos a atáxia, associados a postura de sono que podem indicar efeitos sedativos da droga nestas doses. Estes efeitos foram imediatos nos animais, porém com rápida recuperação, os animais

tratados com a menor dose tiveram recuperação mais lenta do que os animais tratados com a maior dose.

4.10. A exposição ao ADON: efeitos da administração aguda (E2) de Cetamina

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais tratados com veículo ou CET (nas doses de 2,5 mg/Kg ou 10 mg/Kg) na segunda exposição (E2, primeiro dia de tratamento) ao teste. Os dados foram comparados entre si pelo teste estatístico Krukall-Wallis (ANOVA, não-paramétrico; KW) e Wilcoxon (W).

Observamos que o tratamento com as diferentes doses de CET não afetou a frequência e duração das duas etapas do teste do comportamento de espiar, entretanto a duração (W: $p = 0,01$; figura 8A) e a frequência (W: $p = 0,02$; figura 8B) de ON nos animais tratados com CET 2,5 mg/Kg foi maior que em AD e o oposto para os animais tratados com CET 10 mg/Kg, **nos quais** a duração de ON neste comportamento foi maior que em AD (W: $p = 0,02$). Os movimentos angulares de cabeça não apresentaram diferenças na duração e frequência nas duas fases do teste entre os tratamentos. No entanto este comportamento teve um aumento significativo na duração (W: $p = 0,02$) após a apresentação de ON no grupo CET 10 (figura 8C e 8D)

A duração (KW: $H (2, N = 23) = 6,63 p = 0,03$) e a frequência (KW: $H (2, N = 23) = 6,29 p = 0,04$) da fase ON do comportamento de locomoção foram menores no grupo CET 2.5 em relação ao grupo VEI. Neste comportamento, também houve uma discreta diferença significativa na frequência de ON no grupo CET 2.5 (W: $p = 0,05$; figura 8E e 8F), que foi menor em relação ao AD. O comportamento de repouso, teve maior duração em AD (KW: $H (2, N = 23) = 4,77 p = 0,04$) no grupo CET 10 em relação ao veículo. No entanto, na fase ON do teste, a duração também apresentou diferenças (KW: $H (2, N = 23) = 2,47 p = 0,04$), com duração maior nos grupos CET 2,5 e CET 10, mostrando que o tratamento com CET com as diferentes doses faz com que este comportamento seja presente, o que não ocorre com o grupo VEI. No grupo CET 2,5 houve também diferenças na duração entre AD e ON (W: $p = 0,03$;

figura 8G e 8H) neste comportamento, pois em AD o comportamento é nulo e após o ON o comportamento surge com diferenças significantes. Os comportamento de exploração do assoalho e imobilidade alerta não foram modificados pelo tratamento (para estatística completa ver tabela 8 do anexo 1).

Em resumo o tratamento agudo com CET diminui a duração e frequência de espiar após o ON nas duas doses selecionadas em relação ao VEI e ao AD (após cada tratamento). O tratamento aumentou a duração do comportamento de movimentos angulares de cabeça após o ON em CET 2,5 e CET 10. O tratamento diminuiu duração e frequência de locomoção também após o ON e aumentou a duração do repouso em relação ao grupo VEI, entretanto diminuiu em relação ao AD nos grupos CET 2,5 e CET 10.

4.11. A exposição ao ADON: efeitos da administração crônica por 7 dias (E3) de Cetamina

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais tratados com veículo ou CET (nas doses de 2,5 mg/Kg ou 10 mg/Kg) na terceira exposição (E3) ao teste. Os dados foram comparados entre si pelo teste estatístico Krukall-Wallis (ANOVA, não-paramétrico; KW) e Wilcoxon (W).

O tratamento crônico com as diferentes doses de CET não afetou a duração e frequência de espiar nas duas fases do teste (para estatística completa ver tabela 9 do anexo 1). No entanto após a introdução do ON no grupo CET 10, a duração (W: $p = 0,02$; figura 9A e 9B) diminui em relação ao AD. A duração na primeira fase do teste (KW: $H (2, N = 23) = 3,10 p = 0,02$) e na segunda fase do teste (KW: $H (2, N = 23) = 2,28 p = 0,04$) da exploração do assoalho foi maior no grupo tratado com CET 10 em relação ao veículo. Nesta dose o comportamento acontece em ON quando no grupo CET 2,5 e VEI ele é nulo, a frequência não apresentou diferenças entre os tratamentos nas duas fases do teste (KW $p > 0,05$; figura 9C e 9D).

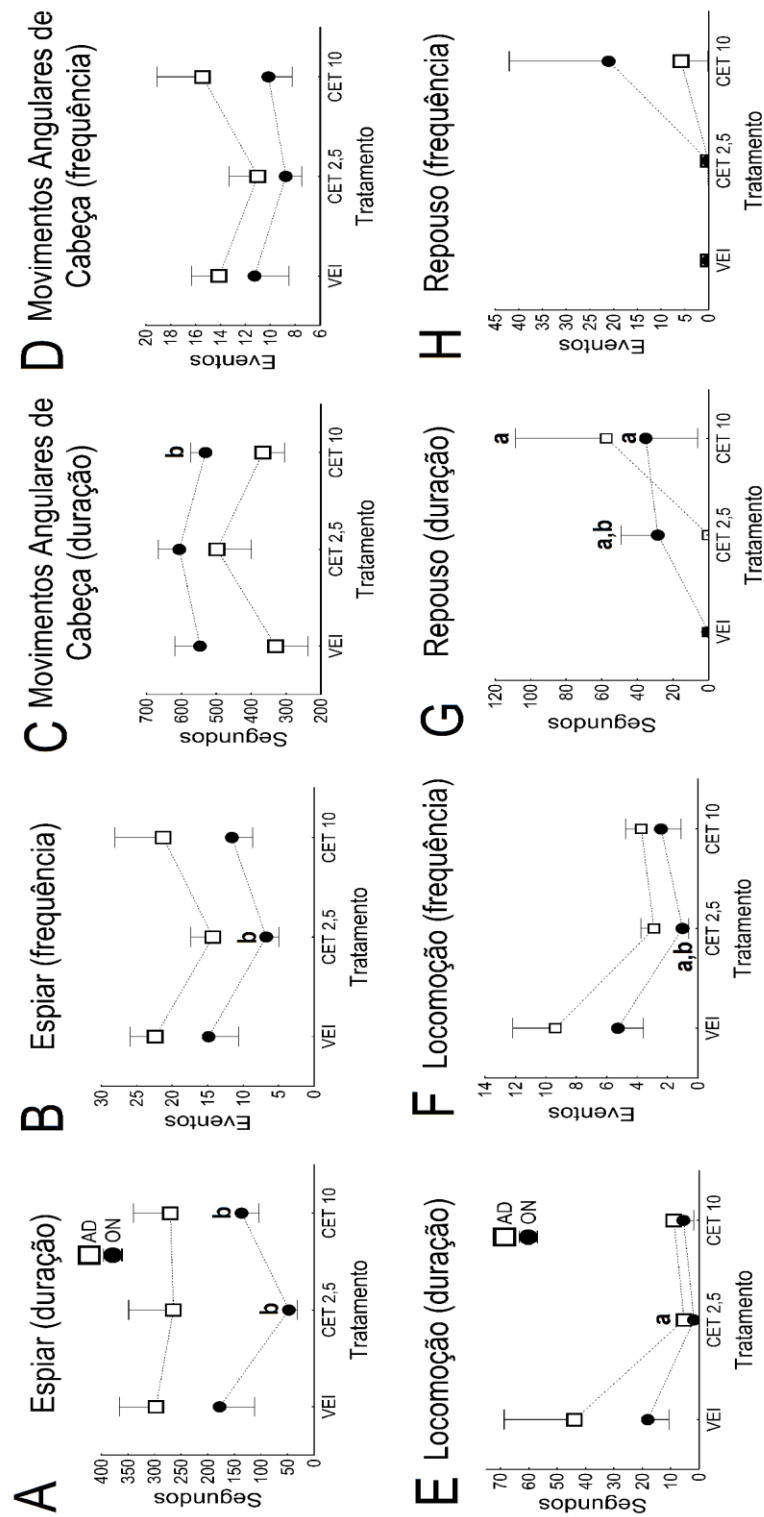


Figura 8: Efeitos da administração aguda de CET no ADON. Durações e frequências (totais nos 15 minutos de AD e nos 15 minutos de ON) de espisar (A,B), movimentos angulares de cabeça (C e D), locomoção (E e F), repouso (G e H) nos três grupos experimentais. (a) indica diferença significativa ($p < 0.05$, teste de Kruskal-Wallis) em relação ao veículo. (b) indica diferença significativa ($p < 0.05$, teste de Wilcoxon) em relação aos dados da etapa AD frente à mesma dose de CET. Os dados são representados por média \pm EPM.

Embora o comportamento de movimentos angulares de cabeça não apresente diferenças significantivas entre os tratamentos, observamos que na dose CET 10 mg/Kg a duração deste comportamento é menor em AD e ON (figura 9C e 9D). Já o repouso (figura 9I e 9J) ocorre neste grupo tratado, mas também sem diferenças estatísticas em relação ao VEI. Outro fato interessante no grupo CET 10 é que após o ON ocorre a imobilidade alerta (mas não ocorre em VEI).

Em resumo, no grupo CET 10, o comportamento de espicar apresenta diferenças entre AD e ON, onde a duração do comportamento é maior em AD em relação ao ON. A exploração do assoalho aumenta em AD no grupo CET 2,5 e CET 10, e surge em ON no grupo CET 10. No grupo CET 10 também surge o comportamento de repouso que não ocorre em VEI e CET 2,5.

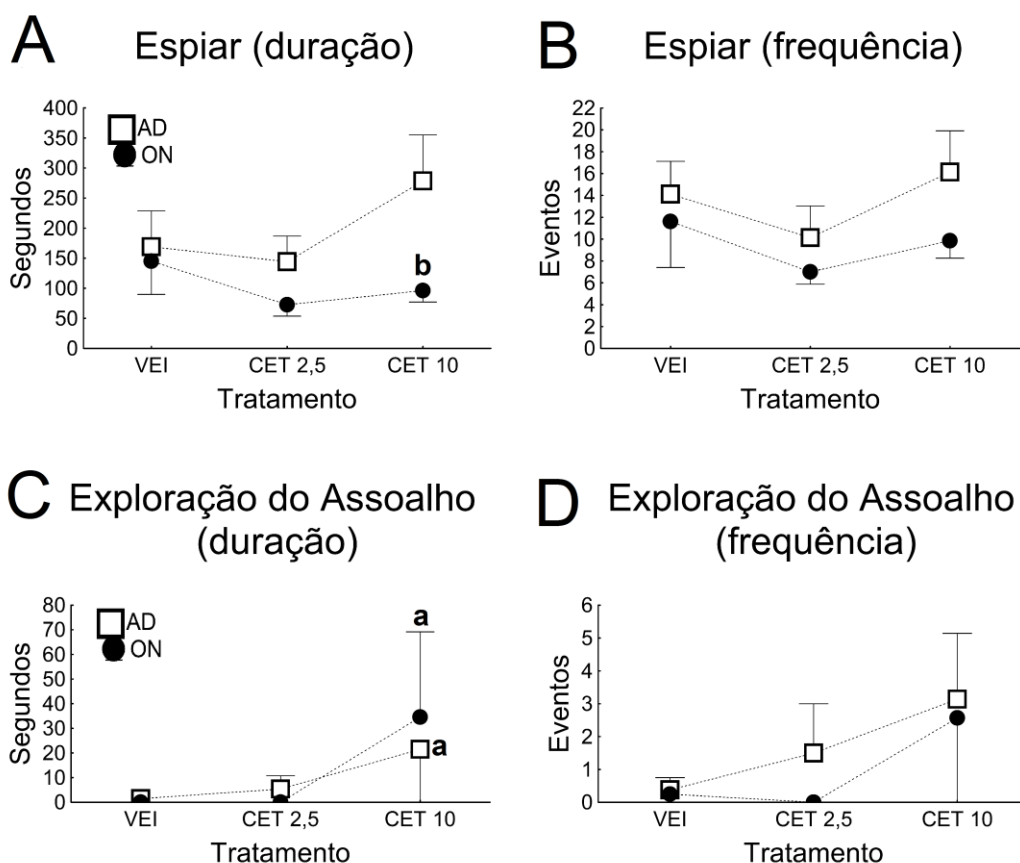


Figura 9: Efeitos da administração crônica de CET nas doses de 2.5mg/Kg ou 10mg/Kg no ADON. Durações e frequências (totais nos 15 minutos de AD e nos 15 minutos de ON) de espicar (A,B), exploração do assoalho (C e D) nos três grupos experimentais. (a) indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) em relação ao veículo. (b) indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Wilcoxon) em relação aos dados da etapa AD frente à mesma dose de CET. Os dados são representados por média \pm EPM.

4.12. Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da CET 2,5 mg/Kg

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais do grupo CET 2,5, na segunda e terceira exposições ao teste. Usamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (W) para analisar as diferenças na duração e frequência de AD e ON em cada exposição e observamos que apenas na segunda fase do teste, a frequência de espirar na terceira exposição é menor que em E2 (W: $p = 0,04$, dados completos tabela 10 do anexo 1).

4.13. Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da CET 10 mg/Kg

Para a descrição abaixo, foram analisados os animais do grupo CET 10, na segunda e terceira exposições ao teste. Usamos o teste não-paramétrico Wilcoxon (W) para analisar as diferenças na duração e frequência de AD e ON em cada exposição e observamos que o tratamento com a cetamina na dose de 10mg/kg não altera os comportamentos com a reexposição ao teste (dados completos tabela 11 do anexo 1).

4.14. Imobilidade tônica:efeitos da administração crônica de CET

Para a descrição abaixo, foram utilizados os dados dos animais tratados com veículo ou cetamina (nas doses de 2,5 mg/kg ou 10 mg/Kg) na terceira exposição (E3, tratamento crônico) ao teste ADON e a exposição ao teste de imobilidade tônica (tentativas e duração), estes dados foram analisados entre si pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para verificar diferenças entre os tratamentos. Também foram correlacionados usando o teste de Spearman (correlação não-paramétrica, SR) e foi realizado a análise de sobrevivência destes grupos.

Verificamos que a duração de IT (KW: $H (2, N= 23) = 0,26$ $p = 0,87$) e número de tentativas de indução da IT (KW: $H (2, N= 23) = 3,81$ $p = 0,14$) não exibiram diferenças significantes entre os tratamentos (figura 10A). A análise de sobrevivência também não apresentou diferenças entre os tratamentos (MC:

chi square: 0,69; df: 2; $p= 0,70$; figura 10B). Na análise de correlações também não encontramos resultados significativos entre duração e tentativas de IT com os comportamentos observados no ADON (SR: $p>0,05$).

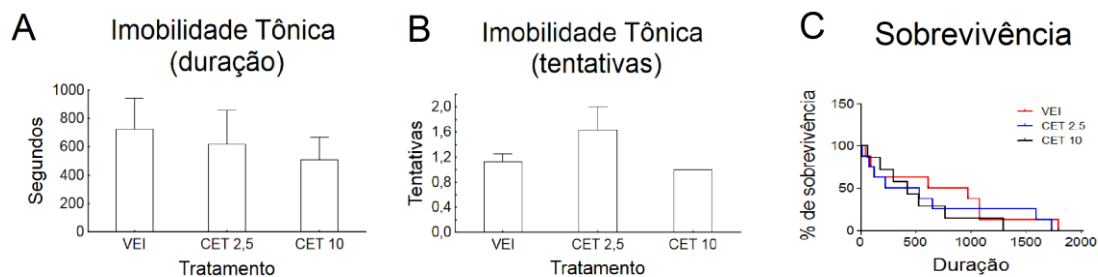


Figura 10. Gráfico de médias±EPM de duração de IT e número de tentativas de IT e análise de sobrevivência para duração de IT. A- Duração em segundos da duração de IT nos grupos VEI, CET 2.5 e CET 10. B- número de tentativas de indução de IT nos grupos VEI, CET 2.5 e CET 10. C- Análise de sobrevivência.

4.15. Neurogênese hipocampal : efeitos da administração crônica de FLX

As contagens de células DCX presentes no hipocampo de pombos adultos tratados com diferentes doses de fluoxetina foram comparadas entre os grupos (VEH, FLX 2,5 e FLX 10) através do teste estatístico Krukall-Wallis (ANOVA, não-paramétrico; KW), em três áreas distintas do hipocampo (lâmina medial (LM), área triangular (TR) e lâmina lateral (LL) quantificamos densidade de células bipolares e multipolares em cada região (células DCX-ir/ mm^2) e obtivemos os seguintes resultados:

Na região da lâmina medial e área triangular a densidade de células bipolares e multipolares não apresentaram diferenças entre os tratamentos (KW $p>0.05$; figura 11D e 11H). Não encontramos diferenças na densidade de células bipolares da lâmina lateral. No entanto encontramos diferenças na densidade de células multipolares desta região (KW: $H(2, N=18) = 4,43$ $p = 0,01$; figura 11F), no qual houve um declínio da densidade de células nos grupos FLX 2.5 e FLX 10 em relação ao grupo VEI. A densidade total de células em cada região também não apresentou diferenças entre os tratamentos, exceto pela lâmina lateral que apresentou uma diferença marginalmente significativa (KW: $H(2, N=18) = 5,62$ $p = 0,06$; figuras 11E, 11G

e 11I).

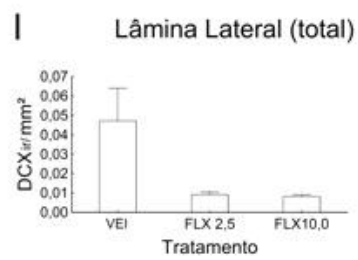
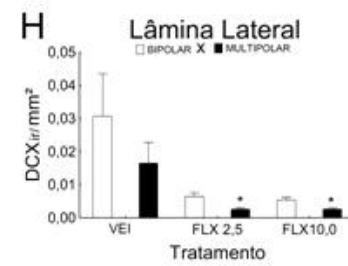
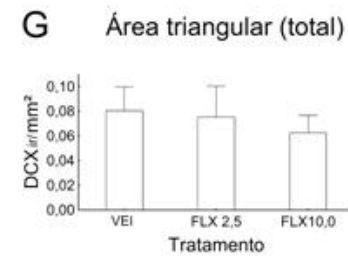
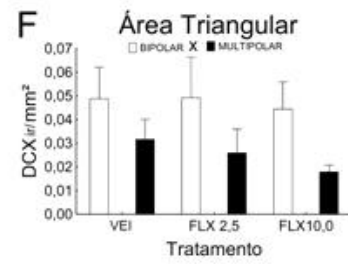
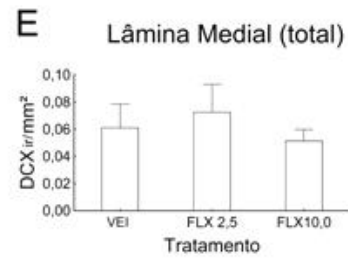
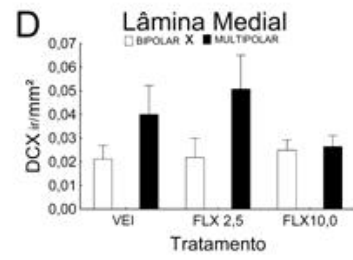
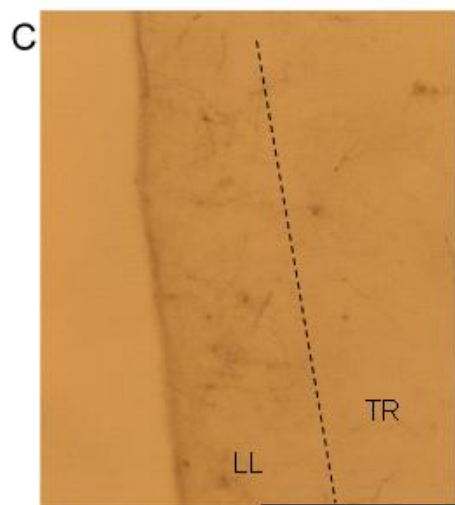
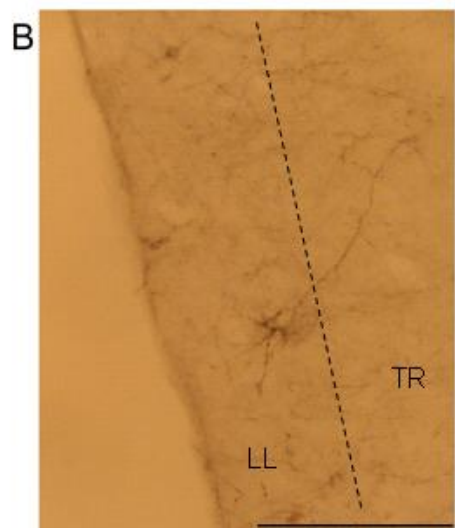
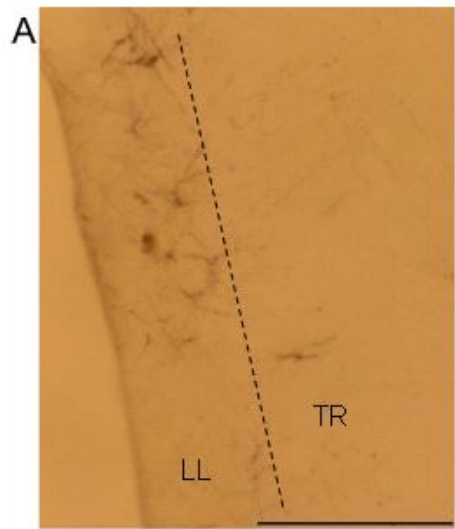


Figura 11: Efeitos do tratamento crônico com FLX sobre o número de células DCX-ir no Hipocampo (HP). A- Fotomicrografia (barra de escala 500 um) de lâmina lateral de HP esquerdo retirado de pombo do grupo VEI. B- Fotomicrografia (barra de escala 500 um) de lâmina lateral de HP retirado de pombo do grupo FLX 2,5. C- Fotomicrografia (barra de escala 500 um) de lâmina lateral de HP retirado de pombo do grupo FLX 10. D- quantificação da desidade de células bipolares e multipolares da lâmina medial. E- quantificação da densidade celular total da lâmina medial. F- quantificação da desidade de células bipolares e multipolares da área triangular. G- quantificação da densidade celular total da área triangular. H- quantificação da desidade de células bipolares e multipolares da lâmina lateral. E- quantificação da densidade celular total da lâmina lateral. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) em relação ao veiculo. Os dados são representados por média \pm EPM.

4.16. Neurogênese hipocampal: efeitos da administração crônica de Cetamina

As contagens de células DCX presentes no hipocampo de pombos adultos tratados com cetamina foi realizada da mesma forma citada nos animais tratados com fluoxetina, através do teste estatístico Krukall-Wallis (ANOVA, não-paramétrico; KW). Na lâmina medial não encontramos diferenças na quantificação de células bipolares e multipolares DCXir/mm² (figura 12D), o mesmo para células bipolares da área triangular. No entanto encontramos diferenças nas células multipolares da área triangular (KW: H (2, N= 17) =9,25 $p = 0,009$, figura 12H) que foi maior no grupo CET 10.

Houve diferenças também na lâmina lateral, na quantificação de células bipolares (KW: H (2, N= 17) =11,35 $p = 0,003$) e células multipolares (KW: H (2, N= 17) =9,94 $p = 0,006$), nos dois casos o número de células DCXir/mm² foi maior no grupo CET 10 (figura 12F). Nesta região quantificada encontramos diferenças também na desidade total de células (bipolares + multipolares) (KW: H (2, N= 17) =10,01 $p = 0,006$; figura 12G) maiores nos grupos CET 2,5 e CET 10.

Em resumo o tratamento com diferentes doses de cetamina provocou um aumento no número de células multipolares na região da área triangular e também bipolares na região da lâmina lateral do hipocampo de animais tratados com as doses 2,5 mg/Kg e 10 mg/Kg. Esse aumento também foi observado quando avaliado o número de células DCXir/área e na densidade total de células.

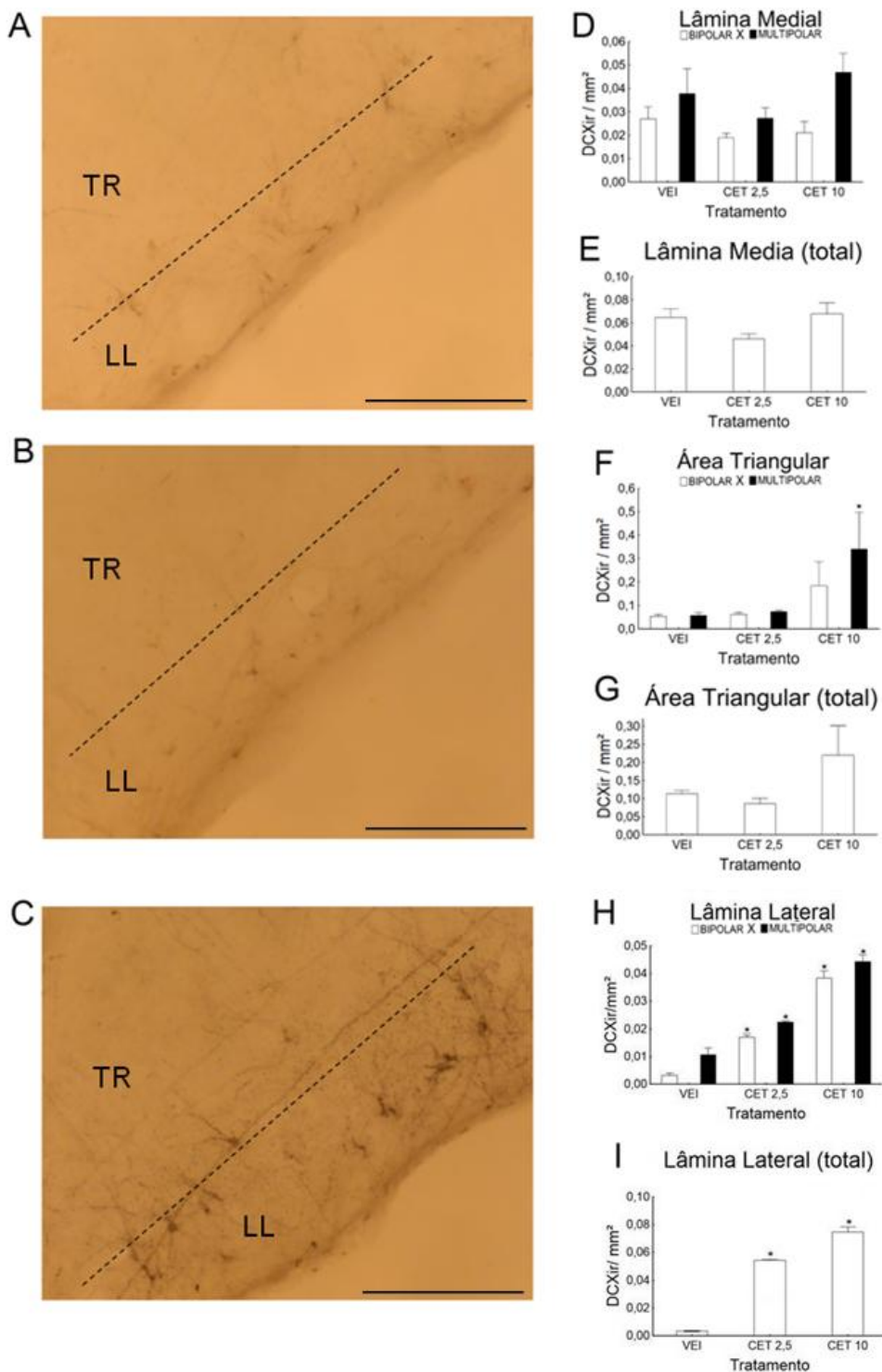


Figura 10. Efeitos do tratamento crônico com CET sobre o número de células DCX-ir no Hipocampo (HP). A- Fotomicrografia (barra de escala 500 μ m) de lâmina lateral de HP retirado de pombo do grupo VEI. B- Fotomicrografia (barra de escala 500 μ m) de lâmina lateral de HP direito retirado de pombo do grupo CET 2,5. C- Fotomicrografia (barra de escala 500 μ m) de lâmina lateral de HP retirado de pombo do grupo CET 10. D- quantificação da densidade de células bipolares e multipolares da lâmina medial. E- quantificação da densidade celular total da lâmina medial. F- quantificação da densidade de células bipolares e multipolares da área triangular. G- quantificação da densidade celular total da área triangular. H- quantificação da densidade de células bipolares e multipolares da lâmina lateral. E- quantificação da densidade celular total da lâmina lateral. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) em relação ao veiculo. Os dados são

representados por média \pm EPM.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, observamos que a administração aguda ou crônica de FLX e de CET afetam a expressão de comportamentos defensivos em relação a estímulos estressantes provocados pela separação dos congêneres seguida de exposição ao ADON. Estes efeitos não parecem serem desencadeados pela repetição dos testes. A reexposição ao teste ADON dos animais pertencentes ao grupo CNT provocou aumento modesto na frequência de um único comportamento exploratório tardio (os movimentos angulares de cabeça) da fase ON na E2 e E3 em relação a E1 (E2 sendo estatisticamente indistinguível de E3). Este discreto efeito não modificou um achado constante nas 3 exposições: os comportamentos exploratórios, locomotores e defensivos durante AD são similares quantitativamente aos observados após o ON nas 3 exposições ao ambiente em animais não tratados com drogas ou tratados com veículo.

Por outro lado, o tratamento agudo com FLX (10 mg/Kg) aumentou o comportamento de espiar no AD, sem afetá-lo na etapa ON. Ambas as doses de FLX utilizadas neste estudo aumentaram as diferenças entre o espiar e a locomoção feitos durante o AD e o realizado após o ON. Estes efeitos foram acarretados por aumento nestes comportamentos durante a fase AD. Além disto, ambas as doses de FLX diminuíram os movimentos angulares da cabeça em AD quando comparados ao ON (que não foram modificados pelo tratamento). Já o tratamento agudo com CET (nas duas doses) diminuiu a duração e frequência de espiar e da locomoção no ON e aumentou a duração (mas não a frequência) dos movimentos angulares de cabeça no ON. Além disto o tratamento crônico com a FLX aumentou a duração (mas não a frequência) dos movimentos angulares de cabeça no ON, e não afetou os demais comportamentos registrados, enquanto a CET aumentou o espiar e a exploração do assoalho em AD. Estes dados sugerem que eventuais efeitos do reteste E2 e E3 não contribuíram para os efeitos observados após primeira injeção ou após o tratamento crônico com estas drogas.

Este resumo geral sugere que os efeitos comportamentais agudos e crônicos das duas drogas usadas neste trabalho foram diferentes entre si, e podem ser melhor analisados separadamente. Em relação à CET, seus efeitos

agudos parecem ser essencialmente hipnóticos: além de diminuir a locomoção, as diferenças no espiar antes e após o ON aparentam ter sido provocadas principalmente por uma diminuição neste comportamento anti-predação/exploratório (ver adiante) em resposta ao ON. Além disso, comportamentos semelhantes a sono foram observados em animais tratados com CET 10mg/Kg imediatamente após as injeções, durante o período de 30 min antes do teste ADON. O tratamento crônico com a dose mais elevada de CET, no entanto, induz um aumento da atividade de exploração do assoalho e para o ambiente (espiar), sugerindo uma desinibição do comportamento em face dos estímulos estressantes fornecidos pelo teste.

Desinibição comportamental também foi observada em mamíferos após o tratamento com drogas antidepressivas (MITCHELL e REDFERN, 1992). Desinibição comportamental pode ser induzida por drogas ou ser manifestações comportamentais mais graves em um efeito geral que a droga tem sobre as emoções e comportamentos, no entanto, a incidência de desinibição comportamental induzida por antidepressivos varia consideravelmente e não pode ser calculada com precisão (BOND, 1998). O tratamento crônico (7 dias) e agudo (1 dia) com CET na dose de 10 mg/kg reduz a imobilidade no teste ADON. Assim, a ação desta droga parece ser apenas parcialmente semelhante em mamíferos e em pombos, já que neste último só observamos os efeitos desinibitórios após 7 dias de tratamento. Zhang et al (2015) também mostraram efeito antidepressivo em ratos com tratamento crônico por 3 e 7 dias, sendo que no tratamento crônico por 7 dias consecutivos, o tempo de imobilidade no teste de natação forçada foi significativamente menor do que o grupo controle, reforçando nossos resultados.

Esta suposta desinibição comportamental de pombos tratados com CET em resposta a um estímulo ameaçador moderado (como a separação social breve com a transferência para um ambiente desconhecido e do qual não se pode fugir ou esquivar), deve ser discutida por meio de uma análise do comportamento de espiar. O comportamento de espiar é um comportamento com movimentos balísticos de alta frequência da cabeça e do pescoço, mesclando movimentos para cima e para baixo e para frente e para trás,

dirigindo os olhos e os meatos auditivos para cima e para o chão; o corpo e os pés permanecem imóveis durante este comportamento. Ele é expresso por pombos confrontados com estímulos potencialmente ameaçadores ou perigosos, incluindo o manuseio, aproximações abruptas de humanos em direção à gaiola, isolamento acústico e visual da ave de seus membros da mesma espécie (SOUZA et al, 2009), súbitos e intensos ruídos de baixa frequência (FERRARI et al, 1999) e a apresentação de estímulos predatórios (um falcão empalhado ou o seu canto), mas não a um estímulo não-predatório ou neutro (um faisão empalhado ou o seu canto; STEPHAN e BUGNYAR, 2013). Também descrito nos tordos americanos (*Turdus migratorius*; VANDERHOFF e EASON, 2009), esses movimentos são considerados uma estratégia anti-predação envolvendo inspeção sensorial de estímulos ameaçadores.

Espiar é diferente dos movimentos de varredura (movimentos angulares da cabeça), que envolvem movimentos angulares discretos da cabeça principalmente no plano horizontal, com movimentos de pescoço ausentes. Assim, aumentos ou diminuições neste comportamento podem ser interpretados como aumentos ou diminuições na aversividade do ambiente percebida pelo pombo. Neste contexto, os efeitos do tratamento crônico com a CET, aumentando o espiar e a exploração do assoalho, poderiam indicar uma mudança na forma usada pelo animal de lidar com o ambiente ameaçador. A CET teria, de acordo com esta especulação, diminuído a inibição comportamental provocada pelo seu transporte a um ambiente estranho e separado de seus congêneres, e aumentado a expressão de comportamentos ativos de vigilância antipredatória.

O tratamento agudo com as duas doses de FLX aumentou o comportamento de movimentos angulares de cabeça após o ON, apontando um aumento da aversividade do ambiente após a novidade apresentada ao animal, sugerindo um efeito ansiogênico da droga. Este efeito também é observado em ratos submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado, onde com o tratamento agudo nestes animais, foi observado a diminuição do percentual de entradas e o tempo gasto nos braços abertos, mostrando um perfil ansiogênico da administração aguda da FLX (SILVA e BRANDÃO, 2000;

SILVA et al, 1999). Este efeito ansiogênico foi visto também em camundongos exposto a um predador natural, onde uma única administração de FLX potencializou reações de defesa em resposta ao predador (GRIEBEL et al, 1995). Porém, os tratamentos crônicos nas doses de 2.5mg/Kg e 10mg/kg não alteraram os comportamentos de locomoção e espiar, sugerindo que o ambiente se tornou menos ameaçador ao animal. Efeito similar pode ser visto em mamíferos (MEZADRI et al, 2011; CAMPOS et al, 2013; GRIEBEL et al, 1995; SILVA e BRANDÃO, 2000).

A comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX e da CET adicionam informações interessantes aos efeitos destas drogas. O tratamento crônico com FLX (E3), nas duas doses, aumentou o espiar e a locomoção em relação ao tratamento agudo (E2), sugerindo que a repetição do tratamento com a FLX aumenta seus efeitos desinibitórios sobre os comportamentos defensivos ativos. Em roedores, o tratamento agudo com FLX provocou maior imobilidade no teste de natação forçada (MEZADRI et al, 2011) e no teste de exposição ao predador (CAMPOS et al, 2013). No teste de nado forçado, a imobilidade pode ser interpretada como uma forma do animal lidar com um estímulo estressante. A maior ou menor expressão deste comportamento ao longo de uma bateria de testes são importantes para analisar os efeitos das drogas antidepressivas, que neste caso tende a ser maior após o tratamento agudo da FLX, aumentando a imobilidade (MEZADRI et al, 2011). O tratamento crônico com FLX diminuiu a expressão de comportamentos defensivos em ratos expostos a um predador, sugerindo um perfil antidepressivo da droga (GRIEBEL et al, 1995).

Já os efeitos do tratamento crônico e agudo com a CET sobre o espiar e os demais comportamentos foram essencialmente similares. Apenas para a dose de 2.5 mg/Kg observamos uma discreta redução na frequência de espiar com o tratamento crônico. Diferentemente da FLX, os efeitos desinibitórios da CET manifestam-se já no tratamento agudo e não mudam com a repetição. Em ratos, o tratamento agudo com CET provoca desinibição e estes efeitos não se modificam com o tratamento crônico, fato evidenciado no teste de natação forçada (ZHANG et al, 2015; XIAN-CANG et al, 2013; GHANG-ZHANG et al, 2013).

Os tratamentos crônicos com a FLX ou com a CET não modificaram a expressão da imobilidade tônica, um comportamento extremo de defesa, realizado frente a uma situação inescapável. Essa falta de resposta pode se dar pelo fato do bloqueio dos receptores NMDA, que foi mostrado por atuar na resposta da IT em mamíferos, pois a administração sistêmica do antagonista do receptor NMDA abole os efeitos de IT em ratos e porquinhos-da-índia (*Cavia Porcellus*) (COUTINHO e MENESCAL DE OLIVEIRA, 2009).

No tratamento com FLX observamos também que duração de IT e tentativas de IT não apresentaram diferenças entre os tratamentos. A análise de sobrevivência também não apresentou diferenças entre os tratamentos e não encontramos nenhuma correlação entre duração e número de tentativas de IT com os comportamentos observados no ADON. No estudo com diferentes cobaias e usando diferentes classes de antidepressivos entre eles o ISRS, Olsen et al (2002) observou que a FLX e outros antidepressivos da classe dos ISRS não possuem quaisquer efeitos sobre a duração de IT em porquinhos-da-índia (*Cavia Porcellus*). No entanto, pombos alojados em ambiente enriquecido possuem maior duração de IT em comparação aos animais alojados em ambiente padrão de laboratório (MELLEU et al, 2015). Enriquecimento ambiental possui efeitos comportamentais em mamíferos que já foram sugeridos como similares aos dos antidepressivos (POSSAMAI et al, 2015; LEGER et al, 2014; HENDRIKSEN et al, 2013). Portanto, pelo menos para o pombo, as drogas antidepressivas investigadas no presente trabalho não parecem ter efeitos comparáveis aos do enriquecimento ambiental em relação a este comportamento defensivo extremo. Nestes achados tanto FLX quanto CET tiveram ações antidepressivas no teste comportamental ADON, mas não na IT, enquanto o enriquecimento ambiental parece ter, além do efeito semelhante aos antidepressivos, ter ação sobre a duração de IT, pois a exposição a ambientes enriquecidos pode favorecer a inibição comportamental defensiva em pombos em resposta a estímulos potencialmente ameaçadores (MELLEU et al, 2015).

Os mecanismos que controlam a neurogênese e sua relevância para comportamentos defensivos em aves não-oscinas ainda não estão bem

esclarecidos (MELLEU et al, 2015). No entanto, em mamíferos, os comportamentos de defesa podem estar relacionados com a neurogênese. Andrade et al (2013) no teste de estresse imprevisível observou que ratos estressados possuíam menor número de células DCX-ir que ratos não estressados. Em camundongos, os comportamentos de defesa motivados pelo estresse crônico estavam associados a um decréscimo na neurogênese de curto prazo (24 horas), que foi totalmente recuperado ao longo prazo (6 semanas; ELIZALDE et al, 2010). Estes dados mostram que o estresse interfere na neurogênese.

Os comportamentos defensivos observados no teste do ADON, podem ter sido provocados pelo estresse do procedimento experimental, e que o efeito antidepressivo retardado da FLX em comparação da CET pode ter causado as diferenças entre os tratamentos na neurogênese, pois, o estresse crônico induziu mudanças duradouras e específicas em atividade neuronal e níveis dos neurotransmissores glutamatérgicos (ELIZALDE et al, 2010), e é possível sugerir que o sistema serotoninérgico está fortemente envolvido com o aumento de ansiedade após a exposição ao estresse crônico (ANDRADE et al, 2013).

Outra evidência importante de que os comportamentos defensivos são independentes da neurogênese foi observada em ratos e camundongos tratados com FLX em diferentes doses. Nestes estudos o tratamento crônico provocou efeitos somente antidepressivos nos animais (SAH et al, 2012; HUANG et al, 2004; HOLLICK et al, 2008), esses dados mostram que o efeito antidepressivo da fluoxetina é independente da neurogênese hipocampal como tem sido evidenciado em diversos estudos (HUANG et al, 2004; SANTARELLI et al, 2003). No entanto, há na literatura estudos que mostram que o bloqueio de receptores NMDA aumenta o número de células recém-nascidas no cérebro de rato (GOULD e TANAPAT, 1997; NACHER et al, 2003), o que corresponde com os nossos achados. Outros estudos também mostram que a neurogênese pode estar ligada ao tratamento com outros antagonistas do receptor NMDA no cérebro de mamíferos (NACHER et al, 2003; KITAYAMA et al, 2003).

O tratamento crônico (7 dias) com CET nas doses de 2.5 ou 10 mg/kg, aumentou o número de neurônios DCX-ir no hipocampo de pombos. O tratamento crônico com 10 mg/Kg de CET aumentou a neurogênese na área

triangular e lâmina lateral do hipocampo dos pombos enquanto que o tratamento com 2.5 mg/Kg aumentou a neurogênese somente na lâmina lateral. Considerando que apenas 10 mg/Kg de cetamina promoveu efeitos comportamentais após o tratamento crônico, é plausível afirmar que a neurogênese na lâmina lateral do hipocampo não está relacionado a efeitos comportamentais da cetamina em pombos adultos. Por outro lado, a neurogênese na área triangular do hipocampo de pombos (homólogo ao giro denteado hipocampal de mamíferos, MELLEU et al, 2013, 2015) poderia contribuir para os efeitos comportamentais da cetamina, porém mais estudos devem ser realizados para esclarecer esta evidência. Retirei uma frase pontuada aqui

Em contrapartida, o tratamento crônico com FLX não provocou alterações neurogênicas no hipocampo de pombos adultos, sugerindo que a neurogênese é independente da resposta a comportamentos defensivos (SAH et al, 2012; HUANG et al, 2004; HOLLICK et al, 2008), embora esteja relacionada com respostas ao estresse crônico (ELIZALDE et al, 2010; ANDRADE et al, 2013). O tratamento crônico com 2.5mg/Kg de FLX, ainda que sem significancia, aumentou o número de células DCX-ir na lâmina medial e diminuiu consideravelmente na lâmina lateral. Essa diminuição foi observada nas três áreas analisadas no tratamento crônico com 10 mg/Kg de FLX, essa diminuição no número de células na lâmina lateral em ambas as doses usadas para o tratamento crônico pode ter sido para dar origem às células que se instalaram na área triangular e lâmina medial do Hp de pombos (MELLEU et al, 2013), pois a presença de uma região proliferativa adjacente a lâmina lateral e a vulnerabilidade destas células às alterações ambientais (MELLEU et al, 2015) dão suporte aos resultados do nosso estudo.

6. CONCLUSÃO

Observamos que a administração aguda ou crônica de FLX e de CET afetam a expressão de comportamentos defensivos em relação a estímulos estressantes provocados pela separação dos congêneres seguida de exposição ao ADON, com efeitos antidepressivos consistente com os achados na literatura. O tratamento crônico com FLX afetou os comportamentos em AD, na dose de 10mg/Kg aumentou os movimentos angulares de cabeça no ON em comparação ao AD, sugerindo que com o ON o comportamento de vigilância ficou mais evidente em virtude da novidade apresentada, já nas duas doses aumentou o espiar em relação ao tratamento agudo, sugerindo que a repetição do tratamento com FLX aumentou os efeitos desinibitórios sobre os comportamentos defensivos ativos, pois o ambiente novo passou a ser potencialmente menos ameaçador.

Em relação à CET, seus efeitos agudos parecem ser essencialmente hipnóticos pois diminui a locomoção e o espiar após o ON. Essa diferença foi provocada por uma diminuição nestes comportamentos em resposta ao ON. Porém, após o ON ocorreu um aumento no comportamento de movimentos angulares de cabeça, que assim como ocorreu no tratamento com FLX, parece ter aumentando em resposta a novidade apresentada. Este comportamento envolve movimentos angulares discretos da cabeça que podem ser interpretados como comportamentos de aversividade do ambiente percebidos pelo pombo em função do ON.

Os comportamentos defensivos observados no ADON podem ter sido provocados pelo estresse do procedimento experimental de um ambiente desconhecido. O efeito “antidepressivo” retardado da FLX em comparação com a CET pode ser responsável pelas diferenças entre os tratamentos na neurogênese pois observamos um aumento na neurogênese hipocampal dos animais tratados com CET, o que não ocorreu com a FLX. Nestes achados tanto FLX quanto CET tiveram ações semelhantes à antidepressivos, no teste comportamental ADON, mas não na IT. Com base nestes resultados, podemos sugerir que comportamentos defensivos de pombos e neurogênese são sensíveis a tratamentos com antidepressivos e alterações ambientais. Além disso esses animais oferecem um modelo interessante para o estudo de

mecanismos comportamentais e neurogênicos.

REFERENCIAS

ALAHMED, S.; HERBERT, J. Strain differences in proliferation of progenitor cells in the dentate gyrus of the adult rat and the response to fluoxetine are dependent on corticosterone. **Neuroscience**, n.157, p.677-682, 2008.

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

AMPUERO, E.; LUARTE, L.; SANTIBÁÑEZ, M.; VARAS-GODOY, M.; TOLEDO, J.; DIAZ-VELIZ, G.; CAVADA, G.; RUBIO, J.; WYNEKEN, U. Two Chronic Stress Models Based on Movement Restriction in Rats Respond Selectively to Antidepressant Drugs: Aldolase C As a Potential Biomarker. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, p.1-9, 2015.

ANDRADE, J.S.; CÉSPEDES, I.C.; ABRÃO, R.O.; DOS SANTOS, T.B.; DINIZ, L.; BRITTO, L.R.G.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; ORTOLANI, D.; MELO-THOMAS, L.; DA SILVA, R.C.B.; VIANA, M.B. Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, n.250, p.81-90, 2013.

ASSIS, L.C.; REZIN, G.T.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; JEREMIAS, I.C.; ZUGNO, A.I.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L. Effect of acute administration of ketamine and imipramine on Creatine kinase activity in the brain of rats. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n.31(3), p.247-252, 2009.

ATALAN, G.; UZUN, M.; DEMIRKAN, I.; YILDIZ, S.; CENESI, M. Effect of Medetomidine-Butorphanol-Ketamine Anaesthesia and Atipamezole on Heart and Respiratory Rate and Cloacal Temperature of Domestic Pigeons. **Journal of Veterinary Medicine**. n.49, p. 281-285, 2002.

AZIZPOUR, A.; HASSANI, Y. Clinical evaluation of general anesthesia with a combination of ketamine HCL and diazepam in Pigeons. **Agricultural Journal**. n7, p.101-105, 2012.

BERMAN, R.B.; CAPPIELO, A.; ANAND, A.; OREN, D.A.; HENINGER, G.R.; CHARNEY, D.S.; KRYSTAL, J.H. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. **Biology Psychiatry**. n.47, p.351-354, 2000.

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.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C.; TAKAHASHI, T.; KELLEY, M.J. Attack and defensive behaviour in the albino rat. **Animal Behavior**. n.25, p.622-634, 1977.

BLAZEVIC, S.; COLIC, L.; CULIG, L.; HRANILOVIC, D. Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. **Behavior Brain Research**. n.230, p.175– 181, 2012.

BLIER, P.; DE MONTIGNY, C.; CHAPUT, Y. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. **Journal of Clinical Psychopharmacology**. p.24-35, 1987.

BOND, A. Drug-Induced Behavioural Disinhibition. **CNS Drugs**. n.1, p. 41-57, 1998.

BOOTH, N.H. Anestésicos intravenosos e outros parenterais. In: BOOTH, N. H.; McDONALD, L.E. Farmacologia e terapêutica em veterinária. 6 ed. Rio de Janeiro : **Guanabara Koogan**, 1992. cap.13, p.168-218.

BORZIO, F. Ketamine hydrochloride as an anesthetic for wildfowl. **Veterinary Medicine – Small Animal Clinician**. n.68, p.1364-1367, 1973.

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

BRANDÃO, M.L.; FONTES, J.C.S.; GRAEFF, F.G. Facilitatory Effect of Ketamine on Punished Behavior. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. p.1.4, 1980.

BREE, M.M.; GROSS, N.B. Anesthesia of pigeons CI 581 (Ketamine) and Pentobarbital. **Laboratory Animal Care**. n.4, p.500-502, 1969.

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(2), p.342–35, 2009.

CALANDREAU, L.; FAVREAU-PEIGNÉ, A.; BERTINA, A.; CONSTANTINA, P.; ARNOULDA, C.; LAURENCEE, S.; LUMINEAUE, S.; HOUELIERE, 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.

CAMPOS, K.F.C.; AMARAL, V.C.S.; JAVIER, L.R.; MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: A prey–predator interaction test. **Behavioural Brain Research**. n.240, p.160-170, 2013.

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

- CARLI, G. Sub-cortical mechanisms of rabbit hypnosis. **Archives Italiennes de Biologie**. n.109, p.15–26, 1971.
- CARRIER, N.; KABBAJ, M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. **Neuropharmacology**. n.70, p.27-34, 2013.
- CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety like behavior: the elevated plusmaze model 20 years on. **Neuroscience Biobehavior Reviews**. n.29, p.1193–1205, 2005.
- CHAIT, L.D.; MCMILLAN, D.E. The effects of phencyclidine on punished behavior in the pigeon. **Pharmacologist**. n.21, p.269, 1979.
- CHAIT, L.D.; GALEN, R.W.; MCMILLAN, D.E. Effects of Phencyclidine and Ketamine on Punished and Unpunished Responding by Pigeons. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. p.145-148, 1981.
- CLEARY, E.C; DOLBEER, R.A. Wildlife Hazard Management at Airports: A Manual for Airport Personnel, **USDA National Wildlife Research Center -Staff Publications**. 2005
- 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.
- CORREL, G.E.; FUTTER, G.E. Two case studies of patients with major depressive disorder given low-dose (subanesthetic) ketamine infusions. **Pain Medicine**. n7, p.92-95, 2006.
- COUILLARD-DESPRES, S.; WUERTINGER, C.; KANDASAMY, M.; CAIONI, M.; STADLER, K.; AIGNER, R.; BOGDAHN, U.; AIGNER L. Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis. **Molecular Psychiatry**. n.14, p.856-864, 2009.
- COUTINHO, M.R; MESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of homocysteic acid in the guinea pig (*Cavia porcellus*) anterior cingulate cortex in tonic immobility and the influence of NMDA receptors on the dorsal PAG. **Behavioural Brain Research**. n.208, p.237–242, 2010.
- COUTINHO, M.R.; DA SILVA, L.F.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA L. Modulation of tonic immobility in guinea pig PAG by homocysteic acid, a glutamate agonist. **Physiology Behavior**. n.94, p.468-473, 2008.
- COWEN, D.S., TAKASE, L.F., FORMAL, C.A., JACOBS, B.L. Age-dependent decline in hippocampal neurogenesis is not altered by chronic treatment with fluoxetine. **Brain Research**. n.1228, p.14-19, 2008.
- 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.

DAHL, M.L. Cytochrome P 450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? **Clinical Pharmacokinetics.** n.41, p.453-70, 2002.

DAHLSTROM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia.** n.20, p.398-399, 1964.

DAVID, D.J.; SAMULES, B.A.; RAINER, Q.; WANG, J.-W.; MARSTELLER, D.; MENDEZ, I.; DREW, M.; CRAIG, D.A.; GUIARD, B.P.; GUILLOUX, J.-P. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. **Neuron,** n.62, p.479-493, 2009.

DE SOUZA, A.C.B.; AVERBECK, E.; PASCHOALINI, M.A.; FARIA, M.S.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. The peeping response of pigeons (*Columba livia*) to isolation from conspecifics and exposure to a novel environment. **Behavior Processes.** n.81, p.26-33, 2009.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **Journal Psychopharmacology.** n.5, p.305-315, 1991.

DENERIS, E. S.; WYLER, S. C. Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. **Nature Neuroscience.** n.15, p.519-527, 2012.

DULAWA, S.C.; GRANDY, D.K.; LOW, M.J.; PAULUS, M.P.; GEYER, M.A. Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. **The Journal of Neuroscience.** n.19, p.9550-9555, 1999.

DUNLAP, K.; MOWRER, O.H. Head Movements and Eye Function of Birds. **Journal of Comparative Psychology.** p.99-113, 1930.

ELIZALDE, N.; GARCIA-GARCIA, A.L.; TOTTERDELL, S.; GENDIVE, N.; VENZALA, E.; RAMIREZ, M.J.; DEL RIO, J.; TORDERA, R.M. Sustained stress-induced changes in mice as a model for chronic depression. **Psychopharmacology.** n.210, p.393-406, 2010.

ERICSSON, K. A.; KRAMPE, R. T.; TESH-RÒMER, C. The role of deliberate practice in the acquisition of expert performance. **Psychological Review.** n.100, p.363-405, 1998.

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

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.

FORKMAN, B.; BOISSY, A.; MEUNIER-SALAUN, M.-C.; CANALI, E.; JONE, R.B. A Critical Review Of Fear Tests Used On Cattle, Pigs, Sheep, Poultry And Horses. **Physiology & Behavior**. n.92, p.340-374, 2007.

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

GALLUP, G.G.; RAGER, D.R. Tonic immobility as a model of extreme states of behavioral inhibition. In: Kavaliers M, (ed). Motor activity and movement disorders. **Humana Press**, Totowa, p.57-80, 1996.

GARCIA, L.S.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; BARBOSA, L.M.; ANDREAZZA, A.C.; STERTZ, L.; FRIES, G.R.; GAVIOLI, E.C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. **Progress in Neuropsychopharmacology e Biological Psychiatry**. n.32, p.140-144, 2008.

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**. n.6, p.765-775, 2002.

GHANG-ZHANG, F.; WANG, W.; SHI, J.-Y.; XU, S.-X.; LI, X.-M.; JI, M.-H.; ZUO, Z.-Y.; ZHOU, Z.-Q.; YANG, J.-J. Inhibition of the L-arginine–nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. n.110, p.8–12, 2013.

GLEESON, S.; WEISSMAN, B.A.; SEGCEL, M.R.; BARRETT, J.E. Neurochemical effects of 5-HT₁ receptor ligands in pigeons. **European Journal of Pharmacology**, n.229, p.109-115, 1992.

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

GOULD, E.; GROSS, C.G. Neurogenesis in adult mammals: Some progress and problems. **The Journal of Neuroscience**. n.22, p.619-623, 2002.

GOULD, E.; TANAPAT, P. Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience**. n.80, p.427-36, 1997.

GOULD, E.; BEYLIN, A.; TANAPAT, P.; REEVES, A.; SHORS, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**. n.2, p.260-226, 1999a.

GOULD, E.; DANIELS, D.C.; CAMERON, H.A.; MCEWEN, B.S. Expression of adrenal steroid receptors by newly born cells and pyknotic cells in the dentate gyrus of the postnatal rat. **Molecular and Cellular Neuroscience**. n.3, p.44-44,

1992.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: **Handbook of anxiety**. n3, p.307-354, 1990. In Roth M, Burrows GD, Noyes R eds.

GRAEFF, F.G.; SCHOENFELD, R.I. Tryptaminergic mechanisms in punished and non punished behavior. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. N.173, p.277-283, 1970.

GRIEBEL, G.; BLANCHARD, C.; AGNES, R.S.; BLANCHARD, R.J. Differential modulation of antipredator defensive behavior in Swiss-Webster mice following acute or chronic administration of imipramine and fluoxetine. **Psychopharmacology**. n.120, p.57-66, 1995.

HAJSZAN, T.; MACLUSKY, N.J.; LERANTH, C. Short-term treatment with the antidepressant fluoxetine triggers pyramidal dendritic spine synapse formation in rat hippocampus. **European Journal Neuroscience**. n.21, p.1299-1303, 2005.

HASTING, N.B.; GOULD, E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. **Journal of Comparative Neurology**. n.413, p.146-154, 1999.

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.

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

HIROTA, K.; LAMBERT, D.J. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British Journal of Anaesthesia**. n.77, p.441-444, 1996.

HOHTOLA, E. Tonic Immobility and Shivering in Birds: Evolutionary Implications. **Physiology & Behavior**. p.475-480, 1981.

HOLLICK, K.A.; LEE, D.C.; HEN, R.; DULAWA, S.C. Behavioral Effects of Chronic Fluoxetine in BALB/cJ Mice Do Not Require Adult Hippocampal Neurogenesis or the Serotonin 1A Receptor. **Neuropsychopharmacology**. n.33, p.406-417, 2008.

HUANG, G.-J.; BANNERMAN, D.; FLINT, J. Chronic fluoxetine treatment alters behavior, but not adult hippocampal neurogenesis, in BALB/cJ mice. **Molecular Psychiatry**. n.13, p.119-121, 2008.

HUANG, G.-J.; HERBERT, J. Stimulation of neurogenesis in the hippocampus of the adult rat by fluoxetine requires rhythmic change in corticosterone. **Biological Psychiatry**. n.59, p.619-624, 2006.

INVERNIZZI, R.; BRAMANTE, M.; SAMANIN R. Role of 5-HT_{1A} receptors in the effects of acute and chronic fluoxetine on extracellular serotonin in the frontal cortex. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. n.54, p.143-147, 1996.

JACOBS, B.L.; AZMITIA, E.C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiology Review**. n.72, p.165-229, 1992.

JANSEN, K. Ketamine: Dreams and realities. Sarasota, FL: **Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies**. 2001.

JONES, R.B. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: A review. **World's Poultry Science Association**. n.42, p.82-96, 1987.

JONES, R.B. Fear and adaptability in poultry: insights, implications and imperatives **World's Poultry Science Association**. n.52, p.131-174, 1996.

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

KAMILOGLU, A.; ATALAN, G.; KAMILOGLU, N.N. Comparison of intraosseous and intramuscular drug administration for induction of anaesthesia in domestic pigeons. **Research in Veterinary Science**. n.85, p.171-175, 2008.

KEILHOFF, H.; BERNSTEIN, G.; BECKER, A.; GRECKSH, G.; WOLF, G. Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia. **Biology Psychiatry**. n.56, p.317-322, 2004.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.G. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. n.94, p. 10409–10414, 1997.

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

KITAYAMA, T; YONEYAMA, M; YONEDA, Y. Possible regulation by N-methyl-D-aspartate receptors of proliferative progenitor cells expressed in adult mouse hippocampal dentate gyrus. **Journal of Neurochemistry**, 2003, 84, 767–780.

KLEMM, W. R. Behavioral inhibition, In *Brainstem Mechanisms of Behavior*, p.497-533, ed. **W. R. Klemm and R. P. Vertes, Wiley & Sons**, Nova Iorque, 1990.

KLEMM, W.R. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("Animal hypnosis"). **Neuroscience Research**. n.4, p.165-212, 1971.

KOEK, W.; PATOISEAI, J.-F.; ASSIE, M.-B.; COSI, C.; KLEVEN, M.S.; DUPONT-PASSELAIGUE, E.; CARILLA-DURAND, E.; PALMIER, C.; VALENTIN, J.-P.; JOHN, G.; PAUWELS, P.J.; TARAYRE, J.-P.; COMPAERT,

F.C. F 11440, a Potent, Selective, High Efficacy 5-HT_{1A} Receptor Agonist with Marked Anxiolytic and Antidepressant Potential. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**. n.1, p.266-283, 1998.

KRAL, K. Behavioural-analytical studies of the role of head movements in depth perception in insects, birds and mammals. **Behavioural Processes**. n.64, p.1-12, 2003.

KOLICK, K.A.; LEE, D.C.; HEN, R.; DULAWA, S.C. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. **Neuropsychopharmacology**. n.33, p.406-417, 2008.

KOS, T.; POPIK, P.; PIETRASZEK, M.; SCHÄFER, D.; DANYSZ, W.; DRAVOLINA, O.; BLOKHINA, E.; GALANKIN, T.; BESPALOV, A.Y. Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. **European Neuropsychopharmacology**. n.16, p.291-310, 2006.

LANKENAU, S.E.; CLATTS, M.C. Ketamine Injection among High Risk Youth: Preliminary Findings from New York City. **Journal of Drug Issues**. N.32, p.893-905, 2002.

LEONE, C.M.; DE AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. Role of 5-hydroxytryptamine in amphetamine effects on punished and unpunished behavior. **Psychopharmacology**. n.80, p.78-82, 1983.

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.

MACLEAN, P.D. Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. **Psychosomatic Medicine**. n.11 (6), p.338-53, 1949..

MADSEN, T.M.; TRESCHOW, A.; BENGZON, J.; BOLWIG, T.G.; LINDVALL, O.; TINGSTRÖM, A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. **Biological Psychiatry**. n.47, p.1043-1049, 2000.

MAENG, S.; ZARATE, C.A.; DU, J.; SCHLOESSER, R.J.; MCCAMMON, J.; CHEN, G. Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. **Biology Psychiatry**. n.63, p.349-352, 2008.

MALAGIE', I.; TRILLAT, A.-C.; JACQUOT, C.; GARDIER, A.M. Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis. **European Journal of Pharmacology**. n.286, p.213-217, 1995.

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.

MANDELKER, L. A toxicity study of ketamine HC1 in parakeets. **Veterinary Medicine-Small Animal Clinician**. n.68, p.487-489, 1973.

MANSOUR, M.A.; MAHMOUD, A.A.; GEDDAWAY, M. Nonopioid versus opioid based general anesthesia technique for bariatric surgery: A randomized double-blind study. **Arábia Journal Anaesthesia**. n.7(4), p.387-91. 2013.

MAR, A; SPREEKMEESTER, E; ROCHFORD, J. Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. **Psychopharmacology**. n.150, p.52-60, 2000.

MASER, J.D.; GALLUP JR, G.G.; HICKS, L.E. Tonic immobility in chickens: possible involvement of monoamines. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. n.89, p.319-328, 1975.

MEHLHORN, J.; REHKÄMPER, G. Neurobiology of the homing pigeon - a review. **Naturwissenschaften**. n.96, p1011-1025, 2009.

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

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

MELLEU, F. F.; CENTURION-WENNINGER, C.F.; SOUZA, V.D.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Chronic fluoxetine failed to modify water and food intake, body weight and defensive behaviours in free-feeding pigeons (*Columba livia*) In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2011, Rio de Janeiro-RJ. Anais da XXVI **Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FeSBE**, 2011b.

MELLEU, F. F.; SOUZA, V.D.; PODOLAN, M.; SANTOS, J.; WALBER, T.; CENTURION-WENNINGER, C.F.; SANTOS, T. S.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. Adult hippocampal neurogenesis, defensive behavior and environmental enrichment in pigeons (*Columba livia*) In: 8th IBRO World Congress Of Neuroscience, 2011, Florença. **Annals of the 8th IBRO World Congress Of Neuroscience**, 2011a.

MEZADRI, T.J.; BATISTA, G.M.; PORTES, A.C.; MARINO-NETO, J.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**. n.195, p. 200-205, 2011.

MILLER, B.R.; HEN, R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. **Current Opinion in Neurobiology**. p.51-58, 2015.

MILLER, B.H.; SCHULTZ, L.E.; GULATI, A.; CAMERON, M.D.; PLETCHER, M.T. Genetic regulation of behavioral and neuronal responses to fluoxetine. **Neuropsychopharmacol.** n.33, p.1312-1322, 2008.

MILLS, A.D.; FAURE, J.M. Divergent Selection for Duration of Tonic Immobility and Social Reinstatement Behavior in Japanese Quail (*Coturnixcoturnix japonica*) Chicks. **Journal of Comparative Psychology.** n.105, p.25-38, 1991.

MITCHEL, P.J.; REDFERN, P.H. Acute and chronic antidepressant drug treatments induce opposite effects in the social behaviour of rats. **Journal of Psychopharmacology.** n.6(2), p.241-257, 1992.

MONASSI, C.R.; LEITE-PANISSI, C.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility. **Brain Research Bulletin.** n.50(3), p.201-208, 1999.

MONASSI, C.R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA L. Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors in the periaqueductal gray matter differentially modulate tonic immobility in guinea pig. **Brain Research.** n.1009(1-2), p.169-180, 2004.

MYCEK MJ, HARVEY RA, CHAMPE PC. Farmacologia ilustrada. 2^a ed. Porto Alegre, **Artmed**; 1998.

NACHER, J.; ALONSO-LLOSA, G.; ROSSEL, D.R.; MCEWEN, B.C. NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. **Neurobiology of Aging.** n.24, p.273-284, 2003.

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.

NASRALLAH, H.A.; HOPKINS, T.; PIXLEY, S.K. Differential effects of antipsychotic and antidepressant drugs on neurogenic regions in rats. **Brain Research.** n.1354, p.23-29, 2010.

NOTTHEBOM, F. Vocal tract and brain: a search for evolutionary bottlenecks. **Annals of the New York Academy of Sciences.** n.280, p.643-649, 1976.

NOTTHEBOM, F. Neuronal replacement in adulthood. **Annals of the New York Academy of Sciences.** n.457, p.143-161, 1985

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.

OHIRA, K.; MIYAKAWA, T. Chronic treatment with fluoxetine for more than 6 weeks decreases neurogenesis in the subventricular zone of adult mice. **Molecular Brain.** p.4-10, 2011.

OHIRA, K.; TAKEUCHI, R.; HIROTAKA, S.; MIYAKAWA, T. Fluoxetine-Induced

Cortical Adult Neurogenesis. **Neuropsychopharmacology**. n.38, p.909-920, 2013.

OLIVIER, B.; VAN OORSCHOT, R. 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. **European Journal of Pharmacology**. n.526, p.207-217, 2005.

OLSEN, C.K.; HOGG, S.; LAPIZ, M.D. Tonic immobility in guinea pigs: a behavioural response for detecting an anxiolytic-like effect? **Behavioral Pharmacology**. n.13, p.261-269, 2002.

PETRIK, D.; LAGACE, D.C.; EISCH, A.J. The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: Are we mistaking the scaffolding for the building? **Neuropharmacology**. n.62, p.21-34, 2012.

PIETERSEN, C.Y.; BOSKER, F.J.; POSTEMA, F.; FOKKEA, D.S.; KORF, J.K.; BOER, J.A.D. Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**. n.30, p.1209-1218, 2006.

POSSAMAI, F.; DOS SANTOS, J.; WALBER, T.; MARCON, J.C.; DOS SANTOS, T.S.; LINO-DE-OLIVEIRA, C. Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. n.58, p.15-21, 2015.

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.; GÜTÜRKÜN, 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.

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

REVEST, J.M.; DUPRET, D.; KOEHL, M.; FUNK-REITER, C.; GROSJEAN, N.; PIAZZA, P.V.; ABROUS, D.N. Adult neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors The role of neurogenesis in anxiety. **Molecular Psychiatry**. n.14, p.959-967, 2009.

RICHARD, S.; LAND, N.; SAINT-DIZIER, H.; LATERRIER, C.; FAURE, J.M. Human Handling And Presentation Of A Novel Object Evoke Independent Dimensions Of Fear In Japanese Quail. **Behavioural Processes**. n.85, p.18-23, 2010.

RODRIGUEZ, J.J.; MONTARON, M.F.; PETRY, K.G.; AUROUSSEAU, C.;

MARINELLI, M.; PREMIER, S.; ROUGON, G.; LE MOAL, M.; ABROUS, D.N. Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**. n.10, p.2994–3006, 1998.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. n.52, p.297-303, 1995.

SAH, A.; SCHMUCKERMAIR, C.; SARTORI, S.B.; GABURRO, S.; KANDASAMY, M.; IRSCHICK, R.; KLIMASCHEWSKI, L.; LANDGRAF, R.; AIGNER, L.; SINGEWLAD, N. Anxiety- rather than depression-like behavior is associated with adult neurogenesis in a female mouse model of higher trait anxiety- and comorbid depression-like behavior. **Translational Psychiatry**. v.2, 2012.

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

SAIRANEN, M.; O'LEARY, O. F.; KNUUTTILA, J. E.; CASTRÉN, E. Chronic Antidepressant Treatment Selectively Increases Expression Of Plasticity-Related Proteins In The Hippocampus And Medial Prefrontal Cortex Of The Rat. **Neuroscience**. n.144, p.368-374, 2006.

SALERNO, A.; VAN TIENHOVEN, A. The Effect Of Ketamine On Heart Rate, Respiration Rate And Eeg Of White Leghorn Hens. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.55, p.69-75, 1976.

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**. p.805-809, 2003.

SCOTT, B.W.; WOJTOWICZ, J.M., BURNHAM, W.M. Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. **Experimental Neurology**. n.165, p.231-236, 2000.

SERRETTI, A.; ARTIOLI, P. The pharmacogenomics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacogenomics Journal**. n.4(4), p.233-44, 2004.

SILVA, D.K.; ANDRADE, F.M. Pharmacogenetics of selective serotonin reuptake inhibitors: a review. **Revista Psiquiátrica do Rio Grande do Sul**. n.1, 2008

SILVESTRE, J.S.; NADAL, R.; PALLARES, M.; FERRÉ, N. Acute effects of ketamine in the holeboard, the elevated-plus maze, and the social interaction test in Wistar rats. **Depression and Anxiety**. n.5(1), p.29-33, 1997.

SPERRY, T.S.; THOMPSON, C.K.; WINGFIELD, J.C. Effects of Acute Treatment with 8-OH-DPAT and Fluoxetine on Aggressive Behaviour in Male

Song Sparrows (Melospizamelodiamorphna). **Journal of Neuroendocrinology**. p.150-160, 2003.

STEPHAN, C.; BUGNYAR, T. Pigeons integrate past knowledge across sensory modalities. **Animal Behavioral**. n.85, p.605-613, 2013.

THURMON, J.C. Preanesthetics and anesthetic adjuncts. In: LUMB & JONES. **Veterinary Anesthesia**. 3.ed. Baltimore: Willians& Wilkins, 1996. Cap. 8, p.183-209.

TOLEDO, C.A.B.; FERRARI, E.A.M. Habituation to sound stimulation in detelencephalated pigeons (*Columba livia*). **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. n.24, p.187-190, 1991.

VALENTINUZZI, V.S.; FERRARI, E.A.M. Habituation to sound during morning and night sessions in pigeons (*Columba livia*). **Physiology Behavior**. n.62, p.1203-1209,1997.

VAN PRAAG, H.; SCHINDER, A.F.; CHRISTIE, B.R.; TONI, N.; PALMER, T.D.; GAGE, F.H.; Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**. n.415, p.1030-1034, 2002.

VANDERHOFF, E.N.; EASON, P.K. The response of American robins (*Turdus migratorius*) to aerial alarms. **Behaviour**. n.146, p.415-427, 2009.

VIEIRA, E.B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; LEITE-PANISSI, C.R. Functional mapping of the periaqueductal gray matter involved in organizing tonic immobility behavior in guinea pigs. **Behavior Brain Research**. n.216, p.94-99, 2011.

WALLRAFF, H.G. Avian navigation: Pigeon homing as a paradigm. Berlin: **Springer Verlag**, 2005.

WALLNAU, L.B.; BORDASH, G.D.; CORSO JR, P. Tonic Immobility in Dometic Fowl: Possible Interaction of Serotonergic and Dopaminergic Mechanisms. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**. v.14, p.469-473, 1981.

WALTON, R.M. Postnatal Neurogenesis: Of Mice, Men, and Macaques. **Veterinary Pathology**. n.49(1), p.155-165, 2012.

WATANABE, S.; SAKAMOTO, J.; WAKITA, M. Pigeons' discrimination of paintings by Monet and Picasso. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**. n.639, p.165-174, 1995.

WEIL, A.; ROSEN, W.; Chocolate to morphine: Understanding mind-active drugs. **Boston: Houghton Mifflin Company**, 1983.

WENGER, G.R. Effects of Phencyclidine and Ketamine in Pigeons on Behavior Suppressed by Brief Electrical Shocks. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v.12, p.865-870, 1980.

WENGER, G. R. Effects of phencyclidine and ketamine on food maintained behavior in the pigeon. **Pharmacologist**. n.16, p.263, 1974.

WESTPHAL, W. P.; TANTI, A.; GIRAULT, V.; BRIZARD, B.; DEVERS, S.; LEGUISQUETI, A.M.; SURGETI, A.; BELZULG, C. Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**. n.23(9), p.797-811, 2013.

XIAN-CANG, M.; DANG, Y.-H.; JIA, M.; MA, R.; WANG, F.; WU, J.; GAO, C.-G.; HASHINOMOTO, K. Long-Lasting Antidepressant Action of Ketamine, but Not Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitor SB216763, in the Chronic Mild Stress Model of Mice. **PLoS One**. v.8, 2013.

ZARATE, C.A.JR.; SINGH, J.B.; CARSON, P.J.; BRUTSCHE, N.E.; AMELI, R.; LUCKENBAUGH, D.A.; CHARNEY, D.S.; MANJI, H.K. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives General Psychiatry**. n.63(8), p.856-64, 2006;

ZHANG, G.F.; ZHOU, Z.Q.; LIU, W.X.; QIU, L.L.; GUO, J.; WANG, X.M.; SUN, H.L.; YANG, J.J. Repeated ketamine administration redeems the time lag for citalopram's antidepressant-like effects. **European Psychiatry**, 2015.

ZHOU, L.; HUANG, K.X.; KECOJEVIC, A.; WELSH, A.M.; KOLIATSOS, V.E. Evidence that serotonin reuptake modulators increase the density of serotonin innervation in the forebrain. **Journal of Neurochemistry**. n.6, p.396-406, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

Tabela 1 (Anexo 1): Comportamentos durante as exposições (E1, E2 e E3) ao teste ADON no grupo CNT

Comportamento	Exposição	E1 (n=6)	E2 (n=6)	E3 (n=6)	Estadística
					Friedman ANOVA X (N = 6, df = 2); p
Espiar	Dur AD	285.04±116.98	313.53±105.63	218.91±86.45	1,33; 0,51
	Dur ON	247.04±109.25	380.00±73.00	466.27±107.93	2,33; 0,31
	Freq AD	20.16±5.12	16.66±4.21	20,66±4.78	2,33; 0,31
	Freq ON	17.16±5.20	24.33±3.09	22.16±2.46	2,33; 0,31
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	93.70±43.26	142.43±36.78	125.92±47.67	1,33; 0,51
	Dur ON	176.80±51.45	133.56±44.83	111.64±31.97	0,33; 0,84
	Freq AD	5.50±1.68	6.16±1.66	4.83±1.13	0.33; 0.84
	Freq ON	3.00±0.89	6.33±1.33 ^a	6.16±1.30 ^a	6.38; 0,04
Exploração do Assoalho	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0
Locomoção	Dur AD	3.97±2.41	15.45±7.02	10.99±4.18	4.00; 0.13
	Dur ON	12.86±3.99	31.40±16.45	38.08±17.56	3.00; 0.22
	Freq AD	3.33±2.15	5.33±1.78	4.00±1.46	2.33; 0.31
	Freq ON	7.00±2.26	7.50±2.91	7.33±1.49	0.60; 0.73
Repouso	Dur AD	45.05±29.28	0.00±0.00	0.00±0.00	4.00; 0.13
	Dur ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.33±0.21	0.00±0.00	0.00±0.00	4.00; 0.13
	Freq ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0
Imobilidade Alerta	Dur AD	52.96±52.29	92.34±92.34	45.68±45.68	2.00; 0.36
	Dur ON	132.17±77.48	60.42±58.49	1.97±1.32	3.90; 0.14
	Freq AD	1.16±1.16	0.50±0.50	0.33±0.33	2.00; 0.36
	Freq ON	1.33±0.42	0.50±0.34	0.33±0.21	4.62; 0.09

Tabela 2 (Anexo 1): Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas no grupo controle de FLX

Comportamento	Exposição	Teste	Reteste	Estatística Wilcoxon Matched Pairs Test p-value
		E2 (n=6)	E3 (n=6)	
Espiar	Dur AD	244.71±72.34	340.08±91.1	0.24
	Dur ON	157.85±90.72	356.56±98.29 ^C	0.04
	Freq AD	16.00±5.23	20.83±2.84	0.34
	Freq ON	13.16±4.13	21.33±4.76	0.75
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	125.85±41.90	69.45±30.40	0.46
	Dur ON	135.23±29.02	89.65±31.37 ^C	0.04
	Freq AD	5.16±1.49	4.50±1.28	0.85
	Freq ON	6.33±1.60	5.00±1.34	0.28
Exploração do Assoalho	Dur AD	0.65±0.44	9.96±9.96	0
	Dur ON	9.90±9.90	9.90±9.90	0
	Freq AD	0.33±0.21	1.50±1.50	0
	Freq ON	0.00±0.00	0.83±0.83	0
Locomoção	Dur AD	13.37±8.45	29.92±15.36 ^C	0.02
	Dur ON	21.84±13.97	55.97±26.51	0.28
	Freq AD	5.00±2.54	8.00±5.27	0.46
	Freq ON	3.16±1.81	10.50±5.51	0.10
Repouso	Dur AD	52.00±36.14	16.56±10.47	0
	Dur ON	165.15	61.49	0.17
	Freq AD	1.33±0.71	0.33±0.33	0
	Freq ON	3.66±1.30	0.66±0.66	0.17
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0

Tabela 3 (Anexo 1): Efeitos da reexposição ao ADON com os intervalos usados nos experimentos com as drogas antidepressivas no grupo controle de CET

Comportamento	Exposição	Teste	Reteste	Estatística Wilcoxon Matched Pairs Test p-value
		E2 (n=6)	E3 (n=6)	
Espiar	Dur AD	168.88±59.94	297.16±68.94	0.11
	Dur ON	144.89±55.17	177.88±65.47	0.31
	Freq AD	14.12±2.99	22.37±3.55 ^c	0.01
	Freq ON	11.62±4.21	14.87±4.26	0.39
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	550.53±102.11	329.71±93.05 ^c	0.04
	Dur ON	606.96±74.11	546.31±72.69	0.20
	Freq AD	13.50±2.01	12.12±2.20	0.73
	Freq ON	7.00±1.71	11.25±2.76	0.12
Exploração do Assoalho	Dur AD	1.42±1.42	1.33±0.65	0.65
	Dur ON	0.00±0.00	0.27±0.27	0
	Freq AD	0.37±0.37	0.75±0.36	0.65
	Freq ON	0.25±0.25	0.12±0.12	0
Locomoção	Dur AD	11.84±4.29	43.85±24.87 ^c	0.04
	Dur ON	12.25±5.89	18.01±7.49	0.06
	Freq AD	4.12±1.31	9.37±2.82 ^c	0.02
	Freq ON	3.62±1.70	5.25±1.66	0.06
Repouso	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	12.15±12.15	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.12±0.12	0.00±0.00	0

Tabela 4 (Anexo 1): Comportamentos no tratamento agudo ao teste ADON (E2) no grupos experimentais VEH, FLX 2,5 e FLX 10,0 tempos totais

Comportamento	Exposição	VEI (n=6)	FLX 2,5 (n=6)	FLX 10 (n=6)	Estatística Kruskal-Wallis: H (2, N=18)
Espiar	Dur AD	244.71±72.34	321.33±49.36	503.49±72.57 ^a	6.24; 0,04
	Dur ON	157.85±90.72	156.43±98.65 ^b	213.34±94.53 ^b	0.04; 0,97
	Freq AD	16.00±5.23	35.16±9.94	39.16±13.62	2.76; 0,25
	Freq ON	13.16±4.13	8.50±2.37 ^b	13.50±3.91	0.98; 0,61
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	125.85±41.90	88.79±29.26	29.17±20.48	4.55; 0,10
	Dur ON	135.23±29.02	201.57±27.56 ^b	162.20±30.67 ^b	3.00; 0,22
	Freq AD	5.16±1.49	7.16±2.24	3.50±1.82	1.62; 0,44
	Freq ON	6.33±1.60	3.83±1.51	7.33±2.12	2.80; 0,24
Exploração do Assoalho	Dur AD	0.64±0.44	1.51±1.00	2.20±1.15	0.65; 0,72
	Dur ON	9.90±9.90	0.00±0.00	0.00±0.00	2.00; 0,36
	Freq AD	0.33±0.21	0.50±0.34	0.83±0.40	0.88; 0,64
	Freq ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1,00
Locomoção	Dur AD	13.37±8.45	40.80±31.02	77.13±37.48	3.20; 0,20
	Dur ON	21.84±13.97	4.17±2.45	3.89±1.56 ^b	2.93; 0,23
	Freq AD	5.00±2.54	17.33±12.59	32.83±15.12	4.09; 0,12
	Freq ON	3.16±1.81	3.00±1.54	2.00±0.77 ^b	0.02; 0,98
Repouso	Dur AD	52.00±36.14	15.35±15.35	0.00±0.00	3.97; 0,13
	Dur ON	165.15±61.49	78.62±35.76	61.14±38.70	1.44; 0,48
	Freq AD	1.33±0.71	0.16±0.16	0.00±0.00	4.59; 0,10
	Freq ON	3.66±1.30	2.00±0.89	0.66±0.49	3.22; 0,19
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1,00
	Dur ON	0.00±0.00	50.70±35.61	11.89±11.03	2.46; 0,29
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1,00
	Freq ON	0.00±0.00	1.66±1.47	0.33±0.21	2.42; 0,29

Tabela 5 (Anexo 1): Comportamentos no tratamento crônico ao teste ADON (E3) no grupos experimentais VEI, FLX 2,5 e FLX 10,0 tempos totais

Comportamento	Exposição	VEI (n=6)	FLX 2,5 (n=6)	FLX 10 (n=6)	Estatística Kruskal-Wallis: H (2, N=18)
Espiar	Dur AD	340.08±91.1	496.64±74.63	470.66±103.51	1.06; 0.58
	Dur ON	356.56±98.29	487.32±64.20	307.65±79.34	3.02; 0.21
	Freq AD	20.83±2.84	25.66±2.61	30.50±4.83	2.56; 0.27
	Freq ON	21.33±4.76	24.50±5.27	22.00±4.15	0.008; 0.99
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	69.45±30.40	49.24±28.75	28.51±11.61	0.73; 0.69
	Dur ON	89.65±31.37	74.07±28.48	111.96±33.15 ^b	1.06; 0.58
	Freq AD	4.50±1.28	4.50±1.52	5.00±1.86	0.37; 0.82
	Freq ON	5.00±1.34	3.50±0.88	7.16±1.01	3.60; 0.16
Exploração do Assoalho	Dur AD	9.96±9.96	0.23±0.23	0.34±0.34	0.027; 0.98
	Dur ON	9.90±9.90	0.43±0.43	0.00±0.00	1.06; 0.58
	Freq AD	1.50±1.50	1.50±1.31	1.16±1.16	0.53; 0.76
	Freq ON	0.83±0.83	0.16±0.16	0.00±0.00	1.06; 0.58
Locomoção	Dur AD	29.92±15.36	32.80±13.23	25.48±10.43	0.92; 0.62
	Dur ON	55.97±26.51	35.44±16.36	12.54±4.18	1.26; 0.53
	Freq AD	8.00±5.27	13.33±4.12	11.50±4.72	2.40; 0.29
	Freq ON	10.50±5.61	14.50±6.12	6.50±1.64	1.79; 0.42
Repouso	Dur AD	16.56±10.47	28.99±28.99	0.00±0.00	2.02; 0.36
	Dur ON	0.00±0.00	9.44±9.44	41.32±26.16	2.52; 0.28
	Freq AD	0.33±0.33	1.16±1.16	0.00±0.00	1.06; 0.58
	Freq ON	0.66±0.66	0.50±0.50	0.83±0.65	0.51; 0.77
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1.00
	Dur ON	0.00±0.00	14.60±14.60	11.33±10.68	2.02; 0.36
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1.00
	Freq ON	0.00±0.00	0.16±0.16	0.33±0.21	2.26; 0.32

Tabela 6 (Anexo 1): Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX 2.5 mg/Kg

Comportamento	Exposição	Teste	Reteste	Estatística Wilcoxon Matched Pairs Test p-value
		E2 (n=6)	E3 (n=6)	
Espiar	Dur AD	321.33±49.36	496.64±74.63 ^c	0.02
	Dur ON	156.43±98.65	487.32±64.20 ^c	0.04
	Freq AD	35.16±9.94	25.66±2.61 ^c	0.02
	Freq ON	8.50±2.37	24.50±5.27 ^c	0.02
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	88.79±29.26	49.24±28.75	0.14
	Dur ON	201.57±27.56	74.07±28.48 ^c	0.04
	Freq AD	7.16±2.24	4.50±1.52	0.46
	Freq ON	3.83±1.51	3.50±0.88	0.78
Exploração do Assoalho	Dur AD	1.51±1.00	0.23±0.23	0
	Dur ON	0.00±0.00	0.43±0.43	0
	Freq AD	0.50±0.34	1.50±1.31	0
	Freq ON	0.00±0.00	0.16±0.16	0
Locomoção	Dur AD	40.80±31.00	32.80±13.23	0.75
	Dur ON	4.17±2.45	35.44±16.36 ^c	0.04
	Freq AD	17.33±12.59	13.33±4.12	0.34
	Freq ON	3.00±1.54	14.50±6.12 ^c	0.02
Repouso	Dur AD	15.35±15.35	28.99±28.99	0.22
	Dur ON	78.62±35.76	9.44±9.44 ^c	0.04
	Freq AD	0.16±0.16	1.16±1.16	0.34
	Freq ON	2.00±0.89	0.50±0.50	0.06
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	50.70±35.61	14.60±14.60	0.75
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	1.66±1.47	0.16±0.16	0.09

Tabela 7 (Anexo 1): Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da FLX 10 mg/Kg

Comportamento	Exposição	Teste	Reteste	Estatística Wilcoxon Matched Pairs Test p-value
		E2	E3	
Espiar	Dur AD	503.49±72.57	470.66±103.51	0.60
	Dur ON	213.34±94.53	307.65±79.34	1.00
	Freq AD	39.16±13.62	30.50±4.83	0.59
	Freq ON	13.50±3.91	22.00±4.15 ^C	0.02
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	29.17±20.48	28.51±11.61	1.00
	Dur ON	162.29±30.67	111.96±33.15	0.22
	Freq AD	3.50±1.82	5.00±1.86	0.71
	Freq ON	7.33±2.12	7.16±1.01	0.22
Exploração do Assoalho	Dur AD	2.03±1.15	0.34±0.34	0
	Dur ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.83±0.40	0.16±0.16	0
	Freq ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0
Locomoção	Dur AD	77.13±37.48	25.48±10.43 ^C	0.04
	Dur ON	3.89±1.56	12.54±4.18 ^C	0.02
	Freq AD	32.83±15.13	11.50±4.72	0.17
	Freq ON	2.00±0.77	6.50±1.64 ^C	0.04
Repouso	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	61.14±38.70	41.32±26.16	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
Imobilidade Alerta	Freq ON	0.66±0.49	0.83±0.65	0
	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	11.89±11.03	11.33±10.68	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.33±0.21	0.33±0.21	0.65

Tabela 8 (Anexo 1): Comportamentos no tratamento agudo ao teste ADON (E2) nos grupos experimentais VEH, CET 2,5 e CET 10,0, tempos totais

Comportamento	Exposição	VEI (n=8)	CET 2,5 (n=8)	CET 10 (n=7)	Estatística Kruskal-Wallis: H (2, N=18)
Espiar	Dur AD	297.16±68.94	264.18±84.27	270.26±69.11	0.23; 0.88
	Dur ON	177.59±65.47	47.34±15.30 ^b	136.33±32.91 ^b	3.75; 0.15
	Freq AD	22.37±3.55	14.25±3.15	21.28±6.81	1.61; 0.44
	Freq ON	14.87±4.26	6.75±1.78 ^b	11.57±2.95	2.45; 0.29
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	329.71±93.04	497.49±94.42	366.19±61.85	2.55; 0.27
	Dur ON	546.31±72.69	605.90±60.44	530.39±42.94 ^b	1.10; 0.57
	Freq AD	14.12±2.20	11.00±2.29	15.42±3.66	1.20; 0.54
	Freq ON	11.25±2.76	8.75±1.25	10.14±1.88	0.06; 0.96
Exploração do Assoalho	Dur AD	1.33±0.65	0.14±0.14	4.97±3.89	1.58; 0.45
	Dur ON	0.27±0.27	0.63±0.63	12.66±12.66	0.05; 0.97
	Freq AD	0.75±0.36	0.12±0.12	0.71±0.47	1.64; 0.43
	Freq ON	0.12±0.12	0.25±0.25	1.00±1.00	0.05; 0.97
Locomoção	Dur AD	43.85±24.87	5.23±1.65	8.83±2.72	2.61; 0.27
	Dur ON	18.01±7.49	1.75±0.79 ^a	5.42±3.68	6.63; 0.03
	Freq AD	9.37±2.82	2.87±0.89	3.71±1.04	3.33; 0.18
	Freq ON	5.25±1.66	1.00±0.37 ^{a,b}	2.42±1.32	6.29; 0.04
Repouso	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	57.40±51.25 ^a	4.77; 0.04
	Dur ON	0.00±0.00	28.50±20.78 ^{a,b}	35.29±23.32 ^a	2.47; 0.04
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	5.80±5.48	4.77; 0.09
	Freq ON	0.00±0.00	0.12±0.12	21.08±20.91	2.68; 0.26
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1.00
	Dur ON	12.15±12.15	6.45±4.65	6.62±5.36	0.36; 0.83
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1.00
	Freq ON	0.12±0.12	0.25±0.16	0.28±0.18	0.61; 0.73

Tabela 9 (Anexo 1): Efeitos do tratamento crônico nos comportamentos nos grupos VEH, CET 2,5 e CET 10,0 ao teste ADON (E3), tempos totais

Comportamento	Exposição	VEI (n=8)	CET 2,5 (n=8)	CET 10 (n=7)	Estatística Kruskal-Wallis H (2, N= 23)	
Espiar	Dur	AD	168.88±59.94	144.30±42.64	278.89±76.08	2.37; 0.30
		ON	144.89±55.17	72.42±18.80	96.12±19.07 ^b	1.10; 0.57
	Frq	AD	14.12±2.99	10.12±2.90	16.14±3.76	1.90; 0.38
		ON	11.62±4.21	7.00±1.11	9.85±1.59	2.61; 0.27
Movimento Angular de Cabeça	Dur	AD	550.53±102.11	609.88±76.81	398.86±85.47	2.90; 0.23
		ON	606.96±74.11	641.95±77.74	563.96±73.50	0.70; 0.70
	Frq	AD	11.50±2.01	9.75±1.53	11.42±2.97	1.93; 0.37
		ON	7.00±1.71	8,87±0.95	10,00±0,97	2.68; 0.26
Exploração do Assoalho	Dur	AD	1.42±1.42	5.36±5.36	21.55±10.68 ^a	3.10; 0.02
		ON	0,00±0,00	0.00±0.00	34.57±34.57 ^a	2.28; 0.04
	Frq	AD	00.37±0.37	1.50±1.50	3.14±1.60	2.51; 0.28
		ON	0.25±0.25	0.00±0.00	2.57±2.57	1.15; 0.56
Locomoção	Dur	AD	11.84±4.29	3.68±1.27	14.06±7.16	2.21; 0.33
		ON	12.25±5.89	5.26±1.13	9.05±4.83	0.44; 0.79
	Frq	AD	4.12±1.31	2.25±0.55	5.14±3.31	2.98; 0.22
		ON	3.62±1.70	1,75±0,16	3.42±1.83	0.27; 0.87
Repouso	Dur	AD	0.00±0.00	0.00±0.00	27.18±27.18	2.28; 0.31
		ON	0.00±0.00	0.00±0.00	43.22±43.22	2.28; 0.31
	Frq	AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.28±0.28	2.28; 0.31
		ON	0.00±0.00	0.00±0.00	0.57±0.57	2.28; 0.31
Imobilidade Alerta	Dur	AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1.00
		ON	0.00±0.00	1.46±1.46	5.44±5.44	1.15; 0.56
	Frq	AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00; 1.00
		ON	0.00±0.00	0.12±0.12	0.14±0.14	1.13; 0.56

Tabela 10 (Anexo 1): Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da CET 2,5 mg/Kg

Comportamento	Exposição	Teste	Reteste	Estatística Wilcoxon Matched Pairs Test p-value
		E2 (n=8)	E3 (n=8)	
Espiar	Dur AD	264.18±84.27	144.30±42.64	0.40
	Dur ON	47.34±15.30	72.42±18.80	0.12
	Freq AD	14.25±3.15	10.12±2.90 ^c	0.02
	Freq ON	6.75±1,78	7.00±1.11	0.34
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	497.49±97.42	609.88±76.81	0.48
	Dur ON	605.90±60.44	641.95±77.74	0.77
	Freq AD	11.00±2.29	9.75±1.53	0.40
	Freq ON	8.75±1.25	8.87±0.95	0.86
Exploração do Assoalho	Dur AD	0.14±±0.14	5.36±5.36	0
	Dur ON	0.63±0.63	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.12±0.12	1.50±1.50	0
	Freq ON	0.25±0.25	0.00±0.00	0
Locomoção	Dur AD	5.23±1.65	3.68±1.27	0.50
	Dur ON	1.75±0.79	5.29±1.13	0.12
	Freq AD	2.87±0.89	2.25±0.55	0.50
	Freq ON	1.00±0.37	1.75±0.16	0.28
Repouso	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	28.50±20.78	0.00±0.00	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.12±0.12	0.00±0.00	0.10
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.000	0.00±0.00	0
	Dur ON	6.45±4.65	1.46±1.46	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.25±0.16	0.12±0.12	0

Tabela 11 (Anexo 1): Comparação entre os efeitos agudos (E2) e crônicos (E3) da CET 10 mg/Kg

Comportamento	Exposição	Teste	Reteste	Estatística Wilcoxon Matched Pairs Test p-value
		E2 (n=8)	E3 (n=7)	
Espiar	Dur AD	270.26±69.11	278.89±76.08	0.73
	Dur ON	136.33±32.91	96.12±19.07	0.12
	Freq AD	21.28±6.81	16.14±3.76	0.11
	Freq ON	11.57±2.95	9.85±1.59	0.89
Movimento Angular de Cabeça	Dur AD	366.19±61.85	398.86±85.47	0.17
	Dur ON	530.39±42.94	563.96±73.50	0.86
	Freq AD	15.42±3.66	11.42±2.97	0.12
	Freq ON	10.14±1.88	10.00±0.97	0.89
Exploração do Assoalho	Dur AD	4.97±3.89	21.55±10.68	0.10
	Dur ON	12.66±12.66	34.57±34.57	0
	Freq AD	0.71±0.47	3.14±1.60	0.10
	Freq ON	1.00±1.00	2.57±2.57	0
Locomoção	Dur AD	8.83±2.71	14.60±7.16	0.22
	Dur ON	5.42±3.68	9.05±4.83	0.71
	Freq AD	3.71±1.04	5.14±2.31	0.13
	Freq ON	2.42±1.32	3.42±1.83	1.00
Repouso	Dur AD	57.40±51.25	27.18±27.18	0
	Dur ON	35.29±23.32	43.22±43.22	0
	Freq AD	5.80±5.48	0.28±0.28	0
	Freq ON	21.08±20.91	0.57±0.57	0
Imobilidade Alerta	Dur AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Dur ON	6.62±5.36	5.44±5.44	0
	Freq AD	0.00±0.00	0.00±0.00	0
	Freq ON	0.28±0.18	0.14±0.14	0