LUCILA EMIKO TSUGIYAMA

**ANÁLISE DE ÁREAS ENCEFÁLICAS ATIVADAS EM POMBOS
POR ESTÍMULOS MAGNÉTICOS E OLFATIVOS**

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

São Paulo
2013

LUCILA EMIKO TSUGIYAMA

**ANÁLISE DE ÁREAS ENCEFÁLICAS ATIVADAS EM POMBOS
POR ESTÍMULOS MAGNÉTICOS E OLFATIVOS**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Ronald Dennis Paul
Kenneth Clive Ranvaud

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Tsugiyama, Lucila Emiko.

Análise de áreas encefálicas ativadas em pombos por estímulos magnéticos e olfativos / Lucila Emiko Tsugiyama. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Dennis Paul Kenneth Clive Ranvaud.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neurociência - fisiologia do comportamento.

Versão do título para o inglês: Analysis of brain areas activated in pigeons by magnetic and olfactory stimuli.

1. Olfato 2. Geomagnetismo 3. Pombos 4. Imunohistoquímica
I. Ranvaud, Prof. Dr. Ronald Dennis Paul Kenneth Clive II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB100/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucila Emiko Tsugiyama.

Título da Dissertação: Análise de áreas encefálicas ativadas em pombos por estímulos magnéticos e olfativos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 – e-mail: rep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 122 nas fls. 109 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Ronald Dennis Paul Kenneth Clive Ranvaud**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Análise de áreas encefálicas ativadas em pombos por estímulos magnéticos e olfativos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Lucila Emiko Tsugiyama** e o pesquisador **Luiz Roberto Giorgetti de Britto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 20.09.2011, com validade de 3 anos.

São Paulo, 22 de setembro de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Ao Prof. Dr. Luiz R. G. Britto pela colaboração e permitido utilizar seu espaço, pelas orientações e apoio

Ao Adilson da Silva Alves, por auxiliar nas técnicas laboratoriais

Aos técnicos Adhemar e Vera pelo apoio e auxílio nos procedimentos laboratoriais

Ao Hugo Henrique Hirata, por ter auxiliado na elaboração do projeto

Ao Prof. Dr. Sérgio Rezende, por construir e ceder as bobinas de Helmholtz

À Profa. Dra. Margareth Capurro, por disponibilizar seu biotério e instalação dos animais

Aos componentes da banca, por contribuir com seu conhecimento e enriquecer o trabalho

Aos familiares e amigos, pela paciência e apoio durante o período do trabalho

“As dificuldades são o aço estrutural que entra na construção do caráter.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

TSUGIYAMA, L. E. **Análise de áreas encefálicas ativadas em pombos por estímulos magnéticos e olfativos.** 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A habilidade do pombo-correio (*Columba livia*) em conseguir retornar ao lar com sucesso após ser levado a longas distâncias do pombal, principalmente quando deslocados em diferentes direções e à lugares desconhecidos, tem instigado pesquisadores a estudar os mecanismos utilizados por esses animais para se orientarem e navegarem no espaço. Dentre as hipóteses para explicar esses mecanismos destacam-se a utilização de dois fatores ambientais: gradientes de odores específicos na atmosfera e o campo geomagnético. O presente estudo teve como objetivo determinar diferenças ou correlações possivelmente existentes entre as áreas cerebrais envolvidas com as vias sensoriais olfativa e magnética. A investigação dessas áreas é realizada a partir de técnicas de imunohistoquímica, utilizando o gene de resposta imediata ZENK como marcador. Cinco grupos de pombos foram comparados: dois grupos foram expostos ao estímulo olfatório, mas um teve oclusão de narinas. Um grupo foi exposto ao estímulo magnético variando em direção e intensidade semelhante ao da campo geomagnético durante o voo, com oclusão de narinas. Dois grupos não foram estimulados, mas um teve oclusão de narinas. Dados indicam igual marcação no bulbo olfatório, córtex pré-piriforme e córtex piriforme em animais com as narinas tampadas, expostos ou não ao estímulo magnético. O estímulo olfatório, por outro lado, foi eficaz em marcar estas estruturas. Conclui-se que o processamento central de pistas magnéticas não está intimamente correlacionado à via olfatória.

Palavras-chave: Olfato. Geomagnetismo. Pombos. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

TSUGIYAMA, L. E. **Analysis of brain areas activated in pigeons by magnetic and olfactory stimuli.** 2013. 50 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The ability of homing pigeons (*Columba livia*) in homing successfully after long-distance displacements to unfamiliar locations has instigated researchers to investigate the orientation and navigation mechanisms used by these animals. There are two main theories to explain how homing pigeons orient and navigate in their return flights from unfamiliar sites: by following olfactory cues in the atmosphere or by means of the geomagnetic field. The aim of this study was to determine whether magnetic and olfactory stimuli activate common brain areas in the pigeon. To investigate brain areas activated by these two ambient stimuli, we employed immunohistochemical techniques, using the immediate early gene ZENK. Five groups of pigeons were compared: two groups were exposed to smell, but one of the groups had their nostrils plugged. One group was exposed to a magnetic field varying in direction, of intensity similar to the geomagnetic field during flight, with nostrils plugged. Two groups were not stimulated, but one had their nostrils plugged, whereas the other did not. The data indicates that ZENK expression in the olfactory bulb, pre-piriform cortex and piriform cortex was not different in birds with nostrils plugged, whether magnetically stimulated or not. The conclusion is that central processing of magnetic cues is unlikely to be intimately related to the olfactory pathway.

Keywords: Sense of olfaction. Geomagnetism. Pigeons. Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BO – Bulbo Olfatório

CPi – Córtex Piriforme

CPP – Córtex pré-piriforme

DAB – Tetrahydrocloroeto de diaminobenzidina

IEG – Immediate Early Gene (Gene de Resposta Imediata)

H₂O₂ – Peroxido de Hidrogênio

LPO – Lobo Paraolfatório

MC – Magnético Controle

ME – Magnético Experimental

NaCl – Cloreto de Sódio

nBOR – Núcleo da Raíz Óptica Basal

OC – Odor Controle

OE – Odor Experimental

PB – Phosphate Buffer (Tampão fosfato)

PET - Politereflato de etileno

PFA – Paraformaldeído

SC – Super-controle

ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Olfacção	14
1.2 Magnetocepção	16
1.3 Genes de resposta imediata	19
1.4 Justificativa	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Desenvolvimento de sistema fechado de estimulação olfativa	22
3.3 Equipamento de estimulação magnética	23
3.4 Protocolo experimental	23
3.5 Período de adaptação	24
3.6 Estimulação olfativa e magnética	25
3.7 Processamento dos tecidos	26
3.8 Imunohistoquímica	26
3.9 Análise dos dados	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Marcação dos tecidos por ZENK	28
4.2 Análise qualitativa das marcações por ZENK	35
4.3 Análise quantitativa das marcações por ZENK	36
5 DISCUSSÃO	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Pombos-correios (*Columba livia*) demonstram grandes habilidades de orientação e de navegação no comportamento de retornar ao lar (*homing*). Este comportamento é bastante plástico, ocorrendo em qualquer época do ano e envolvendo localidades arbitrárias, sendo possível transportá-los para qualquer lugar e liberá-los. Embora a taxa de retorno não seja cem por cento, ela é muito mais alta do que seria de se esperar por uma busca aleatória. Em contraposição, migrações ocorrem apenas em determinada época e ao longo de caminhos atávicos, os quais variam apenas em escala de tempo evolutiva. Muitas espécies mostram notáveis capacidades de *homing*, como o Albatroz de Laysan (*Diomedea immutabilis*), retornando aos seus ninhos após serem transportados a diversas localidades desconhecidas, podendo percorrer até 510 km por dia (KENYON; RICE, 1958). Um dos animais mais utilizados para estudos científicos de *homing* é uma linhagem de pombos domésticos, conhecida como pombos-correios, selecionados não apenas pela habilidade de orientação e navegação mas também por sua exuberância física, a qual permite voos ininterruptos de muitas horas.

Historicamente, pombos-correios foram utilizados para carregar mensagens e, mais recentemente, para competições entre criadores. Já os mecanismos que permitem sua orientação e a navegação tornaram-se um questionamento de cunho científico apenas no final do século XIX (WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 2003). Apesar do esforço de muitos pesquisadores, ainda não estão esclarecidas quais são as informações ambientais e quais os canais sensoriais que esses animais utilizam para determinar sua posição no espaço e manter uma rota (WALCOTT, 1996), sobrevoando terrenos desconhecidos (WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 2003).

Revisões e trabalhos recentes Wiltschko, R., Wiltschko, W. (2003), Patzke et al. (2010), descrevem as primeiras hipóteses quanto aos fatores ambientais que participariam do sistema de navegação e orientação em aves. Yeagley, em 1951, sugeriu que a interação da forças de Coriolis e de fatores geomagnéticos formariam um sistema de coordenadas, pelo qual os pombos poderiam se guiar. Porém, os experimentos do próprio pesquisador não comprovaram a conjectura. Matthews, em 1953, realizou experimentos com pombos jovens, soltando-os de lugares desconhecidos e observou que tinham boa orientação inicial e retornavam com sucesso apenas em dias ensolarados, enquanto em dias nublados, sua orientação era prejudicada. O mesmo foi observado com aves migratórias procelariformes, sugerindo a possibilidade de navegação solar, pela qual existiria um equivalente biológico a

um sextante nesses animais (MATTHEWS, 1953). Em contraposição a essa hipótese, Kramer, em 1957, sugeriu um modelo baseado em dois componentes: um mapa de natureza desconhecida, em que o animal estabelece a posição do local de soltura, ou seja, a posição geográfica em relação ao lar e uma bússola solar (em contraposição a um sextante solar), pela qual orientaria o mapa podendo nele ler a direção a seguir (WILTSCHO, R.; WILTSCHKO, W., 2003). O uso do sol como bússola foi demonstrado de forma quantitativa e convincente a partir de experimentos envolvendo manipulação do relógio biológico dos pombos, que apresentavam rumo de saída distorcido, de acordo com a mudança provocada em seu relógio biológico (SCHMIDT-KOENIG, 1960). Assim, estabeleceu-se a ideia que pombos aprendem as mudanças na posição do sol ao longo do dia em função da hora medida pelo seu relógio circadiano e utilizando a memória para associar a posição do sol a um azimuth. É interessante notar que, ao contrário do caso de um sextante, a bússola solar ignora a elevação do sol (WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 1985).

A partir de estudos realizados com o tordo europeu (*Erithacus rubecula*), um mecanismo alternativo para o componente bússola foi proposto. Além da utilização do sol, as aves seriam capazes de derivar informação direcional a partir da inclinação do campo magnético terrestre, utilizando-o também como uma bússola (WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 2012). Essa hipótese também foi sugerida em pombos-correios, a partir do estudo no qual barras magnéticas presas ao dorso os animais interferiram na orientação dos animais em dias nublados, mas não em dias ensolarados (KEETON, 1971). Dessa maneira, os animais utilizariam o campo magnético para se orientar quando o sol não está disponível, representando um papel secundário na orientação em relação à bússola solar.

Segundo Wiltschko, R. e Wiltschko, W. (1985), esses mecanismos estariam interligados por desenvolvimento ontogênico nesses animais. Quando jovens, iniciando seus voos, essas aves utilizariam um mecanismo inato de orientação, baseado no campo geomagnético (bússola magnética), pela capacidade de perceber o curso das linhas de campo geomagnético. Ao tornarem-se mais experientes, aprenderiam a utilizar estratégias mais eficientes e confiáveis, como a posição do sol (bússola solar), tendo assim dois mecanismos do componente bússola quando adultos.

Embora os experimentos tenham obtido êxito em demonstrar os mecanismos sensoriais referentes ao componente bússola, aqueles utilizados pelos animais para o componente mapa ainda não foram esclarecidos, havendo apenas inúmeras conjecturas referentes ao tema.

Foram propostos vários mecanismos sensoriais referentes ao componente mapa para explicar como os animais se orientam. Um dos mecanismos seria a sensibilidade ao infrassom, que tanto pombos-correios como aves migratórias utilizariam (YODLOWSKI; KREITEN; KEETON, 1977). Em um estudo retrospectivo, Hagstrum (2013), o pesquisador analisou o curioso histórico de pombos-correios da Universidade de Cornell, os quais apresentavam maior dificuldade em retornar ao lar quando liberados em Jersey Hill, exceto por um dia em 1969, quando conseguiram retornar com sucesso. A partir de correlações feitas entre a trajetória das ondas sonoras no lugar de soltura e a performance de voo dos animais, o autor observou que a geometria da área de Jersey Hill interrompia a transmissão do som, interferindo na habilidade navegacional dos pombos, concluindo que o único dia em que retornaram ao lar houve inversão de temperatura, permitindo que o som atingisse o local de soltura por refração, promovendo sucesso na navegação.

A utilização de referências visuais, também denominada pilotagem, é outra maneira utilizada para estabilizar e codificar mnemonicamente a rota até o lar de locais familiares, sem utilizar o sol como referência (BIRO; MEADE; GUILFORD, 2004; BRAITHWAITE; GUILFORD, 1993; GAGLIARDO; IOALÈ; BINGMAN, 1999; GAGLIARDO et al., 2001). Evidências de estudos realizados com pombos-correios liberados de locais já conhecidos mostraram que, sob perturbações magnéticas e com alteração do relógio circadiano, os pombos apresentavam um desempenho normal (BINGMAN; IOALÈ, 1989; GAGLIARDO; IOALÈ; BINGMAN, 1999; GAGLIARDO et al., 2001).

Outra proposta é o uso da olfação, em que os animais possuem uma representação mental do que há ao seu redor baseado na distribuição de referências olfativas dispersas no ambiente, criando um “mapa olfativo” (PAPI; FIORE; BENVENUTI, 1971; WALLRAFF, 2005). Esse mapa seria construído quando o pombo é jovem, associando os odores trazidos pelo vento até o pombal, a partir da direção do vento. Dessa maneira, os animais seriam capazes de determinar a direção quando deslocados para nova região, reconhecendo os odores que prevalecem no lugar de soltura, precisando apenas de uma bússola para reconhecer a direção cardinal oposta ao vento que trazia ao pombal o odor local prevalecente (GAGLIARDO et al., 2001).

Por fim, a sensibilidade ao campo geomagnético tem sido postulada como suficiente para fornecer não apenas uma bússola, mas também um mapa (KEETON, 1971; WALCOTT, 1979; WALKER, 1998). Uma hipótese referente a um sistema magnetoreceptor que possa fornecer a base para um “mapa magnético” seriam estruturas ricas em cristais de magnetita (partículas ferromagnéticas no bico superior dos pombos, pelas quais os pombos teriam

informações sobre a intensidade do campo magnético terrestre, possibilitando sua navegação por lugares desconhecidos (WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 2002). Outro candidato seria a lagena no ouvido interno dos pombos, cujos receptores receberiam informação magnética após a descoberta da presença de minerais ricos em ferro em tais receptores (WU; DICKMAN, 2011). Contudo, ainda não há comprovações satisfatórias da existência e de mecanismos sensoriais referentes a um mapa de navegação por pistas magnéticas e a reprodutibilidade desses experimentos também é outra questão que interfere na credibilidade desses dados.

1.1 Olfacção

O sentido de olfacção era tido como pobre em aves em geral, mas através de estudos anatômicos, morfológicos e eletrofisiológicos em diferentes espécies, observou-se que a estrutura olfatória desses animais era bastante complexa, com projeções neuronais dos bulbos olfatórios (BO) a diversas regiões cerebrais, como córtex piriforme (CPi) e lobo paraolfatório (LPO) (BALTHAZART; TAZIAUX, 2009; McKEEGAN, 2002; McKEEGAN et al., 2002).

A partir de experimentos eletrofisiológicos envolvendo o nervo olfatório e o bulbo olfatório em pombos, observou-se que esses animais também respondiam a diferentes odores e apresentavam reações como mudanças cardiorrespiratórias, dependendo da concentração do composto apresentado (SIECK; WENZEL, 1969). Com reavaliação das aferências e eferências das estruturas que compõem o sistema olfatório com uso de traçador, observou-se que o bulbo olfatório projeta-se ao córtex pré-piriforme (CPP) e ao córtex piriforme (CPi) e que o córtex pré-piriforme projeta-se bilateralmente ao córtex piriforme de maneira indireta (PATZKE; MANNS; GUNTURKUN, 2011). A importância da olfacção para esses animais tem sido demonstrada também em diferentes contextos comportamentais, incluindo a procura de alimentos em kiwis (a única ave que apresenta comportamento de farejamento, e cujas narinas são situadas na ponta do bico), reconhecimento de odores familiares em galinhas domésticas, localização de ninhos em procelariformes e orientação e navegação em pombos-correios (BALTHAZART; TAZIAUX, 2009).

Vários efeitos da privação de estimulação olfativa tem sido demonstrados por diversos pesquisadores ao longo de vários anos. A inserção de tubos plásticos nas narinas, assim isolando do ar inspirado e a mucosa olfatória de pombos-correios resultou em grande prejuízo na navegação dos animais em relação ao grupo controle, quando liberados em lugares desconhecidos (HARTWICK; FOÀ; PAPI, 1977). Estudos realizados por Luschi e

Dall'Antonia (1993) demonstraram que pombos, mesmo anósmicos, se orientam em lugares conhecidos por uso de referências visuais e um “mapa mental” da região, enquanto a olfação seria necessária para navegar em lugares desconhecidos. Papi e Casini (1990) relataram que pombos adultos com lesões em regiões cerebrais relacionadas com a olfação, como o CPi, apresentam dificuldades para se orientar e navegar em ambientes desconhecidos, mas não de lugares familiares, sugerindo que a distribuição de odores característicos na atmosfera seria essencial para estabelecer a rota para seguir. Da mesma maneira, pombos jovens com lesão no CPi apresentam dificuldades para retornar de lugares desconhecidos, sugerindo que, ao contrário de controles, não conseguiram aprender um mapa enquanto estavam no pombal. Por ser uma região que recebe projeções diretamente do BO e indiretamente do CPP, o CPi seria essencial para o processo de aprendizagem e retenção do mapa olfativo, não podendo ser substituído por outra região telencefálica relacionada com a via olfatória (GAGLIARDO; MAZOTTO; BINGMAN, 1997; PATZKE; MANNS; GUNTURKUN, 2011). Segundo Gagliardo et al. (2005), lesões unilaterais no CPi demonstraram que ocorre maior prejuízo no processamento de pistas olfativas para determinar a direção de deslocamento, quando a lesão é realizada no hemisfério esquerdo. No entanto, a autora ainda ressalta que a integridade de ambos CPi é necessária para maior eficiência no comportamento de *homing*.

Segundo Benvenuti e Gagliardo (1996), ao comparar animais com a mucosa nasal tratada unilateralmente com sulfato de zinco (ZnSO_4 4%) e posterior oclusão ipsi ou contralateral, com grupo controle não manipulado, os animais experimentais apresentaram significativa dificuldade em orientação quando o tratamento foi contralateral e capacidade apenas reduzida de retorno ao lar com tratamento ipsilateral. Dessa maneira, o prejuízo na orientação decorria por falta de informação navegacional olfativa proveniente do ambiente, e não por prejuízos inespecífico pelo tratamento realizado. Outro método, Wallraff (1988), consistiu na secção do nervo olfatório. Neste caso, os pombos também apresentaram desorientação quando liberados em regiões desconhecidas, ao contrário do comportamento em locais familiares. Assim, além do sol (usado como bússola), pombos necessitariam de pistas olfativas (mapa) para se orientar e navegar por terrenos desconhecidos, enquanto o retorno ao lar de locais familiares teria influência de outros fatores, tais como memória de referências visuais (GAGLIARDO; IOALÈ; BIGNMAN, 1999; GAGLIARDO et al., 2005; WALLRAFF, 2005).

Para demonstrar a existência do mapa olfativo, um experimento interessante, realizado por Ioalè et al. (1980)¹ apud Able (1996), obteve sucesso ao reverter a direção do vento trazendo odores pombal ao, observando que os animais experimentais voaram em direção oposta ao controle, sugerindo o aprendizado de um mapa olfativo reverso. Ao comparar grupo exposto a odores atmosféricos durante transporte até local de soltura com grupos que respiraram apenas ar inodoro (filtrado) ou ar puro com borrifadas de odores artificiais, Gagliardo et al. (2011) constataram que os dois grupos experimentais apresentaram prejuízos na performance navegacional em relação ao grupo exposto a odores atmosféricos inalterados. Com esse resultado, sugeriram que a presença de odores no ambiente é essencial para uma boa performance de voo.

Embora esses experimentos demonstrem a importância das pistas olfativas para o comportamento de navegação e orientação de pombos-correios, Able (1996) cita que a reprodutibilidade desses experimentos em outras regiões e países tem falhado em gerar resultados eficazes e satisfatórios, mesmo com a utilização de procedimentos semelhantes. Não obstante, o autor ainda levanta algumas questões importantes. Ele pergunta se há certeza que os procedimentos causam completa anosmia, mesmo que se não houver completa anosmia e mesmo assim existir algum efeito, seria de se deduzir que é importante o pombo ter pistas olfativas naturais, e que reduzindo sua capacidade de sentir odores a orientação é afetada, o que não seria surpreendente, pois trata-se de estímulos muito discretos. O autor também questiona se o alcance desse gradiente de odores presentes na atmosfera cobriria longas distâncias, o que parece inverossímil. Ele conclui que a orientação dos animais e que o suposto “mapa olfativo” não seria a única estratégia utilizada por todos os pombos.

1.2 Magnetocepção

Vários seres vivos aparentam ter sensibilidade ao campo magnético terrestre, utilizando-o para navegar e se orientarem no espaço, tais como bactérias, formigas, abelhas, lagostas, anfíbios, tartarugas e aves (LOHMANN K.; LOHMANN, F.; PUTMAN, 2007). Um exemplo são as bactérias magnetotáticas encontradas por Blakemore (1975), microrganismos que se movimentavam direcionadas passivamente pelo campo geomagnético. Essas bactérias possuem uma estrutura composta de partículas chamadas magnetossomas, que são cristais magnéticos, ricos em ferro, de um tamanho que inclui um único monodomínio. Os

¹ IOALÈ, P. Further investigations on the homing behaviour of pigeons subjected to reverse wind direction at the loft. **Monit. Zool. Ital.** (New Series), v. 14, p. 77-87.

magnetossomas são alinhados e em tal número que forma-se um dipolo magnético cujo valor é tal que o campo geomagnético aplica um torque e orienta as bactérias sem que haja desalinhamento significativo pelo movimento browniano.

Em aves, foram propostos alguns candidatos a sistema de magnetoccepção, como o modelo “par de radicais”, mecanismo baseado em uma reação química dependente da luz em fotopigmentos especializados na retina, os quais forneceriam informações referentes a uma bússola. Outro mecanismo utilizaria cristais de magnetita (magnetossomas), que forneceriam informações sobre a intensidade do campo magnético terrestre, participando do componente “mapa de navegação” (WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 2002; WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W., 2005).

Segundo Beason (2005) e Wiltschko, R. e Wiltschko, W. (1996), a bússola magnética das aves poderia ser baseada em criptocromos, fotopigmentos presentes na retina, e estaria relacionado com sua mudança de estado em resposta à intensidade luminosa recebida. Em experimento realizado com tordo europeu (*Erithacus rubecula*), observou-se que além da mudança de estado do fotopigmento em resposta à luz, variando de acordo com o alinhamento do receptor em relação ao campo geomagnético local, facilitando sua utilização como bússola, também. Neste mecanismo é importante que a acuidade visual dos animais não seja degradada (BIRO, D., 2010). Nesse estudo, apenas os pássaros que utilizaram lente fosca no olho esquerdo - permitindo entrada de luz, mas não identificar contorno de objetos - e lente normal no olho direito se movimentaram em direção correspondente à rota de migração (STAPPUT et al., 2010).

Outra hipótese foi apresentada a partir da descoberta de um conjunto de cristais de magnetita superparamagnéticos em seis locais específicos na base do bico superior de pombos que estariam relacionadas com as terminações nervosas livres do ramo oftálmico do nervo trigêmeo (FLEISSNER et al., 2003, 2007). Segundo os autores, esses depósitos de minérios de ferro poderiam ser candidato a um magnetoreceptor, atuando na transdução de campos magnéticos para o sistema nervoso central, podendo ser um componente importante do suposto “mapa de navegação” (FLEISSNER et al., 2007; WILTSCHKO, R. et al., 2010). Além desses achados, Falkenberg et al. (2010), relatam que esses cristais de magnetita também foram encontrados em duas espécies migratórias e em galinhas.

Mora et al. (2004) promoveram um experimento em que pombos experientes eram condicionados a discriminar a presença ou a ausência de anomalia magnética gerada pela presença de um ímã abaixo do assoalho da gaiola, e evidenciaram que sua percepção era mediada pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo (V1). A resposta ao estímulo magnético

tornou-se prejudicada a partir da secção bilateral do ramo oftálmico e também por anestesia local ou aplicação de ímãs na região referente ao bico superior, enquanto a secção do nervo olfatório não gerou prejuízos. Em outro estudo, realizado por Heyers et al. (2010), foi observado maior atividade de um gene de resposta imediata denominado ZENK (IEG ZENK), utilizado para marcar atividade neuronal, em áreas cerebrais que recebem conexão do nervo trigêmeo quando o animal for exposto a um campo magnético. A secção do ramo oftálmico (V1) diminuiu essa ativação. Dessa maneira, os autores sugeriram que a magnetocepção ocorreria na área do bico superior do pombo e seria mediada pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo.

Esses dados acabaram levantando questionamentos sobre a validade dos experimentos relacionados à desorientação ocorrida através da inibição do sistema olfatório, pois poderiam ter alterado a percepção de campos magnéticos ao lesar o nervo trigêmeo (MORA et al. 2004). No entanto, Gagliardo et al. (2006, 2009a,b) realizaram experimentos defendendo que o ramo oftálmico do nervo trigêmeo não seria necessário para orientação, mas sim o nervo olfatório. Ao comparar grupos com lesões no ramo oftálmico ou no nervo olfatório, demonstraram que pombos jovens inexperientes ou jovens exaustivamente treinados, ambos com secção de V1 retornavam ao lar com sucesso, assim como observado em grupos *sham* e controle, enquanto aqueles com secção do nervo olfatório apresentaram desorientação. Dessa maneira, a integridade do nervo olfatório seria essencial para navegação enquanto o ramo oftálmico não afetaria tal habilidade.

Em contrapartida, observou-se que os grupamentos celulares ricos em ferro no bico superior de pombos (Fleissner et al. 2003, 2007) eram macrófagos, após análise da ultraestrutura celular, estudos imunohistológicos, e tomografia computadorizada por ressonância magnética (TREIBER et al., 2012). Esses macrófagos também estariam presentes no trato respiratório e na pele dos animais analisados, sugerindo que os depósitos de minério de ferro encontrados não estariam vinculados a neurônios sensíveis ao campo geomagnético. Dessa maneira, as células sensoriais responsáveis pela magnetocepção mediada pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo sugerido por Mora et al. (2004), Fleissner et al. (2007) e Wiltshko, R. et al. (2010), ainda permanecem desconhecidas.

Recentemente, vários estudos intrigantes envolvendo a sensibilidade magnética de pombos foram publicados. Wu e Dickman (2011), observaram a existência de um possível mecanismo magnetoreceptor, em que componentes ferromagnéticos estariam presentes em uma região no ouvido interno, próximo à cóclea (lagena), os quais poderiam estimular direcionalmente células receptoras. Essa região parece conectar-se por aferências ao núcleo

vestibular, localizado no tronco encefálico, e possibilitaria que o animal se posicione e se localize no espaço. Já sua ablação levaria à incapacidade de retorno ao lar (WU; DICKMAN, 2012).

Gagliardo et al. (2013) realizaram experimentos com aves procelariformes (*Colonectris borealis*), levando os animais para longas distâncias (cerca de 800 km) em época de reprodução, para investigar o papel de pistas olfativas e magnéticas. Os animais com privação olfatória (tratados com ZnSO_4 4%) demonstraram prejuízos na orientação e *homing*, enquanto o grupo controle e o grupo exposto ao estímulo magnético (com ímãs no topo de suas cabeças) apresentaram comportamento navegacional semelhante, sem prejuízos na navegação. Por outro lado, dados divergentes foram observados por Meskenaite et al. 2013, (comunicação pessoal)² no qual os autores sugerem que o sistema olfatório integra informações tanto olfativas como magnéticas. Animais controle e tratados com ZnSO_4 4% foram submetidos a um campo magnético com frequência de 0,5 Hz, variando de 16 a 187 μT . A contagem de neurônios ativados por ZENK revelou aumento na ativação de células no BO e no CPi de animais controle, enquanto anósmicos tiveram diminuição significativa de ativação apenas no BO.

A partir das evidências apresentadas, observam-se conflitos sobre as vias de ativação e os mecanismos neurobiológicos referentes à sensibilidade pombos-correios ao campo geomagnético durante o comportamento de orientação e navegação o que torna estudos nessa área ainda bastante necessários.

1.3 Genes de resposta imediata

Genes de resposta imediata (*immediate early genes* – IEGs) são aqueles que se expressam rapidamente e temporariamente em resposta à atividade neuronal, não necessitando de síntese proteica *de novo* para serem ativados (DAVIS; BOZON; LAROCHE, 2003). Segundo Husband (2004), IEG é parte de uma vasta família de fatores de transcrição gênica que são induzidos, transcrevendo proteínas em vários tipos de células, incluindo neurônios.

Especificamente o IEG promotor de transcrição gênica – ZENK (homólogo de Zif-268, Egr-1, NGFI-A e Krox-24), induz a proteína ZENK em aves, um acrônimo desse membro de genes em diferentes espécies (LONG; SALBAUM, 1998; MELLO; CLAYTON,

² Informação fornecida por Virginia Meskenaite na conferência “BioNav: The application of animal navigation techniques in autonomous vehicles”, Inglaterra, abril, 2013.

1994). Seu RNAm tem pico de expressão em cerca de 30 minutos e sua proteína em 60 a 90 minutos, participando em efeitos como crescimento e diferenciação celular, formação de memória de longo prazo e neuroplasticidade (HUSBAND, 2004; MELLO; RIBEIRO, 1998; TISCHMEYER; GRIMM, 1999). Como a expressão dos IEGs está relacionada com o aumento da atividade local de neurônios, Long e Salbaum (1998), podem ser utilizados para complementar estudos neuroanatômicos, permitindo identificar áreas encefálicas ativadas por determinado estímulo ou comportamentos (HUSBAND, 2004).

A utilização dessa técnica pode ser observada no experimento realizado por Shimizu e Bowers (2004), no qual o produto da proteína do IEG ZENK possibilitou os autores a estudarem regiões encefálicas envolvidas com o comportamento de retorno ao lar em pombos-correios experientes em territórios conhecidos. Através desse experimento, puderam observar aumento de células ZENK-imunorreativas na formação hipocampal, cuja função está relacionada com processamento de informação espacial (PEARCE et al., 2005). Assim, Shimizu e Bowers (2004), sugerem que o produto de sua proteína ZENK possa ser utilizado como marcador de atividade neuronal, possibilitando observar quais neurônios são recrutados e estão ativos durante realização de comportamentos e eventos cognitivos, como a navegação e orientação em pombos-correios, permitindo esclarecer os processos neuronais de determinada área e áreas associadas.

1.4 Justificativa

Devido à existência de controvérsias referentes à interpretação de resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa, surgiu um conflito entre pesquisadores. Enquanto alguns defendem o uso prioritário de odores específicos presentes na atmosfera como estímulo ambiental prioritário para a orientação e a navegação de pombos, outros defendem o uso prioritário do campo geomagnético nesses comportamentos. Esses estudos controversos motivam pesquisas para determinar se pistas ambientais olfativas ou geomagnéticas são realmente o mapa de navegação ou se há processamento nervoso comum que poderia explicar as diferenças nas interpretações de dados experimentais com limitações olfativas ou magnetoceptivas. Havendo correlações, poderia ser possível esclarecer a controvérsia, pois os dois estímulos utilizariam vias neuronais comuns durante o comportamento de orientação e navegação, e interferência em um interferiria no outro também. Assim, é essencial promover experimentos visando compreender as bases neurobiológicas, fisiológicas e cognitivas, com o

auxílio de técnicas como imunohistoquímica e o gene de resposta imediata ZENK, relacionadas à sensibilidade desses animais aos diferentes estímulos ambientais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar áreas de ativação olfatória no encéfalo de pombos-correios, supostamente relacionadas com comportamento de navegação, a partir da aplicação de estímulo magnético e olfativo, utilizando o gene de resposta imediata ZENK como marcador.

2.2 Objetivos específicos

Investigar possíveis interações de áreas corticais relacionadas com as vias olfativa e magnetoceptiva, verificando ativações de áreas do encéfalo de pombos-correios associadas a estímulos magnéticos e olfativos.

Identificar, através da técnica de imunohistoquímica por peroxidase, a expressão da proteína ZENK no encéfalo de pombos-correios pelo efeito de estímulos olfativos e magnéticos.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizados 25 pombos-correios (*Columba livia*), adultos, de ambos os sexos, provenientes de criadores filiados à Federação Paulista de Columbofilia e de fontes comerciais de São Paulo. Os animais tiveram acesso à ração e à água *ad libitum* e foram mantidos em foto período de 12 h/ 12 h, ciclo claro e escuro, com temperatura a 25 °C.

3.2 Desenvolvimento de sistema fechado de estimulação olfativa

Visando minimizar a interferência do ar externo, principalmente durante a aplicação do estímulo olfatório, foi desenvolvido um sistema fechado para realizar os experimentos. Dentro da caixa de madeira, foi colocado um sistema removível, feito a partir de duas garrafas de politereftalato de etileno (PET) interligadas, no qual o animal foi inserido durante a aplicação dos estímulos, esquematizado na figura 1.

Em uma extremidade foi acoplada um tubo de teflon (material que não impregna odores), conectado a um kitassato contendo a determinada solução, acoplado a uma bomba de ar utilizado em aquários. Na extremidade oposta foi conectado um tubo de teflon, ligado a um dissipador de ar, para permitir a saída de ar do sistema. Quando a bomba era ligada, promovia borbulhamento da solução contida no kitassato, permitindo que o fluxo de ar com a substância odorante passasse pelo sistema, enquanto o dissipador permitia a saída do ar para o ambiente. Vale ressaltar que as garrafas PET eram trocadas entre os estímulos, para evitar ocorrência de impregnação do odor.

Figura 1 – Esquema do sistema fechado de estimulação olfativa.

3.3 Equipamento de estimulação magnética

O campo magnético foi aplicado com dois pares de bobinas de Helmholtz, iguais, circulares e dispostas com os dois eixos perpendiculares entre si. Possuem espiras em igual número e são conectadas em paralelo. Portanto, apresentam correntes iguais (Figura 2a e b). De acordo com a geometria de Helmholtz, a distância entre duas bobinas equivale ao raio de cada uma delas, sendo os raios 182 mm e 200 mm neste experimento. Essa disposição permite maior volume possível de campo magnético homogêneo na região da cabeça do pombo (apenas 1% de variação em um volume que inclui 60% da separação das bobinas, ou seja, uma esfera de diâmetro 110 mm).

O estímulo aplicado foi gerado por uma corrente variável, com valores entre zero e o necessário para gerar um campo magnético no plano horizontal igual ao componente horizontal do campo geomagnético.

Figura 2 – a: vista lateral. b: vista superior e externa da caixa utilizada durante os experimentos, envolvida por dois pares de bobinas de Helmholtz.

3.4 Protocolo experimental

Para realização do experimento, os pombos foram separados em cinco grupos, como mostrado no quadro 1.

Quadro 1 - Separação dos grupos que participaram dos experimentos.

Grupos	Estímulo magnético	Estímulo olfativo	Oclusão de narinas
1 Magnético Experimental (ME)	Sim	Não	Sim
2 Magnético Controle (MC)	Não	Não	Sim
3 Super Controle (SC)	Não	Não	Não
4 Olfatório Experimental (OE)	Não	Sim	Não
5 Olfatório Controle (OC)	Não	Sim	Sim

Grupo 1: Os animais receberam apenas estimulação magnética, evitando-se ao máximo a interferência de odores ambientais com oclusão de narinas, com o objetivo de evitar conflitos durante a interpretação dos dados.

Grupo 2: Controle do grupo 1, com objetivo de analisar as mesmas áreas cerebrais, nas mesmas condições, sem apresentar estímulo magnético.

Grupo 3: O super-controle refere-se a um grupo controle puro, cujos estímulos não são apresentados e as narinas não são tampadas. Este grupo permitiu observar a condição cerebral apresentada pelos animais apenas por estarem contidos na caixa e eventuais diferenças geradas por oclusão de narinas.

Grupo 4: Os animais receberam apenas estimulação olfativa. Este grupo também permitiu comparação com o grupo 1, para avaliar eventuais semelhanças ou diferenças nas ativações de áreas cerebrais.

Grupo 5: Controle do grupo 4, para observar diferenças na atividade de áreas cerebrais relacionadas com a olfação, na condição de oclusão de narinas.

3.5 Período de adaptação

Cada pombo foi imobilizado fisicamente no biotério e transportado à sala de experimentação e colocado em uma caixa de madeira, acusticamente blindada, com dois pares

de bobinas de Helmholtz acopladas, permanecendo cerca de 1 h por dia, durante pelo menos cinco dias consecutivos. Neste período não houve aplicação de estímulos, de modo a apenas habituá-los ao estresse da manipulação.

3.6 Estimulação olfativa e magnética

O animal foi colocado no sistema de circulação fechado de ar, dentro de uma caixa de madeira, durante os estímulos magnético e olfatório.

Durante um intervalo de 30 minutos, o estímulo magnético aplicado consistiu em um campo magnético uniforme com grande homogeneidade, gerado por dois pares de bobinas de Helmholtz iguais e dispostas ao longo do mesmo eixo, com direção variando aleatoriamente e intensidade semelhante ao do campo magnético terrestre ($50 \mu\text{T}$). Ao variar o campo magnético gerado pelas bobinas, o pombo variaria seu alinhamento com o campo magnético terrestre, simulando a situação de mudanças de rumos em seu voo. Ao alterar manualmente a corrente da bobina, produziu-se um campo magnético total orientado à 90° à esquerda do norte magnético. A presença do campo magnético gerado pelas bobinas foi confirmada pelo movimento da agulha de uma bússola (de norte à noroeste).

O estímulo olfativo consistiu na apresentação de substâncias odoríferas diluídas em água deionizada (1:100), utilizando um kitassato, na seguinte sequência por 30 minutos, em ciclos de 30 segundos: 30" de apresentação de essência de banana e 30" de apenas água deionizada; 30" de essência de lavanda e 30" de água deionizada; 30" essência de laranja e 30" de água deionizada; 30" de essência de eucalipto e 30" de água deionizada. Esta sequência foi adotada para evitar habituação aos odores e permitir ativação de áreas olfatórias. Segundo Sieck e Wenzel (1969), os animais são sensíveis às substâncias presentes nas essências, tais como amil acetato, e apresentaram mudança na atividade elétrica do bulbo olfatório em experimentos eletrofisiológicos, assim como mudança nas frequências respiratória e cardíaca.

Para promover a oclusão das narinas dos animais, foi utilizado silicone de condensação removível, Xantopren[®] (Heraeus Kulzer GmbH, Gruner Weg 11, Hanau, Alemanha) o qual, segundo Patzke et al. (2010), é eficiente para bloquear informações olfatórias provenientes do ambiente, sem causar danos ao animal.

3.7 Processamento dos tecidos

No período de 90 minutos após apresentar o estímulo, devido ao pico de expressão da proteína ZENK, o pombo foi anestesiado com ketamina 5 mg/ 100 g (peso corpóreo) e xylazina 1 mg/ 100 g, intraperitonealmente. Em seguida, o animal foi perfundido transcardinalmente, com solução fisiológica tamponada 0,9% (volume proporcional ao dobro do peso do animal) à 40 °C e 600 mL de paraformaldeído (PFA) 4%, em tampão fosfato de sódio (PB ou *Phosphate Buffer* 0,1 M).

Após o processo de perfusão, o encéfalo foi removido e pós-fixado em PFA 4% em PB 0,1 M por 4 h, à 4 °C, seguida de transferência para a solução de sacarose 30% para crioproteção, cuja saturação ocorre em 48 h. Foram feitas secções coronais seriadas de 30 μ m do encéfalo e colocados em compartimentos com PB 0,1 M, separados e armazenados.

3.8 Imunohistoquímica

As séries de cortes escolhidas foram lavadas com PB - 0,1 M em agitação constante durante 10 minutos. Em seguida, foram incubados em anticorpo IgG policlonal contra proteína ZENK em coelho (EGR-1 rabbit, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, sc-189), com concentração de 1:100, em solução de bloqueio PB contendo 0,3% Triton X-100 e soro normal de jumento (5%), por 48 h, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o material foi lavado em solução tampão PB 0,1 M em agitação constante, 3 vezes de 10 minutos para retirar anticorpos não ligados.

Posteriormente, foi feita incubação com anticorpo secundário conjugado com biotina, anti-coelho feito em jumento na concentração de 1:200 (Vector Labs. Burlingame, CA) em 0,3% de Triton X-100, em temperatura ambiente por duas horas. O material foi novamente lavado em solução tampão PB 0,1 M em agitação constante, 3 vezes de 10 minutos, após o período de incubação.

Em seguida, os cortes foram incubados em solução de complexo avidina-biotina (*Kit* Elite Vectastain ®ABC, Vector Laboratories), em concentração de 1:100 em 0,3% de Triton X-100 ABC, contendo NaCl 0,4M, por duas horas. Após a incubação em temperatura ambiente, o material foi novamente lavado 3 vezes de 10 minutos em PB - 0,1 M.

Finalmente, o material foi revelado com solução cromógena de 0,05% de tetrahidroclorato de diaminobenzidina (DAB; Sigma). Os cortes foram pré-incubados em solução de alíquota de DAB diluída em 100 mL de PB 0,1 M, por cerca de cinco minutos. Em

seguida, foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio H_2O_2 0,3% (100 μ de H_2O_2 em 10 mL de H_2O destilada). A reação foi deixada até que os cortes apresentassem coloração amarronzada. Após tal processo, o material foi novamente lavado em solução tampão PB 0,1 M várias vezes em agitação constante, para inativar a reação do DAB.

Os tecidos foram montados em lâminas gelatinizadas (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) e deixados para secar em placa quente à 37 °C, por pelo menos 48 h. Após este processo, as lâminas foram lavadas por cinco minutos em água destilada, sendo em seguida, banhadas em tetróxido de ósmio 0,03% de 15 a 30 segundos e lavadas novamente em água destilada, por cinco minutos, para retirar o excesso de tetróxido de ósmio. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em séries de etanol em concentração crescente (70%, 90% e 100% I e 100% II), com duração de cinco minutos em cada banho e mais duas séries de banho em xilol, por dez minutos cada. Finalmente, as lâminas foram cobertas com Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ) e lamínula.

3.9 Análise dos dados

As lâminas foram observadas sob microscopia de campo-claro e a contagem efetuada por densidade de núcleos marcados por ZENK no bulbo olfatório, no córtex pré-piriforme e no córtex piriforme, utilizando o *software* Image J (versão 1.46q). O BO foi amostrado em três áreas (ventral, medial e lateral) de 200 x 200 μ m, o CPP em uma área (lateral) de 200 x 200 μ m e CPi em uma área de 100 x 300 μ m, conforme detalhado abaixo. Para análise estatística dos dados foi utilizado o *software* Graphpad Prism 5, a partir do qual foi aplicado teste ANOVA de 1 via, adotando teste *post-hoc* de Bonferroni. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Marcação dos tecidos por ZENK

A figura 3 mostra as áreas analisadas nas regiões dos BO e CPP e a figura 4 mostra a área analisada no Cpi. As figuras 5, 6, 7, 8 e 9 mostram as regiões nas quais foram realizadas as contagem das células marcadas com ZENK nos grupos controles e experimentais.

Figura 3 – Corte transversal de encéfalo de pombo ($30\ \mu\text{m}$). Áreas selecionadas para análise de células imunorreativas no CPP, representado por um quadrado vermelho e do BO, representado por quadrados pretos. Microscopia de campo claro. Aumento: 6x3.

Figura 4 – Corte transversal de encéfalo de pombo ($30\ \mu\text{m}$). Área selecionada para análise de células imunorreativas no CPi. Microscopia de campo claro.

Figura 5 – Corte transversal do encéfalo de pombo na região do BO ventral. As marcações amarronzadas, mais escuras, representam as células marcadas com ZENK no período de 1 h 30 min após a aplicação do estímulo. **a:** (esquerda) grupo sem estimulação magnética com narinas tampadas (MC) e (direita) grupo recebeu estímulo magnético com narinas tampadas (ME); **b:** grupo sem estimulação e sem oclusão de narinas (SC); **c:** (esquerda) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas tampadas (OC) e (direita) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas abertas (OE). Escala: 20 μ m.

5a)

5b)

5c)

Figura 6 – Corte transversal do encéfalo de pombo na região do BO lateral. As marcações amarronzadas representam as células marcadas com ZENK no período de 1h 30 min após a aplicação do estímulo. . **a:** (esquerda) grupo sem estimulação magnética com narinas tampadas (MC) e (direita) grupo recebeu estímulo magnético com narinas tampadas (ME); **b:** grupo sem estimulação e sem oclusão de narinas (SC); **c:** (esquerda) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas tampadas (OC) e (direita) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas abertas (OE).

6a)

6b)

6c)

Figura 7 – Corte transversal do encéfalo de pombo na região do BO medial. As marcações amarronzadas representam as células marcadas com ZENK no período de 1 h 30 min após a aplicação do estímulo. . **a:** (esquerda) grupo sem estimulação magnética com narinas tampadas (MC) e (direita) grupo recebeu estímulo magnético com narinas tampadas (ME); **b:** grupo sem estimulação e sem oclusão de narinas (SC); **c:** (esquerda) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas tampadas (OC) e (direita) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas abertas (OE).

7a)

7b)

7c)

Figura 8 - Corte transversal do encéfalo de pombo na região do CPP. As marcações amarronzadas representam as células marcadas com ZENK no período de 1 h 30 min após a aplicação do estímulo. **a:** (esquerda) grupo sem estimulação magnética com narinas tampadas (MC) e (direita) grupo recebeu estímulo magnético com narinas tampadas (ME); **b:** grupo sem estimulação e sem oclusão de narinas (SC); **c:** (esquerda) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas tampadas (OC) e (direita) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas abertas (OE). Escala: 20 μm .

8a)

8b)

8c)

Figura 9 - Corte transversal do encéfalo de pombo na região do CPi. As marcações amarronzadas representam as células marcadas com ZENK no período de 1 h 30 min após a aplicação do estímulo. **a:** (esquerda) grupo sem estimulação magnética com narinas tampadas (MC) e (direita) grupo recebeu estímulo magnético com narinas tampadas (ME); **b:** grupo sem estimulação e sem oclusão de narinas (SC); **c:** (esquerda) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas tampadas (OC) e (direita) grupo recebeu estímulo olfatório com narinas abertas (OE). Escala: 20 μ m.

9a)

9b)

9c)

4.2 Análise qualitativa das marcações por ZENK

Nos quadros 2, 3 e 4 estão representadas uma visão geral da imunorreatividade *zenk* observada nas regiões do Bulbo Olfatório, Córtex Pré-piriforme e Córtex Piriforme dos animais pertencentes aos 5 grupos, através de uma análise qualitativa.

Quadro 2 - Análise qualitativa da imunorreatividade ZENK no Bulbo Olfatório dos animais submetidos aos estímulos magnético, olfatório ou sem estímulos. SC: Super-controle; MC: magnético controle; ME: magnético experimental; OC: Odor controle; OE: Odor experimental; (+++) marcação intensa da imunorreatividade *zenk*; (++) moderada; (+) escassa. Não houve corte histológico sem nenhuma marcação.

Imunorreatividade ZENK no BO					
	GRUPOS				
ANIMAIS	OE	OC	ME	MC	SC
1	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)
3	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
5	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)

Quadro 3 - Análise qualitativa da imunorreatividade ZENK no Córtex Pré-piriforme dos animais submetidos aos estímulos magnético, olfatório ou sem estímulos. Grupos: SC: Super-controle; MC: magnético controle; ME: magnético experimental; OC: Odor controle; OE: Odor experimental; (+++) marcação intensa da imunorreatividade *zenk*; (++) moderada; (+) escassa. Não houve corte histológico sem nenhuma marcação.

Imunorreatividade ZENK no CPP					
	GRUPOS				
ANIMAIS	OE	OC	ME	MC	SC
1	(+++)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)
3	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	(+++)	(+)	(+)	(+)	(++)
5	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)

Quadro 4 - Análise qualitativa da imunorreatividade ZENK no Córtex Piriforme dos animais submetidos aos estímulos magnético, olfatório ou sem estímulos. Grupos: SC: Super-controle; MC: magnético controle; ME: magnético experimental; OC: Odor controle; OE: Odor experimental; (+++) marcação intensa da imunorreatividade *zenk*; (++) moderada; (+) escassa. Não houve corte histológico sem nenhuma marcação.

Imunorreatividade ZENK no CPi					
	GRUPOS				
ANIMAIS	OE	OC	ME	MC	SC
1	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)
3	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
4	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)
5	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)

Os dados acima apresentados, embora qualitativos, mostram que há clara tendência à maior marcação, nas estruturas estudadas (BO, CPP e CPi), em animais submetidos aos estímulos olfativos e com narinas livres (OE), do que em qualquer outra condição. Com estimulação magnética (ME) não houve aumento de marcação em relação ao grupo controle (MC), o que primeiramente faz pensar na ausência de interferência entre vias olfatórias e magnéticas nessas estruturas.

4.3 Análise quantitativa das marcações por ZENK

A análise quantitativa realizada no BO (figura 10), no CPP (figura 11) e CPi (figura 12).

Figura 10 – Número médio de células com imunorreatividade ZENK positiva no BO dos cinco grupos analisados. (*) $p \leq 0,05$ e (***) $p \leq 0,0001$. Grupos: MC (magnético controle); ME (magnético experimental); SC (super-controle); OC (odor controle); OE (odor experimental).

Como esperado, observou-se intensa imunorreatividade ZENK nos animais expostos ao estímulo olfatório sem oclusão de narinas (OE), com significância de $p \leq 0,0001$, em relação aos demais grupos. Com oclusão de narinas e exposição a odores (OC), houve a marcação das células decaiu pela metade. O grupo super-controle, sem estímulos e narinas abertas (SC) apresentou marcação intermediária, com significância de $p \leq 0,05$, em relação aos grupos com oclusão de narinas sem exposição a estímulos (MC) e aquele exposto ao estímulo magnético (ME). Entre os grupos com oclusão de narinas, observou-se maior marcação no grupo apresentado a odores (OC) em relação aos demais, enquanto o grupo exposto ao estímulo magnético apresentou marcação semelhante àquele sem estimulação. Não houve diferenças estatísticas entre esses grupos.

Figura 11 - Número médio de células com imunorreatividade ZENK positiva no CPP dos cinco grupos analisados. (*) $p \leq 0,05$ e (***) $p \leq 0,0001$. Grupos: MC (magnético controle); ME (magnético experimental); SC (super-controle); OC (odor controle); OE (odor experimental).

Com relação ao CPP, também observou-se intensa imunorreatividade zenk nos animais expostos aos estímulos olfatórios com narinas abertas (OE), com diferença estatística significativa de $p \leq 0,0001$ em relação aos demais grupos. Com oclusão de narinas e presença de odores, houve diminuição na ativação das células pela metade (OC). O grupo super-controle, sem estimulação e narinas abertas (SC) apresentou marcação intermediária, com significância estatística em relação aos grupos com oclusão de narinas: $p \leq 0,05$ aos grupos exposto à odores com oclusão de narinas (OC) e sem exposição a estímulos (MC) e $p \leq 0,0001$ ao grupo estimulação magnética. Os grupos com oclusão de narinas, com estimulação magnética (ME) e sem estimulação não apresentaram diferença estatística significativa, embora seja possível observar, claramente, maior ativação celular naquele exposto ao campo magnético.

Figura 12 - Número médio de células com imunorreatividade ZENK positiva no CPi dos cinco grupos analisados. (*) $p \leq 0,05$, (**) $p \leq 0,001$ e (***) $p \leq 0,0001$. Grupos: MC (magnético controle); ME (magnético experimental); SC (super-controle); OC (odor controle); OE (odor experimental).

No CPi a ativação das células segue o mesmo padrão das outras estruturas olfatórias analisadas, conforme pode-se verificar comparando as figuras 7, 8 e 9. Houve maior atividade no grupo exposto a odores com narinas abertas (OE) em relação aos demais grupos, com diferença estatística significativa de $p \leq 0,0001$. O grupo sem exposição a estímulos e narinas abertas apresentou maior marcação do que os dois grupos com oclusão de narinas sem estimulação olfativa: $p \leq 0,001$ ao grupo sem estimulação (MC) e $p \leq 0,0001$ ao grupo com estimulação magnética (ME). Não foi observada diferença estatística entre grupos MC e ME, os quais apresentaram semelhança na atividade celular.

5 DISCUSSÃO

Wallraff (2005) e Patzke et al. (2011) afirmam que pistas olfativas são necessárias para navegar, pois manipulações no sistema olfatório, como bloquear a passagem de ar sobre as mucosas olfatórias ocluindo as narinas, usar anestésicos locais, seccionar os nervosolfatórios ou ablação do CPi, geram prejuízos na orientação inicial e no desempenho de *homing*. Odores atmosféricos e o campo geomagnético são considerados os dois substratos ambientais mais importantes no comportamento de navegação e orientação em aves. Dessa maneira, alguns pesquisadores (Gagliardo et al., 2006, 2009a,b; Mora et al., 2004) sugerem que manipulações do sistema olfatório poderia, de alguma maneira, interferir com a sensibilidade ao campo geomagnético, sendo esta a razão das intensas discussões referentes ao tema. Visando averiguar tal especulação, algumas áreas encefálicas relacionadas com a olfação em pombos-correios foram analisadas neste estudo para verificar se são ativadas não apenas por estímulos olfatórios, mas também magnéticos.

Os dados obtidos mostram que a marcação por IEG ZENK das estruturas estudadas (BO, CPP e CPi) é um método de investigação eficiente, ocorrendo intensa marcação das células no grupo exposto aos diferentes odores com narinas abertas (grupo OE), como seria de se esperar pelos estudos realizados por Patzke et al. (2011). Estes autores reavaliaram projeções do bulbo olfatório, assim determinando a hodologia da via olfatória e as estruturas envolvidas, que incluem CPP e CPi. Ao bloquear a mucosa olfativa, essa ativação diminui de forma significativa (grupo OC). A marcação intermediária de ZENK observada no grupo SC com relação aos outros grupos, sugere que haja estímulo olfatório basal no ar, ativando as áreas investigadas. Assim sendo, ao ocluir as narinas com xantopren®, ocorre diminuição da marcação (MC, ME < SC). É interessante notar que o bloqueio não é completo, pois mesmo com as narinas tampadas com xantopren® houve ligeiro aumento nas marcações das células na presença de moléculas odorantes (OC > MC, ME).

Resultados obtidos em estudo anterior realizado no laboratório por Hirata (2008), apresentaram, de forma inédita, ativação de ZENK no CPP após estimulação magnética, mas com significância marginal ($p = 0,051$). No entanto, tal resultado não se confirmou no presente estudo. Os dados obtidos ao analisar o BO, CPi e CPP dos animais expostos apenas ao estímulo magnético (ME) não revelaram aumento significativo de marcação em relação ao seu controle (MC), indicando que a estimulação magnética não resulta em ativação significativa dessas áreas. Visualmente, não apenas nos experimento de Hirata (2008), mas também no presente trabalho, se considerar toda a região do CPP, é possível observar discreto

aumento de células marcadas no grupo exposto ao estímulo magnético em comparação ao controle não exposto ao estímulo magnético. Diferenças entre o trabalho de Hirata (2008) e o presente estudo possivelmente decorrem do efeito adicional de oclusão de narinas para evitar a interferência de odores, que pode ter contribuído para menor ativação, sendo esta a única diferença nas duas condições experimentais. A oclusão das narinas é um método não invasivo. Portanto, não há lesões ou uso de anestésicos, o que garante maior integridade da via olfatória e da mucosa olfativa. Porém Lipp (comunicação verbal)³ conjecturou que o fluxo de ar fosse importante para ativação de células situadas na região da mucosa olfativa e sensíveis ao campo geomagnético, o que é consistente com a diferença entre os dados de Hirata (2008) e do presente trabalho.

Experimentos realizados por Meskenaite et al. (2013) sugerem que o sistema olfatório de pombos seja multimodal, recebendo e processando informações tanto magnéticas quanto olfatórias concomitantemente. Estes pesquisadores relatam que animais expostos apenas a um estímulo magnético (condição I) apresentam intensa marcação de ZENK no BO, significativamente maior que o grupo controle. Por outro lado, a expressão reduziu no grupo com as mucosas olfativas tratadas com ZnSO_4 , expostos (condição II) ou não (condição III) ao estímulo magnético. Há concordância na baixa expressão de ZENK no BO nas condições (II) e (III) de Meskenaite et al. (2013) e no presente estudo, o qual revela queda na expressão de ZENK quando as narinas são ocluídas (grupos MC e ME). Em ambas situações, os pombos são anósmicos, porém, nas condições (II) e (III) há interferência no processo biológico (lesão reversível da mucosa olfativa) enquanto, no presente estudo, por uma mera barreira física.

Meskenaite et al. (2013) observou aumento na marcação de ZENK no CPi do grupo exposto apenas ao estímulo magnético (condição I) em relação ao grupo controle; ligeiro aumento na expressão de ZENK no grupo tratado com ZnSO_4 + exposto ao estímulo magnético (condição II); e significativa diminuição da marcação no grupo apenas tratado com ZnSO_4 (condição III). Já no presente estudo não se observou aumento significativo da expressão de ZENK no CPi em animais expostos ao estímulo magnético (grupo ME).

Com relação ao CPP, que no presente estudo apresentou discreto aumento na expressão de ZENK no grupo ME, embora não significante, não pôde ser comparado aos estudos de Meskenaite et al. (2013), pois esta estrutura não foi analisada.

Diferenças entre os resultados do presente estudo e dos realizados por Meskenaite et al. (2013) provavelmente se originam no protocolo e na metodologia. Nos estudos de

³ Informação fornecida por Hans-Peter Lipp na conferência “BioNav: The application of animal navigation techniques in autonomous vehicles”, Inglaterra, abril, 2013.

Meskenaite et al. (2013), os animais podiam se mover livremente dentro de uma caixa plástica durante a realização dos experimentos e⁴ foram expostos a um campo magnético produzido por um ímã permanente que se deslocava em movimento circular, com grande variação de intensidade (16 a 187 μ T), com quantificação dos dados efetuada por contagem estereológica.

Já no presente trabalho, foram utilizados materiais que não impregnam odores e os animais estavam imobilizados durante o tempo do experimento, com quantificação dos dados por densidade de núcleos marcados. Essas nuances poderiam ter contribuído para a diferença de ativação em algumas áreas corticais nos dois estudos. Alternativamente, o estímulo magnético aplicado no presente estudo (50 μ T) com rotação oscilatória de amplitude 45° no plano horizontal pode não ter sido adequado para gerar suficiente atividade celular. Sendo este o caso, é difícil de se compreender como é possível que a sublime sensibilidade necessária para navegar pelo campo geomagnético seja compatível com a não marcação por um estímulo como efetuado no presente experimento, e sim no estímulo que Meskenaite et al. (2013) aplicaram.

Muitas hipóteses referentes à existência de receptores sensíveis ao campo geomagnético foram propostas: receptores na lagena no ouvido interno (WU; DICKMAN, 2011, 2012), no bico superior inervado pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo (Fleissner et al. 2003, 2007; Wiltschko, R. et al. 2010), mucosa olfativa (MESKENAITE et al. 2013) e na retina do pombo (BIRO, D., 2010). Contudo, apenas para a retina tem sido proposto um mecanismo biofísico preciso, baseado em pares de radicais. Marcadores de atividade neuronal, como IEG ZENK e c-fos, utilizados para a identificação de áreas encefálicas ativadas por estímulos magnéticos apresentaram resultados promissores envolvendo o núcleo principal e o núcleo do trato espinal do complexo trigeminal no tronco encefálico, regiões que recebem aferências primárias do nervo trigêmeo (HEYERS et al. 2010), núcleo vestibular posterior, tálamo dorsal, hipocampo, hiperpallium visual (WU; DICKMAN, 2011), o bulbo olfatório e córtex piriforme (MESKENAITE, et al., 2013). Porém a suposta “via magnetoceptiva” ainda permanecem desconhecida. Segundo Lohmann, K.; Lohmann, F.; Putman et al. (2007), uma das razões que torna a investigação tão difícil é que, enquanto a visão e o olfato necessitam de contato com o ambiente externo para terem sua via ativada, o campo magnético pode passar livremente pelo tecido biológico e, portanto, os magnetoceptores poderiam ser encontrados em qualquer parte do organismo.

Recentemente, um estudo relacionado ao mecanismo de magnetorecepção sugere que os agrupamentos celulares ricos em ferro na maxila do pombo, potencialmente inervados pelo ramo oftálmico do nervo trigêmeo, sejam na realidade, macrófagos, sendo também encontrados em outras regiões do corpo do animal (TREIBER et al., 2012). Assim, esses depósitos de minério de ferro não estariam vinculados a neurônios sensíveis ao campo geomagnético, mas teriam uma função mais geral.

Mouritsen e Ritz (2005) ainda acrescentam que há muitas questões envolvidas na escassez de conhecimento sobre a sensibilidade magnética de aves. Além do biomagnetismo ser um fenômeno pouco estudado, não há anticorpos comerciais específicos contra proteína de aves. Tampouco há desenvolvimento e diversificação de técnicas mais sofisticadas para investigar os mecanismos neurobiológicos, moleculares e fisiológicos, ou pesquisas produzindo aves transgênicas para realização de estudos. Dessa maneira, o estudo do biomagnetismo, tem relevância não apenas na habilidade de orientação e navegação em aves, mas é um tema bastante intrigante academicamente por gerar resultados experimentais muitas vezes controversos, contraditórios ou pouco reprodutíveis, mostrando-se um desafiador problema científico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo não confirmam resultados anteriores, obtidos no mesmo laboratório, que indicavam participação da via olfatória em mecanismos relacionados à magnetoccepção. Correlação entre esses dois sistemas sensoriais poderia esclarecer as origens de controvérsias quanto à relativa importância de pistas olfativas e geomagnéticas na orientação de pombos correios. Pelos dados aqui apresentados, o processamento central de pistas magnéticas não estaria relacionado às estruturas BO, CPP e CPi. Outras áreas encefálicas poderiam ser analisadas para esclarecer se é possível encontrar alguma estrutura encefálica sensível a estímulos magnéticos.

Seria importante também realizar estudos em que os animais são expostos ao estímulo magnético e com narinas abertas, além de animais combinando estímulo magnético e odorante, sempre com as narinas abertas, para averiguar a possibilidade de ocorrer somação e marcação de mais células nas estruturas envolvidas com a olfação. Esses grupos, além de fechar a gama de possibilidades experimentais, representariam a condição mais natural dos animais durante o voo.

Estudos com utilização de diferentes anticorpos, como c-Fos, também seriam interessantes, pois sua sensibilidade para marcar áreas cerebrais poderia possibilitar a análise de outras estruturas, principalmente aquelas não responsivas ao ZENK (como é o caso do núcleo da Raiz Óptica Basal, nBOR).

REFERÊNCIAS

- ABLE, K. P. The debate over olfactory navigation by homing pigeons. **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 121–124, 1996.
- BALTHAZART, J.; TAZIAUX, M. The underestimated role of olfaction in avian reproduction? **Behavioural Brain Research**, v. 200, p. 248-259, 2009.
- BEASON, R. C. Mechanisms of magnetic orientation in birds. **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 565–573, 2005.
- BENVENUTI, S.; GAGLIARDO, A. Homing behaviour of pigeons subjected to unilateral zinc sulphate treatment of their olfactory mucosa. **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 2531-2535, 1996.
- BINGMA N, V. P.; IOALÈ, P. Initial orientation of anosmic homing pigeons based on information gathered at familiar release sites remains homeward direct following clock-shift. **Behavior**, v. 110, p. 205-218, 1989.
- BIRO, D.; MEADE, J.; GUILFORD, T. Familiar route loyalty implies visual pilotage in the homing pigeon. **PNAS**, v. 101, n. 50, p. 17440-17443, 2004.
- BIRO, D. Bird navigation: a clear view of magnetoreception. **Current Biology**, v. 20, n.14, p. R595-R596, 2010.
- BLAKEMORE, R. Magnetotactic bacteria. **Science**, v. 140, n. 4212, p. 377-379, 1975.
- BRAITHWAITE, V. A.; GUILFORD, T. C. Recognition of Familiar Visual Landmarks in Homing Pigeons. **Journal of Navigation**, v. 46, n. 3, p. 371-375, 1993.
- DAVIS, S.; BOZON, B.; LAROCHE, S. How necessary is the activation of the immediate early gene *zif* 268 in synaptic plasticity and learning? **Behavior brain Research**, v. 142, p. 17-30, 2003.
- FALKENBERG, G.; FLEISSNER, G.; SCHUCHARDT, K.; KUEHBACHER, M.; THALAU, P.; MOURITSEN, H.; HEYERS, D.; WELLENREUTHER, G.; FLEISSNER, G. Avian magnetoreception: Elaborate iron mineral containing dendrites in the upper beak seem to be a common feature of birds. **Plos One**, v. 5, n. 2, p.1-9, 2010.
- FLEISSNER, G.; HOLTKAMP-ROTZLER, E.; HANZLIK, M.; WINKLHOLFR, M.; FLEISSNER, G.; PETERSEN, N.; WILTSCHKO, W. Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. **Journal of comparative neurology**, v. 458, p. 350-360, 2003.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

FLEISSNER, G.; STAHL, B.; THALAU, P.; FALKENBERG, G. A novel concept of Ferromagnetic-based magnetoreception: histological and physicochemical data from the upper beak of homing pigeons. **Naturwissenschaften**, v. 94, p. 631-642, 2007.

GAGLIARDO, A.; MAZOTTO, M.; BINGMAN, V. P. Piriform cortex ablations block navigational map learning in homing pigeons. **Behavioural Brain Research**, v. 86, p. 143-148, 1997.

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; BINGMAN, V. P. Homing in Pigeons: the role of the hippocampal formation in the representation of landmarks used for navigation. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 311-315, 1999.

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; ODETTI, F.; BINGMAN, V. P. The ontogeny of the homing pigeon navigational map: evidence for a sensitive learning period. **Proc. R. Soc. Lond. B**, v. 268, p. 197-202, 2001.

GAGLIARDO, A.; ODETTI, F.; IOALÈ, P.; PECCHIA, T.; VALLORTIGARA, G. Functional asymmetry of left and right avian piriform cortex in homing pigeons' navigation. **European Journal of neuroscience**, v. 22, p. 189-194, 2005.

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; SAVINI, M.; WILD, J. M. Having the nerve to home: trigeminal magnetoreceptor *versus* olfactory mediation of homing in pigeons. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2888-2892, 2006.

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; SAVINI, M.; WILD, J. M. Olfactory navigation in homing pigeons: the last challenge. **International Symposium of Olfaction and Taste. Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 434-437, 2009. a

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; SAVINI, M.; WILD, J. M. Navigational abilities of adult and experienced homing pigeons deprived of olfactory or trigeminally mediated magnetic information. **The Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 19 p. 3119-3124, 2009. b

GAGLIARDO, A.; IOALÈ, P.; FILANNINO, C.; WIKELSKI, M. Homing pigeons only navigate in air with intact environment odours: a test of the olfactory activation hypothesis with GPS data loggers. **Plos One**, v. 6, n. 8, p. 1-14, 2011.

GAGLIARDO, A.; BRIED, J.; LOMBARDI, P.; LUSCHI, P.; WIKESKI, M.; BONADONNA, F. Oceanic navigation in Cory's Shearwaters: evidence for a crucial role of olfactory cues for homing after displacement. **Journal of Experimental Biology**, 2013. In press.

HAGSTRUM, J. T. Atmospheric propagation modeling indicates homing pigeons use loft-specific infrasonic 'map' cues. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 687-699, 2013.

HARTWICK, R. F.; FOÀ, A.; PAPI, F. The effect of olfactory deprivation by nasal tubes upon homing behavior in pigeons. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v. 2, p. 81-89, 1977.

HEYERS, D.; ZAPKA, M.; HOFFMEISTER, M.; WILD, J. M.; MOURITSEN, H. Magnetic field changes activate the trigeminal brainstem complex in a migratory bird. **PNAS**, v. 107, n. 20, p. 9394-9399, 2010.

HIRATA, H. H. **Efeito da estimulação magnética na imunorreatividade da proteína ZENK em diferentes regiões do encéfalo de pombos (*Columba livia*)**. 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Universidade de São Paulo: São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://teses.usp.br/teses>> Acesso em: 5 nov. 2010.

HUSBAND, S. A. **Anatomy and function of the Nucleus Accumbens in the pigeon (*Columba livia*)**. 2011. 167 p. Ph. D. Thesis. Department of Psychology, College of Arts and Sciences, University of South Florida, 2004. Disponível em: <<http://scholarcommons.usf.edu/etd/1087>> Acesso em: 17 set. 2011.

KEETON, W. T. Magnets interfere with pigeon homing. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 68, n. 1, p. 102-106, 1971.

KEYON, K. W.; RICE, D. W. Homing of Laysan albatrosses. **The Condor**, v. 60, n. 1, p. 3-7, 1958.

LOHMANN, J. K.; LOHMANN, C. M. F.; PUTMAN, N. F. Magnetic maps in animals: nature's GPS. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 3697-3705, 2007.

LONG, K. D.; SALBAUM, J. M., Evolutionary conservation of the Immediate-Early Gene ZENK. **Molecular biology researches**, v. 15, n. 3, p. 284-292, 1998.

LUSCHI, P.; DALL'ANTONIA, P. Anosmic pigeons orient from familiar sites by relying on the map-and-compass mechanism. **Animal Behavior**, v. 46, p. 1195-1203, 1993.

MATTHEWS, G. V. T. Sun navigation in homing pigeons. **Journal of Experimental Biology**, v. 30, p. 243-267, 1953.

MORA, C. V.; DAVISON, M.; WILD, J. M.; WALKER, M. M. Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon. **Nature**, v. 432, 2004.

MELLO, C. V.; CLAYTON, D. F. Song-induced ZENK gene expression in auditory pathways of songbird brain and its relation to the song control system. **The Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 6652-6666, 1994.

MELLO, C. V.; RIBEIRO, S. ZENK protein regulation by song in the brain of songbirds. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 393, p. 426-438, 1998.

McKEEGAN, D. E. F. Spontaneous and odour evoked activity in single avian olfactory bulb. **Brain Research**, v. 929, p. 48-58, 2002.

McKEEGAN, D. E. F.; DEMMERS, T. G. M.; WATHES, C. M.; JONES, R. B.; GENTLE, M. J. Stimulus-response functions of single avian olfactory bulb neurons. **Brain Research**, v. 953, p. 101-111, 2002.

PAPI, F.; FIORE, L.; FIASCHI, V.; BENVENUTI, S. The influence of olfactory nerve section on the homing capacity of carrier pigeons. **Monit. Zool. Ital. (New Series)**, v. 5, p. 265-267, 1971.

PAPI, F.; CASINI, G. Pigeons with ablated piriform cortex home from familiar but not from unfamiliar sites. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 3783-3787, 1990.

PATZKE, N.; MANNS, M.; GUNTURKUN, O.; IOALÈ, P.; GAGLIARDO, A. Navigation-induced ZENK expression in the olfactory system of pigeons (*Columba livia*). **European journal of neuroscience**, v. 31, p. 2062-2072, 2010.

PATZKE, N.; MANNS, M.; GUNTURKUN, O. Telencephalic organization of the olfactory system in homing pigeons (*Columba livia*). **Neuroscience**, v. 194, p. 53-61, 2011.

PEARCE, J. M.; GEORGE, D. N.; HASELGROVE, M.; ERICHSEN, J. T.; GOOD, M.A. The influence of hippocampal lesions on the discrimination of structure and on spatial memory in pigeons (*Columba livia*). **Behavioral Neuroscience**, v. 119, n. 5, p. 1316-1330, 2005.

SIECK, M. H.; WENZEL, B. Electrical activity of the olfactory bulb of the pigeon. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 26, p. 62-69, 1969.

SCHMIDT-KOENIG, K. Internal clocks and homing. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p. 389-393, 1960.

SHIMIZU, T.; BOWERS, A. N. What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? Selective examination of zenk expression. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 4, p. 845-851, 2004.

STAPPUT, K.; GÜNTÜRKÜN, O.; HOFFMANN, K. P.; WILTSCHKO, R.; WILTSHCKO, W. Magnetoreception of directional information in birds requires nondegraded vision. **Current Biology**, v. 2, p. 1259-1262, 2010.

TREIBER, C. D.; SALZER, M. C.; RIEGLER, J.; EDELMAN, N.; SUGAR, C.; BREUSS, M.; PICHLER, P.; CADIOUX, H.; SAUNDERS, M.; LYTHGOE, M.; SHAW, J.; KEAYS, D. A. Clusters of iron-rich cells in the upper beak of pigeons are macrophages not magnetosensitive neurons. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 367-3710, 2012.

TSCHMEYER, W.; GRIMM, R. Activation of immediate early genes and memory formation. **Cellular and molecular life sciences**, vol. 55, n. 4, p.564-574, 1999.

WALCOTT, C.; GOULD, J. L.; KIRSCHVINK, J. L. Pigeons have magnets. **Science** (New series), v. 205, n. 4410, p. 1027-1029, 1979.

WALCOTT, C. Pigeon homing: observations, experiments and confusions. **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 21-27, 1996.

WALKER, M. M. On a wing and a vector: a model for magnetic navigation by homing pigeons. **Journal of Theoretical Biology**, v. 192, p. 341-349, 1998.

WALLRAFF, H. G. Olfactory deprivation in pigeons: examination of methods applied in homing experiments. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 4, p. 621-629, 1988.

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

WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W. Pigeon homing: change in navigational strategy during ontogeny. **Animal Behavior**, v. 33, p. 583-590, 1985.

WILTSCHKO, W.; WILTSCHKO, R. Magnetic orientation in birds. **The Journal of Experimental Biology**, v. 199, p. 29–38, 1996.

WILTSCHKO, W.; WILTSCHKO, R. Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 445-452, 2002.

WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W. Avian navigation: from historical to modern concepts **Animal Behavior**, v. 65, p. 257–272, 2003.

WILTSCHKO, W.; WILTSCHKO, R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. **Journal of Comparative Physiology**, v. 191, n. 8, p. 675-693, 2005.

WILTSCHKO, R.; SCHIFFNER, I.; FUHMANN, P.; WILTSCHKO, W. The role of magnetite-based receptors in the beak in pigeon homing. **Current Biology**, v. 20, p. 1-5, 2010.

WILTSCHKO, W.; WILTSCHKO, R. Magnetoreception. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 739, p. 126-141, 2012.

WU, L.; DICKMAN, L. D. Magnetoreception in an avian brain in part mediated by inner ear lagena. **Current Biology**, v. 21, n. 5, p. 418-423, 2011.

WU, L.; DICKMAN, L. D. Neural correlates of a magnetic sense. **Science**, v. 336 n. 6084 p. 1054-1057, 2012.

YEAGLEY, H. L.; WHITMORE, F. C. A preliminary study of a physical basis of bird navigation. **Journal of Applied Physics**, v. 18, n. 12, p. 1035-1063, 1951.

YODLOWSKI, M. L.; KREITHEN, M. L.; KEETON, W. T. Detection of atmospheric infrasound by homing pigeons. **Nature**, v. 265, p. 725-726, 1977.