



**UNICAMP**

**FERNANDO CANOVA**

**APRENDIZAGEM DE ESCOLHA ALIMENTAR EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*)  
E IMUNORREAÇÃO PARA AS PROTEÍNAS ZENK E SINAPSINA I NO  
HIPOCAMPO: EFEITOS DO ANTAGONISTA DE RECEPTORES GABA<sub>B</sub>,  
FACLOFENO.**

CAMPINAS  
2014

i





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Instituto de Biologia**



**FERNANDO CANOVA**

**APRENDIZAGEM DE ESCOLHA ALIMENTAR EM POMBOS (*COLUMBA LIVIA*)  
E IMUNORREÇÃO PARA AS PROTEÍNAS ZENK E SINAPSINA I NO  
HIPOCAMPO: EFEITOS DO ANTAGONISTA DE RECEPTORES GABA<sub>B</sub>,  
FACLOFENO.**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade estadual de Campinas, como parte  
dos requisitos exigidos para obtenção do Título  
de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na  
área de Fisiologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL  
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO FERNANDO CANOVA  
E ORIENTADO PELA PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ELENICE APARECIDA  
DE MORAES FERRARI.

CAMPINAS  
2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C165a Canova, Fernando, 1980-  
Aprendizagem de escolha alimentar em pombos (*Columba livia*) e imunorreação para as proteínas Zenk e sinapsina I no hipocampo : efeitos do antagonista de receptores GABA<sub>B</sub>, faclofeno / Fernando Canova. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Aprendizagem espacial. 2. Hipocampo. 3. Memória. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Learning of a food location task in pigeons (*Columba livia*) and immunoreaction for Zenk and Synapsin I protein in the hippocampus : effects of GABA<sub>B</sub> receptor antagonist, Phaclofen

**Palavras-chave em inglês:**

Spatial learning

Hippocampus

Memory

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari [Orientador]

César Renato Sartori

Alexandre César Santos de Rezende

Suzete Maria Cerutti

Carlos Amílcar Parada

**Data de defesa:** 17-03-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de março de 2014

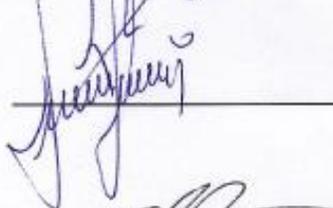
**COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari (Orientadora)



---

Dr. Cesár Renato Sartori



---

Prof. Dr. Alexandre César Santos Rezende



---

Profa. Dra. Maria Andréia Delbin

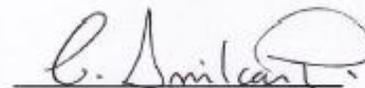
---

Profa. Dra. Suzete Maria Cerutti



---

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada



---

Profa. Dra. Maria Camila Almeida

---

Dra. Emerielle Cristine Vanzela

---



## RESUMO

CANOVA, F. Aprendizagem de escolha alimentar em pombos (*Columba livia*) e imunorreação para as proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo: efeitos do antagonista de receptores GABAB, faclofeno. 2014

A memória espacial tem importante valor para a sobrevivência do organismo. Está relacionada com sua habilidade em utilizar informações que possibilitam a formação de mapas espaciais de acordo com a relevância das relações entre as pistas ambientais. A memória espacial envolve alterações plásticas no hipocampo de roedores e de aves, dentre essas a indução da transcrição de genes de expressão imediata, tais como o *zenk*, que regula a expressão de inúmeros outros genes e proteínas. O gene *zenk* atua na regulação da expressão da proteína Sinapsina. A expressão de sinapsinas também parece estar relacionada com mecanismos sinápticos mediados por receptores GABAB. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, em pombos, a aprendizagem, a consolidação e a persistência da memória espacial em situação de escolha alimentar. A plasticidade neural foi investigada pela análise da imunoreatividade para as proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo. Foram realizados dois experimentos com pombos (*Columba livia*): **Experimento I** avaliou a aprendizagem e memória espacial em animais submetidos ao treino de escolha alimentar em 2 ou 7 sessões de treino. Cada sessão teve 6 tentativas experimentais, numa arena circular com 4 comedouros onde apenas um tinha alimento. A resposta de escolha foi definida como orientar-se, aproximar-se e bicar um comedouro. Foi aplicado também o teste de estratégia espacial, que consistiu em 1 sessão, com 3 tentativas experimentais onde na terceira tentativa foram retirados os comedouros e os animais foram colocados na arena circular para análise do tempo de permanência no quadrante onde antes existia o comedouro com alimento. **Experimento II** avaliou os efeitos do antagonista do receptor GABAB, faclofeno administrado (i.p) imediatamente após as sessões de treino. O teste de persistência da memória espacial foi realizado 7 dias após o treino. A análise imunoistoquímica foi utilizada para avaliação da expressão das proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo. O número de escolhas corretas aumentou em função do treino, variando entre 50 e 88% na primeira e sétima sessões respectivamente (ANOVA,  $p < 0,001$ ). O número de núcleos Zenk - positivos e células Sinapsina I - positivas aumentou no hipocampo de pombos treinados durante 7 sessões (ANOVA,  $p < 0,001$ ). O tratamento com o inibidor do receptor GABAB teve um efeito facilitador nas sessões de treino em comparação com os grupos controles (ANOVA,  $p < 0,001$ ). Os dados indicam que a experiência em escolha espacial desencadeia a ativação de mecanismos sinápticos que resultam na expressão de Zenk e Sinapsina I no hipocampo de pombos, os quais estão envolvidos na consolidação da memória espacial de escolha alimentar. Os efeitos do tratamento com faclofeno sugerem que o receptor GABAB participa destes mecanismos. Em conjunto os presentes dados demonstraram que o pombo é um modelo experimental importante para a análise de mecanismos de plasticidade neural no hipocampo que são conservados entre espécies de mamíferos e aves. Palavras chave: Aprendizagem Espacial; Hipocampo; Proteína Zenk; Sinapsina I; Receptor GABAB



## ABSTRACT

CANOVA,F. Learning of a food location task in pigeons (*Columba livia*) and immunoreaction for Zenk protein and Synapsin I in the hippocampus: Effects of GABAB receptor antagonist, Phaclofen. 2014

The spatial memory has important value for the organism's survival, because it is related with ability to acquire and use space information, enabling the formation of cognitive and spatial maps. The experience with the environment triggers behavioral, cellular and molecular changes in central nervous system that an essential to the formation and consolidation of spatial memory. Therefore, acquisition, consolidation and stability of spatial memory involve plastic changes in the hippocampus of rodents and birds, among these the induction of the expression of early gene transcription such as zenk gene which regulates the expression of numerous other genes and the proteins they control. The gene zenk acts in the formation of new memories and has a role in the regulation of the synapsin protein expression. The expression of synapsins also seems to be related with synaptic mechanisms mediated by the GABA<sub>B</sub> receptor. This study aimed to evaluate, in pigeons, consolidation and persistence of spatial memory in a situation of food location. The underlying neural plasticity was investigated through the analysis of immunoreactivity for Zenk and Synapsin I proteins in neurons of the hippocampus. Adult, male pigeons (*Columba livia*) were used in two experiments. Experiment I investigated learning and spatial memory during short (2 sessions) or long duration training (7 sessions). Sessions had 6 experimental trials and were conducted in a arena with 4 feeders. In each trial the bird was released at a different point of the arena, and the time between the release of the bird and the first feeder pecking response (latency of the choice response) was recorded. Testing for spatial strategy was conducted in the arena without any feeder and the time spent in each quadrant was analyzed. Experiment II analyzed the effects of the post-training administration of phaclofen on the consolidation and persistence of spatial memory. Testing of memory persistency occurred 7 days after the 7th training session. Immunohistochemistry of hippocampal tissue was used for the analysis of expression of Zenk and Synapsin I proteins. Number of correct choice increased across training, with values varying between 50 and 88% in the first and 7th session respectively (Anova,  $p < 0.001$ ). Treatment with GABA<sub>B</sub> antagonist had a facilitatory effect on choice performance which was indicated by lower latency values and higher accuracy values (Anova  $< 0.001$ ). The values of Zenk positive and Synapsin I positive cells counting were higher in the hippocampus of pigeons that were trained during 7 days and in pigeons treated with phaclofen as compared to their respective controls (Anova  $p < 0.001$ ). These data indicated that experience with spatial learning of food choice induced expression of Zenk and Synapsin I proteins in the hippocampus of pigeons during the consolidation of spatial memory. Post-training administration of phaclofen suggested a role of GABA<sub>B</sub> receptor in these experience-dependent synaptic mechanisms. The present results point to the pigeon as interesting animal model for the analysis of neuroplastic mechanisms involved with spatial memory, which are conservative across mammalian and birds species. Keywords: Spatial learning and memory; Hippocampus; Zenk protein; Synapsin I; GABAB Receptor



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	xvii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xxi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	1
APRENDIZAGEM ESPACIAL .....	2
O HIPOCAMPO .....	4
PROTEÍNA ZENK .....	5
PROTEÍNA SINAPSINA I.....	9
RECEPTOR GABA <sub>B</sub> .....	11
FACLOFENO .....	15
OBJETIVOS GERAIS.....	19
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	21
MATERIAIS E METODOS.....	23
EXPERIMENTO I.....	25
ANIMAIS .....	26
EQUIPAMENTOS .....	26
PROCEDIMENTOS .....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
EXPERIMENTO II.....	33
ANIMAIS .....	34
PROCEDIMENTOS .....	34

PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE FACLOFENO .....	35
RESULTADOS	
EXPERIMENTO I.....	37
ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	38
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ZENK E SINAPSINA I .....	43
DISCUSSÃO	
EXPERIMENTO I.....	51
RESULTADOS	
EXPERIMENTO II.....	57
ANÁLISE COMPORTAMENTAL.....	58
EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ZENK E SINAPSINA I .....	62
DISCUSSÃO	
EXPERIMENTO II.....	69
CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
ANEXOS.....	95



"Lute com DETERMINAÇÃO, abrace a vida com PAIXÃO, perca com classe e VENÇA com OUSADIA, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é MUITO para ser insignificante."

*Charles Chaplin*



*Ao infinito e além!*  
*(Buzz Lightyear)*





## **AGRADECIMENTOS**

A minha Família, Sonia Maria Freire, Mônica Canova, José de Paula, Edgard Biccocchi, Terezinha Silva Biccocchi, Juliana Silva Biccocchi e Eliane Silva Biccocchi pelo apoio e compreensão.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, pela grande amizade e orientação, neste trabalho.

A Prof<sup>ª</sup>. Marly Unello Rosinha pela amizade e pela imensa confiança desde o início.

Ao Prof Carlos Amilcar Parada por ceder o laboratório para realização dos procedimentos de imunoistoquímica.

Aos amigos de laboratório Rodolfo Sousa de Faria e Andressa Pelaquim por todos os momentos alegres ou não que passamos juntos.

Aos amigos de departamento Aline Arouca, Aline Tatiane Toneto Inocêncio, Ana Gabriela Conceição-Vertamatti, César Sartori, Gilson Gonçalves Dos Santos, Gustavo Davanzo, Gustavo Trevisan, Heloisa Ferreira Porto, Laís Viana, Larissa Yuri Ishizu, Luiz Alberto Ferreira Ramos.

Aos amigos Amadeu Bonfante, André Pontara, João Rivera, Paula Falquetto, Renato Rodrigues, Saulo Vidal pelos momentos compartilhados.

Aos Professores Dora Maria Grassi Kassis, Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes e Miguel Arcanjo Areas, pela amizade e grande apoio, vocês sem dúvida alguma são as melhores referências para qualquer aluno.

Aos Funcionários Alexandra Rosa, Andréia Aparecida Vigilato, Francini Racz Quinelato, Juvenal Augusto Dantas, Lais Telini, Marina Andresa Cruz, Marise Mello Carnelossi Brunelli, Mônica Poleti, Priscila Cristina da Silva, Silvia Helena Zeferino Evangelista, Washington Luiz Gomes e Wilson Otávio Floriano, sem vocês nenhum trabalho seria possível.

A Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado de programa de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, e

aos responsáveis pela chefia do Instituto de Biologia e do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional durante o período de desenvolvimento deste trabalho, por permitirem acesso sem restrições às instalações.

Esta Tese contou com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo no. 2010/01693-1, sem o qual não seria possível o seu desenvolvimento. São iniciativas como estas que garantem ao Estado de São Paulo a liderança nacional em pesquisa científica e tecnológica.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema ilustrativo do mecanismo de ativação do gene zenk. ....	7
Figura 2: Proteína Zenk atua como fator de transcrição .....	10
Figura 3: Síntese do ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA) .....	12
Figura 4: O receptor GABAB .....	15
Figura 5: Molécula de Faclofeno .....	16
Figura 6: Esquema ilustrativo da ação de faclofeno. ....	17
Figura 7: Sala Experimental.....	27
Figura 8: Arena Experimental .....	28
Figura 9: Latência da resposta de escolha.....	38
Figura 10: Latência percentual média da resposta de escolha.....	39
Figura 11: Porcentagem de escolhas corretas .....	40
Figura 12: Escolhas Corretas por Sessão .....	41
Figura 13: Teste de estratégia espacial .....	42
Figura 14: Fotomicrografia da região hipocampal do encéfalo de pombos. ....	44
Figura 15: Fotomicrografias da região Dorsal do Hipocampo do encéfalo de pombos evidenciando o padrão de marcação após técnica de imunistoquímica	45
Figura 16: Densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo total....	46
Figura 17: Densidade média de núcleos Zenk-positivos.....	47
Figura 18: Densidade média de células Sinapsina I-positivas no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao treino de memória espacial. ....	48
Figura 19: Densidade média de células Sinapsina I positivas .....	49
Figura 20: Latência média da resposta de escolha alimentar nos diferentes grupos. ....	58
Figura 21: Latência percentual média da resposta de escolha.....	59
Figura 22: Porcentagem de escolhas corretas .....	60
Figura 23: Escolhas Corretas por Sessão .....	61

Figura 24: Fotomicrografias da região Dorsal do Hipocampo do encéfalo de pombos evidenciando o padrão de marcação após técnica de imunistoquímica. ....	63
Figura 25: Densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo total....	64
Figura 26: Densidade média de núcleos Zenk-positivos.....	65
Figura 27: Densidade Média de células marcados Sinapsina I-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao treino de memória espacial. ....	66
Figura 28: Densidade média de células Sinapsina I positivas .....	68
Figura 29: Esquema ilustrativo da atividade de Faclofeno. ....	73

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- ABC** – Complexo Avidina Biotina
- AMPc** – Monofosfato cíclico de adenosina
- ANOVA** – Análise de Variância
- C2** – Grupo Controle 2 dias de treino
- C7** – Grupo Controle 2 dias de treino
- Ca<sup>++</sup>** – Cálcio
- CAM-KINASE** – Proteína Quinase Dependente de cálcio
- Cl** – Ion Cloreto
- CREB** – Proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- E2** – Grupo Experimental 2 dias de treino
- E7**– Grupo Experimental 7 dias de treino
- ERK** – Quinase regulada por sinal extracelular
- ETT** – Grupo Experimental Treino e Teste
- FAC** – Grupo Faclofeno
- FACR**– Grupo Faclofeno Recuperação
- GABA** – Ácido gama-aminobutírico
- GABA T** - Ácido gama-aminobutírico Transaminase
- GAD** - Glutamato Descarboxilase
- GEI** – Gene de Expressão Imediata
- GMPC** - Monofosfato cíclico de guanosina
- Hp** – Hipocampo
- HpD** – Hipocampo Dorsal
- HpV**– Hipocampo Ventral
- K<sup>++</sup>** - Íon Potássio
- M00** – Grupo Manipulação
- MAP/K** - Proteína-quinases ativadas por mitógenos

**ML** - Miligrama

**MG** – Miligrama

**NMDA** - N-metil D-Aspartato

**NTR** – Grupo Não Tratado

**NTRR** – Grupo Não Tratado Recuperação

**SAL** – Grupo Salina

**SALR** – Grupo Salina Recuperação

**V** – Ventrículo

**Zenk** - Acrônimo das primeiras letras das proteínas Zif- 268, EGR-1, NGFI-A e Krox 24.

## **INTRODUÇÃO**

## **APRENDIZAGEM ESPACIAL**

Quando o organismo interage com o ambiente e adquire informações sobre o espaço e os objetos nele dispostos, temos como resultado a aprendizagem espacial. Ou seja, o indivíduo tem o seu comportamento controlado por estímulos e informações sobre os eventos que estão presentes ou já estiveram presentes no espaço e, como resultado, ocorre a aquisição ou a modificação dos comportamentos de orientação, localização, aproximação ou afastamento em relação a esses eventos (PRIOR, 2002; PRIOR e GUNTÜRKUN, 2001; ROSSIER *et al.*, 2000). Tolman, em 1948, sugeriu que a memória espacial seria baseada em informações de localização do corpo no espaço, juntamente com uma representação da geometria do ambiente, as quais juntas permitiriam a formação de um mapa espacial para a reorientação do indivíduo.

Portanto, a aprendizagem espacial refere-se à habilidade do animal utilizar informações do espaço físico do ambiente para localizar lugar enquanto a memória espacial refere-se aos processos pelos quais as informações sobre o espaço e as respostas adequadas a ele são codificadas, processadas, armazenadas e evocadas. Assim, a capacidade de recuperar alimentos em locais visitados anteriormente é devida, grande parte, à informação visual do ambiente, tornando-se fundamental para a sobrevivência de uma determinada espécie. Pistas como cores e formas, bem como sua distribuição no espaço, são utilizadas para a orientação do indivíduo (MAYER, *et al.* 2012).

A memória espacial tem importante valor para a sobrevivência do organismo na medida que envolve uma organização de pistas ambientais de acordo com a relevância das relações espaciais entre essas pistas (EICHENBAUM, 1999). A partir dessas relações o organismo é capaz de localizar, por exemplo, o alimento ou água em um determinado ambiente, saber se esse ambiente foi forrageado recentemente ou se existe a presença de um co-específico ou predador (TOMASELLO e CALL, 1997; BEST *et al.*, 2001).

Diferentes informações podem ser usadas em diferentes padrões ou estratégias comportamentais e, dependendo da situação, uma estratégia pode ser usada exclusivamente ou em combinação com outras. Essas possibilidades são evidenciadas por variados experimentos que usam diferentes arranjos espaciais e tarefas comportamentais (POUZET *et al.*, 2002; FINE e JACOBS, 2002). Para se analisar as estratégias utilizadas nesse tipo de aprendizagem e memória, o pesquisador Richard Morris desenvolveu um teste experimental denominado labirinto aquático, normalmente referido como Labirinto Aquático de Morris (MORRIS, 1981; MORRIS *et al.*, 1988). Nesse teste, um tanque com água opaca contendo uma plataforma submersa localiza-se no centro de uma sala, em cujas paredes são fixadas pistas diferenciadas. Os roedores são liberados no tanque, a partir de pontos pré-determinados e diferenciados a cada colocação. A tarefa dos animais é localizar a plataforma submersa fixa, emitindo uma resposta de fuga; a medida de latência, ou seja, o intervalo do tempo entre a colocação do roedor na água e chegar à plataforma é usada como indicativo de aprendizagem. Para orientar-se e aprender a localização da plataforma os animais podem usar as pistas/eventos (figuras e/ou objetos) que compõem o espaço da sala experimental (MORRIS, 1981). Nessa situação, de acordo com a teoria do mapeamento cognitivo, a memória espacial pode envolver a formação de um mapa representativo do espaço. No sistema de mapeamento cognitivo ocorre a utilização de informações presentes no espaço para a formação de um mapa que pode ser definido como uma representação neural do ambiente externo, construído a partir de experiência prévia e da determinação de distâncias, direção e posição espacial de locais e estímulos (SPETCH e HONIG, 1988; WHISHAW, 1998; MORRIS, 1981). Fremouw *et al.* (1997) propôs uma situação para estudar aprendizagem espacial em pombos que poderia ser análoga ao labirinto aquático de Morris, na qual a tarefa era a aprendizagem da localização espacial de um comedouro numa arena com vários comedouros.

De um modo geral, tal como nos experimentos do labirinto aquático de Morris, nos experimentos sobre a aprendizagem de escolha alimentar em pombos observa-se que, com o treinamento, há uma diminuição da latência média da resposta correta em função das tentativas ao longo das sucessivas sessões de treino (MORRIS, 1981; SILVA, 2007).

## **O HIPOCAMPO**

Estudos sobre aprendizagem e memória espacial indicam que o sistema hipocampal de aves, assim como de roedores, primatas não humanos e humanos participa nesses processos comportamentais e cognitivos (COLOMBO et al., 1997; EICHENBAUM, 1999).

Diversas linhas de pesquisas em mamíferos demonstraram a importância do papel do hipocampo para a orientação espacial (O'KEEFE e DOSTROVSKY, 1971; MORRIS *et al.*, 1981). Vários estudos evidenciaram que o hipocampo de aves poderia ser considerado homólogo ao hipocampo de mamíferos, tanto com relação às características embriológicas, quanto aos aspectos topográficos e neuroquímicos (DUBBELDAM, 1998; KREBS *et al.*, 1998; ROSINHA 2003). O hipocampo tem origem na zona subventricular da eminência ganglionária embrionária situada na região dorsomedial do telencéfalo (PARNAVELAS, 2000). As relações topográficas entre o hipocampo de mamíferos e o de aves se dão pelo fato de que, em ambos, a região considerada hipocampo margeia o ventrículo lateral. Além disso, considerando os aspectos neuroquímicos, é encontrada a mesma variedade de neurotransmissores e neuropeptídeos tanto no hipocampo de aves quanto em mamíferos como a serotonina, glutamato e óxido nítrico (JOCA *et al.*, 2003; SILVA, 2007; FLORA FILHO, *et al.*, 2000; ROSINHA, 2003).

Kahn *et al.* (2003), investigando a organização das subdivisões do hipocampo de pombos com traçadores retrógrados (toxina colérica subunidade B) e anterógrados (aminadextrana biotinilada), sugeriram a existência de um circuito tri-sináptico no hipocampo de pombos, comparável ao existente no hipocampo de mamíferos. As fibras aferentes chegam ao hipocampo via região Dorsal cujas

projeções estabelecem sinapses ipsilateralmente na região Ventral. A região Ventral tem projeções para a região Ventral ipsolateral, a qual se projeta para a região Dorsal, fazendo conexões com áreas extrahipocampais.

Estudos realizados tanto em pombos, mandarins, assim como em aves armazenadoras de alimentos, evidenciam a importância do hipocampo neste tipo de memória (WATANABE e BISCHOF, 2012).

Em pombos, o hipocampo é envolvido nas tarefas de retorno ao ninho, ou ao local onde foi criado e alimentado (HOUGH e BINGMAN et al., 2004). Watanabe e Bischof (2012), utilizando-se de lesões hipocampais, demonstraram em aves que o hipocampo é envolvido na aquisição, bem como a retenção de tarefas espaciais. Desse modo, as aves são consideradas como modelos experimentais adequados para a análise de processos e mecanismos neurais que ocorrem no hipocampo durante a formação da memória espacial (HOUGH e BINGMAN et al., 2004). Muitos estudos demonstraram que as aves são capazes de resolver tarefas espaciais (COLOMBO et al., 1997, AMARAL- TOMA e FERRARI, 2004, FREMOW *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 2010), tal como aprender a localização de alimento em uma versão seca do labirinto de Morris quando o hipocampo esta intacto, mas não quando o hipocampo foi lesionado (AMARAL TOMA e FERRARI, 2004; FREMOW et al 1997; WATANABE e BISCHOF 2001).

Além disso, em situação de aprendizagem espacial na qual foram usados sinais espaciais para localização do alimento ocorreu maior ativação de genes de expressão imediata (GEIs) no hipocampo de mandarins do que durante a aprendizagem que não utilizou os sinais espaciais (BISCHOF *et al* 2006). Assim, tal como no hipocampo de roedores, no hipocampo de mandarins ocorre ativação molecular dependente da experiência e essa ativação resulta na transcrição de GEIs (HOUGH e BINGMAN et al., 2004).

## **PROTEÍNA ZENK**

Após estimulação celular decorrente de experiência com o ambiente, os primeiros genes que sofrem regulação de expressão são aqueles que não

requerem síntese *de novo* de novas proteínas, são induzidos precocemente e têm natureza transitória; estes são denominados genes de expressão imediata (GEIs). (CLAYTON, 2000)

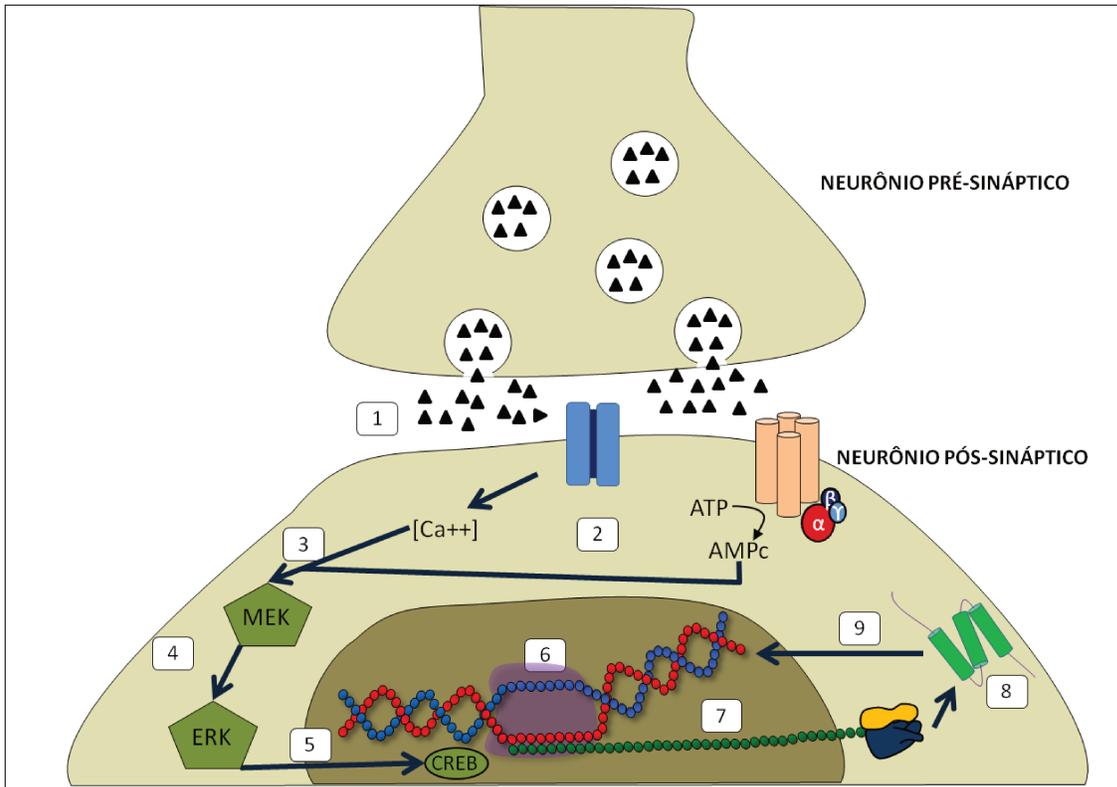
Entre os GEIs melhores caracterizados estão *C-FOS*, *C-jun*, *Krox-20* e *Zif 268*. Este último, também é conhecido como *Krox - 24*, *EGR-1*, *TIS-8*, *NGFI-A* ou *zenk*, ambigüidade devida ao fato de que esse gene foi descoberto independentemente em laboratórios distintos. O termo ZENK (um acrônimo dos quatro primeiros nomes: Zif-268; EGR-1; NGFI-A e Krox-24) é usado para aves, em paralelo com os outros nomes (KNAPSKA e KACZMAREK, 2004; MELLO, 2004).

O GEI *zenk*, que codifica a proteína Zenk, (comumente é usado *zenk* com todas as letras minúsculas para o gene e Zenk com a primeira ou todas as letras maiúsculas para a proteína codificada) tem alta expressão cerebral, e foi um dos GEIs inicialmente clonados e encontrados no cérebro (COLE *et al.*, 1989; WORLEY *et al.*, 1991), sendo uma ferramenta importante utilizada para mapeamento da atividade funcional do cérebro.

O mecanismo de ativação do gene *zenk* inicia-se com um estímulo que atua nas sinapses, sendo transmitido via neurônio pré-sináptico; este resulta em liberação de neurotransmissor e ativação de receptores pós-sinápticos que controlam o influxo de cálcio e ativam vias de sinalização intracelular. A elevação dos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$  e de segundos mensageiros, tais como, AMPc, GMPc, causa a ativação da proteína denominada MEK (Quinase Regulada por Sinal Extracelular Ativada por Mitógeno; molécula de 393 aminoácidos com 43.5 kD), que participa de vários processos celulares incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. Essa ativação de MEK resulta na ativação de outra proteína, denominada ERK (quinase regulada por sinal extracelular) que quando ativada se transloca para o núcleo celular. Essas enzimas catalisam a fosforilação de fatores de transcrição, que se ligam com alta afinidade a seqüências específicas de DNA, na região promotora da transcrição, ativando a RNA

polimerase II, e após a transcrição do RNAm é traduzida em proteínas, como a proteína Zenk. Esta proteína, por também ser um fator de transcrição, tem a capacidade de ligar-se em sítios específicos no DNA e assim iniciar os processos de transcrição e tradução para outras proteínas (Figura 1).

Figura 1: Esquema ilustrativo do mecanismo de ativação do gene zenk.



A ativação do neurônio pré-sináptico, resultante do processamento de estímulo, induz a liberação de neurotransmissores tais como o Glutamato que interagem com receptores ionotrópicos e metabotrópicos da membrana pós-sináptica (1), causando uma alteração na concentração de Cálcio  $[Ca^{++}]$  e início da cascata de ativação do AMPc (2), o que por sua vez ativa a proteína denominada MEK (Quinase Regulada por Sinal Extracelular Ativada por Mitógeno) (3). Isso resulta na ativação de outra proteína, denominada ERK (Quinase regulada por sinal extracelular) (4) que, então, se transloca para o núcleo celular, ativando a proteína CREB (proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc) (5), iniciando assim, a transcrição do RNAm pela RNA polimerase (6). Após essa etapa, os ribossomos (7) serão responsáveis pela tradução deste RNAm em proteína Zenk (8). A proteína Zenk por sua vez, atua como fator de transcrição, ligando-se a sítios específicos do DNA (9), resultando assim na transcrição em RNAm que será traduzido em inúmeras proteínas, tais como a Sinapsina I.

Uma função biológica importante dos GEIs em neurônios seria a participação em mecanismos de sustentação ou estabilização da plasticidade neuronal e na formação de memórias de longo prazo.

Estudos utilizando procedimentos que resultavam em deficiência do gene *zenk* em roedores confirmaram seu papel fundamental em tarefas de memória dependentes do hipocampo (JONES *et al.*, 2001) e na reconsolidação de memórias (LEE, *et al.*, 2004). No estudo comportamental utilizando esQUIVA inibitória feito por Nikolaev *et al.* (1992), observou-se um aumento da expressão de Zenk no hipocampo dos animais treinados. De modo similar, foi demonstrado em ratos que a recuperação da memória do medo contextual resultou em aumento da expressão de *zif 268* em neurônios da região CA1.

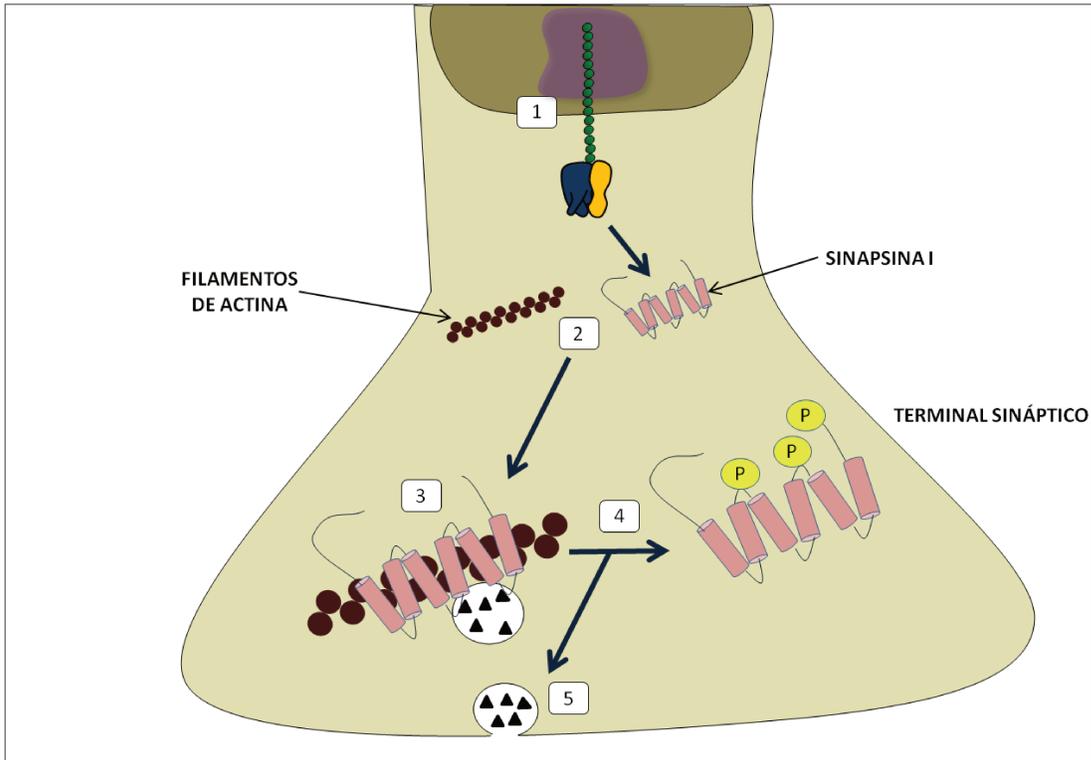
Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que o treino em condicionamento clássico aversivo e o teste de recuperação da memória aversiva ao contexto induzem aumento da expressão do Zenk no hipocampo de pombos (SPERANDÉO, 2005; BRITO *et al.*, 2006 e CANOVA, 2009). Além disso, no trabalho de Canova (2009), avaliando a expressão de Zenk no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo em dois horários do dia, pela manhã e noite, foi constatada uma variação dependente do horário na expressão de Zenk no hipocampo.

Mayer, *et al.* (2010) demonstraram que os GEIs *zenk* e *C - fos* são ativados no hipocampo de mandarins, não apenas durante a aprendizagem de uma tarefa espacial, mas também durante a recuperação da memória dessa tarefa. Contudo observaram que os níveis de expressão desses genes foram mais elevados durante a aquisição do que durante a recuperação da memória.

## **PROTEÍNA SINAPSINA I**

As sinapsinas pertencem a uma família de fosfoproteínas com alta afinidade em terminais nervosos e estão envolvidas na regulação de curto prazo da liberação de neurotransmissores. É distribuída por todo o sistema nervoso central e periférico e não está presente em concentrações significantes em células não neuronais. Esta especificidade foi demonstrada por uma variedade de procedimentos, incluindo imunocitoquímica, *western blotting* e *northern blotting* em diversos tecidos e tipos celulares (DE CAMILLI, *et al* 1990; FDEZ e HILFIKER, 2006). A Sinapsina I, o membro predominante desta família, ancoram as vesículas sinápticas aos filamentos de actina no terminal pré-sináptico. Essas interações são moduladas pela fosforilação reversível da sinapsina I através de várias vias de transdução de sinal (Figura 2).

Figura 2: Proteína Zenk atua como fator de transcrição



A

proteína Zenk após ser transportada para o núcleo celular, atua como fator de transcrição, resultando assim na transcrição em RNAm que será traduzido em Sinapsina I (1) após sua tradução, a proteína Sinapsina I liga-se aos filamentos de actina (2) atuando como proteína de ancoramento das vesículas sinápticas aos filamentos de actina no terminal pré-sináptico (3). Após sua fosforilação (4), as vesículas são desacopladas e o neurotransmissor pode ser liberado na fenda sináptica (5).

Diferenças entre ratos selvagens e *knockout* para Sinapsina I e II mostraram que na falta de Sinapsina as vesículas sinápticas podem ser desestabilizadas ocorrendo um aumento da liberação durante a plasticidade sináptica que se torna defeituosa (SILVA *et al.*, 1996). *In vitro*, as sinapsinas interagem com microtúbulos, microfilamentos, neurofilamentos e espectrina, porém a ação da sinapsina *in vivo* permanece obscura. Sato *et al.* (2000) mostraram que a imunorreatividade para sinapsina I aumentou durante a LTP;

Sinapsinas são substratos importantes para várias proteínas quinases, incluindo a proteína quinase dependente de AMPc (PKA),  $Ca^{2+}$ /calmodulina

proteína quinase (CaM-quinase) I, II e IV (SUDHOF *et al.*, 1989; JOVANOVIC *et al.* 1996, e proteína quinase associado a mitógeno / Erk 1 / 2 (MAPK / ERK)). Sinapsina I e II estão envolvidas tanto na sinaptogênese como na plasticidade das sinapses maduras (CHIN *et al.*, 1995), controlando o tráfego das vesículas sinápticas (HUMEAU *et al.*, 2001; CHI *et al.*, 2001, 2003; BONANOMI *et al.*, 2005; MENEGON *et al.*, 2006). Gomez - Pinilla *et al.* (2001) revelaram que a aprendizagem espacial em ratos utilizando o labirinto aquático de Morris (LAM) induziu o aumento de liberação de Sinapsina I. Michels *et al.* (2005) atribui um papel da Sinapsina na aprendizagem olfatória associativa em *Drosophila*. Kushner *et al.* (2005) detectaram que situações de aprendizagem dependente do hipocampo estimulam a fosforização de ERK que interage com a sinapsina regulando a interação de Sinapsina com o citoesqueleto de actina. Esse mecanismo é considerado importante na regulação da liberação do transmissor, causando melhorias de aprendizagem, plasticidade pré- sináptica e LTP.

Um fato importante é que tanto a proteína Sinapsina I quanto a Sinapsina II são ativadas pelo gene de expressão imediata *zenk*, conforme descrito por Thiel *et al.* (1995) em cultura de tecido neuronal. Com isso, as sinapsinas são candidatas a alvos de GEIs, no entanto, esta relação precisa ser melhor esclarecida.

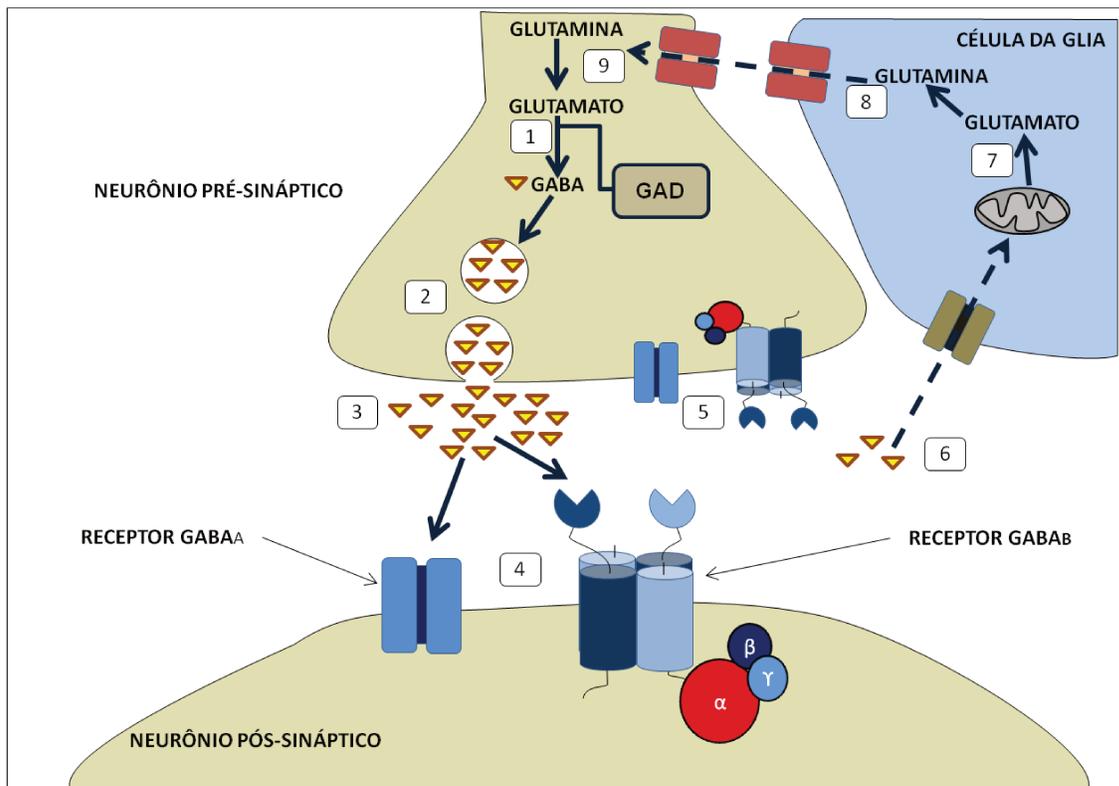
## **RECEPTOR GABA<sub>B</sub>**

O Acido Aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, atua tanto em receptores ionotrópicos como receptores metabotrópicos, atuando no controle tanto elétrico como bioquímico dos neurônios (SIVILOTTI e NISTRÌ, 1991).

A síntese de GABA é mediada pela descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), que catalisa a descarboxilação do glutamato a GABA nas terminações nervosas GABAérgicas. O GABA é acondicionado em vesículas sinápticas e em resposta a um potencial de ação, ocorre liberação de GABA na fenda sináptica por fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica. O término da ação do GABA na sinapse depende de sua remoção do espaço extracelular. Os neurônios e a glia

captam o GABA através de transportadores de GABA específicos. No interior das células, a enzima mitocondrial amplamente distribuída, a GABA-transaminase (GABA-T), catalisa a conversão do GABA regenerando o glutamato (Figura 3).

**Figura 3: Síntese do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)**



Síntese do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) a partir do glutamato (catalisado pela L-glutamato descarboxilase (GAD) (1), Após a síntese, o neurotransmissor GABA é armazenado em vesículas (2) para posterior liberação por exocitose na fenda sináptica (3) e ligação a receptores ionotrópicos (GABA<sub>A</sub>) ou metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>), tanto localizados no neurônio Pós-Sinápticos (4), como localizados nos neurônios Pré-Sinápticos (5), da mesma forma, o GABA é transportado para as células da glia (6); ocorrendo a transaminação de GABA para  $\alpha$ -quetoglutarato, assim, regenerando o glutamato (7), que por sua vez, é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase, e esta por sua vez é transportada ao neurônio pré sináptico (8), sofrendo ação da enzima Glutaminase é novamente sintetizada em Glutamato (9), iniciando um novo ciclo.

Receptores de GABA são divididos em três tipos principais: A, B, e C. O mais proeminente subtipo, o receptor GABA<sub>A</sub>, que é dependente de ligante para controlar o canal de íon Cl<sup>-</sup>, o receptor GABA<sub>B</sub> é um receptor acoplado a proteína G e o receptor GABA<sub>C</sub> também depende do ligante para controlar o canal de Cl<sup>-</sup>. Os receptores GABA<sub>B</sub> ou GABA metabotrópicos interagem com a proteína G inibindo, assim, a adenilato ciclase, ativando os canais de K<sup>+</sup> e reduzindo a condutância de Ca<sup>2+</sup>. Receptores GABA<sub>B</sub> pré-sinápticos funcionam como autorreceptores, inibindo a liberação de GABA, e podem desempenhar o mesmo papel sobre os neurônios liberando outros transmissores.

No Sistema Nervoso Central, os receptores GABA<sub>B</sub> são expressos em concentrações mais baixas que os receptores GABA<sub>A</sub>, principalmente na medula espinal. Os receptores GABA<sub>B</sub> atuam como heterodímeros de subunidades GABA<sub>B1</sub> e GABA<sub>B2</sub>. Interagem com proteínas G (Figura 4), que inibem a adenililciclase, ativam os canais iônicos de K<sup>+</sup> e inibem os canais de Ca<sup>2+</sup> regulados por voltagem. Nas sinapses GABAérgicas, os receptores GABA<sub>B</sub> são expressos em nível tanto pré-sináptico quanto pós-sináptico. Os receptores pré-sinápticos modulam a liberação do neurotransmissor ao reduzir o influxo de Ca<sup>2+</sup>, enquanto os receptores GABA<sub>B</sub> pós-sinápticos produzem PIPS, através da ativação dos canais de K<sup>+</sup> ativados por proteína G. A ativação dos canais de K<sup>+</sup> inibe a descarga neuronal, visto que o K<sup>+</sup> possui um potencial de equilíbrio próximo a -70 mV. Por conseguinte, o aumento da condutância do K<sup>+</sup>, à semelhança da condutância aumentada de Cl<sup>-</sup>, impulsiona a voltagem transmembrana neuronal para potenciais hiperpolarizantes, que reduzem a frequência de disparo de potenciais de ação, e também desvia correntes excitatórias.

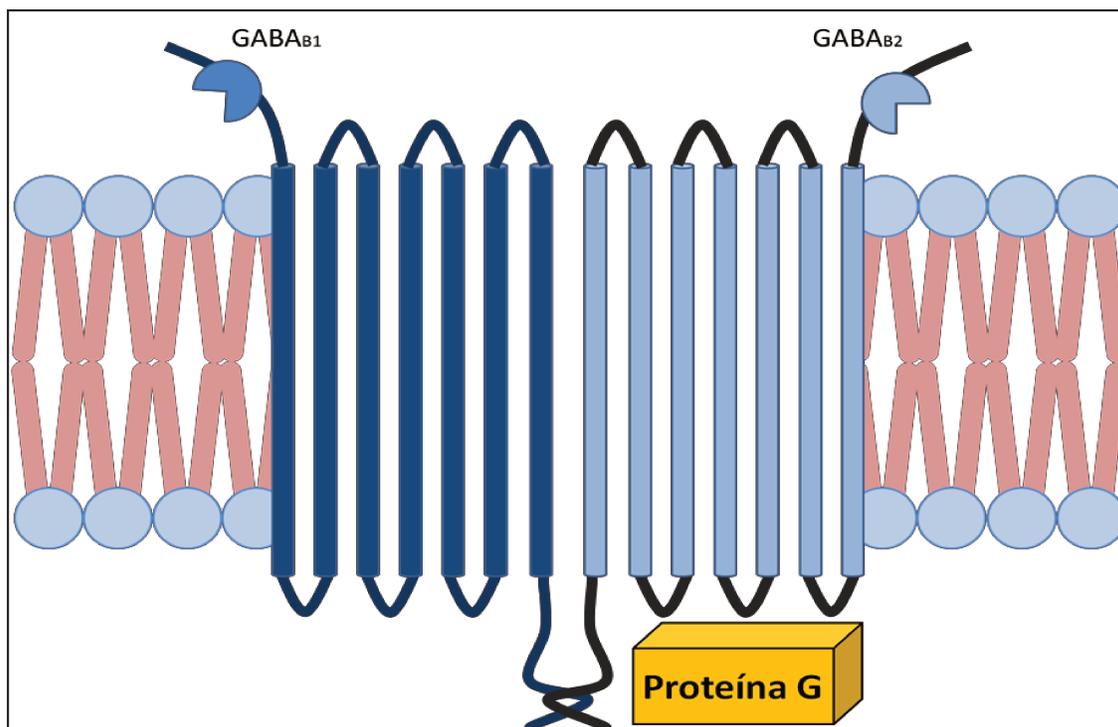
Os receptores GABA<sub>B</sub> estão envolvidos nas ações do etanol (DZITOYEVA, DIMITRIJEVIC e MANEV, 2003), GHB (ácido gama-hidróxibutírico) (DIMITRIJEVIC *et al.*, 2005) e possivelmente na dor (MANEV e DIMITRIJEVIC, 2004). Pesquisas recentes sugerem que este receptor pode representar uma

importante função no desenvolvimento (DZITOYEVA, *et al.*, 2005). A sinalização celular mediada por GABA contribui para a regulação do desenvolvimento neural dependente de experiência com o ambiente, tanto no cérebro em desenvolvimento quanto no cérebro adulto (CHANCEY *et al.*, 2013).

Tanto os receptores GABAA quanto GABAB estão envolvidos na regulação de diversos mecanismos cerebrais, não só fisiológicos, mas também patológicos, incluindo memória, sono, epilepsia além de diversas outras funções (ONG, 2000). Esses receptores GABAB localizados no neurônio pré-sináptico podem ter papel fundamental sobre a cognição em roedores e primatas, pois sua ativação regula a liberação de GABA na fenda sináptica, causando assim uma supressão da capacidade cognitiva nos animais. Isto foi demonstrado em experimentos onde foram utilizados antagonistas do receptor GABAB que bloquearam estes receptores e, assim, causando uma facilitação da memória (FROESTL *et al.*, 2004; SUNYER *et al.*, 2007; SUNYER *et al.*, 2008; SUNYER *et al.*, 2009; JOHN *et al.*, 2009).

John *et al* (2009) avaliando a participação dos receptores GABAB na expressão de sinapsinas constataram um efeito facilitador quando se utiliza antagonistas dos receptores GABAB na expressão desta proteína e na memória. Existem evidências de que a administração de antagonistas do receptor GABAB tem relações com aumento na memória espacial em roedores e mesmo em seres humanos (MONDADORI *et al.*, 1996; NAKAGAWA e TAKASHIMA, 1997; FROESTL *et al.*, 2004; SUNYER *et al.*, 2007). Além disso, pode ser sugerido que os receptores GABA e NMDA teriam uma função complementar no controle na transdução de sinal nos neurônios hipocampais envolvidos com a memória espacial (MÖHLER *et al.*, 2001)

Figura 4: O receptor GABAB

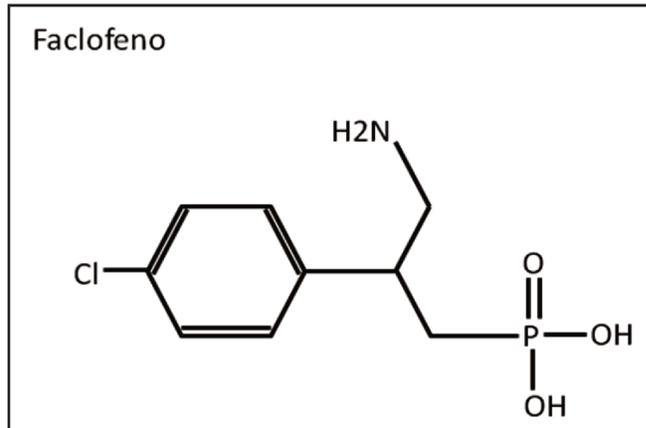


Receptor GABAB, com suas subunidades GABAB1 e GABAB2, interagem com a proteína G ativando assim as cascatas de ações inibitórias.

## FACLOFENO

O ácido fosfônico, 3-amino-2-(4-clorofenil)-propil ou faclofeno (Figura 5) é um antagonista seletivo de receptores GABA<sub>B</sub>, derivado do Baclofeno. Sua estrutura permite ligar-se a um sítio específico dos receptores GABA, impedindo a ligação do neurotransmissor GABA e causando assim o bloqueio de sua atividade (Figura 5) (ONG, 2000).

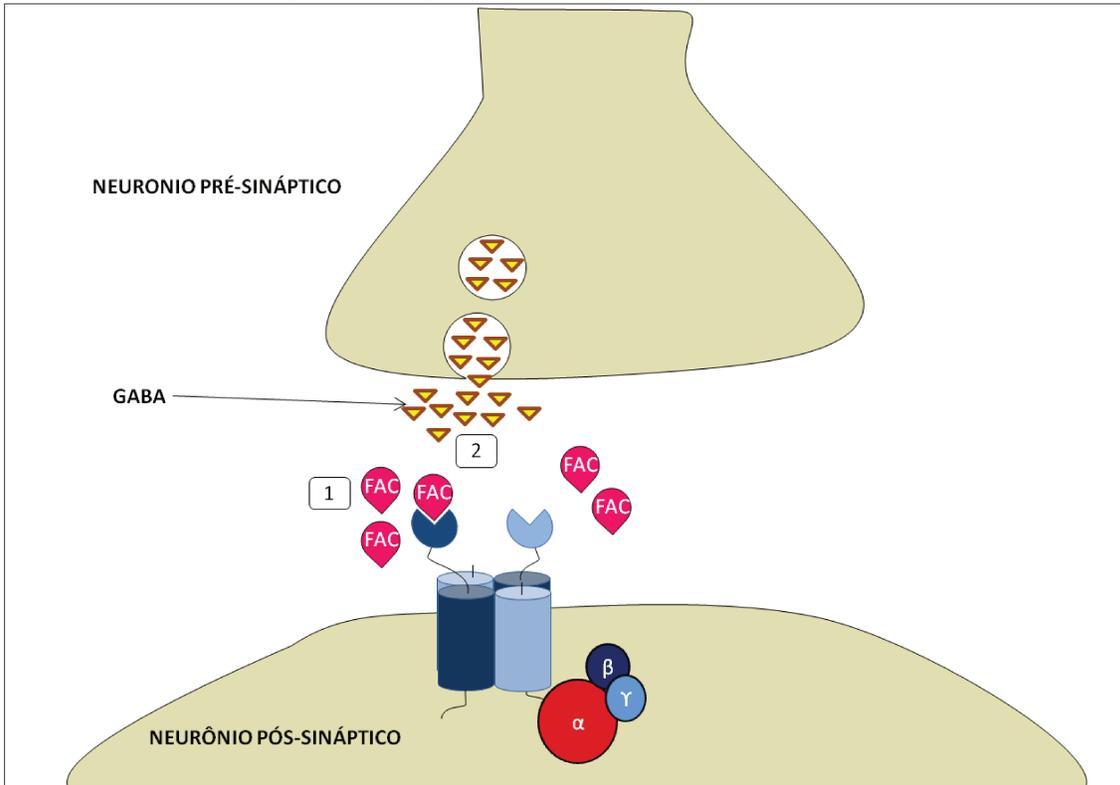
Figura 5: Molécula de Faclofeno



Molécula do ácido fosfônico, 3-amino-2-(4-clorofenil)-propil ou faclofeno.

A afinidade de faclofeno por sítios de ligação GABA<sub>B</sub> foi demonstrada pela primeira vez por Dutar e Nicoll, (1988), que evidenciaram o papel fisiológico para receptores GABA<sub>B</sub> em cérebros de mamíferos. Neste trabalho demonstrou-se que faclofeno poderia impedir a geração de potenciais pós-sinápticos inibitórios tardios em neurônios piramidais do hipocampo.

Figura 6: Esquema ilustrativo da ação de faclofeno.



As moléculas de faclofeno ligam-se a sítio específico do receptor GABAB (GABAB1) (1); isso causa bloqueio da via de sinalização inibitória, impedindo que o neurotransmissor GABA liberado pelo neurônio pré sináptico ligue – se nesse sítio específico (2).

Dessa forma, considerando os pontos apresentados até aqui, uma abordagem interessante seria avaliar os efeitos do treino em memória espacial sobre a expressão das proteínas Zenk e Sinapsina I, eventos moleculares que são desencadeados no hipocampo pela experiência espacial e que tem sido essencialmente relacionados com a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA seguida pelo recrutamento de segundo mensageiros, ativação de vias de sinalização intracelular, regulação da transcrição gênica e tradução de proteínas requeridas para as mudanças funcionais e estruturais que ocorrem nos circuitos neuronais (KANDEL, 2000) Contudo, deve ser lembrado que a integração sináptica da neuroplasticidade hipocampal deve ser, necessariamente, modulada por outros neurotransmissores. Nesse contexto, torna-se interessante analisar a

participação do GABA, o principal neurotransmissor inibitório do encéfalo, nesses mecanismos envolvidos com a aprendizagem espacial em pombos.

As evidências experimentais acima consideradas sugerem que o equilíbrio entre a transmissão gabaérgica e outros neurotransmissores, tais como o glutamato, é importante na mediação dos mecanismos que são essenciais para a formação da memória espacial. Além disso, os mecanismos sinápticos que são mediados pelos receptores GABA parecem ter um papel fundamental na neuroplasticidade hipocampal. Assim, a administração de drogas que podem afetar a transmissão gabaérgica pode interferir na aquisição da aprendizagem e formação da memória espacial. Embora haja um conjunto considerável de estudos que mostram a participação de receptores GABAA e GABAB em diferentes processos comportamentais pode se dizer que ainda são necessária pesquisas sobre o papel de receptores GABAB nos processos de memória que envolve o hipocampo, particularmente no que se refere a estudos que usam aves como sujeitos experimentais. Considera-se, portanto que a análise dos efeitos da administração de faclofeno antagonista de receptores GABAB poderá fornecer informações sobre a participação dos receptores GABAB no processamento da memória espacial.

## **OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a memória espacial em pombos em situação de escolha alimentar em função do número de sessões de treino (a duração do treino) e da administração pós-treino do antagonista do receptor GABAB faclofeno. A plasticidade neural foi investigada pela análise da imunorreatividade para as proteínas Zenk e Sinapsina I em neurônios do hipocampo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos foram:

1. Analisar a aprendizagem e memória espacial de escolha e localização do comedouro correto em pombos treinados em duas ou sete sessões.
2. Analisar a expressão de Zenk e Sinapsina I em neurônios do hipocampo de pombos treinados em localização e escolha do comedouro correto após duas ou sete sessões.
3. Analisar os efeitos da administração IP pós-treino do antagonista do receptor GABA<sub>B</sub>, faclofeno, em aprendizagem de escolha alimentar sobre a memória espacial em situação de localização e escolha do comedouro correto.
4. Analisar a expressão de Zenk e Sinapsina I em neurônios do hipocampo de pombos tratado com administração IP pos treino do antagonista do receptor GABA<sub>B</sub>, faclofeno, em aprendizagem de localização e escolha alimentar sobre a memória espacial em situação de localização e escolha do comedouro correto.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram realizados dois experimentos:

### **EXPERIMENTO I**

Esse experimento investigou: (a) a Aprendizagem e Memória Espacial por análise comportamental em animais submetidos ao treino de escolha alimentar durante 2 (treino de curta duração) ou 7 sessões (treino de longa duração) e (b) os processos e mecanismos de plasticidade subjacentes à memória espacial, por meio da análise imunistoquímica da expressão da proteína Zenk e da Sinapsina I no hipocampo dos animais.

### **EXPERIMENTO II**

Esse experimento investigou: (a) os efeitos do antagonista do receptor GABA<sub>B</sub> faclofeno administrado imediatamente após as sessões de treino de localização e escolha do alimento; (b) a persistência da memória espacial foi avaliada pela exposição à situação experimental 7 dias após o final do treino; e (c) os processos e mecanismos de plasticidade subjacentes à memória espacial por meio da análise imunistoquímica da expressão da proteína Zenk e da Sinapsina I no hipocampo dos animais.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos em acordo com os princípios de ética do trato de animais experimentais e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de animais do DFB-IB da UNICAMP – CEUA 2096-1, (Anexo I).

## **EXPERIMENTO I**

## **ANIMAIS**

Foram utilizados 49 pombos (*Columba livia*), machos, adultos, peso médio de 400 gramas, obtidos de fornecedor comercial, e mantidos em gaiola-viveiro individuais, no biotério de aves sob ciclo claro-escuro de 12-12h e temperatura controlada a 25° C. A alimentação consistiu numa mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração granulada para pombos, areia e farinha de ostra. Após a chegada ao biotério, os animais passaram por um período de 15 dias para adaptação as novas condições, sendo submetidos a medidas profiláticas. Nesse período a alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*.

Os animais foram separados nos seguintes grupos: Experimental 02 dias de Treino (Grupo E2 – n=7) e Controle 02 dias de Treino (Grupo C2 – n=7), submetidos ao treino de curta duração (descrição a seguir); Experimental 07 dias de Treino (Grupo E7 – n=7) e Controle 07 dias de Treino (Grupo C7 – n=7), submetidos ao treino de longa duração (descrição a seguir); Experimental Treino e Teste (Grupo ETT – n=7) submetidos ao treino de longa duração, ao teste de escolha alimentar e de estratégia espacial (descrição a seguir) e grupo Manipulação - Grupo M00 (n=07) que não foi submetido ao treino ou ao teste, sendo apenas feito controle de peso diário.

## **EQUIPAMENTOS**

Foi utilizada uma arena circular com paredes de fórmica branca (110 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade), cujo piso foi revestido com papel pardo. Essa arena foi virtualmente dividida em quatro quadrantes iguais que serviram como base para a localização de cada comedouro nesse espaço. Foi colocado um comedouro em cada quadrante da arena, sendo que um deles continha alimento coberto com areia; os outros três comedouros estavam apenas com areia (Figura 7 e 8). Durante todas as sessões do experimento, a posição da arena em relação aos objetos da sala permaneceu a mesma. Nas paredes da sala experimental (300 x 220 cm) foram fixadas pistas visuais evidentes, figuras geométricas, verde,

vermelha, amarela e azul. Uma câmera de vídeo digital posicionada no teto da sala, a 250 cm acima do centro do labirinto, registrou a trajetória e o comportamento dos animais. O computador que recebeu o sinal de vídeo da sala ficou localizado numa sala adjacente.

Figura 7: Sala Experimental

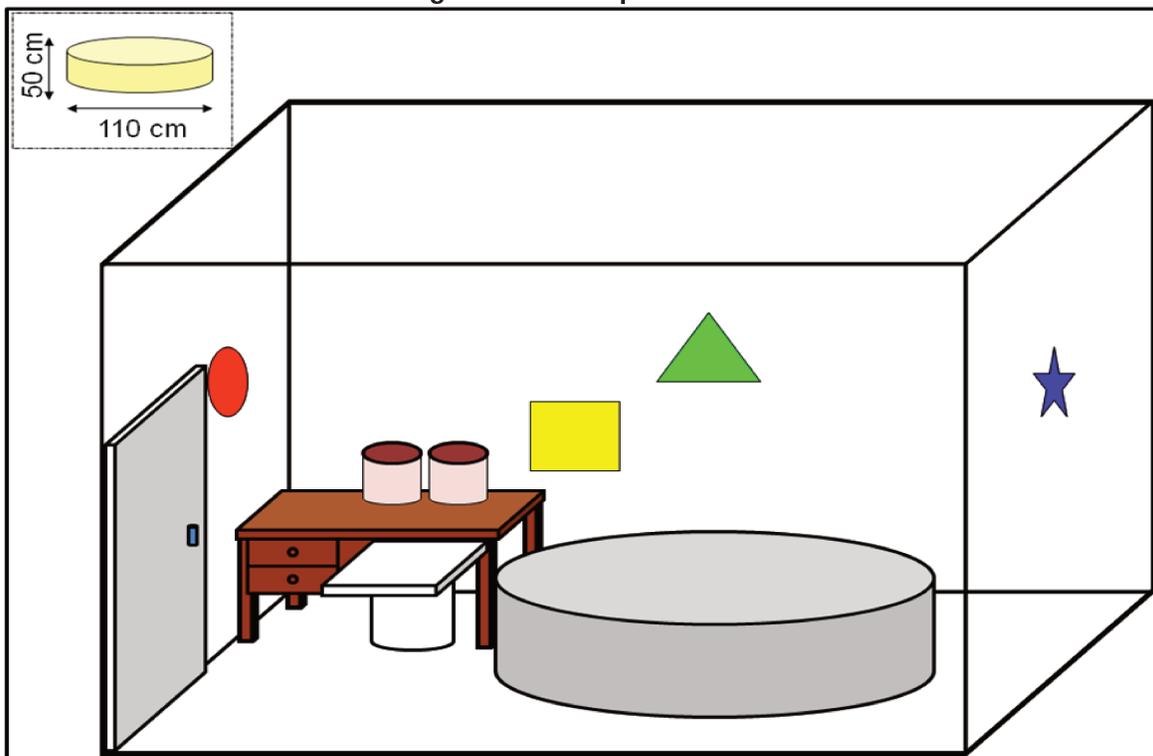


Ilustração esquemática da sala experimental (Vista fronto-lateral) Onde é possível visualizar no centro a arena circular (110 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade). Esta arena foi revestida de fórmica branca. As figuras geométricas coloridas representam as pistas ambientais, além da mesa no canto esquerdo da sala que serviu de apoio para o experimento, serviu também como uma pista ambiental.

Figura 8: Arena Experimental

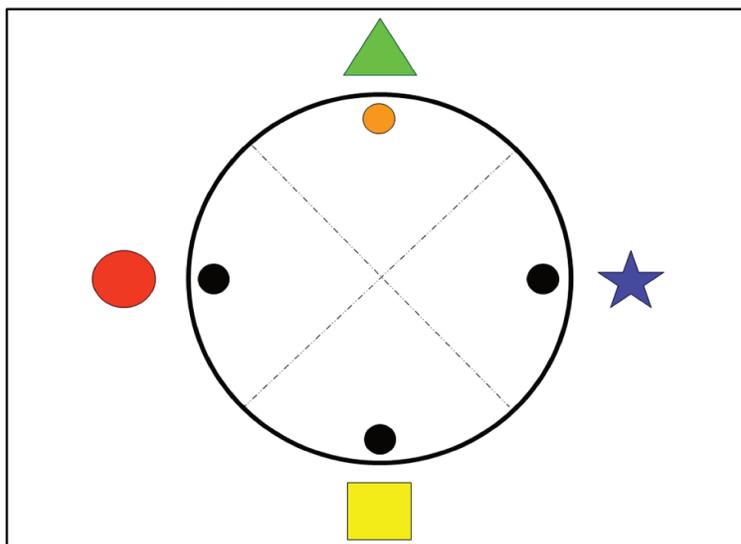


Ilustração esquemática da arena experimental (Vista superior). Arena circular com paredes de fórmica branca (110 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade). As linhas tracejadas representam a divisão virtual dos quatro quadrantes iguais que serviram como base para a localização de cada comedouro nesse espaço (Círculos pretos representam comedouros cheios de areia, círculo laranja representa o comedouro com o alimento coberto por areia).

## PROCEDIMENTOS

### ***Adaptação às condições do biotério:***

Durante um período mínimo de quinze dias antes do experimento, os pombos permaneceram no biotério, sob ciclo claro-escuro de 12-12h (luz acendendo às 6:00h), para adaptação a essas condições. Os animais de todos os grupos foram manipulados no mesmo horário em que ocorreu o experimento, entre 9:00h e 11:00h, nos quatro dias que o precederam.

### ***Controle de peso e privação alimentar:***

Após um período de 8 dias de adaptação os animais passaram por pesagem diária durante 7 dias para cálculo do peso médio *ad libitum*. A seguir, passaram por privação alimentar, com água à vontade e redução gradual da oferta de ração até o animal atingir o peso experimental equivalente a 80% do peso *ad*

*libitum* (peso experimental) o que ocorreu entre 7 a 10 dias após o início da privação alimentar.

***Habituação à arena experimental:***

Os pombos passaram por 20 min de habituação diária à arena experimental por dois dias consecutivos. Nessas sessões os animais tiveram duas exposições à arena, com acesso ao espaço experimental por 10 min, sem apresentação de qualquer estimulação programada. Entre as exposições foram colocados numa gaiola de espera durante 5 min.

***Treinamento de 2 dias (curta duração) em escolha alimentar:***

O treino de curta duração consistiu em 2 sessões com intervalo de 24h entre elas. Cada sessão teve 6 tentativas experimentais. Em cada tentativa o animal era liberado na arena em um quadrante diferente. A resposta de escolha foi definida como orientar-se, aproximar-se e bicar um comedouro. Quando o animal escolheu o comedouro com alimento, se considerou a ocorrência de escolha correta; a escolha de um dos outros três comedouros foi considerada como escolha incorreta. O tempo entre a liberação do animal na arena e a primeira bicada num dos comedouros foi registrado como latência da resposta de escolha. Após uma escolha correta o animal teve acesso ao alimento por 5 segundos, ao final dos quais terminava a tentativa e era então conduzido a uma caixa de espera onde permanecia por 3 min (intervalo entre tentativas). Ao final da sexta tentativa o animal era reconduzido à gaiola-viveiro no biotério. As tentativas em que não ocorreu resposta de escolha tiveram uma duração máxima de 5 min. Os animais dos grupos Controles passaram pelo mesmo procedimento, porém os comedouros estavam vazios em todas as tentativas.

### ***Treinamento de 7 dias (longa duração) em escolha alimentar:***

O treino de longa duração consistiu em 7 sessões, com 6 tentativas experimentais cada e com intervalo entre sessões de 24 h. Os procedimentos descritos para o treino de curta duração foram repetidos em cada uma das sessões. O comedouro contendo alimento foi mantido na mesma posição durante todos os dias de treino. As relações espaciais entre os objetos da sala e a posição do comedouro nesse espaço permaneceram constantes ao longo de todo o experimento, um arranjo que possibilita que o animal utilize essas informações espaciais para encontrar rapidamente o comedouro com alimento. Os animais dos grupos Controles passaram pelo mesmo procedimento, porém os comedouros estavam vazios em todas as tentativas de cada sessão.

### ***Teste de estratégia espacial:***

O teste consistiu em 1 sessão, iniciada 24 horas após o final do treino de longa duração, com 3 tentativas experimentais. Nas duas primeiras o procedimento foi o mesmo das sessões anteriores. Na terceira tentativa foram retirados os comedouros e os animais foram colocados na arena circular para análise do tempo de permanência no quadrante onde antes existia o comedouro com alimento.

### ***Perfusão Transcardíaca:***

Após o último dia de treino (*Grupos E2; E7; C2; C7; M00*) foi feita a perfusão transcardíaca com 400 ml de solução salina (NaCl 0,9%) para a remoção do sangue presente no cérebro, e posteriormente com 400ml de solução tamponada de paraformaldeído a 4%, para fixação do tecido nervoso. Finalizado esse procedimento, o encéfalo dos animais foi removido e mantido de 4-6 horas na solução de paraformaldeído para pós-fixação. Em seguida os encéfalos foram transferidos para uma solução crio - protetora de sacarose a 30% e mantidos em uma temperatura média de 4°C por um período mínimo de 48 horas.

### ***Procedimentos para Imunoistoquímica para Zenk e Sinapsina I***

Para a coleta do material e análise do hipocampo foi considerado o atlas de pombos de Karten & Hodos (1967) com as seguintes coordenadas: AP 8,75 – 7,75. Foram coletadas duas séries de cortes, onde na primeira série foi feita análise imunoistoquímica contra Zenk e na segunda série feita imunoistoquímica contra Sinapsina I.

Os cortes de tecido encefálico com 40µm de espessura obtidos por criostato (Leica CM 1850), após perfusão e congelamento, foram lavados em PB 0,1 M por três vezes, 10 minutos de duração cada. Logo após, os cortes foram incubados com anticorpo primário policlonal Egr-1 (c19) produzido em coelho (Sc-189; Santa Cruz Biotechnology) ou anticorpo primário policlonal Sinapsina I produzido em coelho (AB1543, Millipore - USA) a uma concentração de 1:1000 em solução de triton X-100 0,3% em PB 0,1 M (TXPB) contendo 2% de soro bloqueador, onde permaneceram durante 18 horas, após este período, foram submetidos a três lavagens de 10 minutos em PB 0,1M e incubados com anticorpo secundário biotilado feito em burro (Biotin-Sp-Affinipure Donkey Anti- Rabbit IGG (H+L), Código 711-065-152 empresa Jackson Laboratories - USA) a uma concentração de 1:1000 em solução de TXPB, durante 120 minutos, em rotor, à temperatura ambiente. Novamente passaram por três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M e, a seguir, incubados no complexo ABC (avidina-biotina-peroxidase) em TXPB contendo cloreto de sódio, durante 120 minutos, em rotor, à temperatura ambiente. Nova série de três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M antecedeu a colocação em solução de diaminobenzidina tetrahydroclorido (DAB) em PB 0,1 M durante 15 a 20 minutos, onde foram acrescentados 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%; os cortes ficaram nesta solução de 2 a 6 minutos. Novamente, foram realizadas três lavagens em PB 0,1 M por 10 minutos cada uma e os cortes foram então montados em lâminas, silanizadas e gelatinizadas, para microscopia. Os cortes foram desidratados em série crescente de soluções de álcool e clareador (Hemo-De) e, finalmente as lâminas foram cobertas com a lamínula.

A análise das células marcadas foi feita através de microscopia de campo claro, e a contagem dos neurônios marcados nas áreas do hipocampo, que foi realizada nos cortes de hipocampo de cada animal (pelo menos 5 cortes de cada animal), foi realizada utilizando-se o programa ImageJ (NIH-USA). A contagem das células marcadas seguiu o critério de delimitação virtual das regiões dorsal e ventral (BRITO *et al.*, 2006). Em cada região as células marcadas Zenk-positivas ou Sinapsina I-positivas foram aferidas por contagem unitária. Foram computados núcleos (Zenk) ou células (Sinapsina I) com marcação nítida com coloração de tonalidade amendoada até o marrom escuro. A contagem foi discutida e revista por observador-controle (duplo cego), para fins de controle de validade dos dados. A área de cada região demarcada foi avaliada utilizando-se o programa SigmaScan Pro Image Analysis Versão 5.0.0 (SPSS INC.). A Densidade foi calculada por meio da razão entre o número de células por área da região.

### **Análise Estatística**

A análise estatística dos valores de latência e respostas corretas registrados nas sessões de treino foi realizada por meio da Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey-Kramer para comparações entre grupos.

Na análise de estratégia espacial os valores de tempo de permanência em cada quadrante da arena experimental foram analisados com ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey-Kramer.

Os valores da densidade de células imunorreativas para Zenk e Sinapsina I foram analisados pelo teste ANOVA, considerando-se grupo e região do hipocampo como fatores. Para múltiplas comparações *post hoc* foi utilizado o teste de Tukey-Kramer. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism (versão 5.00, 2007) considerando os valores significantes de  $p < 0,05$ .

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **EXPERIMENTO II**

## **ANIMAIS**

Foram utilizados 42 pombos (*Columba livia*), machos, adultos, peso médio de 400 gramas, obtidos de fornecedor comercial, e mantidos em gaiola-viveiro individuais, no biotério de aves sob ciclo claro-escuro de 12-12h e temperatura controlada a 25° C. A alimentação consistiu numa mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração granulada para pombos, areia e farinha de ostra. Após a chegada ao biotério, os animais passaram por um período de 15 dias para adaptação as novas condições, sendo submetidos a medidas profiláticas. Nesse período a alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*.

Para realizar este experimento os animais foram separados nos seguintes grupos: Grupos: Faclofeno (*FAC*), Salina (*SAL*) submetidos ao treino de longa duração e administração de faclofeno ou Salina e Controle sem tratamento (*NTR*). Cada grupo teve n = 14, onde 7 animais de cada grupo foram submetidos a uma sessão de teste de Persistência da memória espacial, este teste foi feito 7 dias após o final dos treinos, esses animais foram identificados como grupos FACR, SALR e NTR.

## **PROCEDIMENTOS**

Os procedimentos e equipamentos utilizados nas etapas de Adaptação às condições do biotério; Controle de peso e privação alimentar; Habituação à arena experimental; Treinamento em escolha alimentar foram realizadas da mesma forma como descrito no Experimento I.

O teste de persistência da memória espacial consistiu em uma sessão realizada sete dias após o treinamento, com seis tentativas experimentais onde os animais foram recolocados na arena experimental sete dias após o final do treino.

## **PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE FACLOFENO**

Neste experimento, foi feita uma solução contendo 25mg do antagonista de receptores GABAB Faclofeno (Sigma Aldrich – P118) em 10 ml de solução salina 0,9%. Dessa forma, essa solução foi administrada numa dose de 0,3 mg de faclofeno por quilograma de peso do animal, via ip, imediatamente após cada sessão de treino dos grupos *FAC*, de acordo com Froestl, *et al.* (2004). No grupo *SAL* foi administrada apenas solução salina 0,9%, e no grupo *NTR* nenhuma substância foi administrada. Os animais passaram por procedimento de habituação à situação de administração da droga.

Por não haver literatura específica sobre a dosagem de faclofeno neste tipo de abordagem, foi decidido manter a dosagem baseada nos trabalhos de Froestl *et al.* (2004) que utilizaram SGS742.

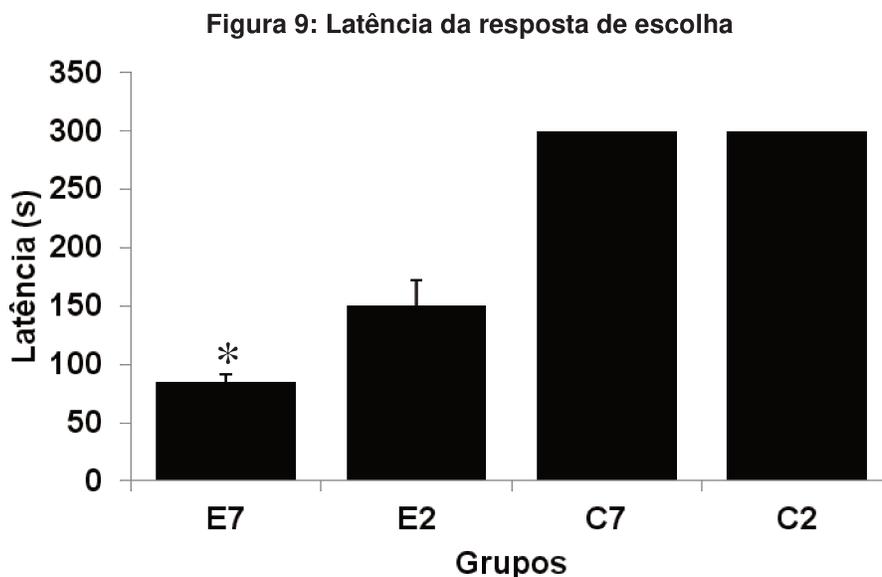
Os demais procedimentos: Perfusão transcardíaca; Procedimentos para Imunoistoquímica para Zenk e Sinapsina e Análise Estatística, foram também realizados conforme o experimento I.



**RESULTADOS  
EXPERIMENTO I**

## ANÁLISE COMPORTAMENTAL

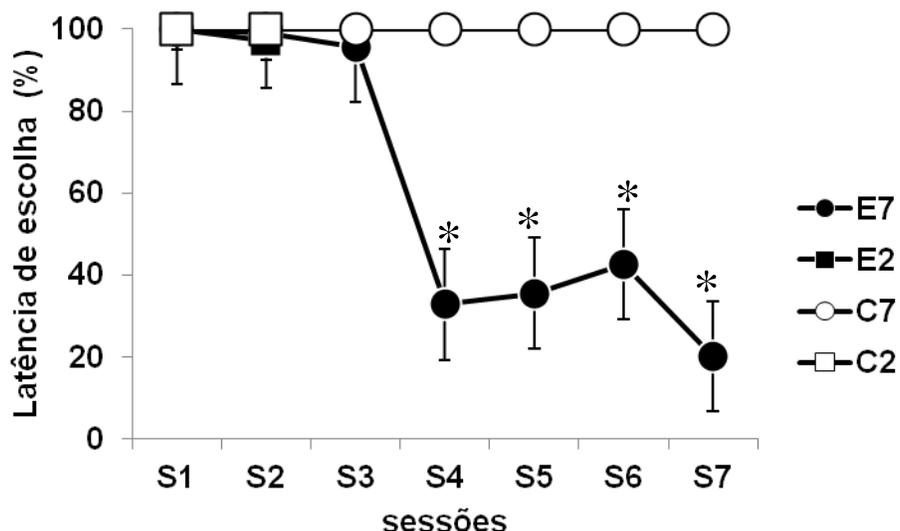
A Figura 9 mostra valores de latência da resposta de escolha alimentar, calculados para o total das sessões de treinamento realizadas com os diferentes grupos – E2, E7, C2 e C7. Tanto o grupo treinado por 02 dias quanto o treinado por 07 dias mostrou latências menores que os controles, sendo as menores latências observadas no grupo E7. A análise estatística com o teste ANOVA confirmou diferenças significativas entre os grupos ( $F_{3,24} = 560,61$ ;  $p < 0,0001$ ). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a latência média do grupo E7 foi significativamente menor que a do grupo E2 ( $p < 0,05$ ), indicando o efeito do treino de longa duração. Os grupos E2 e E7 diferiram significativamente dos grupos controles C2 e C7 ( $p < 0,05$ ).



E2 (Experimental 2 dias de treino), E7 (Experimental 7 dias de treino), C2 (Controle 2 dias de treino), e C7 (Controle 7 dias de treino). \* Diferença significativa em comparação aos demais grupos (Tukey-Kramer,  $p < 0,05$ ).

Na Figura 10 são apresentados os valores da latência média da resposta de escolha em função das sessões de treinamento para cada um dos grupos: – E2, E7, C2 e C7. Cada ponto representa o valor percentual médio das latências, considerando-se os valores registrados na primeira sessão com sendo 100%. Observa-se que houve uma clara diminuição da latência média do grupo E7 a partir da 4ª sessão. Comparações estatísticas com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{=3,34} = 45,22$ ;  $p < 0,001$ ); sessão ( $F_{=6,34} = 3,87$ ;  $p < 0,05$ ) e interação significativa entre grupos x sessões ( $F_{6,6} = 27,32$ ;  $p < 0,001$ ). O teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que as latências das sessões 4, 5, 6 e 7 do grupo E7 foram diferentes das sessões 1, 2 e 3 do mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

Figura 10: Latência percentual média da resposta de escolha

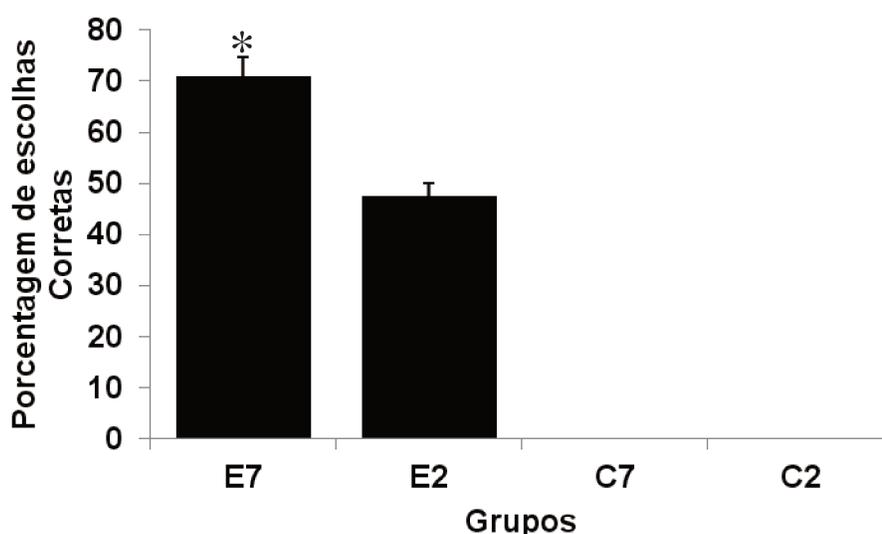


Latência percentual média da resposta de escolha em função das sessões de treinamento.  
 \* Diferença significativa em comparação às sessões 1, 2 e 3 ( $P < 0,05$ ).

A Figura 11 mostra a porcentagem média de escolhas corretas para cada um dos grupos, considerando-se as médias de escolhas corretas em todas as

sessões em relação ao total de escolhas corretas. O treino de longa duração resultou em porcentagem de acerto na localização do alimento acima de 70%. A análise com o teste de variância ANOVA indicou diferenças significativas entre os grupos ( $F_{3,24} = 32,41$ ;  $p < 0,001$ ), O teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou diferenças significativas entre os grupos E7 e E2 ( $p < 0,05$ ),

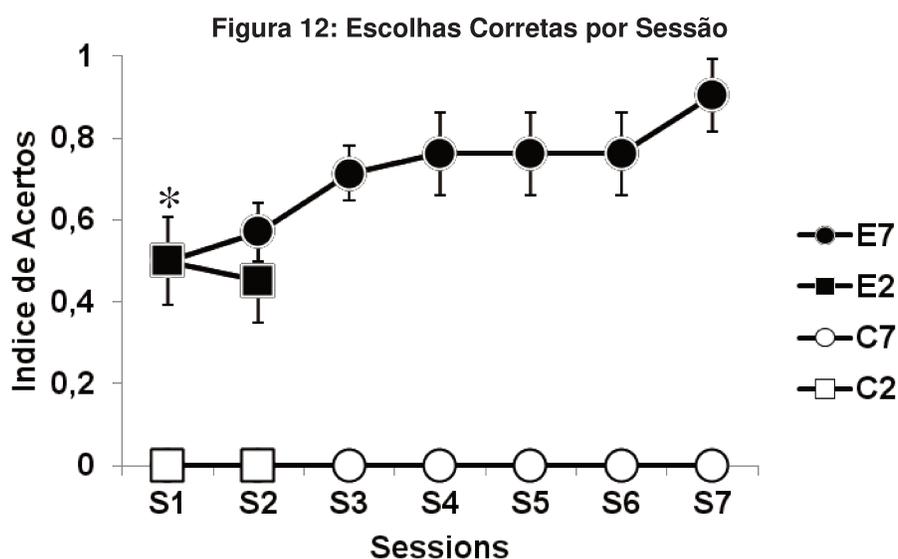
Figura 11: Porcentagem de escolhas corretas



Porcentagem média de escolhas corretas computadas para os grupos E7, E2, C7 e C2. Cada barra representa a porcentagem média de acertos considerando-se todas as sessões de treinamento \* Diferença significativa em relação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ).

Na Figura 12 são apresentados valores dos índices de respostas de escolhas corretas calculados considerando-se a proporção entre as respostas de escolhas corretas em cada sessão em relação ao total de escolhas ( $\frac{\sum \text{respostas corretas}}{\sum \text{respostas corretas} + \text{incorretas} + \text{omissões}}$ ). Os dados analisados por meio de ANOVA para medidas repetidas indicou que o índice de escolhas do comedouro correto diferiu significativamente entre os grupos ( $F_{3,24} = 45,22$ ;  $p < 0,001$ ), entre as sessões ( $F_{6,24} = 3,87$ ;  $p < 0,05$ ), com interação significativa grupo

x sessão ( $F_{=3,6} = 2,82$ ;  $p < 0,05$ ). A interação significativa entre grupo e sessão indicaria que o número de acertos dependeu do tipo e da quantidade de treino. As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que os grupos E2 e E7 diferiram significativamente dos grupos controles C2 e C7 ( $p < 0,05$ ). As diferenças significativas entre as sessões S1 e S7 ( $p < 0,05$ ) indicam o efeito do treino de longa duração.

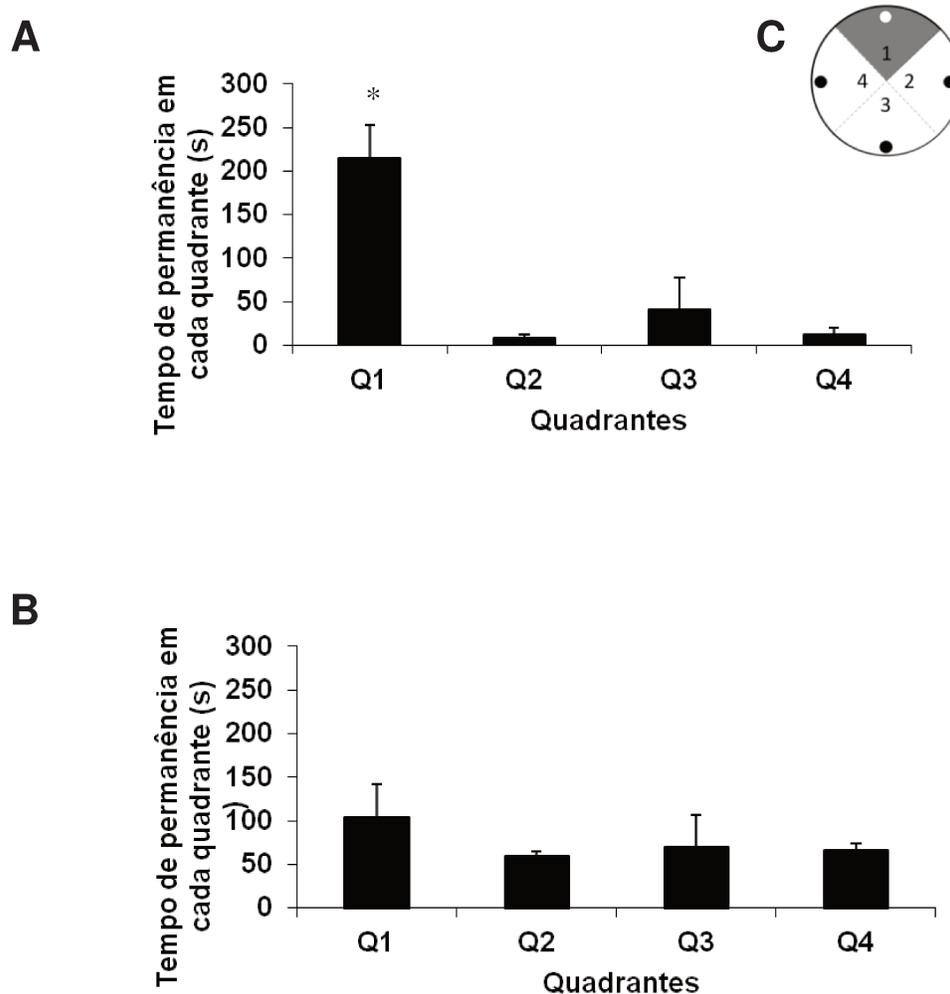


Índice de escolhas corretas calculadas para cada uma das sete sessões de treinamento. Cada ponto representa uma sessão de treinamento com 6 tentativas cada; \* Diferença significativa em comparação aos controles ( $P < 0.05$ ).

Na Figura 13 são apresentados dados de duração percentual de tempo de permanência em cada quadrante virtual da arena de treino durante o teste de estratégia espacial. Os comedouros foram retirados da arena antes dos animais serem liberados nela. Os dados mostram que os pombos do grupo E7 permaneceram em torno de 67% do tempo no quadrante 1, onde estava localizado anteriormente o comedouro correto durante as sessões de treino. As análises com o teste ANOVA indicaram diferença significativas entre os tempos de permanência nos quadrantes entre os grupos ( $F_{1,6} = 12,13$ ;  $p < 0,001$ ) O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que no grupo E7 a

permanência no quadrante 1, foi estatisticamente diferente dos demais quadrantes ( $p < 0,05$ ). O Teste de Tukey-Kramer indicou que a permanência no quadrante correto para pombos do grupo E2 não foi significativamente diferente ( $p > 0,05$ ).

Figura 13: Teste de estratégia espacial

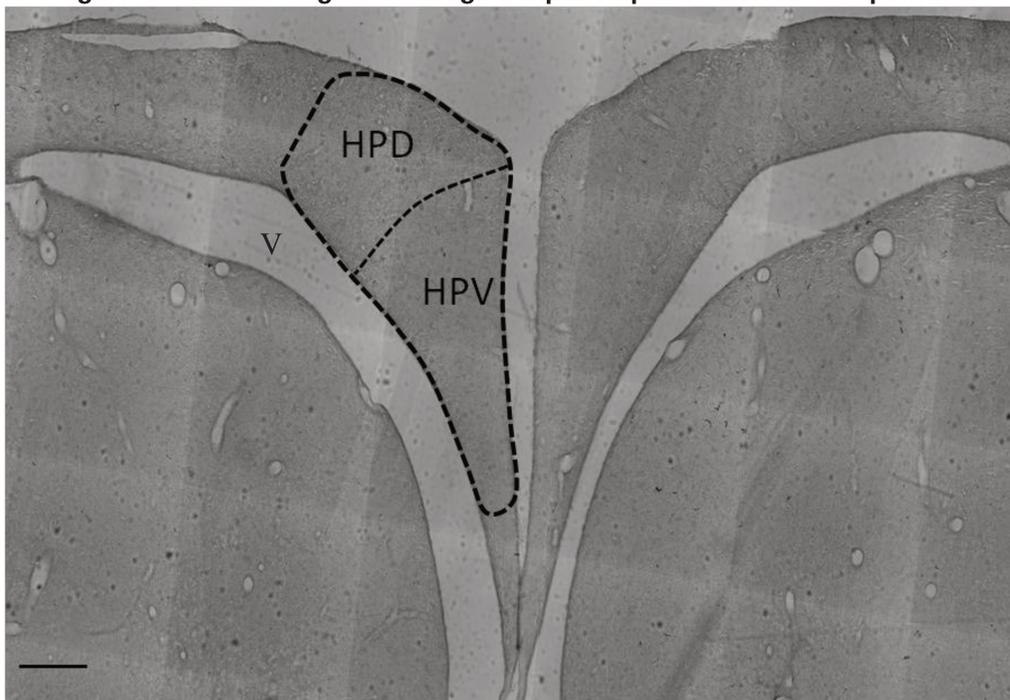


Porcentagem média de permanência em cada quadrante. Em (A) para os animais treinados durante 7 dias (E7), não foi evidenciada diferença significativa entre os quadrantes ( $p > 0,05$ ) Em (B) para os animais treinados durante 2 dias (E2), indicando que a permanência no quadrante 1 foi significativamente maior que os demais quadrantes  $* = p < 0,05$ . Em (C) o detalhe ilustra a posição de cada quadrante, onde o quadrante 1 (cinza) representa o local onde havia o comedouro com alimento, nos demais quadrantes (branco), havia apenas os comedouros com areia.

## **EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ZENK E SINAPSINA I**

A Figura 14 apresenta uma imagem digitalizada de uma secção frontal, bilateral, das regiões anteriores do hipocampo (A 7.75; KARTEN e HODOS 1967). Cortes hipocampais obtidos nesse nível foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para a marcação de células Zenk-positivas ou Sinapsina I-positivas. Essas células, devido à utilização de 3'3 diaminobenzidina, são identificadas em microscópio de campo claro em preto. Na figura14 é possível visualizar, a partir das linhas virtuais sobrepostas às imagens (linhas tracejadas), as regiões hipocampais: Hipocampo Dorsal - HpD e Hipocampo Ventral (HpV) (KREBS, *et al.* 1998). O HpD tem limite inferior, traçado a partir de uma linha virtual que une a borda do ventrículo lateral e a linha medial do hipocampo, e limite superior, traçado a partir de uma linha virtual que une a borda da curvatura do ventrículo lateral à superfície dorsal do telencéfalo. O teto da região ventral corresponde à linha-limite inferior do HpD e superior do HpV (CANOVA, 2009; BRITO *et al.*, 2006; SPERANDÉO, 2006).

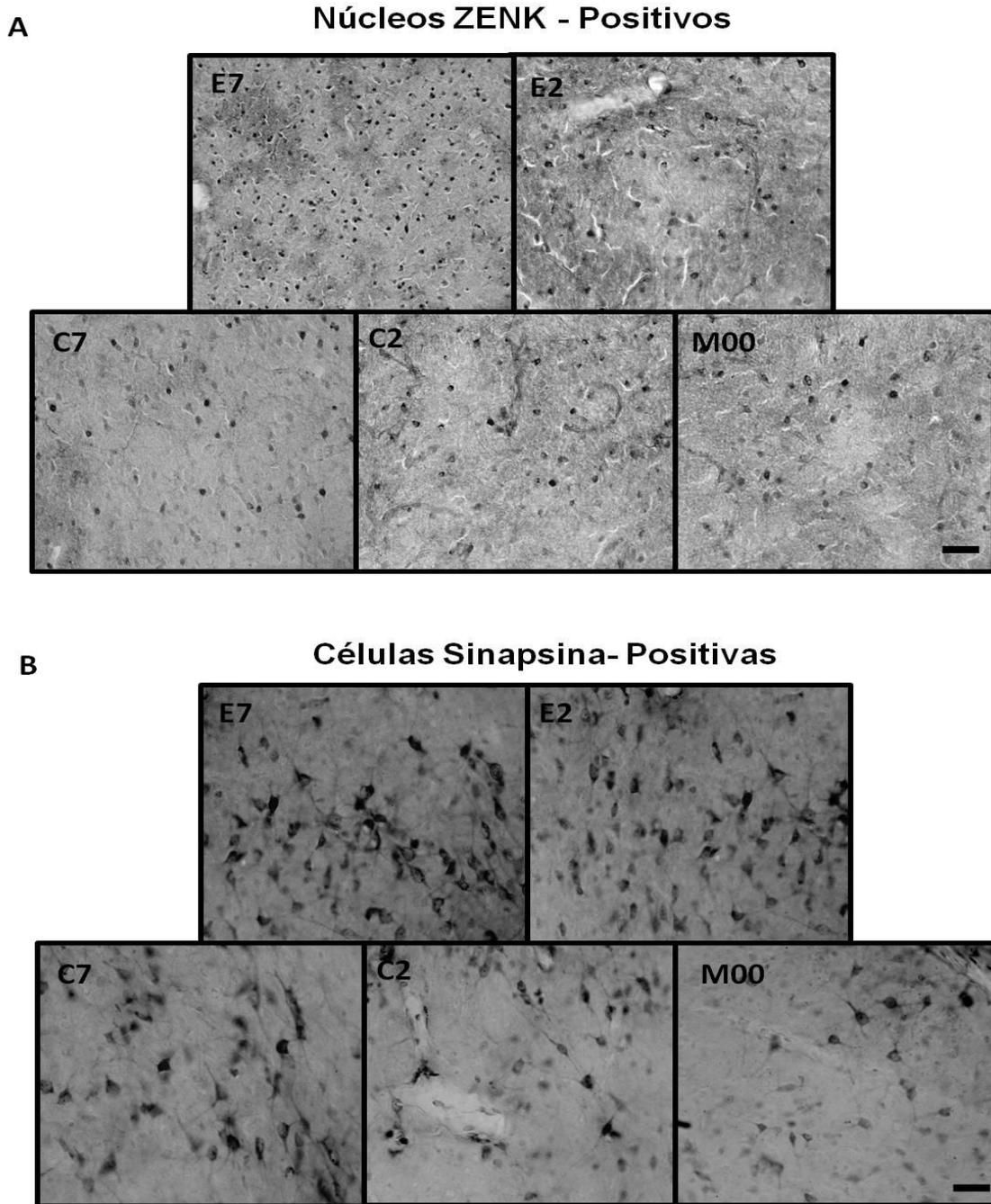
**Figura 14: Fotomicrografia da região hipocampal do encéfalo de pombos.**



As linhas tracejadas em preto delimitam as áreas que serão analisadas, HPD – Hipocampo Dorsal; Hipocampo Ventral - HPV e "V" - Ventrículo; Barra de escala = 500  $\mu\text{m}$ . Esta imagem não sofreu nenhum tipo de tratamento.

Na Figura 15 são apresentadas imagens digitalizadas obtidas a partir de seções frontais das regiões anteriores do hipocampo de pombos dos grupos E7, E2, C7, C2 e M00 (Manipulação). Em (A) temos a marcação imunistoquímica de células Zenk-positivas onde cada ponto escuro indica a marcação característica nuclear. Em (B) são indicadas a marcação imunistoquímica de Sinapsina I – positivas, onde se têm marcação com característica do citoesqueleto.

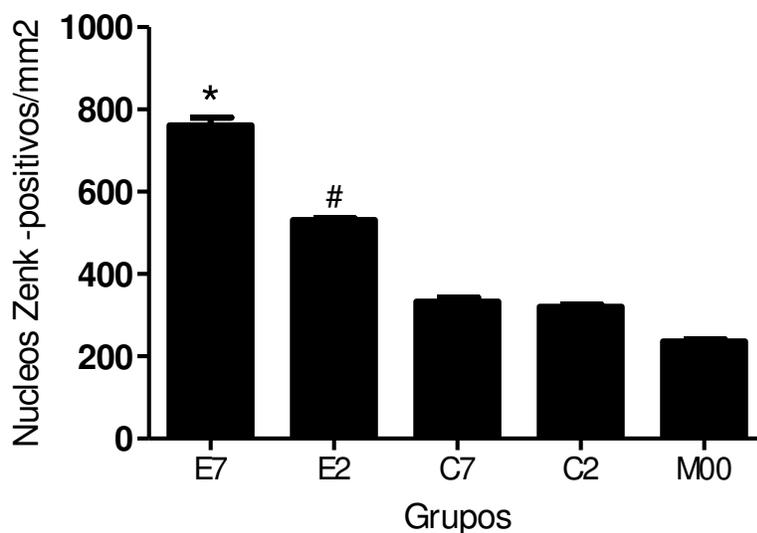
Figura 15: Fotomicrografias da região Dorsal do Hipocampo do encéfalo de pombos evidenciando o padrão de marcação após técnica de imunistoquímica



(A) Proteína Zenk utilizando-se a técnica de imunistoquímica. Barra de escala = 200 $\mu$ m (B): Proteína Sinapsina I utilizando-se a técnica de imunistoquímica. Barra de escala = 100 $\mu$ m.

A Figura 16 mostra a comparação da densidade média de células Zenk-positivas encontradas no hipocampo total de pombos (HpD + HpV), dos grupos E7, E2, C7, C2 e M00, avaliadas após a última sessão de treino de memória espacial. Observa-se uma maior densidade de núcleos Zenk-positivos no hipocampo dos animais do Grupo E7. A análise estatística com ANOVA indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{4,20} = 84,38$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey - Kramer indicou diferença significativa entre E7 e os demais grupos ( $p < 0,05$ ), diferença significativa entre E2 e os grupos E7, C7, C2 e M00 ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos C7 e C2 ( $p > 0,05$ ).

**Figura 16: Densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo total.**

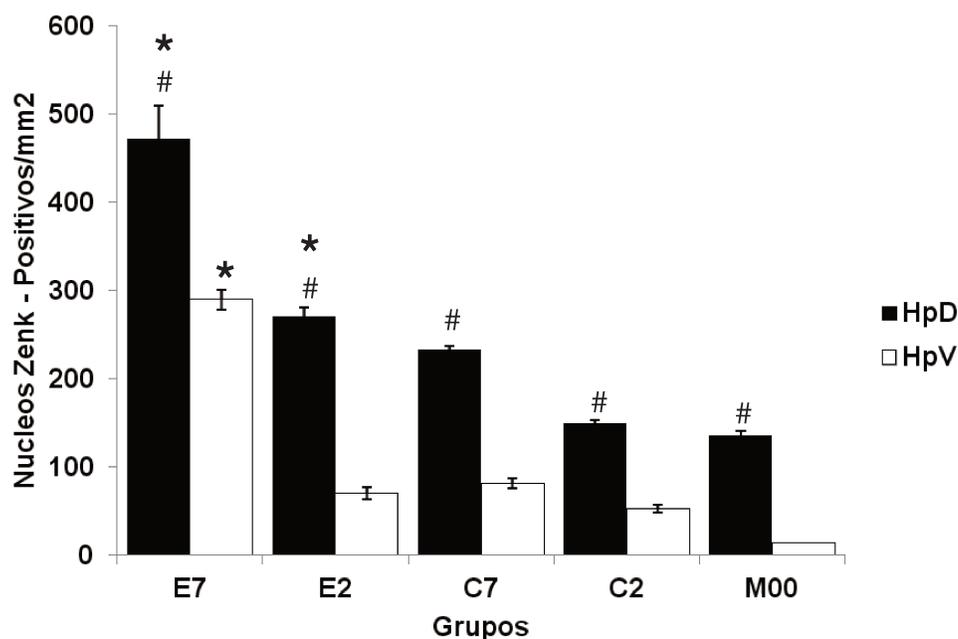


(HpD + HpV) de pombos submetidos ao treino de memória espacial; E7 = Grupo Experimental de longa duração; E2 = Grupo Experimental de curta duração; C7 = Grupo Controlado de longa duração, C2 = Grupo Controle de curta duração e M00 = Grupo Manipulação. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ); # = diferença significativa em comparação aos grupos E7, C2, C7 e M00 ( $p < 0,05$ ).

A Figura 17 mostra a comparação da média de núcleos Zenk-positivos encontrados no hipocampo de pombos dos diferentes grupos, avaliados após a última sessão de treino de memória espacial, essa análise foi feita dividindo-se o

hipocampo nas áreas HpD e HpV para cada um dos grupos. A análise com ANOVA indicou que a média de marcação de núcleos Zenk- positivos em HpD e HpV teve diferença significativa entre grupos ( $F_{4,20} = 44,14$ ;  $p < 0,0001$ ), entre as áreas ( $F_{1,20} = 55,20$ ;  $p < 0,0001$ ), e uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{4,4} = 9,89$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação Zenk-positiva em HpD do grupo E7 foi significativamente diferente de HpV para o mesmo grupo ( $p < 0,05$ ), além de ser diferente de HpD e HpV dos demais grupos – E2, C7, C2 e M00 ( $p < 0,05$ ).

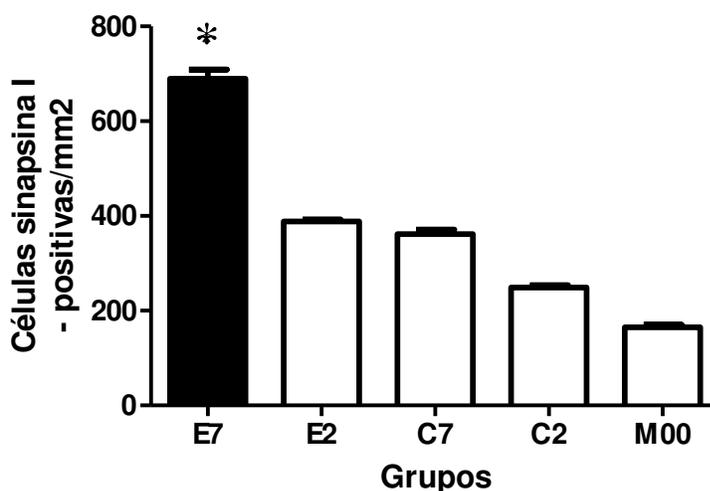
Figura 17: Densidade média de núcleos Zenk-positivos



Densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo de pombos, avaliado após o treino de memória espacial. Para as duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) dos animais dos grupos treinado durante 7 dias (E7), grupos treinado durante 2 dias (E2), grupos controles 7 e 2 dias (C7 e C2), Manipulação (M00). \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). # = diferença significativa em comparação as áreas HpD e HpV ( $p < 0,05$ ).

A Figura 18 mostra a comparação da densidade média de células Sinapsina I-positivas encontradas no hipocampo total de pombos (HpD + HpV), dos grupos E7, E2, C7, C2 e M00, avaliados após o treino de memória espacial. Observa-se uma maior marcação células Sinapsina I-positivas no hipocampo dos animais do Grupo E7. A análise estatística com o teste de variância ANOVA de uma via, indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{(4,20)} = 92,84$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey - Kramer indicou diferença significativa entre E7 com os demais grupos ( $p < 0,05$ ), diferença significativa entre E2 e C2 e M00 ( $p < 0,05$ ), mas não entre E2 e C7 ( $p > 0,05$ ).

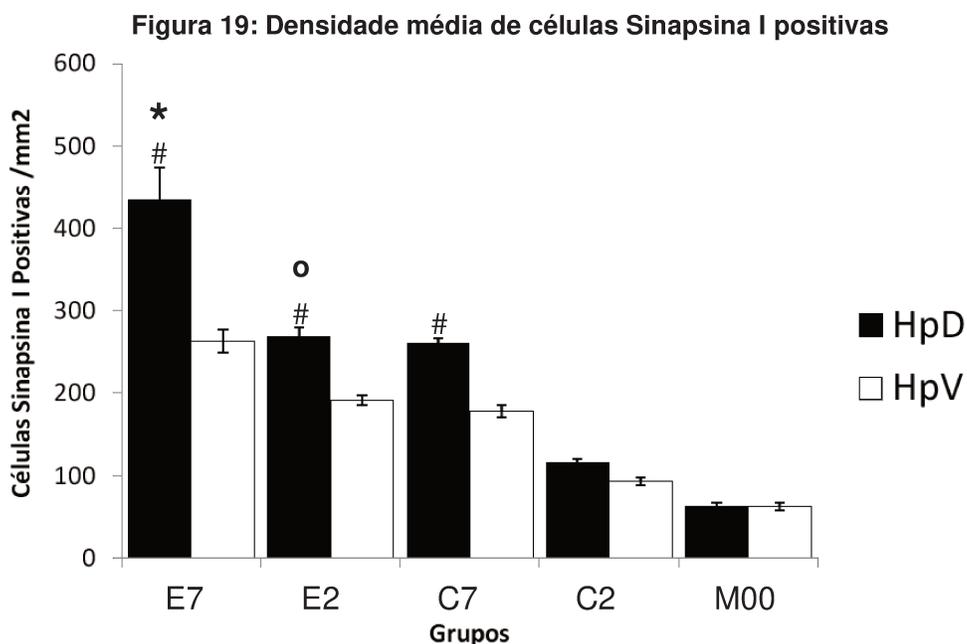
**Figura 18: Densidade média de células Sinapsina I-positivas no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao treino de memória espacial.**



**E7 = Grupo Experimental de longa duração; E2 = Grupo Experimental de curta duração; C7 = Grupo Controlado de longa duração, C2 = Grupo Controlado de curta duração e M00 = Grupo Manipulação. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ )**

A Figura 19 mostra a comparação da densidade média de células Sinapsina I -positivas encontradas no hipocampo de pombos dos diferentes grupos, avaliados após o treino de memória espacial. Comparando-se as regiões HpD e HpV para cada um dos grupos. A análise com ANOVA indicou que a média de marcação células Sinapsina I - positivas em HpD e HpV teve diferença significativa entre grupos ( $F_{4,20} = 91,35$ ;  $p < 0,0001$ ), entre as áreas ( $F_{1,20} = 80,34$ ;  $p < 0,0001$ ), e

uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{4,4} = 40,69$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação de células Sinapsina I - positivas em HpD do grupo E7 foi significativamente diferente de HpV para o mesmo grupo ( $p < 0,05$ ), além de ser diferente de HpD e HpV dos demais grupos – E2, C7, C2 e M00 ( $p < 0,05$ ).



Média de células Sinapsina I-positivos no hipocampo de pombos, avaliado após o treino de memória espacial nas duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) de animais dos grupos treinado durante 7 dias (E7), grupos treinado durante 2 dias (E2), grupos controles 7 e 2 dias (C7 e C2), Manipulação (M00). \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ); # = diferença entre HpD e HpV ( $p < 0,05$ ); ° = diferença significativa em comparação aos grupos E7, C2 e M00 ( $p < 0,05$ ).



**DISCUSSÃO**  
**EXPERIMENTO I**

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores mostrando aprendizagem espacial em aves em uma versão do labirinto espacial adaptada para escolha alimentar, em pombos (AMARAL - TOMA E FERRARI, 2004; FREMOW *et al.*, 1997; KAHN E BINGMAN, 2009), e mandarins (BISCHOF *et al.*, 2006, MAYER *et al.*, 2010, MAYER *et al.*, 2012).

Tanto o grupo E7 quanto o grupo E2 apresentaram significativamente maior imunorreatividade para Zenk do que nos pombos controles resultado que é indicativo de ativação de Zenk dependente de experiência espacial no hipocampo de pombos. Essas observações estão de acordo com os estudos de aprendizagem espacial em mandarins, mostrando a alta ativação de Zenk durante a aprendizagem de uma tarefa espacial, mas não durante a aprendizagem que não exigia uso de pistas espaciais para encontrar alimento (BISCHOF *et al.*, 2006). Além disso, os presentes dados também estão de acordo com trabalhos anteriores de nosso laboratório sobre a expressão de Zenk no hipocampo de pombos de aves treinadas no condicionamento clássico aversivo (CANOVA, 2009; BRITO *et al.*, 2006).

O grupo E7, que mostrou alta precisão na localização do comedouro correto também apresentou o maior número de núcleos Zenk - positivos, em comparação com os outros grupos, E2, C7, C2 e M00. Estas diferenças na imunorreatividade à proteína Zenk no hipocampo podem ser relacionadas com a manutenção a longo prazo e persistência da memória espacial na localização do alimento. É interessante lembrar que a memória de longo prazo se forma a partir do processo de consolidação, que depende da transcrição de RNAm e de novas sínteses de proteínas. Assim, a formação da memória envolve fases distintas que são a aquisição a consolidação recuperação a persistência e ou extinção (BECKINSTEIN *et al.*, 2007) Durante a consolidação ocorrem processos que garantem a estabilidade das informação recém armazenadas e seu armazenamento de longa duração tornando-se persistentes (NADER, 2003). Quando uma memória consolidada é evocada esta novamente se torna instável e

passa por um processo de reconsolidação (NADER, 2003; LEE, *et al.*, 2004), permitindo que a memória já formada se altere. A partir dessa evocação pode ocorrer um processo de reconsolidação que se relaciona com a manutenção ou com a resistência da memória e que é dependente de nova síntese de proteína (LEE, *et al.*, 2004) Reconsolidação é considerado um processo neuronal em que a recuperação de uma memória previamente consolidada retorna a um estado lábil que é mais uma vez sujeito à desestabilização (LEE *et al.*, 2004) . Como um fator-chave para o processo de reconsolidação da memória é a reativação de uma memória consolidada, a suposição de reconsolidação da memória durante a sessão de treinamento pode ser apoiada pelo fato de que a memória do local do alimento foi repetidamente reativada no início de cada sessão de treinamento e, provavelmente, em cada tentativa de treinamento. Além disso, há um conjunto de evidências que mostram que no hipocampo, Zenk é uma molécula relacionada com a memória e é seletivamente envolvida com o processo de reconsolidação (LEE *et al.*, 2004) . Esta evidência fornece outro argumento para apoiar uma relação entre o aumento da expressão de Zenk no hipocampo visto para E7 e a reconsolidação da memória espacial. No entanto, Mayer *et al.* (2010) analisaram a expressão Zenk em mandarins durante a aprendizagem e recordação de uma tarefa de memória espacial e mostraram que o hipocampo dessas aves foi ativado durante a recuperação de uma tarefa espacial aprendida, mas a ativação foi significativamente menor do que quando os animais estavam em fase inicial de aprendizagem. Perante esta discrepância, vale a pena considerar que Mayer et al. (2010) avaliaram a aprendizagem e recuperação, respectivamente, depois de quatro ou doze tentativas consecutivas dentro de um período de tempo relativamente curto, o que poderia explicar os processos de memória de curto prazo, enquanto que em nosso estudo utilizamos períodos de avaliação diária que poderiam explicar a consolidação da memória a longo prazo.

Nosso estudo revelou também que a imunorreação de Sinapsina I teve um aumento proeminente no hipocampo do grupo E7. Sinapsina I é parte de uma

família de fosfoproteínas envolvidas na regulação neuronal da liberação de neurotransmissores, com atividade regulada por fosforilação de CaMKII e está intimamente relacionada às mudanças de plasticidade. CREB e CaMKII são reguladas e ativadas por  $Ca^{2+}$ , com influxo mediado pelo receptor N - metil - D - aspartato (NMDA) e  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Os dados sobre o aumento da imunorreatividade de Sinapsina I após treinamento em localização espacial do alimento são consistentes com vários estudos sobre o aprendizado e memória. Chau *et al.*, (2013) relataram que treinos com cinco dias de aprendizagem associativa em ratos adultos aumentam a expressão de Sinapsina I na camada IV do córtex somatossensorial primário. Além disso, a cascata de atividade sináptica que ativa a Sinapsina I é fundamental para a aprendizagem espacial. Estudos têm mostrado que a aprendizagem dependente do hipocampo estimula o BDNF (GÓMEZ- PINILLA *et al.* 2001) e ERK 1/2 (KUSHNER *et al.*, 2005) e a fosforilação de Sinapsina I e que os déficits na aprendizagem espacial foram relacionados com baixo nível de Sinapsina I (CORRADI *et al.*, 2008 ). Sinapsina I também desempenha um papel na aprendizagem associativa olfativa em *Drosophila* (MICHELS *et al.*, 2005). No entanto, Rapanelli *et al.*, (2009) verificaram que a expressão de Sinapsina I no hipocampo de ratos foi maior durante a aprendizagem inicial de uma tarefa operante do que após a tarefa ter sido aprendida. Esta diferença entre os grupos foi interpretada como refletindo uma diminuição da plasticidade sináptica no grupo que completou o treinamento. Embora incrementos de mRNA de Sinapsina I em um tarefa de aprendizagem instrumental tem sido relacionada com a função sináptica e com o aumento da plasticidade (GOMEZ- PINILLA *et al.*, 2007), ainda precisamos de investigações adicionais para uma melhor compreensão sobre estes questões.

No presente estudo, a análise celular foi realizada considerando a subdivisão do hipocampo em regiões dorsal e ventral (KAHN *et al.*, 2003). Ambas as áreas dorsal e ventral correspondem a subdivisões do hipocampo que são caracterizados por um perfil neuroquímica complexo já descrito por Erichsen *et al.*

(1991). Estudos recentes apresentaram algumas ligações internas importantes que apoiam a proposta de uma organização hodológica em aves que poderia ser semelhante ao circuito trissináptico dos mamíferos (HOUGH *et al.*, 2004; KAHN *et al.*, 2003). Em pombos, a informação sensorial chega através da área dorsal, especificamente para a área dorsolateral com as projeções para a área dorsomedial. Então, um circuito flui para a área ventral ipsolateral e contralateral do hipocampo. Depois deste ponto, o circuito atravessa a área dorsal para outras áreas palidais (ATOJI, *et al.*, 2006). Assim, a imunomarcagem de núcleos Zenk - positivos e Sinapsina I no Hipocampo Dorsal pode assim ser visto como a ativação dos circuitos que processam a informação aferente originada em diferentes regiões como, tálamo, hipotálamo, locus coeruleus e núcleo da rafe. As diferenças na marcação de ambos Zenk e Sinapsina I, que foram encontrados em DHP e em VHP podem ser vistas como prova de uma distribuição diferencial em todas as regiões do hipocampo, e recrutamento regional da atividade neuronal mediada por Zenk e sinapsina I, no hipocampo em uma situação exigindo a memória espacial. A ativação regional do hipocampo também foi relatada por outros estudos que avaliaram a expressão de gene de expressão imediata com ratos e pombos treinados no condicionamento clássico aversivo (BRITO *et al.*, 2006).

A análise do hipocampo de pombos submetidos ao teste de estratégia espacial mostraram que tanto E2 quanto E7 expressaram valores semelhantes para a imunorreatividade para Zenk e Sinapsina I. A ausência de diferenças significativas entre os grupos, após este teste embora inesperada poderia ser explicada em relação as características do teste de estratégia espacial, como nesse teste houve a retirada dos comedouros da arena os pombos foram colocados numa situação que apresentou novidade em relação anteriormente conhecido pelo pombo dos dois grupos, E2 e E7. Neste sentido, este teste pode ser considerado comparável aos testes utilizados para a investigação de processos de aprendizagem que exigem avaliação de ocorrência anterior de estímulos e integração das informações sobre as características de objetos e

localização (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2013). Na verdade, o teste de estratégia espacial representa uma situação em que é necessário que o organismo se lembre da localização espacial de estímulos que não estão mais presentes. O hipocampo, o córtex entorrinal e o córtex pré - frontal (CPF) são indicados como as principais áreas do cérebro envolvidas no processo de reconhecimento de objetos no cérebro de roedores (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2013).

Sarantis *et al.*, (2012) mostraram que a novidade espacial induziu no hipocampo e CPF de ratos um aumento significativo de fosforilação de subunidades dos receptores AMPA e NMDA bem como ativação da via de sinalização de ERK 1/2. (BOZON *et al.*, (2003) demonstraram que camundongos knock out para o gene *zif 268* apresentaram prejuízos severos na memória de reconhecimento e localização de objetos novas em uma arena. Assim, a investigação da expressão de Zenk, Sinapsina I no hipocampo é uma ferramenta potencial para esclarecer a participação e a ativação relativa das diferentes áreas do cérebro durante o teste de estratégia espacial.

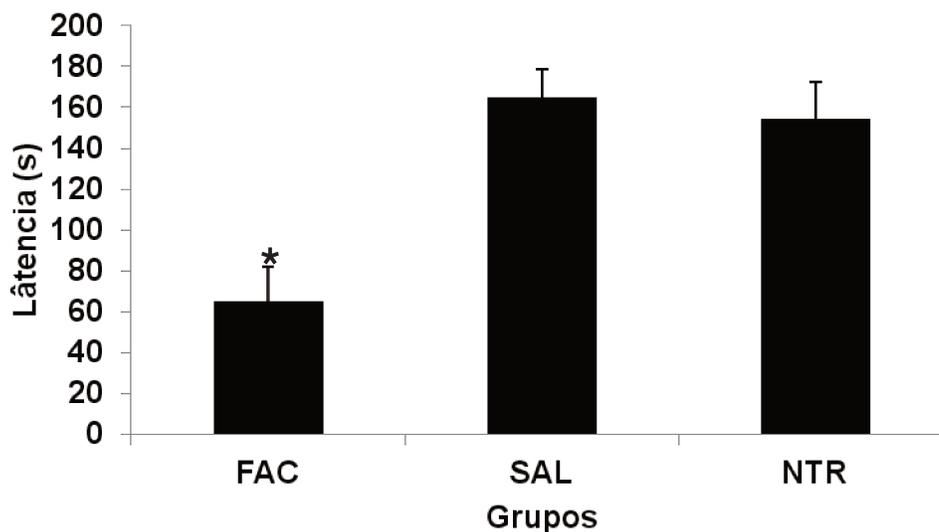
Em conclusão, nossos presentes resultados confirmaram um papel para a ativação de Zenk e Sinapsina I em circuitos neuronais do hipocampo de pombos durante a formação e a persistência da memória espacial em pombos. Os dados apontam para a necessidade de estudos adicionais para esclarecer melhor o papel desempenhado por estas proteínas dentro da rede molecular altamente complexa e dinâmica que é ativada durante as diferentes fases de formação da memória espacial e persistência e a plasticidade subjacente. Além disso, é possível dizer que os nossos dados contribuem e estimulam discussões sobre os muitos mecanismos comportamentais, neurais e moleculares que são conservados no hipocampo de aves e mamíferos.

**RESULTADOS**  
**EXPERIMENTO II**

## ANÁLISE COMPORTAMENTAL

A Figura 20 mostra as distribuições de latência média da resposta de escolha do comedouro nos diferentes grupos submetidos às sessões de treinamento em escolha alimentar – FAC, SAL e NTR. O teste de análise de variância ANOVA indicou diferenças significativas entre grupos ( $F_{(2,39)} = 86,39$   $p < 0,0001$ ). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que no conjunto das sessões de treino a administração de faclofeno resultou em latências significativamente menores em relação aos grupos SAL, e NTR ( $p < 0,05$ ).

Figura 20: Latência média da resposta de escolha alimentar nos diferentes grupos.

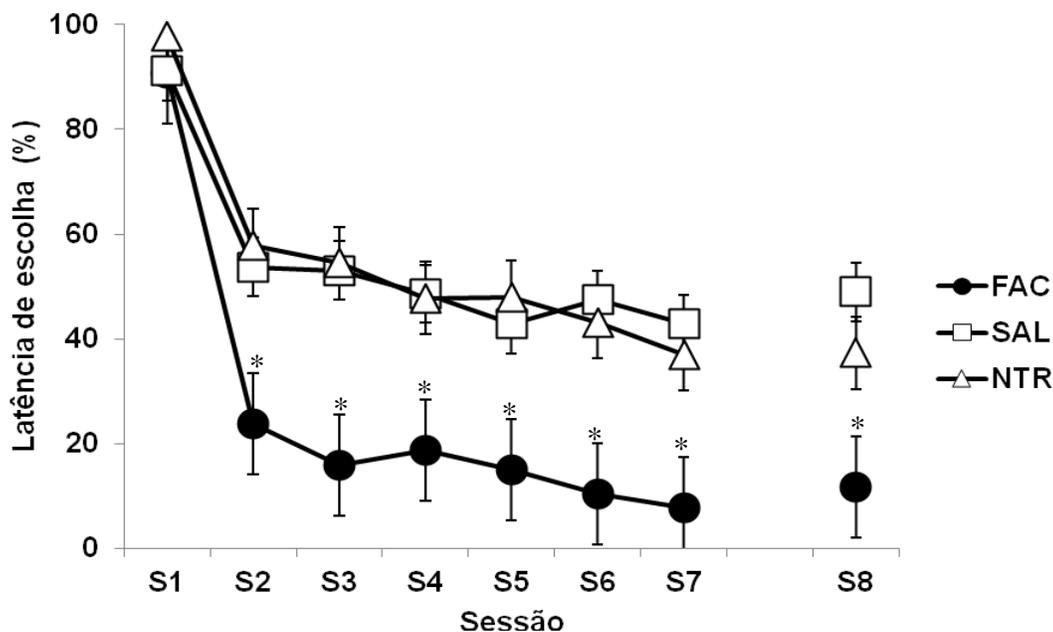


FAC (Grupo Faclofeno), SAL (Grupo Salina), NTR (Grupo Sem Tratamento). \* Diferença significativa em comparação aos grupos SAL, e NTR.

Na Figura 21 são apresentados os valores da latência média da resposta de escolha em função das sessões de treinamento para cada um dos grupos: – FAC, SAL e NTR. Cada ponto representa o valor médio das latências, considerando-se os valores registrados nas 6 tentativas de cada sessão. O teste de análise de ANOVA para medidas repetidas indicou diferença estatisticamente significativa

entre os grupos ( $F_{2,39} = 58,70$   $p < 0,001$ ) sessão ( $F_{7,36} = 201,36$ ;  $p < 0,0001$ ) e interação entre grupo e sessão ( $F_{2,7} = 3,10$   $p < 0,001$ ). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que a as sessões 2, 3, 4, 5, 6 e 7 do grupo FAC foram significativamente diferentes das sessões 2, 3,4, 5, 6 e 7 dos grupos SAL e NTR ( $p < 0,05$ ). Além disso, foi encontrada diferença significativa entre a sessão 8 do grupo FAC em relação aos grupos SAL e NTR ( $p < 0,05$ ). Na sessão 1, o grupo FAC não apresentou diferenças significativas em comparação com a sessão 1 dos grupos SAL e NTR ( $p > 0,05$ ), demonstrando que no início do experimento todos os animais apresentaram latência semelhante.

**Figura 21: Latência percentual média da resposta de escolha**

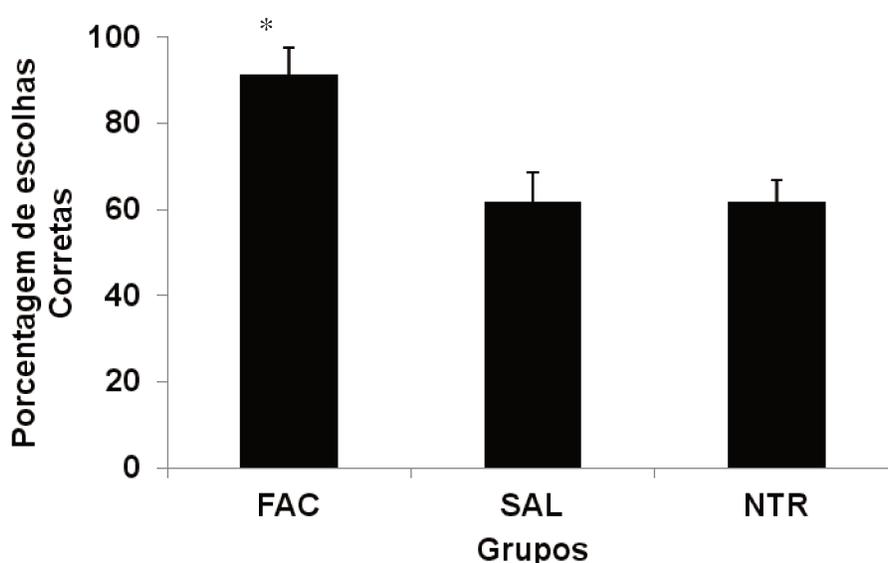


**Latência média da resposta de escolha em função das sessões de treinamento. \* = diferença significativa das sessões do grupo FAC em relação aos demais grupos;  $p < 0,05$ .**

A Figura 22 mostra a porcentagem de escolhas corretas para os grupos FAC, SAL e NTR, indicando que o a administração de faclofeno resultou em índices médios de acerto na localização do alimento que, considerando-se as 07 sessões, foi acima de 86%. A análise com ANOVA de uma via indicou diferenças

significativas entre os grupos ( $F_{2, 39} = 57,52$ ;  $P < 0,0001$ ). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que no conjunto das sessões de treino a administração de faclofeno resultou em escolhas corretas significativamente maiores em relação aos grupos SAL e NTR ( $p < 0,05$ ).

Figura 22: Porcentagem de escolhas corretas

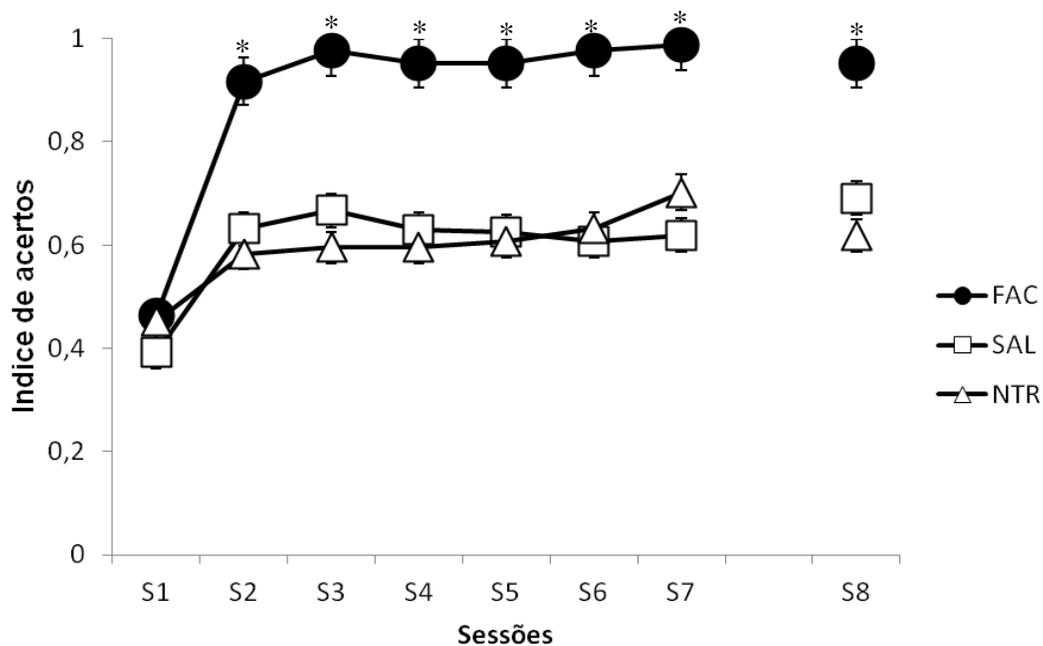


Porcentagem de escolhas corretas entre os grupos FAC, SAL e NTR, \* =  $p < 0,05$ .

Na Figura 23 são apresentados o índice de respostas de escolhas corretas calculadas (resposta correta/total de respostas) para cada uma das sessões de treinamento. Os dados analisados por meio de ANOVA para medidas repetidas indicaram que o índice de escolhas do comedouro correto diferiu significativamente entre os grupos ( $F_{2,39} = 9,18$ ;  $p < 0,05$ ) e entre as sessões ( $F_{2,39} = 22,88$ ;  $p < 0,001$ ). O Teste de Tukey-Kramer para múltiplas comparações *post hoc* indicou que a sessão 1 do grupo FAC é diferente das sessões 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e 8 desse grupo ( $p < 0,05$ ). A média de acertos na última sessão do grupo

FAC foi acima de 91%, enquanto as médias de acerto para a última sessão dos grupos SAL e NTR foram de 57% e 61% respectivamente.

Figura 23: Escolhas Corretas por Sessão



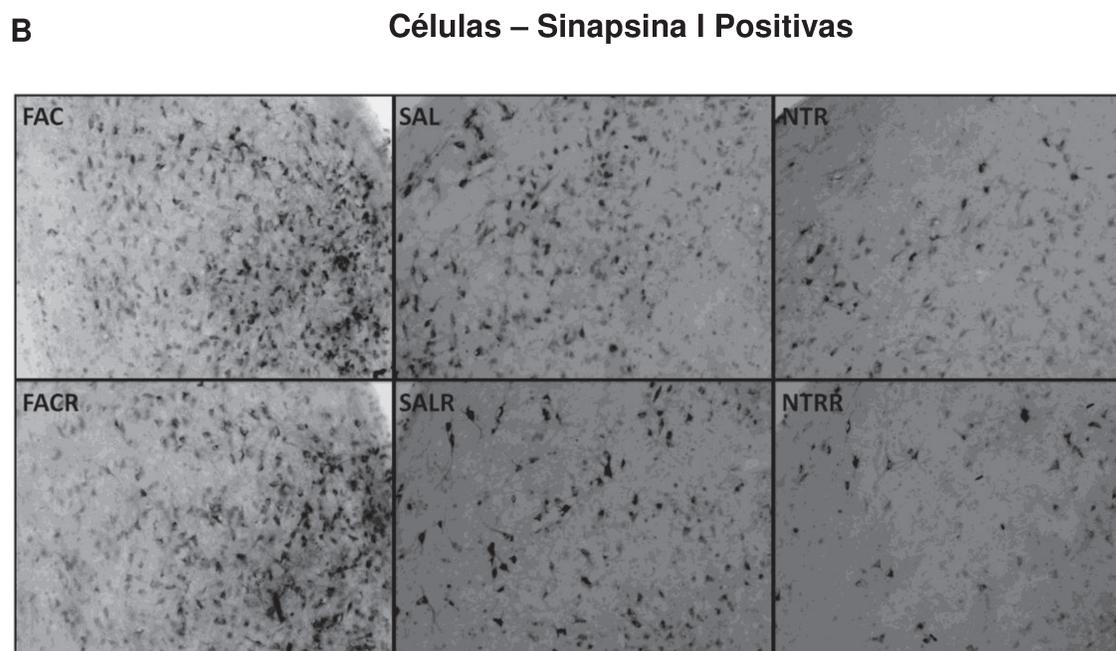
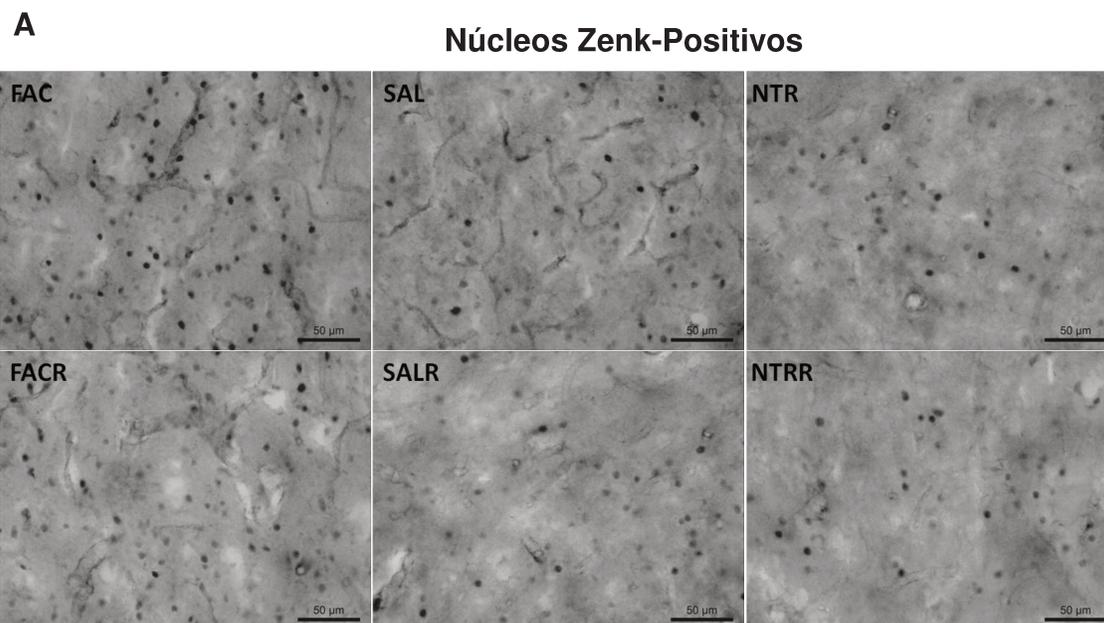
Índice de escolhas corretas calculadas para cada uma das sete sessões de treinamento. Cada ponto representa uma sessão de treinamento com 6 tentativas cada; \* Diferença significativa em comparação a cada sessão dos demais grupos ( $P < 0.05$ ).

## **EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ZENK E SINAPSINA I**

A análise das regiões do hipocampo foi realizada da mesma forma que o descrito no experimento I.

Na Figura 24 são apresentadas imagens digitalizadas de secções frontais, unilaterais, das regiões anteriores do hipocampo. Esses cortes foram submetidos à imunistoquímica para a marcação de células Zenk-positivas onde se têm marcação com característica nuclear (A), ou Sinapsina I – positivas, onde se têm marcação com característica do citoesqueleto (B). Para os Grupos FAC, SAL e NTR, juntamente com as imagens dos Grupos FACR, SALR e NTRR, que foram submetidos ao teste de persistência da memória espacial, esses animais foram treinados durante 7 dias e 7 dias após o último dia de treinos, foram submetidos ao teste de persistência que consistia de mais um dia de treino.

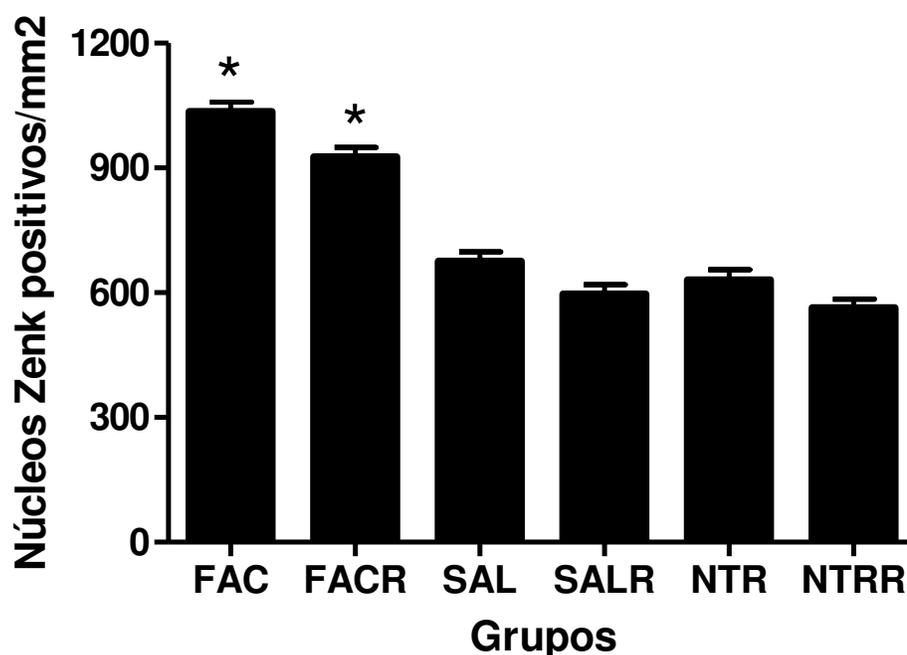
Figura 24: Fotomicrografias da região Dorsal do Hipocampo do encéfalo de pombos evidenciando o padrão de marcação após técnica de imunistoquímica.



(A) Proteína Zenk utilizando-se a técnica de imunistoquímica. Barra de escala = 200µm (B): Proteína Sinapsina I utilizando-se a técnica de imunistoquímica. Barra de escala = 100µm.

A Figura 25 mostra a comparação da média de núcleos Zenk-positivos encontrados no hipocampo de pombos, considerando-se as duas regiões (HpD + HpV), dos grupos FAC, FACR, SAL, SALR, NTR E NTRR, avaliados após o treino de memória espacial. Observa-se uma maior marcação células Zenk-positivas no hipocampo dos animais dos Grupos FAC e FACR em relação aos demais. A análise estatística com ANOVA para múltiplas comparações indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{(5,30)} = 120,9$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey - Kramer indicou diferença significativa dos grupos FAC e FACR com relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

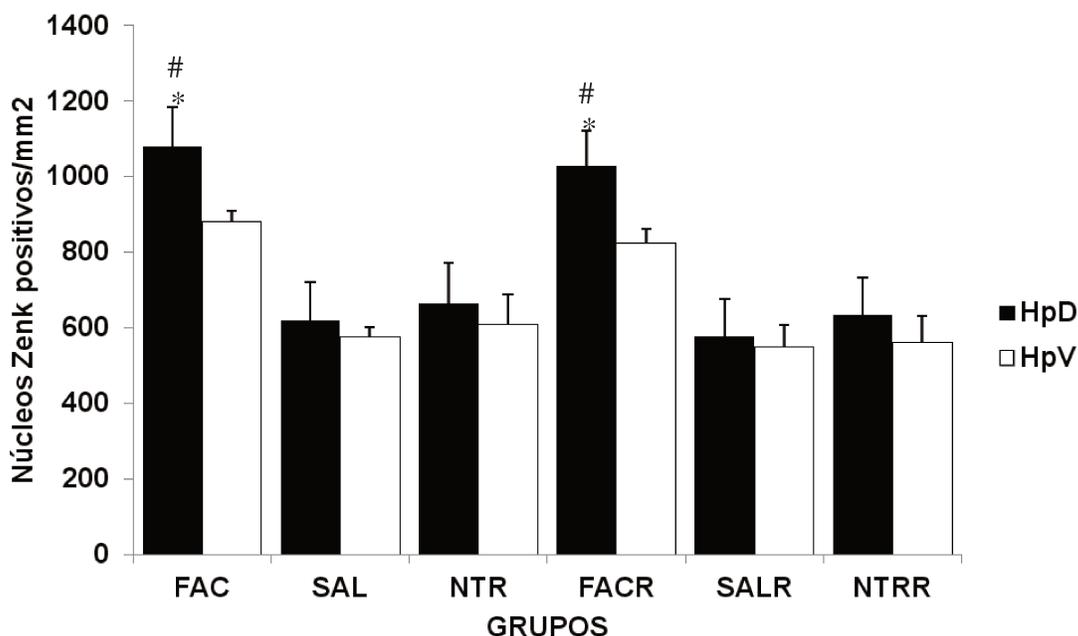
**Figura 25: Densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo total**



Densidade média de núcleos marcados ZENK-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao treino de memória espacial. FAC = Grupo Faclofeno; FACR = Grupo Faclofeno Recuperação; SAL = Grupo Salina, SALR = Grupo Salina Recuperação, NTR = Grupo Não Tratado e NTR = Grupo Não Tratado Recuperação. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

A Figura 26 mostra a comparação da média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo de pombos dos diferentes grupos, avaliados após o treino de memória espacial para HpD e HpV para cada um dos grupos. A análise com ANOVA indicou que a média de marcação de núcleos ZENK-positivos em HpD e HpV teve diferença significativa entre grupos ( $F_{4,28} = 444,14$ ;  $p < 0,0001$ ), entre as áreas ( $F_{1,28} = 1263,93$ ;  $p < 0,0001$ ), e uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{4,4} = 9,89$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação ZENK-positiva em HpD dos grupos FAC e FACR foi significativamente diferente de HpV para os mesmos grupos ( $p < 0,05$ ), além de ser diferente de HpD e HpV dos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

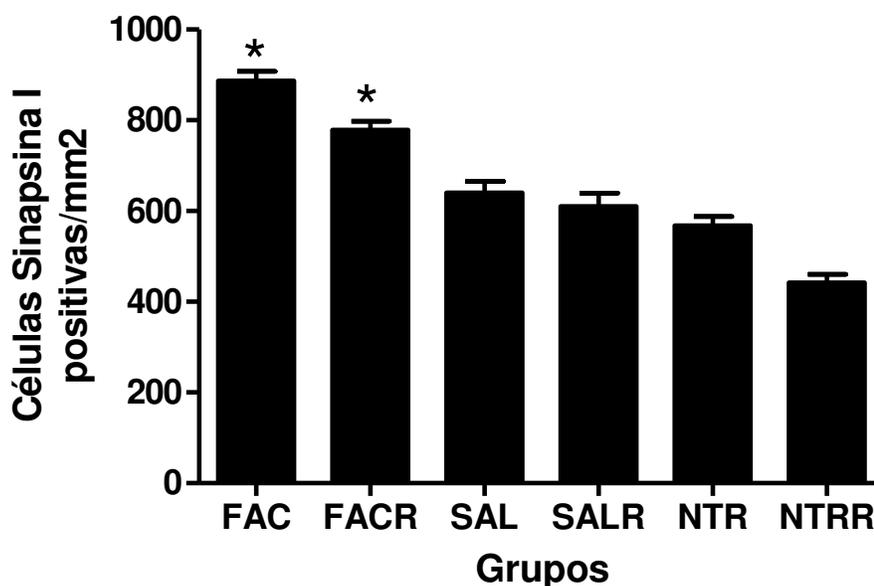
**Figura 26: Densidade média de núcleos Zenk-positivos**



Comparação da média de núcleos ZENK-positivos no hipocampo de pombos, avaliado após o treino de memória espacial. Em (A): as duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) de animais dos grupos FAC = Grupo Faclofeno; FACR = Grupo Faclofeno Recuperação; SAL = Grupo Salina, SALR = Grupo Salina Recuperação, NTR = Grupo Não Tratado e NTRR = Grupo Não Tratado Recuperação. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ); # = diferença entre HpD e HpV ( $p < 0,05$ ).

A Figura 27 mostra a comparação da densidade média da contagem de células Sinapsina I-positivas encontradas no hipocampo total de pombos (HpD + HpV), dos grupos FAC, FACR, SAL, SALR, NTR e NTRR, avaliados após o treino de memória espacial. Observa-se uma maior marcação células Sinapsina I-positivos no hipocampo dos animais dos Grupos FAC e FACR em relação aos demais. A análise estatística com ANOVA para múltiplas comparações indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{5,30} = 120,9$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey - Kramer indicou diferença significativa dos grupos FAC e FACR com relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

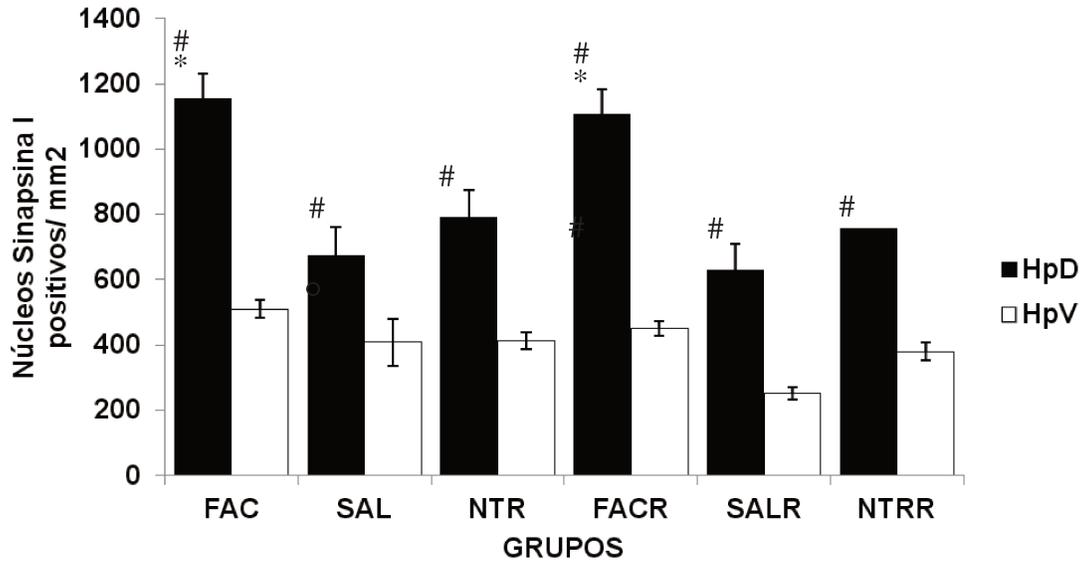
**Figura 27: Densidade Média de células marcadas Sinapsina I-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao treino de memória espacial.**



FAC = Grupo Faclofeno Consolidação; FACR = Grupo Faclofeno persistência; SAL = Grupo Salina, SALR = Grupo Salina persistência, NTR = Grupo Não tratado e NTRR = Grupo Não Tratado persistência. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

A Figura 28 mostra a comparação da Densidade Média de células Sinapsina I - positivas encontradas no hipocampo de pombos dos diferentes grupos, avaliados após o treino de memória espacial. São apresentados os valores da densidade média para as áreas HpD e HpV para cada um dos grupos; A análise com ANOVA indicou que a densidade média de marcação de células Sinapsina I - positivas em HpD e HpV teve diferença significativa entre grupos ( $F_{5,30} = 691,35$ ;  $p < 0,0001$ ), entre as áreas ( $F_{1,30} = 80,34$ ;  $p < 0,0001$ ), e uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{4,4} = 40,69$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação Sinapsina I - positiva em HpV do grupo E7 foi significativamente diferente de HpD para o mesmo grupo ( $p < 0,05$ ), além de ser diferente de HpD e HpV dos demais grupos – E2, C7, C2 e M00 ( $p < 0,05$ ).

Figura 28: Densidade média de células Sinapsina I positivas



Comparação da média de células Sinapsina I-positivas no hipocampo de pombos, avaliado após o treino de memória espacial. As duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) de animais do grupo administrado faclofeno (FAC), Administrado salina (SAL) e o grupo Não tratados (NTR) \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ); # = diferença entre HpD e HpV em relação ao mesmo grupo ( $p < 0,05$ ).

**DISCUSSÃO**  
**EXPERIMENTO II**

O presente estudo apresenta os dados referentes aos efeitos do antagonista de receptores GABA<sub>B</sub>, Flacofeno, sobre a memória da localização do alimento e demonstra o papel dos receptores GABA<sub>B</sub> na aprendizagem, formação e persistência da memória espacial e em mecanismos moleculares subjacentes a tais processos em pombos.

Os animais treinados aprenderam a identificar os comedouros com alimento, como é demonstrado pela diminuição da latência da resposta de escolha. Os dados concordam com o estudo de Kahn & Bingman (2009), demonstrando que os pombos aprenderam a identificar comedouros com alimento e a discriminar entre comedouros com alimentos preferenciais e não preferenciais. Também estão em acordo com estudos prévios que mostraram aprendizagem espacial em pombos treinados numa versão sem água do labirinto de Morris (FREMOW et al., 1997), e em memória espacial de localização de alimento por pombos (AMARAL-TOMA e FERRARI, 2004; KAHN e BINGMAN, 2009), e por Mandarins (BISCHOFF *et al.*, 2006, MAYER *et al.*, 2010, MAYER *et al.*, 2012).

Todos os grupos treinados aprenderam a escolher o comedouro com alimento (correto) reduzindo as latências de escolhas e aumentando os índices de acerto ao longo das sessões. Dados da curva de latência revelam que os pombos que receberam o inibidor de receptores GABA<sub>B</sub> aprenderam a encontrar o comedouro correto dentre as quatro opções disponíveis apresentando latência significativamente menor comparando aos demais grupos. Isso indica que o tratamento pela administração do flacofeno teve um efeito facilitador que é visto logo na segunda sessão, mantendo-se o efeito positivo nas sessões subsequentes. Os animais dos grupos que receberam salina (SAL) ou nenhum tratamento (NTR) também mostraram diminuição de latência de resposta de escolha ao longo das sessões. Houve diferença significativa nos valores de latência e na quantidade de respostas corretas quando comparados os animais FAC, SAL e NTR, demonstrando assim que a utilização do inibidor de receptores GABA<sub>B</sub> flacofeno teve um efeito neste tipo de tarefa de aprendizagem. Podemos

então inferir que com a ação do inibidor dos receptores GABA<sub>B</sub>, ocorreu, além da alteração significativa da latência de escolha, uma melhora no índice de acertos. Ou seja, os resultados indicam um efeito de aprendizagem e não apenas alterações motoras que poderiam justificar a diminuição da latência. Além disso, um provável efeito do faclofeno sobre a motricidade também deve ser desconsiderado pelo fato de que a droga foi administrada após a sessão de treino que ocorreu 24 horas antes.

No presente estudo, pombos que receberam doses diárias do antagonista de receptores GABA<sub>B</sub> imediatamente após cada sessão de treino, tiveram melhores desempenhos na tarefa de memória espacial, fato que sugere um efeito de faclofeno na consolidação da memória espacial. Assim, a consolidação da memória e sua recuperação podem ter sido potencializada pelo bloqueio dos receptores GABA<sub>B</sub> e conseqüentemente a memória permaneceu fortalecida, o que explicaria os baixos valores de latência e alto índice de acertos nas sucessivas sessões de treino essas características do desempenho dos pombos tratados com faclofeno se mantiveram no teste realizado sete dias após a última sessão de treino, o que reforça a possibilidade de facilitação da memória.

As análises de imunistoquímica demonstraram a expressão das proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo, indicando o envolvimento dessas proteínas na memória espacial de escolha alimentar. De fato, os pombos dos três grupos, treinados na tarefa de escolha do comedouro e localização do alimento, apresentaram expressão das proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo, porém essa expressão foi maior nos pombos tratados com faclofeno, FAC e FACR, do que nos pombos que receberam apenas salina, SAL e SALR, ou que não foram tratados, NTR e NTRR. Assim, podemos considerar que a expressão das proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo foi afetada positivamente pelo bloqueio do receptor GABA<sub>B</sub>. Tal como observado no Experimento I os presentes dados confirmam diversos estudos sobre aprendizagem e memória espacial que indicam que o sistema hipocampal participa nesses processos comportamentais e

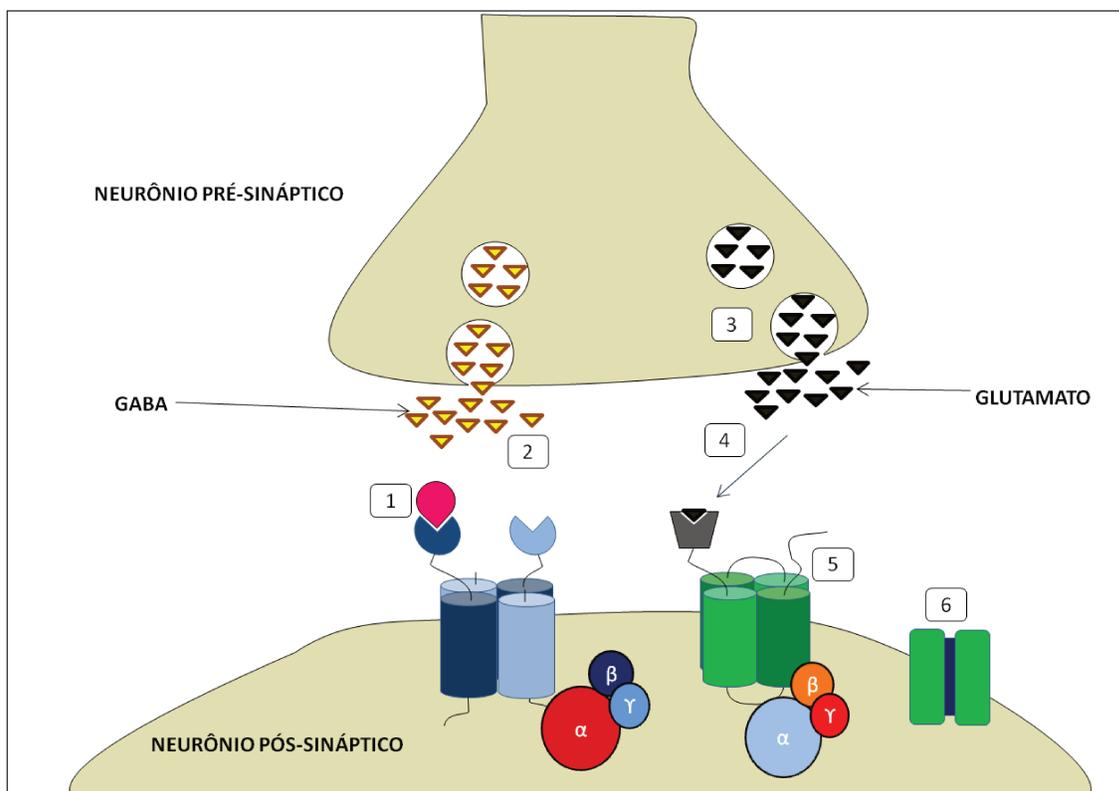
cognitivos, (COLOMBO, 1997, EICHENBAUM, 1999). Particularmente, os presentes dados indicam a ativação de circuitos do hipocampo dorsal, evidenciada pela maior expressão de Zenk e Sinapsina I.

Uma hipótese para os resultados obtidos neste experimento é que a proteína Sinapsina I seja regulada tardiamente por genes de expressão imediata tais como o *zenk*. Apoiados nisso, verificamos que a expressão de Sinapsina I, assim como a expressão da proteína Zenk aumentou após o treino de escolha alimentar e esse aumento foi potencializado com a utilização de faclofeno. Este aumento na expressão de Sinapsina I ocorre provavelmente pela ativação inicial do gene *zenk*, que por sua vez, ativa outros genes de expressão tardia, sendo um deles o gene responsável pela Sinapsina I. Esta hipótese poderia ser confirmada, por exemplo, pelo bloqueio do gene *zenk* ou mesmo a utilização de animais *knockout* para este gene, quando seria esperada a diminuição da expressão de Sinapsina I e conseqüentemente prejuízos na memória de longo prazo.

A grande maioria dos trabalhos relacionando a participação de GABA na aprendizagem e memória utilizam principalmente agonistas e antagonistas dos receptores GABAA, ao passo que muito poucos se interessaram pelos possíveis efeitos da influência dos receptores GABAB. Acreditamos que isso ocorra, devido à grande maioria dos receptores do tipo GABA encontrados no SNC serem do tipo GABAA e apenas uma pequena parte é do tipo GABAB (MARTIN, 2002). Por esse motivo, de acordo com os presentes dados sobre a influência de antagonistas dos receptores GABAB podemos supor que estes participam em tarefas de aprendizagem e memória, mais especificamente nas tarefas usadas neste trabalho. Nossa hipótese que tenta explicar a relação entre a utilização de faclofeno como antagonista de receptores GABAB e a conseqüente melhora da memória espacial é que, como o faclofeno se liga em sítios específicos do receptor GABAB, não permitindo assim a ação do neurotransmissor GABA, a conseqüência seria a de que não haja a ativação da via inibitória que causaria a supressão da capacidade cognitiva nos animais. Assim, como apenas os

receptores GABA<sub>B</sub> estariam bloqueados, a ação de outros neurotransmissores continuaria a ocorrer. Por exemplo, a ação excitatória do glutamato não seria afetada negativamente, ocorrendo sua liberação na fenda sináptica (Figura 29), influenciando assim na ativação de diversas proteínas, entre elas a proteína Zenk, que, como já foi mencionado, tem efeito na expressão da proteína Sinapsina I.

**Figura 29: Esquema ilustrativo da atividade de Faclofeno.**



As moléculas de Faclofeno liberadas ligam-se aos sítios específicos do receptor GABA<sub>B</sub> (1); isso impede que os neurotransmissores GABA liberados pelo neurônio pré sináptico liguem – se nesses sítios específicos causando bloqueio da via de sinalização inibitória (2). Por outro lado, existe a liberação de glutamato pelos mesmos neurônio pré sinápticos (3); o glutamato liberado por não sofrerem qualquer alteração pela presença de faclofeno, ligam-se nos receptores pós sinápticos (4) podendo estes serem metabotrópicos (5) ou ionotrópicos (6), essa ligação causa a ativação da via excitatória.

Embora ainda não se possa explicitar quais os mecanismos responsáveis por essa facilitação da aprendizagem e memória, é possível que esta seja assim, decorrente da diminuição de inibição e consequente aumento da ativação em circuitos excitatórios mediados pela ação, por exemplo, do glutamato. Os receptores GABA<sub>B</sub> interagem com a proteína G inibindo assim a adenilato ciclase, ativando os canais de K<sup>+</sup> e reduzindo a condutância de Ca<sup>2+</sup>. Receptores GABA<sub>B</sub> pré-sinápticos funcionam como autoreceptores, inibindo a liberação de GABA, e podem desempenhar o mesmo papel sobre os neurônios que liberam outros neurotransmissores. (GOODMAN E GILMAN, 2008). Assim, o bloqueio desses receptores pré-sinápticos, resulta em diminuição da inibição neuronal decorrente tanto da menor liberação de GABA, como também da maior liberação de glutamato a qual resultaria na potenciação da ação excitatória pós-sináptica. De fato, já foi relatado que um efeito da administração do antagonista GABA<sub>B</sub> seria o aumento na potenciação sináptica de longa duração (LTP), porém esse efeito dependeria da frequência de estimulação usada para a indução da LTP (MOTT e LEWIS, 1994).

Assim, no presente estudo, os pombos que receberam doses diárias de faclofeno imediatamente após cada sessão de treino, tiveram melhor desempenho nas tarefas de memória espacial. Visto que a administração de faclofeno ocorreu após o treino, a sua ação pode ter afetado tanto o processo inicial de consolidação, como também o processo de persistência da memória espacial. Portanto, os mecanismos desencadeados pela experiência do treino em escolha alimentar e que eventualmente levam à formação da memória ou a sua persistência podem ter sido potenciados pelo bloqueio dos receptores GABA<sub>B</sub>. Como o faclofeno se liga em sítios específicos do receptor GABA<sub>B</sub>, não permitindo assim que o neurotransmissor GABA ative esse receptor, a sua ação impede a ativação de vias inibitórias, ou seja, causa uma inibição da inibição e consequente facilitação da cascata de eventos intracelulares dependente da experiência. Desse modo, a ação de antagonistas GABA<sub>B</sub> potencializaria a ativação da cascata que é

iniciada em neurônios dos circuitos do hipocampo durante a exposição à situação de treino. Essa cascata se inicia com a liberação de glutamato e consequente ativação dos receptores NMDA, desencadeando uma sequência de eventos intracelulares pré e pós-sinápticos que resultam em mudanças celulares duradouras subjacentes à formação e persistência da memória de longa duração, entre as quais se incluem aumento na expressão tanto de Zenk quanto de Sinapsina I.

Uma proposta interessante para essa abordagem seria verificar o efeito em longo prazo da administração de faclofeno, uma vez que se obteve aumento na expressão tanto de Zenk quanto de Sinapsina I. Seria possível observar se a hiperestimulação dos neurônios desta via não acarretaria prejuízos de longo prazo e consequentemente aparecimento de enfermidades relacionadas, assim como descrito no trabalho de Loss (2013), onde foi possível observar que a hiperestimulação de receptores do tipo NMDA estão relacionados com o aparecimento de estado epilético. Junto a isso, seria interessante a utilização de antagonistas do receptor GABAA, assim, poderíamos observar se o bloqueio simultâneo de GABAA e GABAB causaria aumento na aquisição e recuperação da memória espacial. Uma vez que a concentração dos receptores GABAA é maior que GABAB, é esperado que o bloqueio da via inibitória cause um aumento ainda maior da memória espacial. Tais manipulações poderiam também ser realizadas por meio de infusões intra-cerebrais, o que permitiria explorar com maior precisão o papel relativo de receptores GABA em diferentes áreas cerebrais, particularmente do hipocampo, em diferentes fases da memória espacial.

Os presentes dados indicam que os receptores GABA<sub>B</sub> participam de processos de memória espacial em pombos e que o bloqueio desses receptores facilitou o desempenho numa tarefa de memória espacial de localização do alimento. Neste sentido, os dados concordam com a literatura que demonstra que o uso de um antagonista do receptor GABA<sub>B</sub> leva, geralmente, a uma facilitação de processos cognitivos, enquanto que o uso de agonistas GABA<sub>B</sub> geralmente

resulta em supressão de componentes cognitivos do comportamento. Assim, nossos dados situam-se no contexto de estudos que consideram que os antagonistas GABA<sub>B</sub> poderiam ser úteis no tratamento clínico de transtornos cognitivos (FROESTL *et al.*, 2004; JOHN *et al.*, 2009; SUNYER *et al.*, 2008; BOWERY, 2010). Contudo, deve-se considerar que ainda necessitamos de maiores esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos com os efeitos de receptores GABA<sub>B</sub> em processos comportamentais e de formação de memória. Por exemplo, Bowery *et al.* (2002), avaliando os efeitos da utilização de agonistas e antagonistas dos receptores GABA<sub>B</sub> no encéfalo de ratos notaram que com a utilização de baclofeno, um agonista dos receptores GABA<sub>B</sub>, houve maior liberação do neurotransmissor GABA e também supressão de memória. Shirai *et al.* (2013) sugeriram que a ativação de receptores GABA<sub>B</sub> no cerebelo de camundongos resultante da ação do baclofeno, facilitaria a formação da memória de longa duração do reflexo optocinético. Por outro lado, também foi verificado que a administração de baclofeno aumentou o consumo de alimentos em pintainhos (BUNGO *et al.* 2003), mas não afetou o consumo de alimentos em frangos de corte (JONAIIDI *et al.* 2002; BUNGO *et al.* 2003).

Embora os receptores do tipo GABA que predominam no SNC sejam do tipo GABA<sub>A</sub> (MARTIN, 2002), acreditasse que o presente trabalho indica que os receptores GABA<sub>B</sub> têm um papel funcional importante em processos de aprendizagem e memória corroborando com estudos anteriores realizado com roedores (BOWERY, 2010). Além dos nossos dados adicionarem novas informações sobre as funções dos receptores GABA<sub>B</sub> em processos comportamentais e cognitivos em pombos, sugerem o seu papel na regulação de eventos moleculares no hipocampo de aves que são essenciais para a memória espacial. Dessa forma, este estudo, juntamente com um crescente conjunto de dados recentes (FARIA *et al.*, 2013; MAYER *et al.*, 2012) indica que as aves, e particularmente o pombo, constituem modelos experimentais interessantes para o estudo dos aspectos comportamentais e moleculares da aprendizagem espacial,

possibilitando a análise de características que são conservativas entre espécies de mamíferos e aves.



## **CONCLUSÕES**

- A aprendizagem na escolha do comedouro correto e a operação de processos de memória de longa duração em pombos treinados na localização espacial do comedouro com alimento foram dependentes da duração do treino, sendo observadas nos pombos treinados durante 7 sessões, mas não naqueles treinados em apenas duas sessões (Experimento 1).
- As análises imunistoquímicas das regiões hipocâmpais sobre a participação das proteínas Zenk e Sinapsina I demonstraram que o treino na tarefa de localização espacial do alimento induziu a expressão de ambas às proteínas no hipocampo de pombos, sendo que ocorreu maior expressão no hipocampo de pombos treinados por 7 sessões.
- O tratamento com Faclofeno, um antagonista dos receptores GABA<sub>B</sub>, administrado após cada sessão de treino teve um efeito facilitatório sobre o desempenho na tarefa de memória espacial de localização do alimento (Experimento 2), indicando que os receptores GABA<sub>B</sub> participam de processos de memória espacial em pombos. Neste sentido, os dados concordam com a literatura que demonstra que o uso de antagonistas dos receptores GABA<sub>B</sub> leva, geralmente, a uma facilitação de processos cognitivos.
- O efeito facilitatório na memória espacial em pombos tratados com faclofeno foi expresso também pela hiperregulação da expressão de Zenk e Sinapsina I no hipocampo, em comparação com o grupo controle tratado com salina ou o grupo não tratado.
- Os nossos dados adicionam novas informações sobre as funções dos receptores GABA<sub>B</sub> em processos comportamentais e cognitivos em pombos e na regulação de eventos moleculares no hipocampo que são essenciais para a memória espacial.
- O presente trabalho contribui para a análise da memória espacial em pombos, na sequência dos estudos desenvolvidos no Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento, acrescentando informações sobre os fundamentos

comportamentais, celulares e moleculares dos processos de aprendizagem e memória de eventos que envolvem memória espacial em aves e mamíferos.

- Dessa forma, este estudo indica que as aves, e particularmente o pombo, constituem modelos experimentais interessantes para o estudo dos aspectos comportamentais e neurais da aprendizagem espacial, possibilitando a análise de características que são conservativas entre espécies de mamíferos e aves.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. AMARAL-TOMA, M. FERRARI, E.A.M. Effects of hippocampal lesions in a food location task in pigeons. *Behav Brain Res*.5;148(1-2):21-34. 2004.
2. ATOJI, Y.; WILD, J.M. Anatomy of the avian hippocampal formation. *Rev Neurosci*. 17(1-2):3-15, 2006.
3. BEST, P. J.; WHITE, A. M.; MINAI, A. Spatial processing in the brain: The Activity of Hippocampal Place Cells. *Annual Review of Neuroscience*, 24,459-486, 2001.
4. BEKINSCHTEIN, P. CAMMAROTA, M. MEDINA, J.H. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*. 76:677-83, 2013.
5. BISCHOF, H.J.; LIESHOFF, C.; WATANABE, S. Spatial memory and hippocampal function in a non-foodstoring songbird, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Rev Neurosci*. 17(1-2):43-52, 2006.
6. BONANOMI D, MENEGON A, MICCIO A, FERRARI G, CORRADI A, KAO HT, BENFENATI F, VALTORTA F. Phosphorylation of synapsin I by cAMP-dependent protein kinase controls synaptic vesicle dynamics in developing neurons. *J Neurosci*. 10;25(32):7299-308, 2005.
7. BOZON, B.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron*. 13;40(4):695-701, 2003.
8. BRITO, I. BRITTO, L. R. G., FERRARI, E. A. M. Analysis of Zif268 expression in the hippocampus of the pigeon after training in classical sound-shock conditioning. *Behav Neurosci*; 120(2): 353-61, 2006.
9. BUNGO, T.; IZUMI, T.; KAWAMURA, K.; TAKAGI, T.; UEDA, H.; FURUSE, M. Intracerebroventricular injection of muscimol, baclofen or nipecotic acid stimulates food intake in layer-type, but not meat-type, chicks.v. *Brain Res*. 235-8, 2003.
10. CANOVA, F. Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo de

- pombos (*C. livia*), Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2009.
11. CHANCEY, J.H.; ADLAF, E.W.; SAPP, M.C.; PUGH, P.C.; WADICHE, J.I.; OVERSTREET-WADICHE, L.S. GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. **J Neurosci.** 33(15):6614-22, 2013.
  12. CHAU L. S., DAVIS A.S., GALVEZ R. Neocortical synaptic proliferation following forebrain-dependent trace associative learning. **Behav Neuroscience** 127 (2): 285-292, 2013.
  13. CHI, P.; GREENGARD, P, RYAN, T.A. Synapsin dispersion and reclustering during synaptic activity. **Nat Neurosci.** 4(12):1155-7, 2001.
  14. CHI, P.; GREENGARD, P. & RYAN, T. A. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies. **Neuron.** 10; 38(1):69-78, 2003.
  15. CHIN, L. S. LI, L. FERREIRA, A. KOSIK, K.S. & GREENGARD, P. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 26;92(20):9230-4, 2006.
  16. CLAYTON, D. F. The genomic action potential. **Neurobiol. Learn. Mem.,** 185-216, 2000.
  17. COLE, A. J.; SAFFEN, D. W.; WORLEY, P. F. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neuron by synaptic NMDA receptor activation. **Nature,** 474-476, 1989.
  18. COLOMBO, P.J.; WETSEL, W.C.; GALLAGHER, M. Spatial memory is related to hippocampal subcellular concentrations of calcium-dependent protein kinase C isoforms in young and aged rats. **Proc Natl Acad Sci USA.** 94(25):14195-9. 1997.
  19. CORRADI, A.; ZANARDI, A.; GIACOMINI, C.; ONOFRI, F.; VALTORTA, F.; ZOLI, M.; BENFENATI, F. Synapsin-I- and synapsin-II-null mice display an

- increased age-dependent cognitive impairment. *J Cell Sci.* 121(18):3042-51, 2008.
20. DE CAMILLI, P.; BENFENATI, F.; VALTORTA, F. & GREENGARD, P. The Synapsins. *Annu. Ver. Cell Biol.*; 6:733-460, 1990.
21. DIMITRIJEVIC, N.; DZITOYEVA, S.; SATTA, R.; IMBESI, M.; YILDIZ, S.; MANEV, H. Drosophila GABA(B) receptors are involved in behavioral effects of gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *Eur J Pharmacol* 519 (3): 246–52, 2005.
22. DUBBELDAM, J.L. *Birds*. In: Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors: The central nervous system of vertebrates. Berlin:Springer. 1525–1636, 1998.
23. DUTAR, P.; NICOLL, R.A. Pre- and postsynaptic GABAB receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron.* 1(7):585-91, 1988.
24. DZITOYEVA, S.; DIMITRIJEVIC, N.; MANEV, H. Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in Drosophila: adult RNA interference and pharmacological evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (9): 5485–90, 2003.
25. DZITOYEVA, S.; GUTNOV, A.; IMBESI, M.; DIMITRIJEVIC, N.; MANEV, H. Developmental role of GABAB(1) receptors in Drosophila. *Brain Res Dev Brain Res* 158 (1-2): 111–4, 2005.
26. EICHENBAUM, H., Hippocampus and Mechanisms of declarative Memory. *Behavioral Brain Research*, 103: 123-133, 1999.
27. ERICHSEN, J.T.; BINGMAN, V.P.; KREBS, J.R. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. *J Comp Neurol.* 314(3):478-92, 1991.
28. FDEZ, E. & HIFIKER, S. Vesicle pools and synapsins: New insights into old enigmas, *Brain Cell Biology.* 35, 107–115, 2006.

29. FINE, I.; JACOBS, R.A. Comparing perceptual learning across tasks: A review. **J Vis** 2:190-203, 2002.
30. FLORA FILHO, R, ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 46.3. 2000.
31. FREMOUW, T. JACKSON-SMITH, P. & KESNER, R. P. Impaired place learning and unpaired cue learning in hippocampal-lesioned pigeons. **Behav. Neurosci.** 11(50): 963-975, 1997.
32. FROESTL, W. GALLAGHER, M. JENKINS, H. MADRID, A. MELCHER, T. TEICHMAN, S. MONDADORI, C.G. PEARLMAN, R. SGS742: the first GABA(B) receptor antagonist in clinical trials; **Biochem Pharmacol.** 15;68(8):1479-87, 2004.
33. GÓMEZ-PINILLA, F. SO, V. & KESSLAK, J. P. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. **Brain Res.** 15;904(1):13-9, 2001.
34. GOODMAN, L.S; GILMAN, A. Manual of Pharmacology and Therapeutics. New York – United States: McGraw Hill. Cap 12, Pag. 214. 2008.
35. HILFIKER, F.; PIERIBONE, V. A.; CZERNIK, A, J.; KAO, H. T.; AUGUSTINE, G. J. & GREENGARD, P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release; **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, 354; 269 – 279, 1999.
36. HOUGH, G.E. & BINGMAN, V.P. (2004) Spatial response properties of homing pigeon hippocampal neurons: correlations with goal locations, movement between goals, and environmental context in a radial-arm arena. **J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.**, 190, 1047–1062. 2004.
37. HUMEAU, Y. DOUSSAU, F. VITIELLO, F. GREENGARD, P. BENFENATI, F. & POULAIN, B. Synapsin controls both reserve and releasable synaptic

- vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in *Aplysia*. **J Neurosci**. 15;21(12):4195-206. 2001.
38. JOCA, S. L. R.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES F. S.; Estresse, depressão e hipocampo *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25. 2003.
39. JOHN, J. P. P.; SUNYER, B. HÖGER, H. POLLACK, A. & LUBEC, G.; hippocampal synapsin isoform levels are linked to spatial memory enhancement by SGS742, **Hippocampus**; 19:731-738, 2009.
40. JONAI, H.; BABAPOUR, V.; DENBOW, D.M. GABAergic control of food intake in the meat-type chickens. **Physiol Behav.** 465-8, 2002.
41. JONES, M. W., ERRINGTON, M. L., FRENCH, P. J., FINE, A., BLISS, T. V., GAREL, S., CHARNAY, P., BOZON, B., LAROCHE, S., DAVIS, S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. **Nature Neurosci.** 4: 289–296, 2001.
42. JOVANOVIĆ, J. N. BENFENATI, F. SIOW, Y. L. SIHRA, T. S. SANGHERA, J. S. PELECH, S. L. GREENGARD, P. & CZERNIK, A. J. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 16;93(8):3679-83, 1996.
43. KAHN, M.C. & BINGMAN, V. P. Avian Hippocampal Role in Space and Content Memory. **European Journal of Neuroscience**, 30: 10: 1900–1908, 2009
44. KAHN, M.C. & BINGMAN, V. P. Lateralization of Spatial Learning in the Avian Hippocampal Formation. **Behavioral Neuroscience**, 118: 2: 333–344, 2004.
45. KAHN, M.C.; HOUGH, I.I., G.E.; EYCK G.R.T.; BINGMAN V.P. Internal connectivity of the homing pigeons (*Columba Livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. **J. Comp. Neurol**, 459:127-141, 2003.

46. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Principles of neural science. New York : McGraw-Hill, 2000.
47. KARTEN, H. J.; HODOS, W. *A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (Columba livia)* The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1967.
48. KNAPSKA, E.; KACZMAREK, L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? **Prog in Neurobiol** 74: 183–211, 2004.
49. KREBS, J. R.; ERICHSEN, J. T.; BINGMAN, V. P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the Dorsomedial Telencephalon of the pigeon. **J. Comp. Neurol.**, 407, 37-43. 1998.
50. KUSHNER, S.A. ELGERSMA, Y. MURPHY, G. G. JAARSMA, D. VAN WOERDEN, G. M. HOJJATI, M. R. CUI, Y. LEBOUTILLIER, J.C. MARRONE, D.F. CHOI, E. S. DE ZEEUW, C. I. PETIT, T. L. POZZO-MILLER, L & SILVA, A. J. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. **J Neurosci.** 19;25(42):9721-34, 2005
51. LEE, J. L., B. J. EVERITT, AND K. L. THOMAS. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science** 304:839-843, 2004.
52. LOSS, C.M.: Participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA na morte neuronal e nas alterações comportamentais induzidas pelo modelo experimental de status epilepticus em ratos jovens. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde Dissertação de Mestrado, 2013.
53. MANEV H, DIMITRIJEVIC N. Drosophila model for in vivo pharmacological analgesia research. **Eur J Pharmacol** 491 (2-3): 207–8, 2004.
54. MARTIN, I.L.; DUNN, S.M.J.: GABA Receptors; **Toctris Reviews**, 20,1:7, 2002

55. MAYER U, WATANABE S, BISCHOF HJ. Hippocampal activation of immediate early genes Zenk and c-Fos in mandarins (*Taeniopygia guttata*) during learning and recall of a spatial memory task ***Neurobiol Learn Mem.*** 93(3):322-9, 2010.
56. MAYER U, WATANABE S, BISCHOF HJ. Spatial memory and the avian hippocampus: Research in mandarins. ***J Physiol Paris.*** pii: S0928-4257(12)00021-6, 2012.
57. MELLO C. V. Identification and analysis of vocal communication pathways in birds through inducible gene expression. ***Ann Acad Bras Cienc.***;76(2):243-6. 2004.
58. MENEGON, A.; BONANOMI, D.; ALBERTINAZZI, C.; LOTTI, F.; FERRARI, G.; KAO, H. T.; BENFENATI, F.; BALDELLI, P.; VALTORTA, F. Protein kinase A-mediated synapsin I phosphorylation is a central modulator of Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptic activity. ***J Neurosci.*** 8;26(45):11670-81, 2006.
59. MICHELS, B.; DIEGELMANN, S.; TANIMOTO, H.; SCHWENKERT, I.; BUCHNER, E. & GERBER, B. A role for Synapsin in associative learning: the *Drosophila* larva as a study case. ***Learn Mem.*** 12(3):224-31, 2005.
60. MÖHLER, H. CRESTANI, F. RUDOLPH, U. GABA(A)-receptor subtypes: a new pharmacology. ***Curr Opin Pharmacol.*** 1(1):22-5. 2001.
61. MONDADORI C, MOBIUS HJ, BORKOWSKI J. The GABAB receptor antagonist CGP36742 and the nootropic oxiracetam facilitate the formation of long-term memory. ***Behav Brain Res.*** 77:223-5, 1996.
62. MORRIS, R.G.M. Spatial Localization does not require the presence of local cues. ***Learn Motiv*** 12: 239-260, 1981.
63. MORRIS, R.G.M.; KANDEL, E.R.; SQUIRE, L.R. The neuroscience of learning and memory: cell neural circuits and behavior. ***T ins*** 11(4): 125-127, 1988.
64. MOTT, D.D.; LEWIS, D.V. The pharmacology and function of central GABAB receptors. ***Int Rev Neurobiol.*** 36:97-223, 1994.

65. NAKAGAWA Y, & TAKASHIMA T. The GABAB receptor antagonist CGP36742 attenuates the baclofen- and scopolamine-induced deficit in Morris water maze task in rats. *Brain Res*;766:101–6, 1997.
66. NIKOLAEV E., KAMINSKA B., TISCHMEYER W., MATTHIES H., KACZMAREK L. Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioral training. *Brain Res Bull*, 28(3): 479-84, 1992.
67. O'KEEFE J, DOSTROVSKY J., The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*. 171-5, 1971.
68. ONG, J.; KERR, D. I. B.; Recent advances in GABAB receptors: from pharmacology to molecular biology; *Acta Pharmacol*.21(2): 111 – 123, 2000.
69. PARNAVELAS, J.G. The origin and migration of cortical neurons: new vistas. *Trends Neurosci*. 23(3):126-31, 2000.
70. POUZET, B.; ZHANG, W.N., FELDON, J. AND RAWLINS, J.N.P. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies. *Behav Brain Res*,133: 279-291,2002.
71. PRIOR, H. Orientation and lateralized cue use in pigeons navigating a large indoor environment. *J Exp Biol*, 205: 1795-1805, 2002.
72. PRIOR, H.; GÜNTÜRKÜN, G. Parallel working memory for spatial location and food-related object cues in foraging pigeons: binocular and lateralized monocular performance. *Learn Mem*, 8: 44-51, 2001.
73. RAPANELLI, M.; FRICK, L. R.; & ZANUTTO, B. S.; Differential gene expression in the rat hippocampus during learning of an operant conditioning task, *Neuroscience* (163)1031–1038, 2009.
74. RIBEIRO, S.; Dream, memory and Freud's reconciliation with the brain; *Bras. Psiquiatr.* (Supl II): 59-63, 2003.

75. ROSINHA, M. U. Distribuição de Neuromarcadores na Formação Hipocampal de Aves, Universidade Estadual de Campinas, Tese de Mestrado, 2003.
76. ROSSIER, J.; HAEBERLI, C. AND SCHENK, F. Auditory cues support place navigation in rats when associated with a visual cue. **Behav Brain Res**, 117: 209-214, 2000.
77. SARANTIS, K.; ANTONIOU, K.; MATSOKIS, N.; ANGELATOU, F. Exposure to novel environment is characterized by an interaction of D1/NMDA receptors underlined by phosphorylation of the NMDA and AMPA receptor subunits and activation of ERK1/2 signaling, leading to epigenetic changes and gene expression in rat hippocampus. **Neurochemistry International**, 60: 55–67, 2012.
78. SATO, K.; MORIMOTO, K.; SUEMARU, S.; SATO, T. & YAMADA, N. Increased synapsin I immunoreactivity during long-term potentiation in rat hippocampus. **Brain Res**. 28;872(1-2):219-22, 2000.
79. SIEGEL, J.J., NITZ, D. & BINGMAN, V.P. Lateralized functional components of spatial cognition in the avian hippocampal formation: evidence from single-unit recordings in freely moving homing pigeons. **Hippocampus**, 16, 125–140. 2006.
80. SILVA AJ, ROSAHL TW, CHAPMAN PF, MAROWITZ Z, FRIEDMAN E, FRANKLAND PW, CESTARI V, CIOFFI D, SÜDHOF TC, BOURTCHULADZE R. Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity. **Curr Biol**. 6(11):1509-18, 1996.
81. SILVA, M. I. Distribuição de células imunorreativas para a sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) no hipocampo de pombos (*Columba livia*) após aprendizagem de escolha alimentar. Dissertação de mestrado, 2007.
82. SIVILOTTI L, NISTRINI A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. **Prog Neurobiol**. 36:35–92. 1991.

83. SPERANDÉO, M. L.A. Evocação da memória aversiva: Participação do receptor NMDA e análise da ativação de ZENK no hipocampo de pombos. Tese de Mestrado pela Universidade Estadual de Campinas, 2005.
84. SPETCH, M.; HONIG, W.K. Characteristics of pigeons spatial working memory in an open-field task. **An Learn Behav**, 16(2), 123-131, 1988.
85. SÜDHOF, T. C.; CZERNIK, A. J.; KAO, H. T.; TAKEI, K.; JOHNSTON, P. A.; HORIUCHI, A.; KANAZIR, S. D.; WAGNER, M. A.; PERIN, M. S. & DE CAMILLI, P.: Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. **Science**. 29;245(4925):1474-80, 1989.
86. SUNYER, B.; PATIL, S.; FRISCHER, C.; HOGER, H.; SELCHER, J.; BRANNATH W. & LUBEC G. Strain-dependent effects of SGS742 in the mouse, **Behavioral Brain Research**, 181, 64–75, 2007
87. SUNYER, B.; DIAO, W. F.; KANG, S. U.; AN, G.; BODDUL, S. & LUBEC, G. Cognitive Enhancement by SGS742 in OF1 Mice is Linked to Specific Hippocampal Protein Expression, **Journal of Proteome Research**, 7, 5237–5253, 2008.
88. SUNYER, B.; AN, G.; KANG, S. U.; HOGER, H. & LUBEC G. Strain-dependent hippocampal protein levels of GABAB-receptor subunit 2 and NMDA-receptor subunit 1. **Neurochemistry International** 55: 253–256, 2009.
89. THIEL G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol.*; 3(1):87-95, 1995. TOLMAN, E. C. Cognitive maps in rats and men. **Psychol Rev.** 55(4):189-208, 1948.
90. TOMASELLO, M.; CALL, J. Primate Cognition. New York: Oxford University Press, 1997.
91. WATANABE, S. Lesions in the basal ganglion and hippocampus on Performance in a Wisconsin Card Sorting Test-like task in pigeons. *Physiology & Behavior* 85; 324 – 332, 2005.

92. WATANABE, S, BISCHOF, HJ Spatial Cognition of Mandarins in a Morris-maze Analogue Apparatus. *International Journal of Comparative Psychology*, 25, 276-28; 2012.
93. WHISHAW, I.Q. Place learning in Hippocampal rats and the path integration hypothesis. *Neurosci Behavi R*, 22 (2):209-220, 1998.
94. WORLEY PF, CHRISTY BA, NAKABEPPU Y, BHAT RV, COLE AJ, BARABAN JM. Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci*.15;88(12):5106-10, 1991.
95. ZHOU, Z.X.; XIONG, W.X. ZHANG, X.G.; GE, S.J.: Retrieval of Consolidated Spatial Memory in the Water Maze Is Correlated with Expression of pCREB and Egr1 in the Hippocampus of Aged Mice. *Dement Geriatr Cogn Disord Extra* 3:39–47, 2013.

**ANEXOS**



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

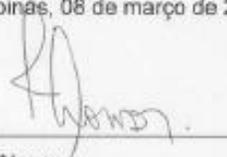
Certificamos que o Protocolo nº 2096-1, sobre "Aprendizagem de escolha alimentar em pombos (*Columba Livia*) e imunorreação para as proteínas Zenk e Sinapsina I no hipocampo: efeitos do antagonista de receptores GABA<sub>B</sub>, SGS742", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari / Fernando Canova, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 08 de março de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2096-1, entitled "Learning to choose foog for pigeons (*Columa Livia*) and immunoreaction for Zenk protein and Synapsin I in the hippocampus: effects od GABAB receptor antagonist, SGS742", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 8, 2010.

Campinas, 08 de março de 2010.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alongo  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comite@unicamp.br](mailto:comite@unicamp.br)  
<http://www.fb.unicamp.br/ceea/>