HUGO HENRIQUE HIRATA

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA NA IMUNORREATIVIDADE
DA PROTEÍNA ZENK EM DIFERENTES REGIÕES DO ENCÉFALO DE
POMBOS (*Columba livia*)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Fisiologia).

São Paulo
2008

HUGO HENRIQUE HIRATA

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO MAGNÉTICA NA IMUNORREATIVIDADE
DA PROTEÍNA ZENK EM DIFERENTES REGIÕES DO ENCÉFALO DE
POMBOS (*Columba livia*)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências (Fisiologia).

Área de Concentração: Fisiologia

***Orientador: Ronald Dennis Paul Clive
Kenneth Ranvaud***

São Paulo
2008

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Hugo Henrique Hirata.

Título da Dissertação: Efeito da estimulação magnética na imunorreatividade da proteína Zenk em diferentes regiões do encéfalo de pombos (*Columba livia*).

Orientador(a): Ronald Dennis Paul Kenneth Clive Ranvaud.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a 29 / 04 / 08

☒ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome: Claudio Antonio Barbosa de Toledo

Instituição: UNICID

Examinador(a):

Assinatura:

Nome: Luiz Roberto Giorgetti de Brito

Instituição: ICB - USP

Presidente:

Assinatura:

Nome: Ronald Dennis Paul K. Clive Ranvaud

Instituição: ICB - USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **74** nas fls. **48** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Ronald Dennis Paul Clive Kenneth Ranvaud** Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Efeito da estimulação magnética na imunorreatividade da proteína ZENK em diferentes regiões do encéfalo de pombos-correio"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Hugo Henrique Hirata e o pesquisador Luiz Roberto G de Britto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **31.08.2007**.

São Paulo, 03 de setembro de 2007.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

RESUMO

Hirata, HH Efeito da estimulação magnética na imunorreatividade da proteína ZENK em diferentes regiões do encéfalo de pombos (*Columba livia*) [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Um acúmulo de evidências sugere que animais vertebrados são capazes de detectar informações geomagnéticas, dentre eles, podemos citar os mais estudados, o caso clássico do pombo-correio (*Columba livia*). A descoberta de material biomagnético no epitélio do bico superior de pombos sugere a possibilidade de um mecanismo transdutor de campo magnético situado nessa região. Pelos resultados obtidos em outros contextos, a utilização de genes de resposta imediata (IEGs) combinada com tratamentos disruptivos e tarefas clássicas de orientação é tida como metodologia promissora para se conseguir uma descrição mais compreensiva dos canais sensoriais e dos mecanismos de processamento nervoso envolvidos no comportamento de orientação, entre os quais a putativa magnetorecepção. Pela atividade de IEGs, especificamente a expressão da proteína ZENK, avaliamos diferencialmente áreas cerebrais ativadas em pombos expostos ou não a uma estimulação magnética, 1h e 3h após a estimulação. A análise quantitativa (teste T) mostrou um aumento no número de neurônios ZENK positivos na região do córtex pré-piriforme de pombos estimulados ($p=0,051$) em relação aos controles, não havendo diferença entre os grupos de 1h e 3h (ANOVA, uma via). Esses neurônios estão relacionados ao sistema olfativo, o que reforça a idéia de que esse sistema seja importante no comportamento de orientação mas ao mesmo tempo apresenta a primeira evidência experimental de um possível envolvimento da via olfatória na magnetorecepção. Esse resultado indica que é necessário tomar o maior cuidado na interpretação de experimentos comportamentais inibindo a via olfativa, pois, além de causar anosmia, essas manipulações poderiam também lesar mecanismos magnetoreceptivos.

Palavras-chave: *Columba livia*. ZENK. Magnetorecepção. Gene de expressão imediata.

ABSTRACT

Hirata, HH Effect of magnetic stimulation on ZENK-immunoreactivity in different regions of the pigeon (*Columba livia*) brain [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Much evidence suggests that vertebrate animals are capable of detecting geomagnetic information, among them, we can cite the best studied classic example of homing pigeon (*Columba livia*). The discovery of biomagnetic material in the pigeon upper beak suggest the possibility of a magnetoreceptor transduction mechanism situated in this area. Because of the results obtained in other contexts, the use of Immediate Early Genes (IEGs), combined with disruptive treatments and classic orientation tasks is a promising tool towards a more accurate description of sensory channels and of neural processing mechanisms involved in orientation behaviour, particularly the putative magnetoreception mechanism. Using IEG activity, specifically, the ZENK-immunoreactivity protein, we studied different pigeon brain areas activated after magnetic stimulation, compared to no stimulation, at two periods of latency after the end of the experimental session (1h and 3h). Quantitative analysis (T test) showed an increase in labeling in the prepiriform cortex (CPP) of stimulated pigeons in relation to controls ($p=0,051$), but no difference between 1h and 3h groups (one-way ANOVA). These neurons are related to the olfactory system, reinforcing the idea that this system is important for orientation, but at the same time presents the first experimental evidence of a possible participation of olfactory pathways in magnetoreception. This result indicates that it is important to take utmost care in interpreting results of behavioural experiments in which olfaction is inhibited, since such manipulations may not only cause anosmia, but also loss of magnetic sensitivity.

Key words: *Columba livia*. ZENK. Magnetoreception. Immediate early genes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 A magnetocepção.....	14
1.2 Genes de resposta imediata.....	17
1.3 Justificativa.....	18
2 OBJETIVO.....	20
2.1 Objetivo específico.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 Animais.....	21
3.2 Período de adaptação.....	22
3.3 Estudo de timing.....	22
3.4 Precauções tomadas.....	22
3.5 Estímulo magnético.....	23
3.6 Descrição da bobina.....	23
3.7 Processamento do tecido.....	25
3.8 Imunohistoquímica.....	26
3.9 Análise de dados.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Uma visão geral.....	28
4.2 Bulbo olfatório e córtex pré-piriforme.....	30
5 DISCUSSÃO.....	35
5.1 Uma visão geral.....	35
5.2 Bulbo olfatório e córtex pré-piriforme.....	35
5.3 Considerações gerais.....	37
6 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Um dos fenômenos mais intrigantes do comportamento animal é a capacidade inerente de explorar o ambiente e nele localizar-se de forma a retornar a uma toca pelo caminho mais curto [1], ou a itens de alimento anteriormente escondidos em diversos locais de seu território. Tais movimentos são levados ao extremo quando consideramos certas migrações, nas quais a capacidade de navegação de muitos vertebrados, sobretudo aves, peixes e mamíferos marinhos, são verdadeiramente globais [3].

Fenômeno distinto é mostrado por muitas espécies, que possuem extraordinárias capacidades de retornar ao seu ambiente de origem não apenas depois de deslocamentos exploratórios espontâneos, ou em deslocamentos periódicos e espacialmente estereotipados como nas migrações, mas também quando deslocados passivamente por algum experimentador a centenas ou mesmo milhares de quilômetros [4] e nas mais diversas e arbitrárias direções em qualquer época do ano. Conhecido em inglês como “*homing*”, literalmente “retorno ao lar”, tal comportamento demonstra de maneira claríssima quão versátil e poderosa é a capacidade de navegação destes animais. O exemplo clássico desse é o caso dos pombos-correio, cepa do pombo comum, *Columba lívia*, selecionada pelo homem por essa capacidade. O fato de ter sido possível selecionar tal cepa, em uma espécie não migratória, de áreas abertas (penhascos), em que a orientação visual é eficaz, sugere que exista um potencial muito grande de orientação e navegação em grande parte do reino animal.

O pombo-correio é um animal doméstico cujos ancestrais são de origem mediterrânea. Há mais de 4000 anos foram domesticados pelos egípcios com o intuito de se levar mensagens mais rapidamente dos mais remotos lugares, artifício obtido sob paciente seleção artificial [5, 6]. Apesar desta tradição muito antiga, somente a partir do final do século XIX essa notável capacidade de orientação, tornou-se uma preocupação científica [7]. Hoje, em pleno século XXI, as perguntas mais básicas (e relevantes!) quanto às informações sensoriais usadas pelos animais para determinar sua posição, e para a manutenção de sua rota, ainda não foram esclarecidas de forma satisfatória [7]. A conhecida habilidade de voltar para casa a partir de lugares distantes e desconhecidos

levanta questões a respeito de quais informações sensoriais são utilizadas pelo pombo para conseguir definir e manter uma rota [8]. Os primeiros conceitos modernos vieram dos estudos de Yeagley (1947) [9], que sugeriu o envolvimento da força de Coriolis e parâmetros geomagnéticos; de Mathews (1953)¹ apud Wallraff, 2005 [10], com uma hipótese da navegação solar, pelo qual os pombos teriam algum tipo de sextante; e de Kramer (1952)² apud Wallraff, 2005 [10], com um modelo de dois componentes, uma bússola e um mapa. Estes trabalhos pioneiros estimularam numerosos outros e levaram a um período de intensa pesquisa e à formação de um grupo de interesse abrigado pelo consagrado Royal Institute of Navigation [11]. Interessante notar que a palavra navegação remete ao localizar-se e estabelecer uma rota segura e eficiente para seres humanos em alto mar. É famosa a preocupação dos antigos navegantes, com o “Problema da Longitude”, que aponta à dificuldade de se determinar posição na superfície da Terra no sentido leste-oeste. A determinação da outra coordenada, a latitude (deslocamento no eixo norte-sul), é relativamente fácil, a partir de observações astronômicas: ela corresponde ao maior ângulo de elevação do sol no dia (corrigindo para época do ano) ou ao ângulo entre a estrela polar e o horizonte. O Problema da Longitude teve grande importância histórica [12], e foi resolvido com o trabalhoso desenvolvimento de relógios suficientemente precisos ao longo do século XVIII (erro de pouco mais de dois segundos por mês, um feito extraordinário pela tecnologia da época). Não é, portanto, surpreendente como a capacidade de navegação de animais apresente tamanho fascínio para nós.

Inúmeros estudos propuseram os mais diferentes mecanismos sensoriais para explicar como animais se orientam, dentre eles: a utilização de campos magnéticos [7, 13-15], distribuição de odores característicos na atmosfera [16-18], uso de referências visuais como relevo e estradas [19, 20], e infra-sons [21]. Porém, um grande empecilho emergente é a grande dificuldade que se tem em formular um modelo integrado de navegação e orientação. Até o momento, todas as tentativas de explicar o fenômeno através de somente um ou dois fatores não foram bem sucedidos [7]. Tampouco, não foi bem sucedida qualquer das tentativas de integração dos mecanismos demonstrados experimentalmente. Isso tem gerado um debate muito acalorado, que ultimamente repercutiu na lista de

1 Mathews G.V.T. Sun navigation in homing pigeons. *J. Exp. Biol.* 1953; 30:243-267.

2 Kramer, G. Die Sonnenorientierung der Vogel. *Verh. Dtsch Zool. Ges.* 1952, 77-84.

discussão internacional sobre orientação e navegação animal, administrado pelo Royal Institute of Navigation [11], reacendendo as dúvidas e controvérsias entre as duas polaridades dominantes, os que defendem o papel insubstituível de pistas olfativas e aqueles que defendem a importância das magnéticas.

Estudo pioneiro de Yeagley (1947) [9] relatou que barras magnéticas coladas na cabeça de pombos prejudicavam a tomada de um rumo de saída. No entanto, replicações posteriores (por outros pesquisadores e até mesmo pelo próprio Yeagley³, 1951 apud Keeton, 1971 [13]), não confirmaram esses achados iniciais.

Adicionalmente, o estudo de pássaros ingênuos tem trazido à luz alguns fatos interessantes. Verificou-se que a experiência é capaz de modificar a estratégia seguida pelos pombos jovens [22]. Keeton e Godebert (1970) [23] foram os primeiros a perceberem que a orientação de pombos muito jovens e ingênuos difere dos mais velhos e experientes. Wiltschko (1983) [24] vai além, sugere que a orientação nos primeiros vôos é limitada aos mecanismos inatos do animal, baseados sobretudo no campo geomagnético, e que, conforme esse ganha experiência, começa a aprender a utilizar mais informações, passando gradualmente a utilizar estratégias mais redundantes, sofisticadas e confiáveis, tornando-se aos poucos um adulto experiente.

Wiltschko (1983) [24] propõe que a bússola magnética é a fonte de informação relevante para os jovens inexperientes, já que, a simples percepção do campo magnético e do curso das linhas do campo seriam suficientes para a ave distinguir direções (e.g. “norte e sul”). Para tanto, não seria necessário aprendizado (seria como distinguir a posição “cima-baixo”, sendo o animal o ponto referencial), diferentemente da bússola solar. Para o uso da bússola solar, o pombo deve observar o movimento do sol a cada dia, associando a posição do sol a cada momento do dia com a hora, pelo relógio circadiano. Isso é evidenciado pelo fato de que os pombos se adaptam às condições astronômicas do local em que são criados, seja no hemisfério norte ou no hemisfério sul, e, portanto, não podem se basear em qualquer mecanismo inato, pois o sol se desloca em direções opostas nos dois hemisférios. A memória também é necessária, pois, no local de soltura, o animal deve associar a posição do sol a um azimuth, conforme aprendido anteriormente na região do pombal.

³ Yeagley, H. L., J Appl Phys, 1951, 22, 746.

Experimentos em dias nublados (com o céu completamente encoberto, com iluminação homogênea, e, portanto, sem qualquer pista visual sobre a posição do sol), indicaram que pombos experientes carregando pequenas barras magnéticas tomavam rumos aleatórios [25], mas com o sol visível, os magnetos tinham um efeito mínimo. Por outro lado, pombos ingênuos, mesmo na presença do sol, não tomavam a direção de casa [13], sugerindo que a informação magnética seria usada durante a ausência da informação solar pelos adultos, mas os jovens precisariam de ambas informações, solar e magnética, sem distorções.

Vários dos resultados acima não foram reproduzidos por outros autores, caracterizando uma grande variabilidade no comportamento dos pombos, e/ou a presença de fatores importantes desconhecidos e não controlados. Não é surpreendente que seja difícil investigar um fenômeno tão complexo, com inúmeros parâmetros ambientais que podem afetar os resultados de um experimento. Os mais coerentes resultados na orientação de pombos (e de muitos outros animais), confirmados por todos os autores que aplicaram a técnica, foram obtidos em experimentos que alteraram o relógio interno dos animais [26, 27]. Conforme o mecanismo descrito acima, uma defasagem do relógio biológico dos pombos, mantendo-os em local fechado, com iluminação artificial, defasada em relação ao ciclo claro-escuro natural para a região, deveria causar um viés na orientação inicial dos pombos.

Com base no mecanismo de bússola solar, tal viés pode ser previsto quantitativamente com grande facilidade, pois quando liberado, o pombo lê a posição do sol como aquela que seria apropriada ao horário de seu relógio circadiano, e não como a posição apropriada para a hora do dia real. Assim, o adiantamento (atraso) de 6h no ciclo-claro-escuro artificial em relação ao dia natural da região, leva a um desvio de 90° no sentido anti-horário (horário, respectivamente), em relação à rota dos controles – no hemisfério norte.

Para se entender isso, basta pensar que, se liberados ao meio dia, os pombos cujos relógios biológicos foram adiantados considerarão que o sol aponta ao oeste (azimute apropriado para as 18h00), mas no hemisfério norte o sol estaria de fato no sul, portanto o mapa dos pombos seria orientado com o oeste voltado para o sul geográfico, ou seja, uma rotação de 90 graus para esquerda (sentido anti-horário, olhando-se de cima para baixo). Caso o experimento fosse realizado no hemisfério sul, o viés seria, claramente, invertido (à direita, sentido

horário, olhando-se de cima para baixo). O viés associado à defasagem do relógio biológico dos pombos apenas aparece na presença do sol, demonstrando a importância do sol na orientação dos pombos. Na ausência do sol, pombos com relógio interno alterado, tomam o mesmo rumo que controles (pombos com relógio interno intacto), evidenciando a presença de algum outro mecanismo de orientação independente do relógio biológico e da posição do sol [28].

Keeton (1969) [28] sugere que haja redundância nas pistas utilizadas na orientação de pombos, e que, portanto, seja difícil excluir a participação de dada pista, pois ela pode ser substituída por outra, redundante. Desta forma seria essencial eliminar todas as pistas que participam de algum mecanismo de orientação para se inibir a capacidade de orientação.

1.1 A magnetocepção

Conjuntos de cristais de magnetita superparamagnética foram recentemente identificadas nas terminações nervosas livres do ramo oftálmico na base do bico superior de pombos-correio [29-31] e conseqüentemente, interpretados como sendo parte de um putativo sistema magnetoreceptor. Anteriormente várias publicações apontaram à presença de diferentes formas de cristais biossintetizados com propriedades magnéticas que poderiam, em princípio, mediar a transdução do campo geomagnético (para uma revisão das evidências da sensibilidade de pombos a campos magnéticos no contexto do comportamento de orientação, veja-se [15]). Um exemplo clássico de cristais de óxidos de ferro magnéticos biossintetizados é o caso das bactérias de pântanos, que inspirou a elaboração de modelos teóricos de magnetoreceptores, em outras espécies. Blakemore (1975) [32] constatou a presença de monodomínios de magnetita, alinhados em forma de corrente, que atuam como ímãs e tem a propriedade de alinhar a bactéria ao longo das linhas de campo geomagnético local, orientando seu deslocamento de maneira adaptativa, na direção do fundo do pântano.

Cristais de magnetita podem participar da transdução da informação geomagnética para o Sistema Nervoso de diversas formas. Poderiam agir, através do torque, ou pressão, sobre receptores secundários (p.e. mecanoreceptores), na

tendência ao alinhamento com o campo geomagnético, como a agulha de uma bússola. Alternativamente, poderiam agir através da abertura de canais iônicos, devido a rotação dos cristais de magnetita [33]. A presença dessas partículas acoplada nas terminações do ramo oftálmico (V1) do nervo trigêmeo fomentaram estudos posteriores [2].

Mora et al. (2004) [2] relatam ter condicionado pombos experientes a discriminar uma situação com a presença de um campo magnético, produzido pelo experimentador, de uma situação de controle, em que o campo anômalo era ausente, e mostraram que a magnetocepção era mediada pelo ramo oftálmico (V1) do nervo trigêmeo. A resposta condicionada ao estímulo magnético tornou-se prejudicada tanto pela secção bilateral do ramo oftálmico, como pela anestesia local e a aplicação de magnetos na região do bico superior, enquanto que a secção do nervo olfatório não levou a prejuízo algum (Fig.1). Esse resultado complementa um estudo eletrofisiológico no gânglio trigeminal e seu ramo no nervo oftálmico [34], em que se verificou o registro de atividade eletrofisiológica em *Dolichonyx oryzivorus* (*Icteridae*, conhecido como triste-pia, ou *bobolink*, em inglês) frente a pequenas variações magnéticas (da ordem de 0,5% do campo terrestre total).

Assim, a validade dos trabalhos clássicos que demonstravam prejuízo na orientação ao inibir o sistema olfativo (lavagem da mucosa olfativa com ZnSO₄ (7%), anestesia local, tampões nasais etc., ver [35]), foi questionada [2], uma vez que poderiam ter alterado as terminações trigeminais e a percepção de campos magnéticos, e não apenas ter tornado os pombos anósmicos.

Em resposta a esse trabalho, Gagliardo et al. [36] demonstraram que esta objeção não procede, mostrando que o ramo oftálmico não é necessário para garantir o retorno ao lar em pombos ingênuos, mas o nervo olfatório, sim. (Fig. 1).

Fig. 1: Representação do nervo trigêmeo, nervo oftálmico e nervo olfatório (FONTE: Mora. et al. [2]; 2004).

Estudos eletrofisiológicos [37] também verificaram que no hipocampo de pombos, neurônios (3 em 7) de disparo rápido (>17 potenciais de ação/s) apresentavam claramente um aumento fásico no disparo durante pelo menos uma das transições dos campos magnéticos usados, enquanto que nenhum dos 37 neurônios de disparo lento (<14 potenciais de ação/s) testados mostrou alguma mudança.

Respostas eletrofisiológicas a campos magnéticos também foram detectadas em regiões encefálicas de aves relacionadas ao sistema visual (Beason, Semm, 1994⁴ apud Johnsen e Lohmann, 2005 [33]). Semm e Demaine [38], relataram que o núcleo da raiz óptica basal (nBOR) de pombos e o teto óptico (estrato griseo) incluem neurônios que respondem a mudanças direcionais do campo magnético local quando o animal se encontra iluminado, tendo uma atividade de resposta máxima com iluminação nos comprimentos de onda 503 nm e 582 nm. Esses resultados apontariam para a existência de um mecanismo magnetocetivo mediado pela visão [39].

De forma complementar, o estudo realizado por Quentmeier (1990) em seu mestrado [40] verificou alterações na frequência cardíaca e respiratória em pombos estimulados magneticamente, e no entanto, é mais um trabalho que não foi reproduzido nem no laboratório em que a própria Quentmeier trabalhou, e nem em tentativas do nosso próprio laboratório aqui em São Paulo.

⁴ Beason, RC, Semm, P. In: Biological Effects of Electric and Magnetic Fields Vol. 1 (ed. Carpenter, D.O.) 241-260 (Academic, New York, USA, 1994)

1.2 Genes de resposta imediata

A utilização de genes de resposta imediata (*“immediate early genes”* ou “IEGs”) é uma ferramenta experimental moderna muito útil na identificação diferencial de áreas encefálicas ativadas por determinada estimulação, ou pela execução de dado comportamento ou por ocasião de um evento cognitivo específico [41]. É surpreendente seu pouco uso para obtenção de uma melhor compreensão das bases neurais envolvidas na orientação e navegação de pombos.

IEGs são, em geral, genes que se expressam rapidamente e temporariamente em resposta a uma estimulação despolarizante [42-44], tendo seu m-RNA um pico de expressão em cerca de 30 minutos, e sua proteína em 1-2 horas [45]. Uma vez ligado ao promotor do gene-alvo, eles participam na regulação de sua expressão através de processos ainda não muito bem esclarecidos, responsáveis pelos efeitos a longo prazo, como crescimento celular e diferenciação [43], desencadeando uma segunda onda de expressão gênica.

Outras das funções biológicas preconizadas como importantes de suas proteínas são a de estar relacionadas com os mecanismos de manutenção ou estabilização da plasticidade neuronal e formação de novas memórias [46]. Especula-se que a indução do ZENK⁵ seja um dos eventos iniciais na cascata de regulação genética ligada à ativação neuronal e a alterações sinápticas [43, 47].

Nemec, Burda e Oelschlager, 2005 [48] propõem a utilização de IEG, combinada com tratamentos disruptivos e tarefas clássicas de orientação para se conseguir uma descrição mais abrangente das redes neurais envolvidas nesse comportamento. Ainda há poucos relatos na literatura abordando orientação e navegação através da aplicação destes recursos modernos de biologia molecular.

Estudo pioneiro em toupeiras, mostrou através do fator de transcrição do c-fos (um outro tipo de IEG), a existência de neurônios no colículo superior que são ativados devido a mudanças na polaridade do campo magnético [49]. E o mais interessante, a frequência de mudança da polaridade, levou a uma diminuição da intensidade da imunorreatividade, porém com uma maior área ativada, fato esse inesperado e ainda sem explicação.

⁵ Aqui usaremos a grafia ZENK para designar o produto de expressão (a proteína) do IEG zenk.

Recentemente, Mouritsen et al. (2005) [50], utilizando a expressão de ZENK, verificaram uma região adjacente à via visual, chamada de Cluster N, em aves migratórias noturnas (*Sylvia borin* e *Erithacus rubecula*) ativada somente à noite, fato não visto em aves não-migratórias. Os autores sugerem que essa região possa estar envolvida na integração da informação magnética mediado pela visão.

Shimizu et al. [51] utilizaram essa técnica, especificamente o produto da proteína do IEG ZENK (acrônimo de Zif-268, Egr-1, NGFI-A, e Krox-24), para investigar regiões encefálicas envolvidas no sobrevôo de território familiar por pombos-correio experientes enquanto retornavam ao pombal. Verificaram que a formação hipocampal lateral e a porção medial do estriato médio exibiam um significativo aumento de células ZENK-positivas em relação aos controles que não realizaram a tarefa; e não observaram diferenças no hipocampo medial, estriato lateral (controle motor), subdivisões do Wulst e córtex piriforme (que tem função olfativa). Estes resultados sugerem a participação daquelas 2 regiões no retorno ao lar, para aquela situação específica.

Utilizamos esse indicador diferencial de ativação neuronal no estudo de áreas encefálicas de pombos sob estimulação magnética, já que essa informação pode esclarecer de forma inédita a participação de áreas encefálicas envolvidas na magnetoccepção.

1.3 Justificativa

A aplicação de técnicas de biologia molecular promete abrir caminhos para a compreensão do comportamento de orientação e de navegação de pombos-correios. Até o momento essas técnicas têm sido pouco usadas nesses estudos, em que foram privilegiadas técnicas comportamentais. Há uma controvérsia de muitos anos ao redor da importância relativa de pistas ambientais olfativas e geomagnéticas. Com essas técnicas modernas, deveria ser possível esclarecer a importância relativa desses diferentes canais sensoriais na orientação de pombos-correio, ou mostrar que há alguma associação entre os dois canais sensoriais. Se isso for demonstrado, seriam reforçadas as atuais conjecturas relativas a possíveis interpretações alternativas dos experimentos que mostraram extraordinários

prejuízos na orientação pombos tornados anósmicos, sobretudo quando houver lesões amplas.

2 OBJETIVO GERAL

Identificar no laboratório áreas do sistema nervoso central de pombos correios ativadas por estímulos supostamente importantes no comportamento de orientação (a exemplo de estímulos magnéticos), para poder, em seguida, determinar se essas áreas são também ativadas quando o animal executa um voo de retorno ao pombal de uma localidade desconhecida, assim reforçando (ou negando) a participação da modalidade sensorial na execução da tarefa de orientação e de voo de retorno.

2.1 Objetivo específico

Focar a possibilidade de interação de magnetorecepção e olfação, identificando a expressão alterada de ZENK em áreas corticais com implicações olfativas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos 16 pombos de linhagem inespecífica (*Columba livia*) de ambos os sexos, pesando entre 280-350g no início dos experimentos, adquiridos de um fornecedor local. Os animais tinham acesso à comida e água *ad libitum*, e foram mantidos em um fotoperíodo de 12h/12h claro e escuro, início do claro às 6h00, em local fechado e com temperatura controlada (21°C). Os experimentos se deram no período de Agosto a Novembro entre 11h00 e 16h00 (fase clara do ciclo). Os pombos foram divididos em 4 grupos experimentais, definidos pelo tratamento recebido e intervalo de tempo entre o fim do tratamento e a perfusão realizada para iniciar o protocolo de medida da imunorreatividade da proteína ZENK (ZENK-ir).

a-) Pombos (n=4) que receberam estímulo magnético por 1h e que foram perfundidos 1h após o término da sessão (M1),

b-) Pombos (n=4) que receberam estímulo magnético por 1h e que foram perfundidos 3h após o término da sessão (M3),

c-) Pombos (n=4) que somente permaneceram em uma caixa semelhante à situação dos outros, mas sem receber estímulo, por 1h e que foram perfundidos 1h após o término da sessão (C1) e

d-) Pombos (n=4) que somente permaneceram na mesma caixa sem receber estímulo por 1h e que foram perfundidos 3h após o término da sessão (C3)

O protocolo adotado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) em 03.09.2007 (Protocolo registrado sob nº 74 nas fls. 48 do livro 2).

As etapas do protocolo são descritas a seguir.

3.2 Período de adaptação

Os pombos foram imobilizados fisicamente, um a um, no biotério e transportados dentro de uma caixa fechada até a sala de experimentação, onde foram colocados, individualmente, dentro de uma caixa acusticamente blindada, e lá permaneciam por pelo menos 2h por dia, mas sem aplicação de estímulos magnéticos. Manobra esta, repetida por um período mínimo de 1 semana. O propósito dessa manobra era de habituar os pombos ao estresse da manipulação que sofreriam no dia do experimento final, com estimulação magnética.

3.3 Estudo de timing

Verificamos se a ZENK-ir variava em função de diferentes tempos pós-estímulo, uma vez que não há relatos sobre esse tipo de informação sensória. Estipulamos 2 períodos: 1h (período de pico de ZENK-ir descrito em outras situações) e 3h após o fim da sessão.

3.4 Precauções adotadas

Na tentativa de se minimizar imunorreatividade inespecífica, foram tomadas as seguintes precauções:

1. Evitou-se realizar o experimento nos dias agendados para faxina tanto no laboratório, quanto no biotério de pombos, readequando para o dia posterior.
2. O mesmo experimentador foi responsável pela manipulação dos animais, sendo evitado também o uso de perfumes ou outras substâncias, por exemplo, produtos de limpeza, para não causar estimulação olfativa variada.
3. O início da sessão (entrada do animal na caixa) se deu por volta das 11h00, finalizando às 13h00 para o grupo 1h, e às 16h00 para o grupo 3h. Essa precaução tinha por objetivo diminuir efeitos de oscilações circadianas nas mais diversas funções fisiológicas.

3.5 Estímulo magnético

No dia do experimento, cada animal passou pelo mesmo procedimento realizado no período de adaptação. Os grupos magnético1 (M1) e 3 (M3) receberam o estímulo magnético por 1h, enquanto que seus respectivos controles somente tiveram a experiência de permanecer pelo mesmo período em uma, caixa igual, dentro da mesma cabine isolada acusticamente. Por meio de um par de bobinas de Helmholtz, acopladas à caixa acusticamente blindada, estimulamos o animal por 1h, através de variações aleatórias tanto na direção do vetor quanto na intensidade do campo total descritas a seguir.

3.6 Descrição da bobina

O campo magnético foi aplicado com um par de bobinas de Helmholtz (Fig. 2) (para garantir o maior volume possível de campo magnético homogêneo na região da cabeça do pombo), com o eixo perpendicular, ao campo magnético da Terra, no plano horizontal. O par de bobinas tinha uma separação (e, portanto também raio, sendo essa a condição imposta por Helmholtz) de 182 mm.

Fig. 2 - Bobina de Helmholtz. (a) vista superior (sem tampa), (b) vista lateral e (c) vista frontal (com tampa)

No laboratório, o pombo foi mantido por uma hora estacionário, dentro de uma caixa colocada em uma sala acusticamente isolada, com a região da cabeça dentro da esfera de homogeneidade do campo magnético aplicado pelas bobinas de Helmholtz. Aplicou-se um campo magnético variado no tempo, que simulou uma situação de vôo em que, dando guinadas, o pombo variaria seu alinhamento com o campo magnético da Terra. Havia variações concomitantes do valor total do campo magnético total em que o pombos se encontrava, nunca superiores a 40%.

Alterando, manualmente, a corrente na bobina, produziu-se um campo magnético total (campo da bobina mais campo geomagnético -corrente nula na bobina), orientado a noventa graus à esquerda do norte magnético. Para determinar a amplitude da corrente que deveria passar pelas bobinas, foi utilizada uma bússola.

Primeiro determinou-se a direção do campo magnético terrestre, e o gerado pelas bobinas foi alinhando a noventa graus, orientado para o oeste.

A seguir foi registrada a posição do botão da fonte de corrente que causava uma deflexão de quarenta e cinco graus, de forma que a agulha apontasse para o noroeste. Nesta condição o campo produzido pelas bobinas era igual, em módulo, à componente horizontal do campo terrestre. O estímulo aplicado ao pombo foi gerado por uma corrente variada aleatoriamente, à mão, entre zero e aproximadamente o valor que causava a rotação até o noroeste.

3.7 Processamento do tecido

Após 1h ou 3h do fim da sessão experimental, o pombo era anestesiado, recebendo uma dose letal de Ketamina (5mg/100g de peso corpóreo) e Xylazina (1mg/100g), intramuscular. Após anestesia, o animal era perfundido transcardiacamente com 300-400mL de solução fisiológica tamponada, pH=7,4, seguida de aproximadamente 400mL de solução de paraformaldeído 4%, pH=7,4, em tampão fosfato de sódio (PB, ou *Phosphate Buffer*) 0,1M. A seguir o encéfalo era removido da caixa craniana, pós-fixado em formaldeído 4% em PB por 4h a 4°C, e então, colocado em uma solução de sacarose 30% em PB (a saturação ocorre dentro de 48h) para crioproteção. Na última etapa, os encéfalos eram

cortados transversamente aproximadamente na região do tronco encefálico, de forma a facilitar no seu alinhamento, congelados em gelo seco e cortados em secções coronais seriadas de 30µm no micrótomo (cortes “*free-floating*”). As secções eram coletadas em 6 compartimentos separados em série paralela, e eram armazenadas em freezer (-20°C) em solução anti-freezing (sacarose 15% e etilenoglicol 30% em PB 0.05M).

3.8 Imunohistoquímica

As primeiras séries de cortes eram selecionadas para serem processadas. Elas foram primeiramente lavadas 3 vezes em tampão fosfato (PB) 0,1M sob agitação constante por 10 minutos, em seguida, incubadas com o anticorpo IgG primário policlonal contra proteína ZENK feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, nº catálogo Sc-189,) diluído a 1:100 ou 1:200 em solução de bloqueio PB contendo 0,3% Triton X-100 e soro de jumento (1%), durante 48h a 4°C. O material foi lavado em solução tampão nova de PB 0,1M, por 3x de 10min, para retirada dos anticorpos não ligados, e posteriormente incubado com anticorpo secundário biotinilado anti-coelho feito em jumento na concentração de 1:200 (Vector Labs. Burlingame, CA) por 2h em temperatura ambiente (TA) (22°C); novamente lavado (3x de 10min) e incubado, por 2h em TA, em uma solução do complexo avidina-biotina (*kit* Elite Vectastain® ABC, Vector Laboratories, diluição 1:200), preparada com 30min de antecedência, para permitir a formação de complexos avidina-biotina-peroxidase. Passadas 2h, o material era lavado em PB por 3x de 10min, e, finalmente revelado em uma solução cromógena de 0,05% tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma) por 5min, seguida pela adição de peróxido de hidrogênio 0,003% (concentração final), reação deixada seguir até a formação de uma coloração acastanhada (o que durava 5min em média). Após novas lavagens para a inativação da reação e retirada do DAB, os tecidos eram montados em lâminas gelatinizadas (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) e deixados secar em placa quente a 37°C por pelo menos 18h. Após isso, as lâminas eram hidratadas, banhadas em Tetróxido de Ósmio 0,03% por 30 segundos, lavadas em água destilada para retirada do excesso do Tetróxido de Ósmio, desidratadas em séries de etanol (70-90-100-

100%) por 5min em cada concentração, imersas em 2 séries de xilol por 5min e cobertas com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) e laminula. Testes controles para especificidade da imunohistoquímica foram feitos omitindo-se o anticorpo primário na preparação, em que não se verificou reação inespecífica. E uma série completa de secções foi corada pelo método de Nissl para visualização dos grupos celulares.

3.9 Análise dos dados

Após preparação, as lâminas foram observadas sob microscopia de campo claro (ZEISS Axioskop equipado com uma câmera digital ZEISS AxioCam) e a contagem das células marcadas (ZENK-imunorreativas, ZENK-ir) foi feita no bulbo olfatório (BO) e córtex pré-piriforme (CPP), manualmente com ajuda do software "AXIOVISION", versão 4.6. Alguns cortes representativos foram fotografados (4164 x 3120 pixels, RGB 24-bit) para registro permanente das imagens. As comparações, conforme procedimento de outros autores [41, 52], deram-se pela quantificação dos núcleos imunorreativos de um corte de mesmo nível aproximado (A 14.5 do atlas estereotático de encéfalo de pombo [53]) para todos os animais dentro de uma área representativa (350 X 270µm). Não fizemos distinções entre as camadas celulares do BO. Dividimos o BO em 3 regiões (ventral, medial e lateral), tendo como referência o ventrículo olfatório de modo que conseguíssemos contabilizar uma área representativa. Já o CPP foi dividido em 2 porções (lateral e medial). O teste ANOVA uma via (software Graphpad InStat 3.0), foi utilizado para comparar a quantidade de núcleos ZENK-ir entre os grupos, com comparações post-hoc de Tukey, seguido de Teste T de Student para verificar diferenças entre áreas específicas, valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Uma visão geral

A Tabela 1 mostra avaliações qualitativas da imunoreatividade de cinco territórios do encéfalo de pombos, comparando 8 indivíduos submetidos à estimulação magnética com oito indivíduos controle. Para quatro dos indivíduos de cada grupo o tempo entre a estimulação e a perfusão foi de uma hora, e para os restantes, três horas. Apesar de qualitativos esses dados apresentam interesse, pois mostram, em seu conjunto, tendências que motivam e direcionam uma sequência ao presente trabalho.

Comparando as marcações após uma e após três horas da estimulação experimental aparece uma leve tendência à diminuição das marcações após três horas da estimulação em relação à condição de uma hora de latência apenas. Essa tendência é mais presente nos animais submetidos à estimulação magnética do que nos controles.

Em dois territórios, hipocampo e a porção medial do estriato medial, há indícios de maior marcação nos pombos estimulados do que nos controles, tendência também presente no núcleo accumbens, mas menos marcada. Na área parahipocampal não parece haver qualquer diferença entre experimentais e controles, e apenas no córtex piriforme poderia haver uma menor marcação nos experimentais do que nos controles.

Dificuldades experimentais levaram em algumas preparações à presença muito intensa de hemácias (marcação inespecífica) que prejudicou uma análise quali e quantitativa dessas áreas.

Tabela 1 - Análise qualitativa dos cinco territórios ZENK-ir analisados em 8 pombos após 1h e 3h de estimulação magnética e 8 pombos controle. O significado dos símbolos é dado na Tabela 2, abaixo.

Pombo	Tempo	Territórios ZENK-ir				
		APH	Hp	Cpi	Ac	mMSt
CM1	1	+	+	+	+	+
CM2	1	(+)	-	+	(+)	++
CM3	1	++	+	+	(+)	+
CM4	1	++	(+)	(+)	ND	(+)
CM5	3	(+)	-	-	++	-
CM6	3	+	+	(+)	++	++
CM7	3	+	-	(+)	-	+
CM8	3	++	-	++	(+)	(+)
M1	1	++	+	-	++	++
M2	1	++	++	+	+	++
M3	1	++	+	(+)	-	(+)
M8	1	(+)	(+)	-	++	++
M4	3	(+)	+	+	+	+
M5	3	+	(+)	(+)	+	+
M6	3	(+)	-	(+)	(+)	(+)
M7	3	+	(+)	(+)	(+)	++

Tabela 2 - Significado dos símbolos que aparecem na Tabela 1, acima.

APH	área parahipocampal
Hp	hipocampo
Cpi	córtex piriforme
Ac	núcleo accumbens
mMSt	porção medial do estriato medial
++	intenso ZENK-ir
+	moderado ZENK-ir
(+)	escasso ZENK-ir
-	ausência de ZENK-ir
ND	não disponível

4.2 Bulbo olfatório e córtex pré-piriforme

A análise quantitativa se concentrou no BO e no CPP, pois essas estruturas apresentaram as diferenças mais claras entre os pombos submetidos à estimulação magnética e os controles. Entretanto, como descrito acima, nós também observamos, pelo menos qualitativamente, outras regiões importantes no comportamento de *homing*, incluindo córtex piriforme (Cpi) [54, 55], hipocampo (Hp) [56-58], área parahipocampal (APH) e porção medial do estriato medial (mMSt) [51], que não apresentaram diferenças claras (Tabela 1).

Não havendo diferenças estatísticas (Fig. 3) [ANOVA de uma via, $p=0,13$ (CPP) e $p=0,10$ (BO)] na imunorreatividade entre os tempos de espera para a perfusão (1 ou 3 horas) agrupamos os grupos controle 1h e 3h e o grupo magnético 1h e 3h, formando apenas 2 grupos, o controle (C) e o magnético (M), respectivamente.

Fig. 3 – Números médios de núcleos ZENK-imunorreativos (ZENK-ir) ($\pm$ DP) no BO e CPP após 1h e 3h do término da sessão de estimulação.

Apesar de termos observado uma intensa imunorreatividade para ZENK no BO (Fig. 3 e Tabela 3), não houve diferença estatística ($p = 0.49$), no BO como um todo (e nem entre suas subdivisões) entre os grupos, experimental e controle (Fig. 6, Fig.7 e Fig. 8).

Ao contrário do BO, foram observadas diferenças na imunorreatividade para ZENK no CPP (Tabela 3). Pombos que foram estimulados magneticamente

apresentaram em média 92 ($dp = 39$) núcleos marcados por área ($350 \times 270 \mu\text{m}$), enquanto que nos controles foram, em média, apenas 57 ($dp = 24$) por área. A diferença entre os grupos foi marginalmente significativa, $p = 0.051$. Interessante também notar uma diferença regional observada: a porção lateral do CPP apresentou maior efeito da estimulação magnética em relação ao grupo controle ($p = 0.04$) (Fig.4), do que a porção medial ($p = 0.09$) (Fig.5).

Tabela 3 - Efeito da estimulação magnética na IR-ZENK no sistema olfatório de pombos

Grupo celular	Controle	Magnético
CPP*	57±24	92±39
CPP/L*	29±17	44±17
CPP/M	28±13	46±23
BO	434±156	494±186
BO/V	174±64	203±79
BO/L	133±68	158±64
BO/M	128±39	133±65

Números médios e desvio padrão ($\pm$ D.P.) de núcleos IR-ZENK por secção no grupo controle ($n=8$) e tratado ($n=8$) *Diferença significativa entre grupos controles e magnéticos, pelo teste T($p<0,05$).

Fig.4 - (a) Fotomicrografia de campo-claro (x25) de uma secção coronal de encéfalo de pombo na região do BO e CPP. Retângulos coloridos indicam a localização das imagens coletadas para quantificação da ZENK-ir, vermelho corresponde a CPP medial, azul a CPP lateral, preto a BO medial, amarelo a BO lateral, verde a BO ventral. BO, bulbo olfatório; CPP, córtex pré-piriforme; VO, ventrículo olfatório. Escala, 1mm. (b) Fotomicrografias representativas de campo-claro (x400) de ZENK-ir no CPP lateral dos animais tratados e controles; (i) animal tratado pós-1h do fim da sessão; (ii) controle pós 1h do fim da sessão; (iii) animal tratado pós-3h do fim da sessão; e (iv) controle pós-3h do fim da sessão. Escala, 50µm.

Fig. 5 - (continuação) Fotomicrografias representativas de campo-claro (x400) de ZENK-ir no CPP medial dos animais tratados e controles; (i) animal tratado pós-1h do fim da sessão; (ii) controle pós 1h do fim da sessão; (iii) animal tratado pós-3h do fim da sessão; e (iv) controle pós-3h do fim da sessão.

Fig. 6 - (continuação) Fotomicrografias representativas de campo-claro (x400) de ZENK-ir no BO ventral dos animais tratados e controles; (i) animal tratado pós-1h do fim da sessão; (ii) controle pós 1h do fim da sessão; (iii) animal tratado pós-3h do fim da sessão; e (iv) controle pós-3h do fim da sessão.

Fig. 7 - (continuação) Fotomicrografias representativas de campo-claro (x400) de ZENK-ir no BO lateral dos animais tratados e controles; (i) animal tratado pós-1h do fim da sessão; (ii) controle pós 1h do fim da sessão; (iii) animal tratado pós-3h do fim da sessão; e (iv) controle pós-3h do fim da sessão.

Fig. 8 - (continuação) Fotomicrografias representativas de campo-claro (x400) de ZENK-ir no BO medial dos animais tratados e controles; (i) animal tratado pós-1h do fim da sessão; (ii) controle pós 1h do fim da sessão; (iii) animal tratado pós-3h do fim da sessão; e (iv) controle pós-3h do fim da sessão.

5 DISCUSSÃO

5.1 Uma visão geral

Apesar de não significativas às tendências a uma maior imunoreatividade com a latência mais curta entre a estimulação e a perfusão, o resultado é importante por indicar a latência mais curta (1 h) como adequada em experimentos futuros. Tal tendência, porém, não é suficientemente forte para recomendar a exclusão de latências mais longas (até 3h). Parece remota a possibilidade que diferenças nas latências entre 1 h e 3 h causem efeitos determinantes na marcação das regiões estudadas. Apesar de que é bem sabido que o pico de ZENK-ir se dá em 1h após dada estimulação/evento e começa a decair a partir de 3h [45].

Como alvos de interesse futuro, os dados qualitativos recomendariam o hipocampo e a porção medial do estriado medial. O primeiro, especialmente, é interessante por sua associação à representação espacial e memória [58, 59], e o segundo está associado a formação de traços de memória [60] e a motivação [61].

O núcleo da raiz óptica basal e o teto óptico são áreas interessantes no contexto do comportamento de orientação e navegação, sobretudo nas quais há muita especulação de interação entre magnetorecepção e visão. Depois de um grande investimento inicial nessas áreas, questionando metodologia e tentando várias possibilidades, soubemos que outros pesquisadores também observaram que o nBOR, em particular, não apresenta imunoreatividade para ZENK [62] , e, portanto seria recomendável abordar esse território com outros IEGs em tentativas experimentais futuras.

5.2 Bulbo olfatório e córtex pré-piriforme

Os dados aqui descritos sugerem a possibilidade, inédita, da participação de elementos da via olfatória na percepção de campos magnéticos em pombos, por uma via que implica especialmente o córtex pré-piriforme.

Há várias propostas de mecanismos que implicam entradas visuais na percepção de campos magnéticos, mas a possibilidade do envolvimento de entradas olfativas foi levantada até o momento apenas como mera conjectura em

discussões abertas em Congressos. Para explicar os efeitos de manipulações olfativas, Schmidt-Koenig⁶ [s.d.] argumenta (inf.pess.) que possivelmente essas manipulações afetam o putativo sensor magnético baseado em cristais de óxidos de ferro (magnetossomas) relatados na literatura [29, 31, 63-65], presentes na região do bico dos pombos. O argumento apresenta como base de plausibilidade o fato da região do bico, mencionada nos trabalhos que descrevem a existência de magnetossomas, ser também a região da mucosa olfativa. Porém, nunca houve, até agora, qualquer proposta bem embasada, tanto teórica como experimentalmente, que justificasse qualquer ligação entre olfação e percepção de campos magnéticos.

Trabalhos pioneiros descreveram a presença de material ferromagnético na porção cefálica do pombo [63], destacando-se a musculatura do pescoço, região entre a dura-máter e a caixa craniana. Em outras espécies de aves (*Gallus gallus* [66], *Taeniopygia guttata* - zebra finch -, alguns albatrozes e diversas aves migratórias), e em outras classes como peixes (trutas, especificamente na parte mais rostral) e crustáceos (lagostas) descreveu-se também a presença desse tipo de material (ver revisão em [67]). Pesquisas recentes [29, 31, 64, 65, 68] descrevem a presença de material ferromagnético no epitélio das mucosas da região do bico superior de pombos-correio. Interessante é um aglomerado de material magnético distribuído em 6 pontos simétricos na região do bico [68].

Outras estruturas também chamaram atenção, como as terminações nervosas do ramo oftálmico (V par craniano), onde foram encontrados cristais ferromagnéticos bem organizados [65]. A presença desses grânulos (da ordem de 1-3µm) levantou inúmeras conjecturas quanto à natureza e design do putativo receptor de campos magnéticos em vertebrados (referências em [69]).

Há grande ênfase na região trigeminal por vários autores. A descrição mais atual de materiais biomagnéticos [31], deixa claro que esse tipo de material se encontra em uma forma dispersa, mas não propõe mecanismos biofísicos de transdução. Não é de se surpreender que o biomagnetismo em vertebrados continue como uma modalidade controversa, uma vez que, seria necessário um maior detalhamento para viabilizar reflexões mais seguras para essa modalidade sensorial, tanto no que concerne sua importância nas pesquisas em orientação quanto às questões neuroanatômicas associadas.

⁶ Schmidt-Koenig, Klaus. Informação pessoal [s.d.]

Apesar da relevância da eventual participação de estruturas nervosas com função olfativa na detecção de campos magnéticos, não podemos concluir que a desorientação observada nos animais nos experimentos que manipulam a via olfativa possa ser explicada, mesmo em parte, por um déficit sensorial magnético. A razão disso é que além de estratégias invasivas/lesivas (lesão do epitélio olfativo por ZnSO_4 [70], anestesia local, secção do nervo olfatório [71], e lesão do córtex piriforme [54]), os efeitos da restrição olfativa foram observados também em estudos não invasivos/lesivos (como o uso de tampões nasais [71], e isolamento do animal, sem contato com ventos locais [72]). Tais manipulações não isolam as células transdutoras do campo geomagnético, e, portanto não há como explicar sua eficácia em desnortear os pombos por interferir na magnetoccepção das aves. Desse modo, não podemos excluir ou desprezar a importância das pistas olfativas, atribuindo a um efeito colateral magnético as manipulações olfativas.

Por outro lado, apesar do nervo olfativo não ter participação na detecção da presença de campos magnéticos [2], especulamos que exista uma via paralela à trigeminal, identificada pelos pesquisadores, responsável pela percepção de outras características (como a intensidade e/ou direção, por exemplo) do estímulo magnético, não contemplados pelo protocolo de Mora et al. São questões para próximas pesquisas.

5.3 Considerações gerais

Intrigante estudo em toupeiras [49], em que se verificou uma marcação menos intensa e mais espalhada frente a estimulação magnética, nossos dados nos permitem inferir algo sobre distribuição topográfica dos neurônios responsivos a campo magnético. As aves estimuladas apresentaram um maior número de neurônios ZENK-ir na porção lateral. Os autores argumentam que:

“(i) a mudança de polaridade representa um estímulo menos relevante do que a presença de um campo magnético, (ii) os neurônios dos compartimentos coliculares individuais respondem a somente campos magnéticos de polaridade distinta e (iii) os compartimentos que respondem de forma diferente a polaridades de campo são distribuídos de maneira sistemática na camada cinzenta intermediária”.

Portanto, é válido pensar num padrão de distribuição mais espalhada dos neurônios ativos, e conseqüentemente, maior número de neurônios ativados.

Lieshoff et al [73] verificaram uma intensa ZENK-ir (análise qualitativa) no BO de *Taeniopygia guttata* (diamante-mandarim, em inglês: *zebra finch*) tanto submetido ao tratamento (cortejo da fêmea) quanto nos controles, o que sugere uma elevada atividade basal no BO, como verificado em nossos dados. Uma elevada atividade basal pode mascarar uma tênue imunorreatividade no BO frente a algum estímulo. Já estudos em camundongos, utilizando o IEG c-Fos, mostraram padrões de imunorreatividade específicos para cada tipo de cheiro na região do bulbo olfatório acessório [74], uma região de neurônios de 3ª ordem.

Pesquisas com outros genes de expressão imediata (fos, jun, arc), da mesma família do zenk, poderiam revelar atividade neuronal em áreas sensoriais potencialmente promissoras como: áreas trigeminais (ex. núcleo trigeminal principal, arcópio, núcleo basorostral palial) e visuais (ex. nBOR) não marcadas pelo ZENK, devido a características intrínsecas, ainda não muito bem compreendidas [62].

Mai e Semm (1990)⁷ apud Nemec, Burda e Oelschlager, 2005 [48], utilizando o marcador de atividade metabólica 2-deoxi-D-(14C) glicose (2-DG) mapearam o consumo de glicose de áreas encefálicas de pombos expostos a campos magnéticos alternantes e constataram aumento de atividade em estruturas visuais primárias e secundárias (durante o dia), e tecto óptico e nucleus isthmi (durante a noite). No entanto, houve uma diminuição dos valores no hipotálamo e aumento na glândula pineal, em ambos os períodos. Os autores nada relatam sobre o sistema olfatório, e menos ainda o sistema trigeminal, porém reforçam a ideia da existência da sensibilidade a campos magnéticos associados ao sistema visual. Dados esses são corroborados por registros eletrofisiológicos [38], porém tentativas de se reproduzir esses dados em nosso laboratório foram em vão (Ranvaud⁸, inf.pess.).

⁷ Mai JK, Semm P. Pattern of brain glucose utilization following magnetic stimulation. J Hirnforsch. 1990;31(3):331-6.

⁸ Ranvaud, Ronald. Informação pessoal. [s.d.]

6 CONCLUSÕES

- Nossos dados aqui descritos sugerem a possibilidade, inédita, da participação de elementos da via olfatória na percepção de campos magnéticos em pombos. No entanto, enfatizamos que outros experimentos devem ser feitos antes de afirmarmos categoricamente, devido ao histórico que se tem em baixa reprodutibilidade das manipulações magnéticas.
- Manipulações invasivas/lesivas da via olfativa, podem prejudicar o putativo sistema magnetoceptor, e conseqüentemente a tomada de rumo correta em direção ao pombal.
- A não imunorreatividade por ZENK em áreas sensoriais trigeminais primárias (núcleo basorostral palial e arcopácio), hipocampo e nBOR, comprometeram uma análise mais acurada e uma discussão mais rica frente as recentes descobertas. O uso desse marcador de atividade neuronal não é indicado para o estudo dessa modalidade de estímulo nessas regiões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Wehner R, Menzel R. Homing in the ant *Cataglyphis bicolor*. *Science*. 1969 Apr 11;164(876):192-4.
- [2] Mora CV, Davison M, Wild JM, Walker MM. Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. *Nature*. 2004 Nov 25;432(7016):508-11.
- [3] Gauthreaux SA. Animal migration, orientation and navigation. New York: Academic Press 1980.
- [4] Schmidt-Koenig K. Avian orientation and navigation. London: Academic Press 1979.
- [5] Levi WM. The Pigeon. Sumter, S.C.: Levi Publishing Company 1981
- [6] Baldaccini NE. Pigeon homing: trends and perspectives. *Comp Biochem Physiol*. 1983;76A:639-42.
- [7] Wiltschko R, Wiltschko W. Avian navigation: from historical to modern concepts. *Anim Behav*. 2003;65(2):257-72.
- [8] Walcott C. Pigeon homing: observations, experiments and confusions. *J Exp Biol*. 1996;199(Pt 1):21-7.
- [9] Yeagley HL, Whitmore FC. A preliminary study of a physical basis of bird navigation. *J Appl Phys*. 1947;18(12):1035-63.
- [10] Wallraff H. Avian navigation: pigeon homing as a paradigm. 1^a ed: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2005.
- [11] Navigation RI. Lista de discussão. 05/01/08 [cited; Available from: <http://www.rin.org.uk/sigs-branches/animal>
- [12] O'Connor JJ, Robertson EF. English attack on the longitude problem. 1997 [cited 05/01/08]; Available from: <http://www-history.mcs.st-andrews.ac.uk/HistTopics/References/Longitude2.html>

- [13] Keeton WT. Magnets interfere with pigeon homing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Jan;68(1):102-6.
- [14] Walker MM. On a wing and a vector: a model for magnetic navigation by homing pigeons. *J Theor Biol*. 1998 Jun 7;192(3):341-9.
- [15] Able KP. Magnetic orientation and magnetoreception in birds. *Prog Neurobiol*. 1994 Mar;42(4):449-73.
- [16] Papi F, Fiore L, Fiaschi V, Benvenuti S. Olfaction and homing in pigeons. *Monit Zool Ital*. 1972;6:85-95.
- [17] Wallraff HG. Navigation by homing pigeons: updated perspective. *Ethol Ecol Evol*. 2001;13(1):1-48.
- [18] Papi F. Olfactory navigation in birds. *Experientia*. 1990;46:352-63.
- [19] Baker RR. *Bird Navigation: the solution of a mystery?* London:: Hodder & Stoughton 1984.
- [20] Lipp HP, Vyssotski AL, Wolfer DP, Renaudineau S, Savini M, Troster G, et al. Pigeon homing along highways and exits. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):1239-49.
- [21] Schöps M, Wiltschko W. Orientation of homing pigeons deprived of infrasound. *J Ornithol*. 1994;135:415.
- [22] Wiltschko R, Wiltschko W. Pigeon homing: change in navigational strategy during ontogeny. *Animal Behaviour*. 1985;33:583-90.
- [23] Keeton WT, Goibert A. Orientation by untrained pigeons requires the sun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970 Apr;65(4):853-6.
- [24] Wiltschko R. The ontogeny of orientation in young pigeons. *Comp Biochem Physiol A*. 1983;76(4):701-8.
- [25] Keeton WT. Effects of magnets on pigeon homing. In: Galler SR, Schmidt-Koenig K, Jacobs GJ, Belleville RE, eds. *Animal orientation and navigation*. Washington, D.C.: NASA SP-262 1972:579-94.
- [26] Schmidt-Koenig K, Ganzhorn JU, Ranvaud R. *Orientation in Birds*. Basel: Birkhauser Verlag 1991.

- [27] Schmidt-Koenig K. Internal clocks and homing. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1960;25:389-93.
- [28] Keeton WT. Orientation by pigeons: is the sun necessary? Science. 1969 Aug 29;165(3896):922-8.
- [29] Fleissner G, Holtkamp-Rotzler E, Hanzlik M, Winklhofer M, Fleissner G, Petersen N, et al. Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. J Comp Neurol. 2003 Apr 14;458(4):350-60.
- [30] Hanzlik M, Heunemann C, Holtkamp-Rotzler E, Winklhofer M, Petersen N, Fleissner G. Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. Biometals. 2000 Dec;13(4):325-31.
- [31] Tian L, Xiao B, Lin W, Zhang S, Zhu R, Pan Y. Testing for the presence of magnetite in the upper-beak skin of homing pigeons. Biometals. 2007 Apr;20(2):197-203.
- [32] Blakemore R. Magnetotactic bacteria. Science. 1975 Oct 24;190(4212):377-9.
- [33] Johnsen S, Lohmann KJ. The physics and neurobiology of magnetoreception. Nat Rev Neurosci. 2005 Sep;6(9):703-12.
- [34] Semm P, Beason RC. Response to small magnetic variations by the trigeminal system of the bobolink. Brain Res Bull. 1990;25(5):735-40.
- [35] Wallraff HG. Avian Navigation: Pigeon Homing as Paradigm. 1^a ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 2005.
- [36] Gagliardo A, Ioale P, Savini M, Wild JM. Having the nerve to home: trigeminal magnetoreceptor versus olfactory mediation of homing in pigeons. J Exp Biol. 2006 Aug;209(Pt 15):2888-92.
- [37] Vargas JP, Siegel JJ, Bingman VP. The effects of a changing ambient magnetic field on single-unit activity in the homing pigeon hippocampus. Brain Res Bull. 2006 Jun 30;70(2):158-64.
- [38] Semm P, Demaine C. Neurophysiological properties of magnetic cells in the pigeon's visual system. J Comp Physiol 1986 Nov;159A(5):619-25.

- [39] Leask MJ. A physicochemical mechanism for magnetic field detection by migratory birds and homing pigeons. *Nature*. 1977 May 12;267(5607):144-5.

- [40] Quentmeier B. Cardiac and respiratory responses to magnetic fields in pigeons. *In: Orientation and navigation - birds, humans, and other animals*. London, Cardiff: The Royal Institute of Navigation 1989.

- [41] Mello CV, Ribeiro S. ZENK protein regulation by song in the brain of songbirds. *J Comp Neurol*. 1998 Apr 20;393(4):426-38.

- [42] Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988 Jun 3;240(4857):1328-31.

- [43] Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 1990 Apr;4(4):477-85.

- [44] Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci*. 1989 Nov;12(11):459-62.

- [45] O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, Baraban JM. The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci*. 1999 Apr;22(4):167-73.

- [46] Davis S, Bozon B, Laroche S. How necessary is the activation of the immediate early gene zif268 in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res*. 2003 Jun 16;142(1-2):17-30.

- [47] Clayton DF. The genomic action potential. *Neurobiol Learn Mem*. 2000 Nov;74(3):185-216.

- [48] Nemec P, Burda H, Oelschlager HH. Towards the neural basis of magnetoreception: a neuroanatomical approach. *Naturwissenschaften*. 2005 Apr;92(4):151-7.

- [49] Nemec P, Altmann J, Marhold S, Burda H, Oelschlager HH. Neuroanatomy of magnetoreception: the superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal. *Science*. 2001 Oct 12;294(5541):366-8.

- [50] Mouritsen H, Feenders G, Liedvogel M, Wada K, Jarvis ED. Night-vision brain area in migratory songbirds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 7;102(23):8339-44.

- [51] Shimizu T, Bowers AN, Budzynski CA, Kahn MC, Bingman VP. What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? Selective examination of ZENK expression. *Behav Neurosci*. 2004 Aug;118(4):845-51.
- [52] Sockman KW, Gentner TQ, Ball GF. Recent experience modulates forebrain gene-expression in response to mate-choice cues in European starlings. *Proc R Soc London*. 2002;269B(1508):2479-85.
- [53] Karten HJ, Hodos W. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon. Baltimore: John Hopkins University Press 1967.
- [54] Papi F, Casini G. Pigeons with ablated pyriform cortex home from familiar but not from unfamiliar sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(10):3783-7.
- [55] Gagliardo A, Odetti F, Ioale P, Pecchia T, Vallortigara G. Functional asymmetry of left and right avian pyriform cortex in homing pigeons' navigation. *Eur J Neurosci*. 2005 Jul;22(1):189-94.
- [56] Bingman VP, Gagliardo A, Ioale P. Hippocampal participation in the sun compass orientation of phase-shifted homing pigeons. *J Comp Physiol* 1996 Nov;179A(5):695-702.
- [57] Bingman VP, Mench JA. Homing behavior of hippocampus and parahippocampus lesioned pigeons following short-distance releases. *Behav Brain Res*. 1990 Nov 30;40(3):227-38.
- [58] Bingman VP, Yates G. Hippocampal lesions impair navigational learning in experienced homing pigeons. *Behav Neurosci*. 1992 Feb;106(1):229-32.
- [59] Bingman VP, Ioale P, Casini G, Bagnoli P. The avian hippocampus: evidence for a role in the development of the homing pigeon navigational map. *Behav Neurosci*. 1990 Dec;104(6):906-11.
- [60] Packard MG, Knowlton BJ. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:563-93.
- [61] Izawa E, Zachar G, Yanagihara S, Matsushima T. Localized lesion of caudal part of lobus parolfactorius caused impulsive choice in the domestic chick: evolutionarily conserved function of ventral striatum. *J Neurosci*. 2003 Mar 1;23(5):1894-902.

- [62] Mello CV, Clayton DF. Differential induction of the ZENK gene in the avian forebrain and song control circuit after metrazole-induced depolarization. *J Neurobiol.* 1995 Jan;26(1):145-61.

- [63] Walcott C, Gould JL, Kirschvink JL. Pigeons have magnets. *Science.* 1979;205(4410):1027-9.

- [64] Winklhofer M, Holtkamp-Rotzler E, Hanzlik M, Fleissner G, Petersen N. Cluster of superparamagnetic magnetite particles in the upper-beak skin of homing pigeons: evidence of a magnetoreceptor? *Europ J Mineral.* 2001;13(4):659-69.

- [65] Williams MN, Wild JM. Trigeminally innervated iron-containing structures in the beak of homing pigeons, and other birds. *Brain Res.* 2001 Jan 19;889(1-2):243-6.

- [66] Wiltschko W, Freire R, Munro U, Ritz T, Rogers L, Thalau P, et al. The magnetic compass of domestic chickens, *Gallus gallus*. *J Exp Biol.* 2007 Jul;210(Pt 13):2300-10.

- [67] Wiltschko W, Wiltschko R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *J Comp Physiol* 2005 Aug;191A(8):675-93.

- [68] Hanzlik M, Heunemann C, Holtkamp-Rotzler E, Winklhofer M, Petersen N, Fleissner G. Superparamagnetic magnetite in the upper beak tissue of homing pigeons. *BioMetals.* 2000;13(4):325-31.

- [69] Mouritsen H, Ritz T. Magnetoreception and its use in bird navigation. *Curr Opin Neurobiol.* 2005 Aug;15(4):406-14.

- [70] Benvenuti S, Ranvaud R. Olfaction and the homing ability of pigeons raised in a tropical area in Brazil. *J Exp Zool A.* 2004 Dec 1;301A(12):961-7.

- [71] Wallraff HG. Olfactory deprivation in pigeons: examination of methods applied in homing experiments. *Comp Biochem Physiol* 1988;89A(4):621-9.

- [72] Wiltschko R, Schops M, Kowalski U. Pigeon homing: wind exposition determines the importance of olfactory input. *Naturwissenschaften.* 1989 May;76(5):229-31.

- [73] Lieshoff C, Grosse-Ophoff J, Bischof HJ. Sexual imprinting leads to lateralized and non-lateralized expression of the immediate early gene zenk in the zebra finch brain. *Behav Brain Res.* 2004 Jan 5;148(1-2):145-55.

[74] Zou Z, Li F, Buck LB. Odor maps in the olfactory cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 24;102(21):7724-9.