



RODOLFO SOUZA DE FARIA

Investigação sobre as relações entre a persistência da memória do medo após condicionamento clássico aversivo e a expressão do BDNF no hipocampo e na amígdala.

CAMPINAS – SP
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



RODOLFO SOUZA DE FARIA

Investigação sobre as relações entre a persistência da memória do medo após condicionamento clássico aversivo e a expressão do BDNF no hipocampo e na amígdala.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a 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 RODOLFO SOUZA
DE FARIA E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. ELENICE
APARECIDA DE MORAES FERRARI

CAMPINAS – SP
2014

F225i Faria, Rodolfo Souza, 1987-
Investigação sobre as relações entre a persistência da memória do medo após condicionamento clássico aversivo e a expressão do BDNF no hipocampo e na amígdala / Rodolfo Souza de Faria. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Condicionamento clássico. 2. Estimulos aversivos. 3. Hipocampo. 4. Amígdalas. 5. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 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: Investigation on the relationship between the persistence of fear memory after classical aversive conditioning and the expression of BDNF in the hippocampus and amygdala

Palavras-chave em inglês:

Classical conditioning

Aversive stimuli

Hippocampus

Amygdala

Brain-derived neurotrophic factor

Área de concentração: Fisiologia

Títuloção: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari [Orientador]

Cláudia Vianna Maurer Morelli

Gilberto Fernando Xavier

Newton Sabino Canteras

Suzete Maria Cerutti

Data de defesa: 22-07-2014

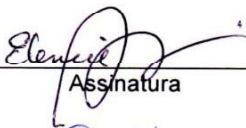
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Campinas, 22 de Julho de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. **Elenice Aparecida de Moraes Ferrari**
(orientadora)


Assinatura

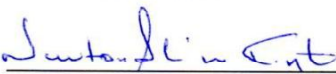
Profa. Dra. **Cláudia Vianna Maurer Morelli**


Assinatura

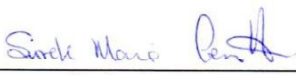
Prof. Dr. **Gilberto Fernando Xavier**


Assinatura

Prof. Dr. **Newton Sabino Canteras**


Assinatura

Profa. Dra. **Suzete Maria Cerutti**


Assinatura

Profa. Dra. **Claudia Herrera Tambeli**

Assinatura

Prof. Dr. **Alexandre César Santos Rezende**

Assinatura

Profa. Dra. **Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes**

Assinatura

RESUMO

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) participa de processos de plasticidade sináptica subjacentes à aprendizagem e memória. A ação do BDNF no hipocampo e na amígdala é necessária para a formação de memória emocionais, incluindo a memória de medo. Além disso, foi demonstrado em roedores que a persistência da memória aversiva depende um pico tardio na expressão de BDNF-maduro que ocorre no hipocampo. Contudo, ainda são necessárias investigações sobre o papel do BDNF-maduro na plasticidade sináptica e processos de memória em aves. Neste estudo o Experimento 1 investigou se o condicionamento som-choque induz um ciclo tardio de expressão do BDNF-maduro no hipocampo e amígdala de pombos. Pombos adultos receberam implante bilateral de microcânula intra-hipocampal e, sete dias após foram treinados com três pareamentos som-choque e designados para um dos três grupos: condicionamento e anisomicina (CondANI), condicionado e salina (CondSAL) e condicionado não tratado (Cond). O grupo NAIVE não teve tratamento ou condicionamento. O Experimento 2 investigou se o bloqueio da ação do BDNF-maduro por infusão intra-hipocampal de anisomicina, e do antagonista do receptor TrkB, K252a, interferem na persistência da memória de medo condicionado ao contexto e ao som. Foram usados grupos de pombos que receberam infusão intra-hipocampal 11 h após o treino de salina (CondSAL2 e CondSAL7), anisomicina (CondANI2 e CondANI7), ou K252a (CondK2 e CondK7), e também controles não tratados (Cond2 e Cond7). Os animais foram testados ao contexto e a som 2 ou 7 dias após treino. No Experimento 1 a análise por Western blotting indicou que os valores de BDNF-maduro no hipocampo dos pombos Cond e CondSAL foram maiores do que nos pombos CondANI e NAIVE ($p < 0,05$). Os valores de BDNF-maduro na amígdala não diferiram entre os grupos condicionados ($p > 0,05$). No Experimento II não houve diferenças significativas entre grupos no teste ao contexto realizado 2 dias após o treino ($p > 0,05$), mas no quando testados 7 dias após o treino os grupos CondANI7 e CondK7 apresentaram menor ocorrência de congelamento do que Cond7 e CondSAL7 ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre grupos nos testes ao som realizados 2 e 7 dias após o condicionamento ($p > 0,05$). Os dados do Experimento I indicaram que o treino em condicionamento clássico aversivo induziu o aumento tardio da expressão BDNF-maduro no hipocampo e na amígdala, enquanto que os dados do Experimento 2 demonstraram que a infusão intra-hipocampal de anisomicina e de K252a prejudicaram a persistência da memória de medo condicionado ao contexto, mas não a memória de medo condicionado ao som. Esses resultados estariam relacionados com uma dissociação entre o hipocampo e amígdala no processamento das informações contextuais e sonoras no medo condicionado. Em conjunto nossos dados evidenciam que a experiência do condicionamento ativa uma série de eventos moleculares que levam ao aumento da expressão do BDNF-maduro no hipocampo e na amígdala, garantindo a regulação fina da plasticidade neuronal necessária para a memória.

Palavras-chave: condicionamento clássico aversivo; hipocampo; amígdala; pró-BDNF; BDNF-truncado; BDNF-maduro.

ABSTRACT

The Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) participates in processes of synaptic plasticity underlying learning and memory. The action of BDNF in the hippocampus and amygdala is necessary for the formation of emotional memory, including fear memory. Furthermore, it was demonstrated that rodent aversive memory depends on persistence of a late peak in the expression of mature BDNF, which occurs in the hippocampus. However, we still need further investigations on the role of mature BDNF in synaptic plasticity and memory processes in birds. In this study, Experiment 1 investigated whether the tone-shock conditioning induces a late cycle-expression of mature - BDNF in the hippocampus and amygdala of pigeons. Adult pigeons underwent bilateral implantation of intra-hippocampal microcanulae and seven days later were trained with three tone-shock pairings and assigned to one of three groups: conditioning and anisomycin (CondANI), conditioning and saline (CondSAL) and untreated conditioning (Cond). The NAIVE group had no treatment or conditioning. Experiment 2 investigated whether blockade of the action of mature-BDNF with intra-hippocampal infusion of anisomycin or of TrkB receptor antagonist, K252a, interferes with the persistence of memory of conditioned contextual fear and conditioned tone fear. Groups of birds that at 11 h after the training received intra-hippocampal infusion of saline (CondSAL2 and CondSAL7) anisomycin (CondANI2 and CondANI7) or K252a (CondK2 and CondK7) as well as untreated controls (COND2 and Cond7) were used. Tests to the context and to the tone were conducted 2 days or 7 days after training. In Experiment 1 analysis by Western blotting indicated values of mature-BDNF in the hippocampus of pigeons and Cond CondSAL that were higher than in CondANI and NAIVE pigeons ($p < 0.05$). The values of mature-BDNF in the amygdala did not differ between the conditioned groups ($p > 0.05$). In Experiment II there were no significant differences between groups in the context test conducted 2 days after training ($p > 0.05$), but when tested 7 days after training both the CondANI7 and CondK7 groups showed lower occurrence of freezing than Cond7 and CondSAL7 ($p < 0.05$). There were no significant differences between groups in the tests to the tone conducted 2 or 7 days after conditioning ($p > 0.05$). The data of Experiment I indicated that training in classical aversive conditioning induced increase in late expression of mature-BDNF in the hippocampus and amygdala, whereas the data from Experiment 2 showed that intra-hippocampal infusion of anisomycin and K252a disrupted persistence of the memory of contextual fear conditioning, but not of fear memory to the tone. These results could be related to a dissociation between the hippocampus and amygdala in processing auditory and contextual information in fear conditioning. Taken together our data show that the conditioning experience activates a series of molecular events that lead to increased expression of mature-BDNF in hippocampus, and amygdala, which guarantee regulation of neuronal plasticity required for memory.

Key words: aversive classical conditioning; hippocampus; amygdala; pro-BDNF; truncated-BDNF; mature-BDNF.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aprendizagem e Memória	1
1.2. Condicionamento Clássico Aversivo	6
1.3. Persistência da memória	9
1.4. Participação do BDNF em processos de aprendizagem e memória	12
1.5. Caracterização do hipocampo e amígdala de aves	15
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Sujeitos	21
3.2. Equipamentos	23
3.2.1. Caixas experimentais para habituação - condicionamento - teste	23
3.3. Procedimentos	24
3.3.1. Adaptação às condições do biotério	28
3.3.2. Habituação ao contexto do laboratório	28
3.3.3. Cirurgia de implante das cânulas e dos eletrodos	28
3.3.4. Infusão intra-hipocampal	30
3.3.5. Treino em condicionamento som-choque	31
3.3.6. Teste ao contexto de condicionamento	31
3.3.7. Teste de exposição ao som	31
3.3.8. Análise comportamental	32
3.3.9. Decapitação	33
3.3.10. Perfusão	34
3.3.11. Análise dos níveis do BDNF por Western Blotting	34
3.3.12. Análise das células BDNF-positivas por Imunofluorescência	36
3.3.13. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Experimento 1	39
4.1.1. Análise dos comportamentos durante a sessão de Condicionamento Clássico Aversivo	39
4.1.2. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão proteica das isoformas do BDNF no hipocampo	41
4.1.3. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão proteica da tPA no hipocampo	46
4.1.4. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão proteica das isoformas do BDNF na amígdala	48
4.1.5. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão proteica da tPA na amígdala.	53
5. DISCUSSÃO	55
5.1. Experimento 1	55
6. RESULTADOS	63
6.1. Experimento 2	63
6.1.1. Efeitos da anisomicina e da K252a sobre o comportamento de pombos em situação de condicionamento clássico aversivo	63

7. DISCUSSÃO	77
7.1. Experimento 2	77
8. CONCLUSÕES	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
10. ANEXOS	105
10.1. Declaração do comitê de ética	105

“É talvez o último dia da minha vida. Saudei o Sol, levantando a mão direita, mas não o saudei, dizendo-lhe adeus, fiz sinal de gostar de o ver antes: mais nada.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A minha Família pelo amor, apoio e compreensão.

Em especial a minha orientadora, querida Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, proporcionando todo o apoio, tanto de natureza acadêmica quanto pessoal, necessário para que eu pudesse sempre seguir em frente. Além do orientador acadêmico, ganhei também uma grande amiga.

Ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada pela amizade, e por que prontamente assumiu a minha orientação após o afastamento da Profa. Elenice, proporcionando todo o apoio necessário.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Cesar Renato Sartori, pela grande amizade e ajuda em todos os momentos deste trabalho.

A Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse pela amizade e apoio ao longo de todo trabalho.

Agradeço aos professores componentes da banca de defesa de tese, Profa. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli, Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, Prof. Dr. Newton Sabino Canteras, Profa. Dra. Suzete Maria Cerutti, Prof. Dr. Alexandre César Santos de Rezende, Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Marcondes por terem aceito o convite para participar da minha defesa, o que seguramente contribui para o enriquecimento deste evento que encerra o meu trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Marta Helena Krieger por ceder o laboratório para realização dos procedimentos experimentais.

Aos amigos de laboratório Fernando Canova, Maria Luiza Sperandeo, Rúbia Mendonça de Miranda, Marcus Vinicius de Carvalho e Andressa Pelaquim por todos os momentos que passamos juntos e pela ajuda nos experimentos.

Aos amigos de departamento Aline Arouca, Aline Tatiane Toneto Inocêncio, Amanda Alvim Negreti, Ana Gabriela Conceição-Vertamatti, Elayne Vieira Dias, Gilson Gonçalves Dos Santos, Heloisa Ferreira Porto, Laís Viana, Larissa Yuri Ishizu, Luiz Alberto Ferreira Ramos, Maria Athie, Priscila Cristina da Silva.

Aos Funcionários Alexandra Rosa, Andréia Aparecida Vigilato, Juvenal Augusto Dantas, Marise Mello Carnelossi Brunelli, Priscila Cristina da Silva, Silvia Helena Zeferino Evangelista, Washington Luiz Gomes, sem vocês nenhuma pesquisa 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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo dos processos de síntese e clivagem do BDNF	11
Figura 2 - Esquema da conectividade intra-hipocampal	15
Figura 3 - Esquema da representação da amígdala no encéfalo de pombos	16
Figura 4 - Situação experimental	24
Figura 5 - Diagrama dos procedimentos experimentais	26
Figura 6 - Diagrama dos procedimento do experimento 2	27
Figura 7 - Posicionamento da cânula intra-hipocampal	29
Figura 8 - Duração da porcentagem de cada tipo de comportamento durante a sessão de treinamento em Condicionamento Clássico Aversivo	40
Figura 9 - Expressão no hipocampo das isoformas do BDNF 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo	42
Figura 10 – Relação dos valores de BDNF-maduro para pró-BDNF e de BDNF-maduro para BDNF-truncado no hipocampo de pombos 12 h após Condicionamento Clássico Aversivo	43
Figura 11 - Expressão no hipocampo das células BDNF-positivas 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo	45
Figura 12 - Expressão no hipocampo da tPA 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo	47
Figura 13 - Expressão na amígdala das isoformas do BDNF 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo	49
Figura 14 – Relação dos valores de BDNF-maduro para pró-BDNF e de BDNF-maduro para BDNF-truncado na amígdala de pombos 12 h após Condicionamento Clássico Aversivo	50
Figura 15 - Expressão na amígdala das células BDNF-positivas 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo	52
Figura 16 - Expressão na amígdala da tPA 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo	54
Figura 17 - Duração média (+EPM) dos comportamentos exibidos durante as sessões de treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 2 dias e teste ao som 2 dias	65
Figura 18 - Duração média (+EPM) dos comportamentos exibidos durante as sessões de treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 7 dias e teste ao som 7 dias	69
Figura 19 - Duração média dos comportamentos por bloco exibidos durante as sessões de	

treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 2 dias e teste ao som 2 dias	72
Figura 20 - Duração média dos comportamentos por bloco exibidos durante as sessões de	
treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 7 dias e teste ao som 7 dias	75

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AD = amígdala dorsal

Allt = proteína anexina II tetrâmero

AMPA = α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4

ANOVA = teste estatístico para análise de variância

AP = anteroposterior

AV = amígdala ventral

CA = condicionamento aversivo

Ca²⁺ = cálcio

CCK = colecistoquinina

C° = graus celsius

Cond = grupo condicionado

CondANI = grupo condicionado anisomicina

CondSAL = grupo condicionado salina

CRE = elemento de resposta do AMPc

CREB = proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc

DM = dorso-medial

DMd = dorso-medial-dorsal

DMv = dorso-medial-ventral

EC = estímulo condicionado

ECA = exploração cautelosa

EI = estímulo incondicionado

EXP = exploração

GA = aparelho de golgi

GONG = congelamento

h = hora

HP = hipocampo

kD = kiloDalton

LENK = leucina encefalina

LOC = locomoção

LTP = potenciação de longa duração

LISTA DE ABREVIATURAS

M = molar

mA = miliampere

MAN = manutenção

mg = miligrama

min = minuto

mm = milímetro

mm² = milímetro quadrado

MOV = movimentos Isolados-

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

ms = milissegundo

N = neostriatum

NaCL = cloreto de sódio

NMDA = N-metil D-Aspartato

NPY = neuropeptídeo Y

PA = paleostriatum

PAR = parado

PFA = solução de paraformaldeído

pH = potencial hidrogeniônico

PRE = pré- exploratórios.

RC = respostas condicionadas

SKI-1 = subtilizin/kexin-isozyme 1

SNC = sistema nervoso central

SP = substância P

TF = tampão fosfato

tPA = plasminogênio tissular

TrkB = tirosina-quinase B

um = micrometro

V = ventrículo

VIG = vigilância

VIP = polipeptídeo vasoativo intestinal

VL = ventro-lateral

VM = ventro-medial

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aprendizagem e Memória

Os indivíduos de todas as espécies possuem a habilidade de reagir adequadamente a situações de perigo que ameaçam a sua sobrevivência. Esta habilidade pode ser incondicionada ou não aprendida, como também pode ser aprendida. Assim, por meio da experiência com eventos ameaçadores ou perigosos os indivíduos adquirem conhecimento sobre eles e o ambiente em que ocorrem, podendo prever sua ocorrência futura e programar ou modificar os seus comportamentos. Essas experiências vivenciadas desencadeiam alterações comportamentais, celulares e moleculares no sistema nervoso central (SNC), resultando na formação da memória. Essa capacidade de aprendizagem é extraordinária, pois é por meio dela que é possível modificar o comportamento em relação aos eventos do ambiente e as respostas do organismo (Catania, 1999; Kandel, 2001).

Os estudos sobre aprendizagem salientam que existem diferentes tipos de experiências que resultam em processos não-associativos e em processos associativos, fundamentando a consideração das classes de aprendizagem não-associativa e de aprendizagem associativa. Ocorre aprendizagem não-associativa quando a experiência vivenciada pelo indivíduo envolve um só tipo de estímulo que se repete regularmente ou que tem duração prolongada, sem que se estabeleçam relações funcionais entre estímulos ou entre estímulo e comportamento. Quando isso acontece, ocorrerá à habituação, processo caracterizado pelo decréscimo progressivo da resposta a estímulos inócuos, repetitivos ou contínuos. Quando há a exposição a um estímulo aversivo pode ocorrer aumento na magnitude da resposta a

um estímulo inócuo que ocorre num momento posterior, sem associação com o primeiro. A aprendizagem associativa ocorre quando as experiências vivenciadas resultam no estabelecimento de uma relação de associação ou de contingência entre diferentes estímulos e também entre estímulos e comportamentos. Isso ocorre no condicionamento clássico, com relações de associação ou contingências entre dois estímulos (por exemplo, som e choque, cheiro e alimento) e no condicionamento operante, com estabelecimento de contingências entre estímulos antecedentes, comportamento e o estímulo consequente (por exemplo, som, resposta de pressão à barra, alimento) (Ferrari et al., 1999; Kandel, 2001).

As experiências não-associativas e associativas induzem processos comportamentais de aprendizagem que se correlacionam com alterações celulares e moleculares no SNC que garantem a formação da memória. A memória é caracterizada como o processo de manutenção ao longo do tempo do conhecimento adquirido por aprendizagem; a duração da memória depende de mecanismos celulares e moleculares específicos (Kandel, 2001).

A memória pode ser classificada de acordo tanto com a sua duração ou seu período de armazenamento, ou seja, memória de curto prazo e de longo prazo, quanto de acordo com seu conteúdo, ou seja, memória explícita e implícita (Kandel, 2001). A memória de curto prazo se refere ao armazenamento de pequena quantidade de informações por período de tempo limitado a segundos e poucos minutos, até 3 horas, sendo independente da transcrição de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), e de síntese proteica. Já a memória de longo prazo refere-se ao armazenamento de grande quantidade de informações por um período de tempo prolongado que pode variar em horas, dias e até anos (Izquierdo et al., 2000; Bekinschtein et al., 2007; Mizuno et al., 2012). A memória de longo prazo pode ser

explícita ou declarativa quando inclui o conhecimento auto-biográfico e sobre fatos ou eventos, cuja evocação requer um esforço consciente. Também, a memória de longo prazo pode ser implícita, de procedimento ou operacional quando está relacionada a comportamentos que dependem de treino repetido, e a informações que não dependem da consciência para serem evocadas, como ocorre em condicionamentos reflexos e em habilidades motoras (Squire e Kandel, 2003).

1.2. Condicionamento Clássico Aversivo

A exposição a eventos ambientais aversivos e ameaçadores desencadeia respostas de defesa e resulta em formação da memória de experiências aversivas que persistem no tempo. Entre tais experiências temos aquelas que resultam em condicionamento clássico aversivo, também denominado Pavloviano ou respondente (Rescorla, 1968), o qual se refere a uma classe de aprendizagem que envolve relações de contingência entre um estímulo inócuo e um estímulo aversivo incondicionado, as quais resultam em controle de estímulos com a ocorrência de processos comportamentais complexos, cuja organização envolve atividade em circuitos neuronais que integram diferentes áreas cerebrais. Uma intensa investigação sobre o controle de estímulos estabelecido pelo condicionamento clássico aversivo contribuiu expressivamente para a produção do conhecimento sobre as bases neurais da aprendizagem e memória, principalmente do medo condicionado (Fendt e Fanselow, 1999).

No condicionamento clássico aversivo um evento/estímulo, inicialmente neutro (som ou luz) seguida de um estímulo incondicionado (EI) aversivo (choque elétrico) adquire a capacidade de controlar as respostas incondicionadas a outro estímulo ao qual foi associado; ou seja, torna-se um estímulo condicionado (EC) que

passa a eliciar respostas condicionadas (RC) (Rescorla, 1968; Catania, 1999; Kandel, 2001; Bast et al., 2003; Brito et al., 2006). O EI é também associado ao ambiente onde ocorre o condicionamento, denominado como contexto de treinamento (Anagnostaras et al., 2001; Maren, 2001; Canteras et al., 2012). A partir destas associações estabelece-se uma relação em que o estímulo neutro (som, luz ou contexto) passa a ser um EC, que elicia a resposta condicionada, denominada de medo ou medo condicionado (Landeira-Fernandez, 1996; Maren et al., 1997; Fanselow, 2010). Portanto, após pareamentos som-choque, os estímulos contextuais ou do som (EC) passam a induzir a ocorrência de comportamentos defensivos, parte do repertório de defesa que contribuem para a autopreservação do organismo (Fendt e Fanselow, 1999; Maren, 2001; Shuhama et al., 2007). Tais comportamentos foram identificados e classificados por meio de análises experimentais, consistindo em exploração cautelosa do ambiente por meio da avaliação de risco, comportamentos alimentares, locomoção, imobilidade completa ou congelamento (*freezing*), fuga orientada ou ataque, e submissão (Blanchard et al., 1988; Shuhama et al., 2007). Geralmente essas respostas são acompanhadas de reações neurovegetativas tais como aumento da pressão sanguínea, frequência cardíaca e respiratória, analgesia e alterações hormonais (Fendt e Fanselow, 1999).

Entre as estruturas neurais que participam dos processos de aprendizagem e memória do medo condicionado, estão a amígdala e o hipocampo. A amígdala é o componente central do circuito neural do medo, sendo mais responsável pela memória emocional aversiva sinalizada ou discriminativa; o hipocampo, por sua vez, foi identificado como uma estrutura mais envolvida com processos de memória contextual aversiva, sendo fundamental para a estabilização da representação sensorial e cognitiva do contexto (Kim e Fanselow, 1992, Eichenbaum et al., 1992;

Izquierdo e Medina, 1993; LeDoux, 2000; Maren, 2001; Zhang et al., 2001; Bast et al., 2003; Brito et al., 2006; Ma et al., 2011; An et al., 2012; Canteras et al., 2012; Wang et al., 2013). Uma das funções do hipocampo seria montar uma representação contextual associada ao estímulo incondicionado, permitindo consolidar e estabilizar uma memória de uma representação integrada do contexto aversivo (Agnostaras et al., 2001; Bast et al., 2001). Também há evidências de que o hipocampo participa dos processos de condicionamento clássico aversivo a estímulos discretos (Richmond et al., 1999; Bast et al., 2003). A memória permanece hipocampo-dependente poucos dias após o treino, sendo progressivamente incorporada a outras áreas corticais (Bontempi et al., 1999; Tse et al., 2007). Além disso, demonstrou-se que o complexo da amígdala basolateral está envolvido na consolidação da memória do medo contextual em resposta a um ambiente relacionado com o predador. Lesões dos núcleos basomedial posterior e lateral da amígdala de gatos causaram uma redução nas respostas de medo contextual (Martinez et al., 2011).

A discussão da participação do hipocampo no condicionamento de medo é encontrada em uma extensa literatura, principalmente nas duas últimas décadas (Beckinschtein et al., 2007; Fanselow, 2010; Mizuno et al., 2012; Wang et al., 2013). Há estudos que indicam que o hipocampo dorsal de mamíferos participaria fundamentalmente do condicionamento contextual aversivo, mas não do condicionamento a um estímulo discreto, como o som ou a luz (Kim e Fanselow, 1992; Maren et al., 1997). Contudo, as evidências mais recentes indicam que o hipocampo ventral participa do condicionamento de medo ao som (Bast et al., 2003) e que o hipocampo ventral também participa de forma importante no condicionamento ao contexto (Zhang et al., 2001).

Em trabalhos já conduzidos no grupo de pesquisas do Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento foi confirmado que no hipocampo de pombos, tal como em mamíferos, ocorre uma ampla distribuição de receptores glutamatérgicos do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4 (AMPA), conforme visto no mapeamento imunohistoquímico de subunidades desses receptores de glutamato (Rosinha, 2003). A participação desses receptores em processos de aquisição e consolidação de memória aversiva em pombos foi indicada pelos efeitos amnésicos de infusões intra-hipocampais de 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-diona (DNQX) antes e após o condicionamento clássico aversivo (Scarpim et al., 2007). Além disso, observou-se a marcação imunoistoquímica do produto do gene de expressão imediata *zenk*, a proteína Zenk, indicativa da ativação neuronal no hipocampo de pombos induzida pelo treino com condicionamento som-choque (Brito, 2002; Brito et al., 2006) e pela re-exposição ao contexto do condicionamento som-choque (Sperandéo et al., 2005; Canova, 2009). Dessa forma, esses estudos representam uma contribuição de interesse para a análise dos substratos moleculares da aprendizagem e memória e confirmam que o pombo é um modelo experimental interessante para o estudo do hipocampo em processos de condicionamento clássico aversivo (Brito et al., 2006; Brito et al., 2011). Por outro lado, suscitam questões sobre os outros mecanismos envolvidos na plasticidade sináptica relacionada com a memória aversiva.

1.3. Persistência da memória

O processo de memória é descrito como envolvendo diferentes fases: aquisição, consolidação, evocação, reconsolidação, persistência e extinção das informações adquiridas, sendo cada fase caracterizada por eventos neurais específicos (Izquierdo et al., 2000; Bekinschtein et al., 2007; Cunha et al., 2010).

Nas primeiras horas após o treino, a experiência desencadeia as primeiras mudanças nos circuitos neuronais (memória de curto-prazo), iniciando-se a fase de consolidação da memória. A consolidação caracteriza-se como uma organização gradual das informações constantes do sistema de memória de curto-prazo, ainda vulneráveis à desorganização, de modo a torná-las estáveis para o armazenamento a longo-prazo (Mcgaugh, 2000). Portanto, a consolidação inicial ocorreria por meio de uma reorganização de memórias de curto-prazo (Mckenzie e Eichenbaum, 2011). A reexposição a eventos ou situações já memorizadas induz a evocação da memória original, processo que é considerado fundamental para a reativação e consequente reconsolidação da memória, garantindo que a memória de longa-duração persista ao longo do tempo (persistência). Se a reativação da memória ocorre na ausência de um estímulo reforçador durante um período prolongado de tempo, essa evocação na ausência do reforçamento resultará no enfraquecimento da memória, caracterizando um processo de extinção. Estas fases parecem requerer a síntese de novas proteínas e a expressão de genes para produzir modificações estruturais estáveis das sinapses e garantir que as novas memórias sejam fortalecidas e mantidas ao longo do tempo (Izquierdo, 2006). É bem reconhecido que a consolidação da memória envolve uma cascata de eventos moleculares e celulares relativamente breve e que altera a eficácia sináptica (Mcgaugh, 2000). Evidências recentes indicam também que o processo de consolidação envolve uma fase tardia de eventos moleculares que seriam responsáveis pela persistência da memória de longo-prazo (Mcgaugh, 2000; Bekinschtein et al., 2007; Ou et al., 2010; Bekinschtein et al., 2010).

A consolidação e a persistência da memória envolvem mecanismos cuja ocorrência parece se repetir em ciclos. Eckel-Mahan et al (2008) demonstraram que a

persistência da memória de longo prazo pode ser dependente da reativação da via de sinalização intracelular envolvendo AMPc/MAPK/CREB no hipocampo. Essa consideração relaciona-se com evidências de que repetidos ciclos de síntese do receptor de glutamato do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA) seriam requeridos para consolidação da memória e sua manutenção (Cui et al., 2004).

Kim e Fanselow (1992) foram pioneiros na análise do papel do hipocampo na consolidação de memória emocional aversiva em ratos. Esses autores mostraram o papel dinâmico do hipocampo na formação de memórias de condicionamento som-choque, e indicaram um processamento diferencial para o armazenamento das informações aversivas, relativas aos estímulos contextuais e à memória do som, um estímulo discreto. Esses dados somaram-se àqueles que mostravam a importância funcional da formação hipocampal na aprendizagem e na memória contextual em mamíferos (Eichenbaum e Otto, 1992; Maren e Baudry, 1995).

Apesar dos muitos estudos sobre o envolvimento do hipocampo e da amígdala na aprendizagem (Brito et al., 2006; Ou et al., 2010; Ma et al., 2011; An et al., 2012; Wang et al., 2013), delimitando as proteínas envolvidas no processo de aquisição da memória aversiva, poucos estudos analisaram questões referentes ao papel destas estruturas na persistência por um longo prazo da memória adquirida, principalmente no modelo do condicionamento aversivo.

Contudo, as questões relativas à persistência da memória são importantes na medida em que estão relacionadas à própria função da memorização. De certo modo, essas questões estão implícitas na própria definição de aprendizagem e memória, visto que as alterações de comportamento decorrentes da aprendizagem

devem perdurar no tempo e se caracterizar por alterações na probabilidade futura de ocorrência de comportamentos.

Este processo que traduz a persistência da memória exige uma maquinaria complexa de eventos celulares e moleculares envolvidos na plasticidade neuronal. E uma importante proteína para estes eventos plásticos da persistência da aprendizagem é o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), neurotrofina envolvida na memória de longa duração (Bekinschtein et al., 2007; Nagappan et al., 2009; Ou et al., 2010; Martinez-Moreno et al., 2011; Mizuno et al., 2012).

1.4. Participação do BDNF em processos de aprendizagem e memória

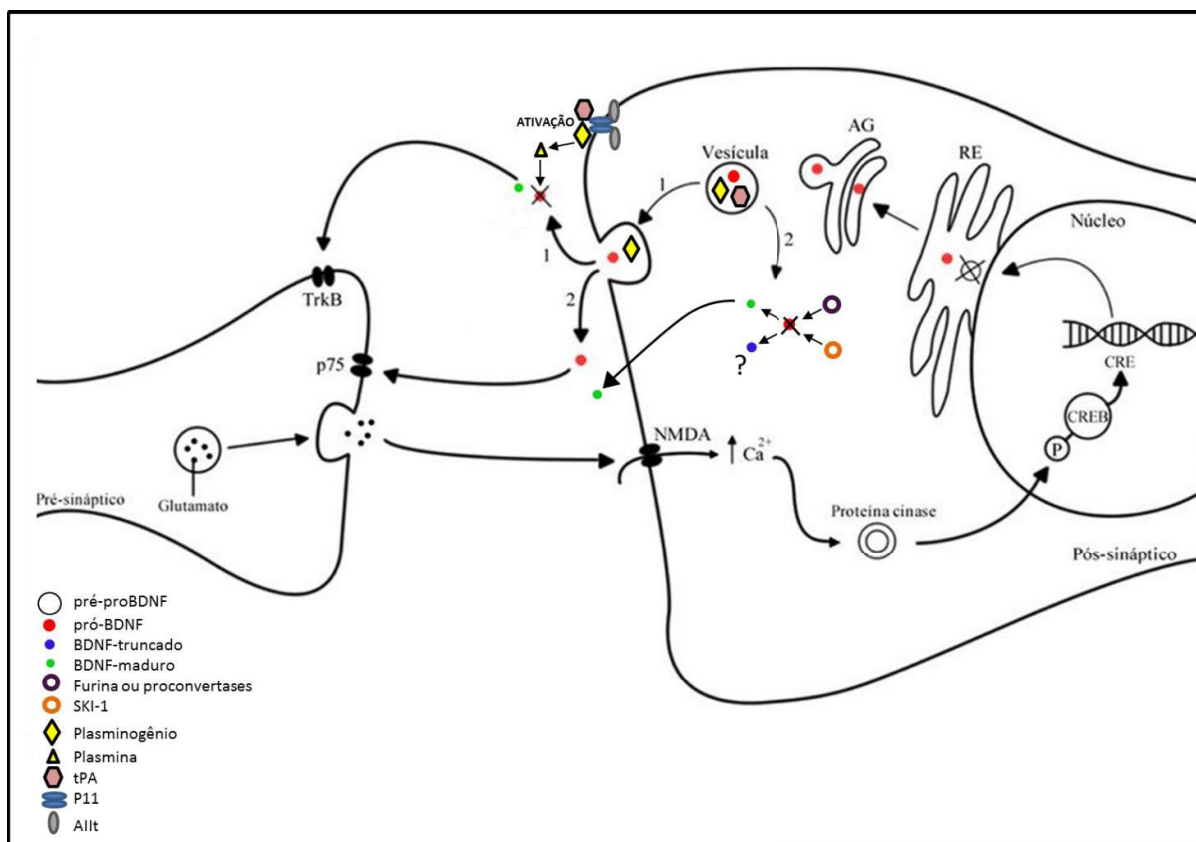
Os processos moleculares envolvidos na síntese do BDNF se iniciam a partir da liberação do Glutamato pelo neurônio pré-sináptico, e sua ligação no receptor pós-sináptico NMDA, promovendo o influxo intracelular de cálcio (Ca^{2+}), que por sua vez, ativa proteínas cinases que participam de uma complexa via de sinalização intracelular culminando na fosforilação da proteína ligante ao elemento de resposta do AMPc (CREB) (Lochner et al., 2008; Yang et al., 2009; Cunha et al., 2010). A CREB ativa o elemento de resposta do AMPc (CRE), desencadeando a transcrição do gene do BDNF e a tradução da molécula protéica precursora denominada pre-próBDNF, que é clivada gerando o pró-BDNF 32 KiloDalton (kDa) (Cunha et al., 2010). O pró-BDNF, é armazenado em vesículas no Aparelho de Golgi (GA) e, posteriormente, pode seguir duas vias de processamento pós-transcricional distintas (Mowla et al., 2001; Binder e Scharfmann, 2004). Pode ser clivado intracelularmente por enzimas distintas, pela enzima Subtilizin/Kexin-isozyme 1 (SKI-1), furina ou proconvertases, gerando outras duas isoformas diferentes: BDNF-truncado (28 kDa) e BDNF-maduro (14 kDa), respectivamente (Noble et al., 2011). Alternativamente, o

pró-BDNF pode ser secretado por exocitose e clivado extracelularmente pela protease plasmina que é expressa na forma de um zimogênio inativo denominado plasminogênio (Cunha et al., 2010; Noble et al., 2011). A ativação do plasminogênio envolve outra protease, o ativador do plasminogênio tissular (tPA) e a proteína anexina II tetrâmero (Allt). A Allt é um complexo heterotetrâmero composto por duas subunidades p36, também referidas como anexina II, e duas subunidades p11 (Kassam et al., 1998). A p11, também denominada S100A10, pertence à família S100 de proteínas e é encontrada no citosol e na superfície interna da membrana plasmática, e também está presente na superfície extracelular (Svenningsson e Greengard, 2007). Foi demonstrado que a subunidade p11 é determinante para a função da Allt na sua interação molecular com o plasminogênio, bem como no seu efeito de estimular em cerca de 300 vezes a ativação do plasminogênio mediada pelo tPA (Kassam et al., 1998). Desta forma a proteína Allt interage com ambos plasminogênio e tPA na superfície extracelular potencializando a geração de plasmina ativa (Kim e Hajjar, 2002). A plasmina que, por sua vez, cliva o pró-BDNF gerando BDNF-maduro (Pang et al., 2004; Lu et al., 2005). Tanto o tPA quanto o plasminogênio são vastamente expressos no sistema nervoso, em regiões como hipocampo, amígdala e hipotálamo (Melchor e Strickland, 2005). O plasminogênio é exclusivamente expresso por neurônios e secretado na fenda sináptica e o tPA é secretado por neurônios, de maneira dependente de atividade, e também pela glia (Lu et al., 2005).

O pró-BDNF tem alta afinidade para o receptor de neurotrofina p75, cuja ativação desencadeia efeitos pró-apoptóticos e anti-plasticidade (Lu et al., 2005; Cunha et al., 2010; Xu et al., 2010; Sanchez et al., 2011; Dieni et al., 2012). Por sua vez, o BDNF-maduro exerce seus efeitos fisiológicos de sobrevivência celular e

plasticidade neuronal, interagindo predominantemente com seu receptor de membrana específico, tirosina-quinase B (TrkB) (Lu et al., 2008; Nagappan et al., 2009). Já para a isoforma truncada não se conhece ainda uma função bem estabelecida (Seidah et al., 1999; Mowla et al., 2001; Mizoguchi et al., 2011; Carlino et al., 2011; Sartori et al., 2011; Garcia et al., 2012). A figura 1 apresenta uma representação esquemática da síntese e processamento pós-transcricional do BDNF descritos acima.

Figura 1 - Esquema representativo dos processos de síntese e clivagem do BDNF.



BDNF é sintetizado na molécula precursora pré-proBDNF, que é clivada (X) no Reticulo Endoplasmático (ER) gerando o pró-BDNF, então transportado para o Aparelho de Golgi (GA) e posteriormente para Rede Trans-Golgi (TGN) formando vesículas. O pró-BDNF pode seguir por duas vias distintas, (1) permanecer intracelularmente e ser clivado em BDNF-maduro pela furina ou proconvertases, e posteriormente ser exocitado ou em BDNF-truncado pela SKI-1, (2) ser secretado por exocitose e clivado extracelularmente pela plasmina ativa gerando a isoforma madura. O pró-BDNF tem alta afinidade para o receptor de neurotrofina p75, desencadeando efeitos pró-apoptóticos e anti-plasticidade. Por sua vez, BDNF-maduro exerce seus efeitos fisiológicos de sobrevivência celular e plasticidade, interagindo predominantemente com seu receptor específico de membrana, TrkB.

O BDNF é uma proteína cuja expressão é ativada em decorrência de atividade neuronal no contexto um evento de aprendizagem, promovendo as alterações moleculares subjacentes ao processo de formação da memória de longa duração (Bekinschtein et al., 2007; Nagappan et al., 2009; Ou et al., 2010; Martinez-Moreno et al., 2011; Mizuno et al., 2012). A expressão da isoforma madura do BDNF é aumentada após o treino em tarefas de aprendizagem (Hall et al., 2000; Sartori et al., 2009). Estudos recentes relataram a ocorrência de um pico nos níveis hipocámpais de BDNF-maduro, em aproximadamente 12 h após o treino de condicionamento operante de esquiva inibitória em roedores (Bekinschtein et al., 2007). Este pico tardio da expressão do BDNF-maduro foi também encontrado na amígdala de roedores nas 12 h após treino de condicionamento aversivo (Ou et al., 2010).

O aumento da expressão do BDNF-maduro em estruturas neurais tem sido implicado na persistência da memória de longo prazo associada ao condicionamento do medo contextual em roedores (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2010). Porém, a relação entre as três isoformas de BDNF (pró-BDNF, BDNF-truncado, BDNF-maduro) no processo da persistência da memória não é bem compreendida, especialmente no que diz respeito ao condicionamento clássico aversivo som-choque.

1.5. Caracterização do hipocampo e amígdala de aves

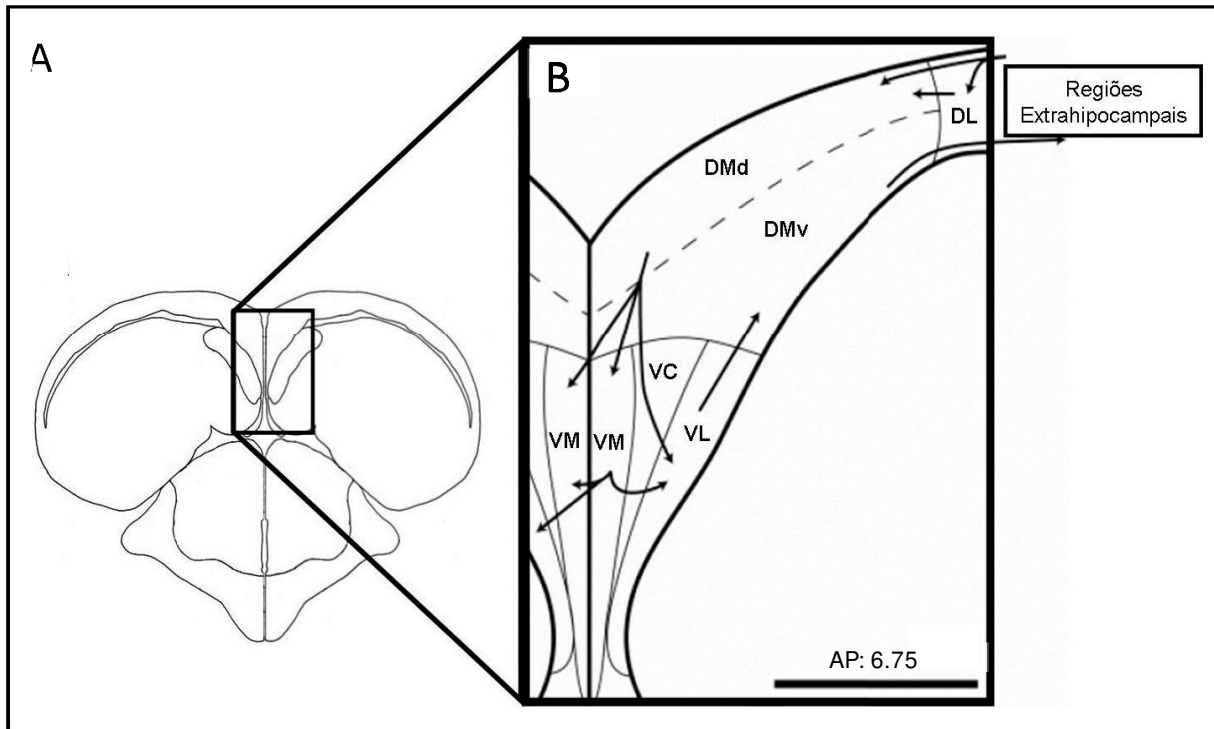
Em mamíferos, a formação Hipocampal é uma estrutura do lobo temporal que inclui o hipocampo propriamente dito (corno de Ammon), o giro denteado, o subículo, e o córtex entorrinal (Machado, 2004). O hipocampo pode ser dividido em quatro áreas: as camadas CA1 e CA3 que se localizam na região superior e inferior, respectivamente, a camada CA2, que constitui uma pequena zona de transição entre CA1 e CA3, e a camada CA4, que fica na zona de transição entre o hipocampo e o giro denteado (Bear et al., 2002). As estruturas constituintes do sistema hipocampal estão interligadas por um circuito excitatório tri-sináptico e unidirecional, que inclui a via perforante, a via das fibras musgosas e a via eferente das fibras colaterais de Schaffer (Kandel et al., 2001).

Apesar da organização morfológica da formação hipocampal de aves ser diferente daquela descrita em mamíferos, aspectos topográficos, neuroquímicos e funcionais similares foram descritos. Tanto em mamíferos quanto em aves o hipocampo margeia o ventrículo lateral. Do ponto de vista anatômico, a formação hipocampal de aves localiza-se na porção dorso medial do cérebro anterior e está dividida em duas regiões com camadas celulares distintas: a área para-hipocampal que está localizada dorso-lateralmente, e o hipocampo propriamente dito, localizado ventro-medialmente (Campbell e Hodos, 1970).

O hipocampo de aves apresenta a região dorso-medial (DM), com as suas subdivisões em dorso-medial-dorsal (DMd) e dorso-medial-ventral (DMv) e a região ventral com suas subdivisões em região ventro-lateral (VL) e região ventro-medial (VM), contendo células piramidais e uma área triangular medial localizada entre os braços da área em “V” (Székely 1999; Atoji et al., 2002; Atoji e Wild, 2006).

Kahn et al. (2003) investigaram a organização anatômica das subdivisões do hipocampo de pombos com traçadores retrógrados e anterógrados, e sugeriram a existência de um circuito tri-sináptico no hipocampo de pombos, comparável ao existente em mamíferos (Figura 2). A entrada sensorial se localiza na área dorsolateral, como ocorre no córtex entorrinal em mamíferos. Da área dorsolateral seguem projeções para área dorsomedial, tal como ocorrem as projeções pela via perfurante do córtex entorrinal para o giro denteado no hipocampo de mamíferos. Da área dorsomedial seguem projeções para as áreas ventromedial e ventrolateral, como ocorre entre o giro denteado e a área CA3 no hipocampo de mamíferos. Da área ventrolateral seguem projeções ipsilateralmente para área ventromedial e para a área ventrolateral contralateral, como ocorrem em mamíferos as projeções da região CA3 para as CA1 ipsilateral e contralateral. Em mamíferos a área CA1 se projeta para o *subiculum*, em pombos a área ventrolateral se projeta para a área dorsomedial. O *subiculum* e a área dorsomedial se projetam para fora da formação hipocampal em mamíferos e aves (Atoji et al., 2002; Kahn et al., 2003). Székely, (1999) identificou projeções eferentes para outras regiões, tais como as do hipocampo dorsolateral de onde se projetam fibras para os núcleos basorostrais, arcopálio, septo lateral e regiões meso-diencefálicas.

Figura 2 - Esquema da conectividade intra-hipocampal

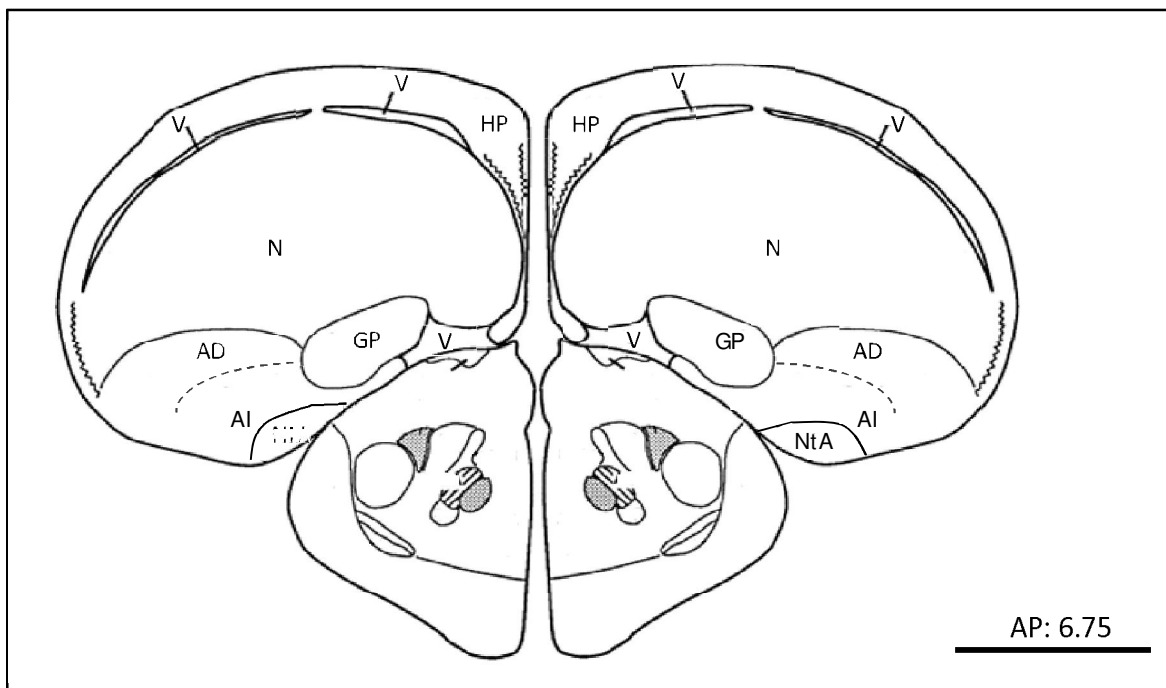


AP = anteroposterior, DL = região Dorso Lateral, a linha tracejada mostra a divisão da área dorsomedial (DM) em porção dorsal (DMd) e ventral (DMv). Setas representam conexões entre as áreas hipocampais. VC = área ventral central; VL = área ventrolateral; VM = área ventromedial. Escala de Barra = 1mm. (Modificado de Kahn et al., 2003; Karten e Hodoss, 1967; Canova, 2009)

Em mamíferos, a amígdala é uma estrutura que faz parte do sistema límbico, intimamente conectada ao hipocampo, cujas funções estão relacionadas à organização da resposta de medo condicionado e outras emoções. Entre as regiões da amígdala, dois núcleos foram especialmente focalizadas na pesquisa do medo condicionado, ou seja, os núcleos centrais e laterais. O núcleo lateral da amígdala parece ser o local primário em que as associações entre o estímulo condicionado (EC) e o estímulo incondicionado (EI) são formadas e armazenadas, sendo referido como um local crítico para a memória do medo. Por outro lado, o núcleo central, que tem projeções para o hipotálamo e tronco encefálico, é fundamental para a expressão do medo condicionado (Canteras et al., 2012).

Em aves considera-se que o complexo amigdalóide consiste de uma região palial posterior, núcleos taeniae e amígdala sub-palial (Reiner et al., 2004). Em pombos, a amígdala não se localiza intimamente conectada ao hipocampo, ficando na região do arcopallium que inclui várias populações neuronais consideradas homólogas as regiões da amígdala de mamíferos. No arcopallium as regiões particularmente comparáveis à amígdala de mamíferos são o núcleo taeniae e os núcleos amigdalóides sub-paliais (Yamamoto et al., 2005) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da representação da amígdala no encéfalo de pombos



AD = arcopallium dorsal, AI = arcopallium intermediário, HP = hipocampo, N = nidopallium, PA = paleostriatum, V = ventrículo. (Modificado de Kahn et al., 2003; Yamamoto et al., 2005).

Os estudos neuroquímicos do hipocampo e amígdala de aves indicam que são encontrados os diversos tipos de neurotransmissores e neuropeptídeos também presentes no hipocampo e amígdala em mamíferos. Krebs et al. (1991) descreveram uma região com terminais de fibras mediais aferentes, na qual se encontram fibras

imunoreativas para substância P (SP), colecistoquinina (CCK), leucina encefalina (LENK), polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e neuropeptídeo Y (NPY); havendo também a presença de fibras colinérgicas, catecolaminérgicas, serotoninérgicas e glutamatérgicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Experimento 1

Objetivo geral: Investigar se o condicionamento clássico som-choque induz um ciclo tardio de expressão das três isoformas do BDNF (pró-BDNF, BDNF-madurado, BDNF-truncado), e da tPA no hipocampo e amígdala de pombos. As expressões de BDNF e tPA foram investigadas inibindo a síntese proteica com infusão intra-hipocampal de anisomicina 11 h após o condicionamento.

Objetivo específico: Investigar se a infusão intra-hipocampal de anisomicina 11 h após o condicionamento clássico som-choque induz alterações da expressão do BDNF e da tPA na amígdala.

2.2. Experimento 2:

Objetivo: Investigar o papel do BDNF-maduro no processo da consolidação e persistência tanto da memória contextual quanto da memória ao som, através da infusão de anisomicina ou K252a no hipocampo 11 h após o condicionamento som-choque.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

Foram utilizados pombos machos, adultos, derivação não controlada da espécie *Columba livia* (350-500 g, 1-2 de idade), adquiridos de um mesmo fornecedor. Após a chegada ao biotério, foram mantidos em quarentena, recebendo banho e tratamento anti-parasitas internos e externos. Durante esse período, os animais sofreram manipulações de caráter dessensibilizatório, profilático (administração de anti-helmínticos) e terapêutico (extinção de escabiose). Em seguida, foram alojados em gaiolas-viveiro individuais, identificados numericamente e catalogados e tiveram água e comida *ad libitum* (mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração especial para aves, areia e farinha de ostra). Ventilação higiênica periódica foi promovida por exaustores e o controle de temperatura foi feito pelo uso de condicionadores de ar (25 °C). Nestas condições foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h. Todos os procedimentos experimentais foram realizados em acordo com as prescrições do comitê de ética de experimentação com animais da UNICAMP, sob o protocolo CEUA 2928-1. Foram constituídos os seguintes grupos:

- **Experimento 1:**

1. Grupo NAIVE (NAIVE; n= 12). Pombos apenas adaptados à manipulação e pesagem, que passaram por eutanásia 12 h após a última pesagem.
2. Grupo Condicionado Não Tratado (Cond; n= 12). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que passaram por eutanásia 12 h após o término da sessão de treino.

3. Grupo Condicionado Veículo-Salina (CondSAL; n= 12). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de veículo salina fisiológica no hipocampo 11 h após o término da sessão e passaram por eutanásia 1 h depois.

4. Grupo Condicionado Anisomicina (CondANI; n= 12). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de anisomicina no hipocampo 11 h após o término da sessão e passaram por eutanásia 1 h depois.

- **Experimento 2:**

1. Grupo Condicionado Não tratado 2 dias (Cond2; n= 5). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e testados ao contexto e ao som 2 dias depois do treino.

2. Grupo Condicionado Veículo 2 dias (CondSAL2; n= 5). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de veículo salina fisiológica no hipocampo 11 h após o término da sessão de treino e testados ao contexto e ao som 2 dias depois do treino.

3. Grupo Condicionado Tratado-anisomicina 2 dias (CondANI2; n= 7). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de anisomicina no hipocampo 11 h após o término da sessão de treino e que serão testados ao contexto e ao som 2 dias depois do treino.

4. Grupo Condicionado Tratado-K252a 2 dias (CondK2; n= 8). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de K252a no hipocampo 11 h após o término da sessão de treino e que serão testados ao contexto e ao som 2 dias depois do treino.

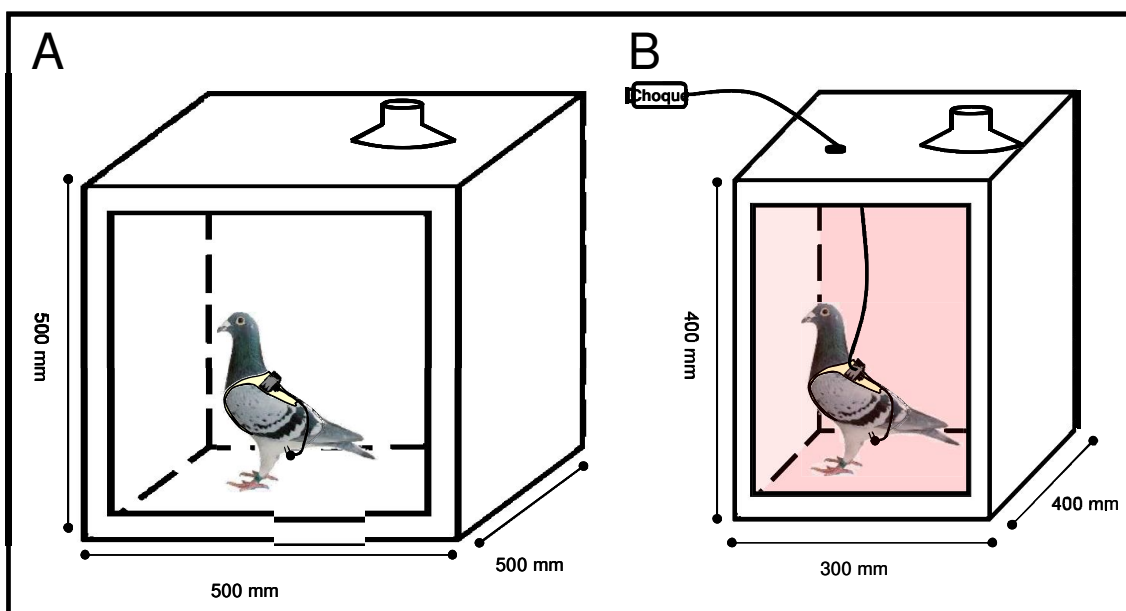
5. Grupo Condicionado Não tratado 7 dias (Cond7; n= 5). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e testados ao contexto e ao som 7 dias depois do treino.
6. Grupo Condicionado Veículo 7 dias (CondSAL7; n= 5). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de veículo salina fisiológica no hipocampo 11 h após o término da sessão de treino e testados ao contexto e ao som 7 dias depois do treino.
7. Grupo Condicionado Tratado-anisomicina 7 dias (CondANI7; n= 7). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de anisomicina no hipocampo 11 h após o término da sessão de treino e que serão testados ao contexto e ao som 7 dias depois do treino.
8. Grupo Condicionado Tratado-K252a 7 dias (CondK7; n= 8). Pombos treinados com três apresentações de som-choque e que receberam infusão de K252a no hipocampo 11 h após o término da sessão de treino e que serão testados ao contexto e ao som 7 dias depois do treino.

3.2. Equipamentos

3.2.1. Caixas experimentais para habituação - condicionamento - teste: As sessões de habituação e de teste ao som foram realizadas numa câmara de observação (50 x 50 x 50 cm.), com paredes brancas e porta lateral, o lado frontal foi construído com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. A iluminação era feita com lâmpadas fluorescentes brancas de 9 W, localizadas nas paredes laterais (Figura 4A). As sessões experimentais de condicionamento som-choque e de teste ao contexto foram realizadas numa câmara de observação (30 x 40 x 40 cm.), com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal

construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. A iluminação era feita com lâmpadas vermelhas de 15 W, localizadas nas paredes laterais (Figura 4B). Os choques eram aplicados através dos eletrodos a partir de uma fonte (FORINGER, USA), controlados por marcadores de tempo eletromecânicos. Todas as sessões foram gravadas digitalmente com o auxílio do software (WinVDR pro versão 3.7.0).

Figura 4 - Situação experimental



(A) caixa de habituação/teste ao som (medidas 50X50X50) (1) Auto falante onde eram emitidos os estímulos sonoros no teste ao som (72 dB, 6 s). (B) caixa experimental de condicionamento som-choque/teste ao contexto (medidas 30X40X40) (1) botão de acionamento do choque elétrico (5 mA, 35 ms) no treino, (2) auto falante onde eram emitidos os estímulos sonoros (72 dB, 6 s) no treino. (CANOVA, 2009)

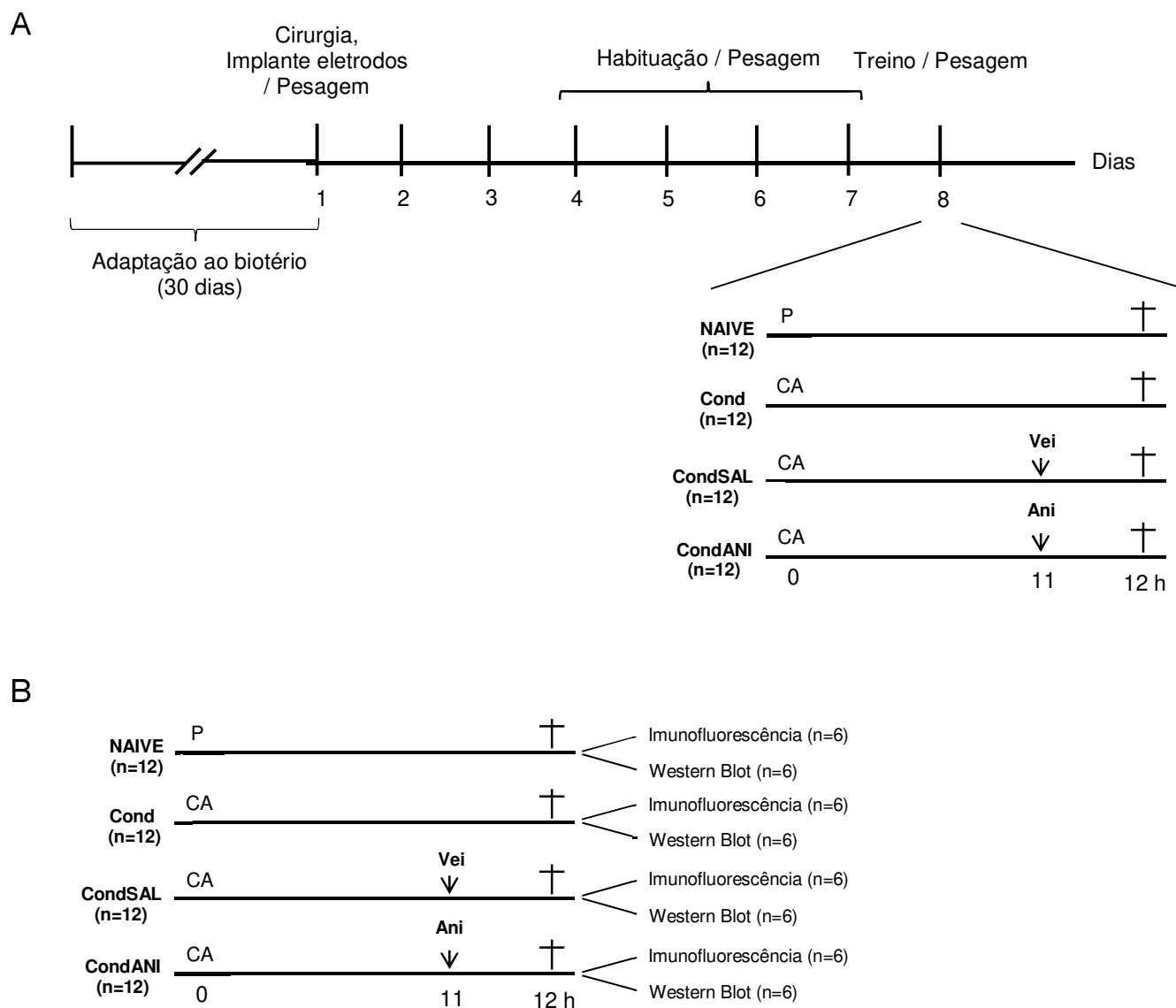
3.3. Procedimentos

Experimento 1: adaptação às condições de biotério (por 30 dias), cirurgia de implante das cânulas e eletrodos (dia 1), recuperação cirúrgica (dias 2 e 3), habituação (dias 4, 5, 6 e 7), condicionamento som-choque, infusão intrahipocampal

(veículo, anisomicina), decapitação/perfusão (dia 8). Posteriormente foram realizadas as análises comportamentais, e moleculares: Western Blot e Imunofluorescência (Figura 5A). Os grupos após o sacrifício foram divididos, resultando em 6 animais de cada grupo para análise de expressão proteica por Western Blot, e 6 animais de cada grupo para análise de expressão proteica por Imunofluorescência (Figura 5B). Os procedimentos de cirurgia de implante das cânulas e eletrodos, habituação, condicionamento som-choque dos grupos condicionados e a pesagem do grupo NAIVE foram realizados no período da manhã, das 07:00 às 9:00 min, apenas a infusão intra-hipocampal do veículo e anisomicina foram realizadas no período da noite 19:00 às 21:00 min.

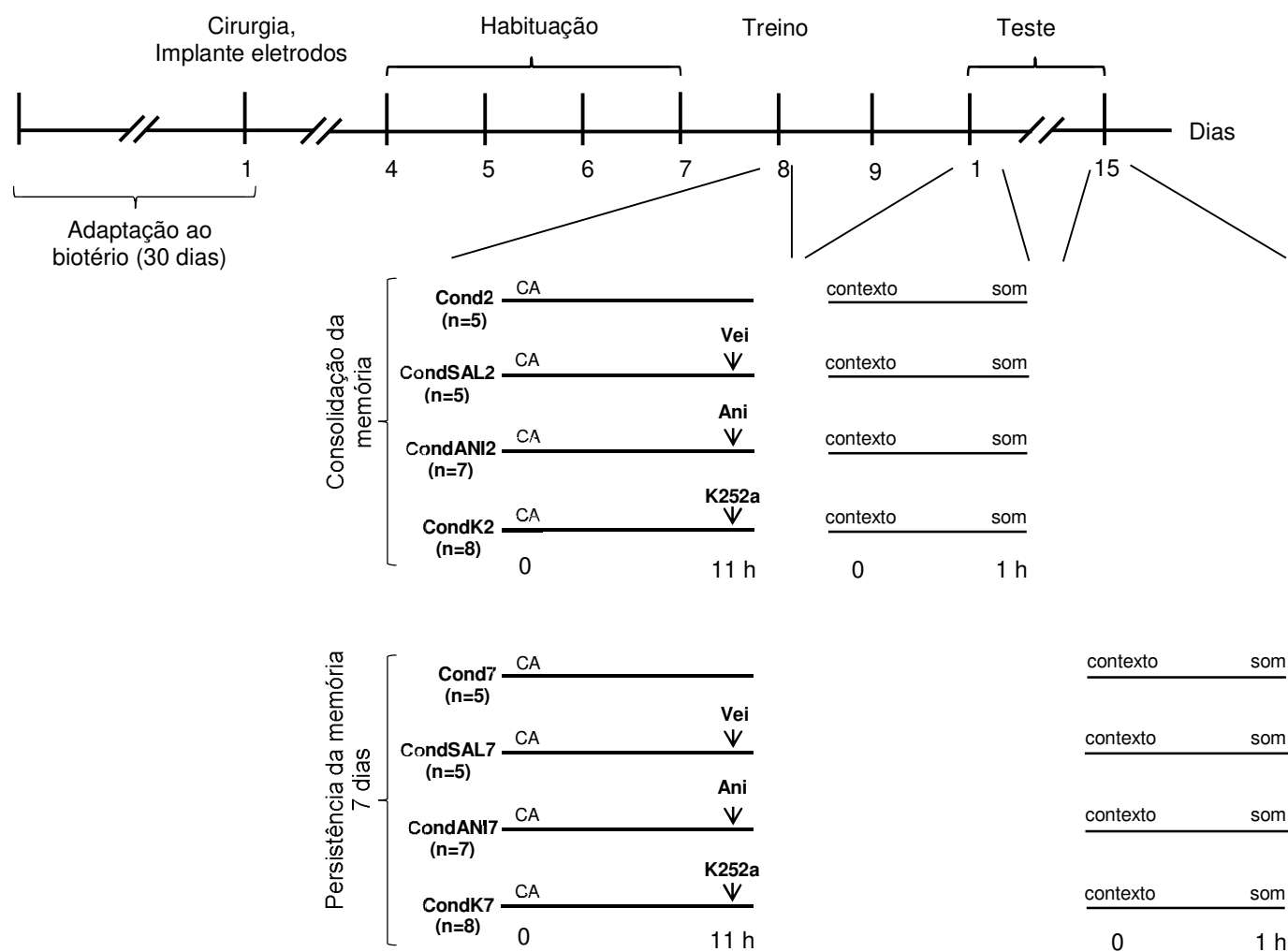
Experimento 2: adaptação às condições de biotério (por 30 dias), cirurgia de implante das cânulas e eletrodos (dia 1), recuperação cirúrgica (dias 2 e 3), habituação (dias 4, 5, 6 e 7), condicionamento som-choque, infusão intrahipocampal (veículo, anisomicina, K252a) (dia 8), testes de reexposição ao contexto e ao som em um novo contexto, decapitação (dia 10), testes de reexposição ao contexto e ao som em um novo contexto, decapitação (dia 15). Posteriormente foram realizadas as análises comportamentais. (Figura 6). Os procedimentos de cirurgia de implante das cânulas e eletrodos, habituação, condicionamento som-choque, teste ao contexto, teste ao som foram realizados no período da manhã, das 07:00 às 10:00 min, apenas a infusão intra-hipocampal do veículo, anisomicina e K252a foram realizadas no período da noite 19:00 às 21:00 min.

Figura 5 - Diagrama dos procedimentos do experimento 1



(A) Os animais do grupo NAIVE não foram treinados, apenas pesados (P), e 12 h após sacrificados (†). Os grupos: Cond, CondSAL e CondANI foram treinados: Condicionamento Aversivo (CA), e 12 h após sacrificados (†). (B) todos os grupos após o sacrifício foram divididos, resultando em 6 animais de cada grupo para análise de expressão proteica por Western Blot, e 6 animais de cada grupo para análise de expressão proteica por Imunofluorescência.

Figura 6 - Diagrama dos procedimentos do experimento 2



Os animais dos grupos Condicionado Não Tratado 2 dias (Cond2), Condicionado Veículo 2 dias (CondSAL2), Condicionado Tratado-anisomicina 2 dias (CondANI2), Condicionado Tratado-K252a 2 dias (CondK2), foram treinados: Condicionamento Aversivo (CA), e 2 dias após testados ao contexto, 1h após testados ao som. Os animais dos grupos Condicionado Não Tratado 7 dias (Cond7), Condicionado Veículo 7 dias (CondSAL7), Condicionado Tratado-anisomicina 7 dias (CondANI7), Condicionado Tratado-K252a 7 dias (CondK7), foram treinados: Condicionamento Aversivo (CA), e 7 dias após testados ao contexto, 1h após testados ao som.

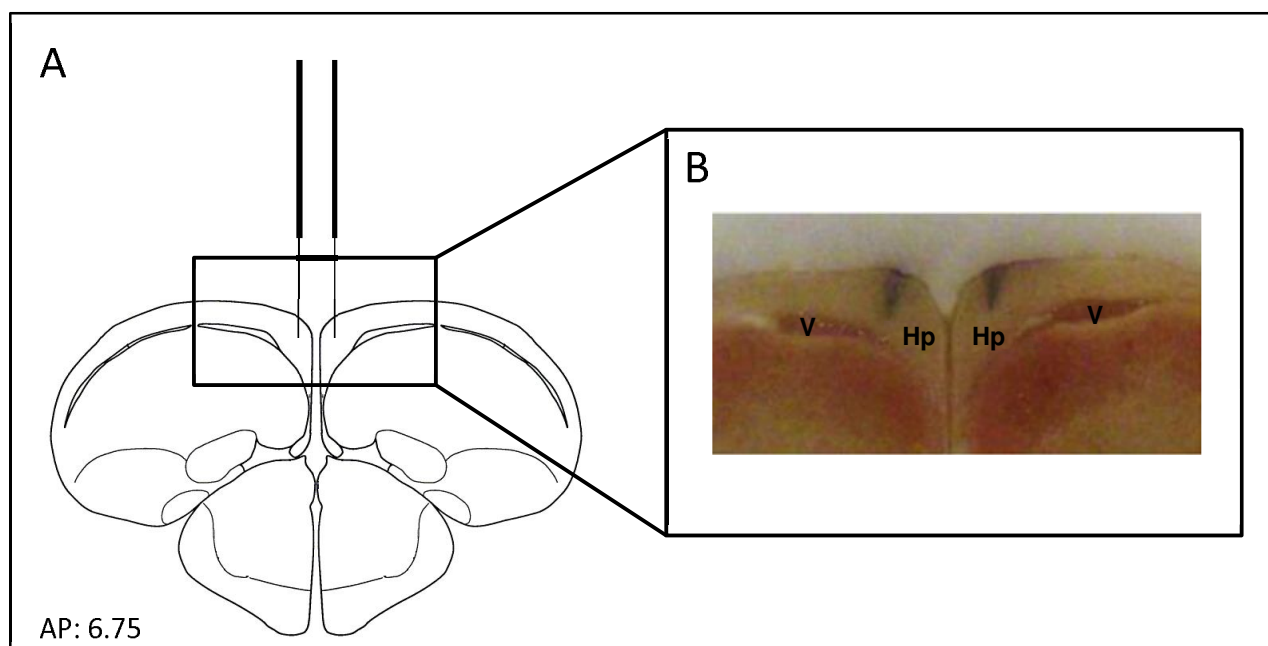
3.3.1. Adaptação às condições do biotério: Após chegarem ao biotério, os pombos passaram para as gaiolas-viveiro individuais, onde foram submetidos à adaptação às condições do biotério por um período mínimo de 20 dias, sendo mantidos sob temperatura média de 25° C, ciclo-claro escuro 12:12 h e com alimentação *ad libitum*. Em seguida foram iniciados os procedimentos experimentais.

3.3.2. Habituação ao contexto do laboratório: Foram realizadas sessões diárias de 30 min, em uma câmara experimental diferente daquela do treino, durante 4 dias no mesmo horário previsto para os testes comportamentais. Nesses dias, os animais do grupo NAIVE do experimento 1 foram apenas retirados das gaiolas-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e recolocados na gaiola-viveiro. Esse procedimento visa controlar a interferência de comportamentos relacionados com a novidade do ambiente experimental durante o treino.

3.3.3. Cirurgia de implante das cânulas e dos eletrodos: Os pombos foram anestesiados profundamente com uma solução de xilasina e cetamina (0.1 miligrama/quilograma, 1:1, i.m.). Após a anestesia, as penas do dorso da cabeça foram removidas, e foi estabelecido o ponto zero antero-posterior (AP) do aparelho esterotáxico (David Kopf, mod. 1204, com um adaptador Revzin para pombos) e colocado o animal. A seguir foi feita assepsia cutânea com peróxido de hidrogênio a 3% e realizada uma incisão na pele (linha sagital) para exposição da calota craniana e visualização da sutura sagital. A trepanação foi feita nas coordenadas: AP 6,75 mm; V 1.5 mm; L 0.8 mm (Karten & Hodos, 1967). Com uma broca de alta rotação, foram feitos dois orifícios nas regiões dorso-látero-mediais, de acordo com os pontos já estabelecidos. A microcânula de aço inoxidável 26G (*gauge*), medindo 12 mm foi

cuidadosa e lentamente introduzida até a profundidade do ponto V. Em seguida, foi realizada a fixação com solução de acrílico com líquido e pó auto-polimerizáveis. Após a secagem, a haste do aparelho estereotáxico foi levantada lentamente, ficando as cânulas fixadas ao acrílico. Um fio de aço medindo 12 mm de comprimento, e espessura igual ao diâmetro interno da cânula foi introduzido na cânula-guia e fixado à resina, para obliteração da mesma. As microcânulas ficaram posicionadas nos dois hipocampus (Figura 7).

Figura 7 - Posicionamento da cânula intra-hipocampal



(A) representação esquemática de uma secção coronal do cérebro de um pombo (Karten e Hodos, 1967). (B) seção frontal do cérebro congelado de um pombo ao nível do hipocampo. As zonas azuis correspondem ao sítio da infusão intra-hipocampal de uma solução contendo 0,5 ul de corante azul de Evans, usado para a visualização da correta colocação da cânula. Hp: Hipocampo; V: ventrículo.

Foram implantados eletrodos de aço inoxidável (0,5 mm; 0.020”) cronicamente nos ossos púbicos dos animais sob anestesia, e então ligados a um colete de tecido que continha um plugue de tomada elétrica (fêmea), a qual seria conectada no plugue de tomada elétrica (macho) da caixa experimental. Ao final, os animais retornaram para suas gaiolas-viveiro, lá permanecendo por um período de 7 dias para recuperação pós-operatória, antes do início dos procedimentos comportamentais.

3.3.4. Infusão intra-hipocampal: No experimento 1 os animais receberam infusões em cada hipocampo de 0,8 µl de salina (grupo CondSAL), 0,8 µl de anisomicina (grupo CondANI). No experimento 2 os animais receberam infusões em cada hipocampo de 0,8 µl de salina (grupos CondSAL2, CondSAL7), 0,8 µl de anisomicina (grupos CondANI2, CondANI7), 0,5 µl K252a (grupos CondK2, CondK7). A solução de anisomicina (Sigma-Aldrich) foi preparada com 0,01 g de anisomicina dissolvida em 50 µl de HCL (0,15 molar - M), e 50 µl de NaOH (0,15 M), pH de 7,4, formando uma solução salina que também foi usada no preparo do veículo, porém sem a droga. A infusão intra-hipocampal foi de 0,8 µl contendo 80 µg de anisomicina em cada hipocampo (Power et al., 2006; Bekinschtein et al., 2007). A solução de K252a (Sigma-Aldrich) foi preparada com 0,0001 g dissolvida em 5 ml de HCL (0,15 molar - M), e 5 ml de NaOH (0,15 M), pH de 7,4, formando uma solução salina que também foi usada no preparo do veículo, porém sem a droga. A infusão intra-hipocampal foi de 0,5 µl contendo 50 ng de K252a em cada hipocampo (Ou et al., 2010). As infusões foram feitas utilizando-se uma seringa Hamilton de 10 µl, acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha gengival 30G fixada em sua extremidade. A seringa Hamilton foi adaptada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) regulada para infusão de 0,25 µl/min. Terminada esta etapa, foi dado um

intervalo de 5 minutos e, em seguida, o procedimento foi repetido no hemisfério oposto. Fim da segunda etapa, foram aguardados mais cinco minutos antes da retirada da agulha de micro injeção e do animal ser devolvido à gaiola-viveiro.

3.3.5. Treino em condicionamento som-choque: Os animais do experimento 1 dos grupos Cond, CondSAL, CondANI e do experimento 2 todos os grupos receberam a apresentação de um som-choque (5 mA, 35 ms - 72 dB, 6 s) no 5°, 10° e 15° minuto. A sessão de treino teve 20 min de duração. Os animais do grupo NAIVE do experimento 1 não foram expostos ao contexto de apresentação de estímulos, e sim passaram pela pesagem no mesmo horário do treino.

3.3.6. Teste ao contexto de condicionamento: O teste ao contexto de condicionamento, realizado no Experimento 2, ocorreu 48 h ou 7 dias após o treino e consistiu na colocação do pombo na mesma câmara em que recebeu as apresentações de som-choque. A sessão do teste teve 10 min de duração e não foi apresentado qualquer estímulo. Findo o teste, os animais retornaram ao biotério onde permanecerão por 1 hr, e posteriormente foram submetidos ao teste ao som.

3.3.7. Teste de exposição ao som: O teste de condicionamento ao som, foi realizado 48 h ou 7 dias após o treino e consistiu na colocação do pombo numa outra câmara com características diferentes daquela em que recebeu as apresentações de som e choque, 1 hr após o fim ao teste ao contexto. A sessão do teste ao som teve 10 min de duração com a apresentação de 03 estímulos sonoros (3 min, 6min e 9 min).

3.3.8. Análise comportamental: A transcrição dos comportamentos observados durante a sessão experimental foi realizada utilizando o software EthoLog 2,2 (Ferramenta transcrição Etológico, 1995-1999, Ottoni, 2000). Um observador treinado registrou as sequências dos comportamentos em andamento durante toda a sessão de treino na base dos vários tipos de comportamentos (Brito et al., 2006, Reis et al., 1999). A duração de cada tipo de comportamento foi usada para a análise da duração relativa considerando a duração da sessão. A ocorrência do comportamento de congelamento foi obtida a partir de todas as sequências do comportamento registrados durante a sessão, utilizando um tempo de amostragem com intervalos de 30 segundos. A gravação dos tipos de comportamento foi de acordo com as seguintes descrições comportamentais (Brito et al., 2006; Reis et al., 1999).

Congelamento (CONG): o comportamento de congelamento foi registrado cada vez que foram observados no mínimo 5 dos seguintes critérios: a) flexão total ou parcial das pernas (agachado ou encolhido); b) separação ampla entre os pés (base de apoio alargada); c) cauda e asas desalinhadas; d) região ventral ou peitoral do corpo em contato com o piso ou com uma das paredes da câmara; e) pescoço com extensão restrita ou encolhido; f) olhos totalmente abertos (midríase); g) cabeça imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente; h) respiração acelerada e, i) ausência de outros comportamentos observáveis.

Explorar (EXP): movimentos relacionados à investigação visual de partes ou do ambiente como um todo, com extensão do pescoço, semi-rotação da cabeça ou com deslocamento lento da cabeça num espaço de 180°.

Exploração Cautelosa (ECA): estando o animal em postura de congelamento, ocorre extensão do pescoço e orientação da cabeça para uma determinada região

do ambiente, seguido por encolhimento do pescoço e retorno à condição anterior ou movimentos sequenciais restritos da cabeça.

Locomoção (LOC): deslocamento do corpo no espaço, em relação a um ponto qualquer que não ele mesmo, envolvendo andar, pisotear, esvoaçar, pular, circular.

Manutenção (MAN): comportamentos relacionados com ajustes corporais e vegetativos (bocejar, deglutir, piscar), auto-limpeza estimulação e coçar a cabeça e o corpo.

Movimentos isolados (MOV): nesta categoria serão incluídos todos os movimentos que resultam em mudanças restritas de localização espacial de partes do corpo do animal.

Parado (PAR): Ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte deste: o animal interrompe o movimento em curso ou fica sem se mover, em pé, geralmente no centro da câmara experimental e sem apoio peitoral, com o pescoço encolhido ou em pequena extensão, com o bico voltado para a direção dos pés e com ângulo entre o bico e o papo < que 60°.

Pré-exploratórios (PRE): constituem em reações reflexas que foram geralmente observadas antecedendo o explorar, como o sobressalto e o estremecimento.

Vigilância (VIG): Ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte deste: o animal fica imóvel, com alargamento da distância entre os pés, geralmente em pé; o pescoço apresenta extensão restrita e a cabeça fica imóvel e direcionada para um único ponto no ambiente, e o ângulo entre o bico e o papo = ou > que 90°.

3.3.9. Decapitação: No experimento 1 seis animais de cada grupo passaram por decapitação por guilhotina 12 h após o condicionamento som-choque, sendo os cérebros removidos, os hipocampus e amígdalas dissecados, e o tecido estocado

em freezer (-80° C). No experimento 2 todos os animais de todos os grupos passaram por decapitação por guilhotina 1 h após o teste ao som.

3.3.10. Perfusão: No experimento 1 seis animais de cada grupo passaram por perfusão 12 h após o condicionamento som-choque, sob anestesia profunda com cetamina (Francotar, VIRBAC, 0,06ml/100g de peso corporal, i.m.) e Xylazina (Rompum, MILES- LAB, 0,04ml/100g de peso corporal, i.m.). Cirurgicamente, a caixa torácica foi exposta, e injetada heparina sódica 0,2 ml/100g de peso no ventrículo esquerdo, seguida de perfusão por via transcardíaca com solução salina tamponada 0,9%, 100ml/100g de peso (pH 7,4), para a remoção do sangue presente no cérebro, e com solução de paraformaldeído (PFA), a 4% em tampão fosfato (TF) 0,1M; pH 7,4 em uma temperatura de 4° C para a fixação do tecido nervoso. Os cérebros foram retirados do crânio e mantidos por 4 horas na mesma solução de PFA, para pós-fixação. Os cérebros foram transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em TF 0,1 M, pH 7,4 e mantidos em uma temperatura média de 4° C por 48 h.

3.3.11. Análise dos níveis do BDNF e tPA por Western Blotting: 50 µl das amostras de hipocampo ou amígdala (concentração de proteínas totais = 50 ug/ml) foram diluídas com 50 µl de tampão de Laemmli (0,0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e fervidas durante 5 min. Após rápida centrifugação a 10.000 g (30 seg), as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%). A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%) ajustado para pH 8,3. A separação

eletroforética das proteínas foi realizada à intensidade de corrente constante (25 mA), durante aproximadamente 2 horas, resultando em valores de voltagem variando entre 70 a 120V. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, em uma voltagem 100V, durante 2 horas. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1%) e etanol (18%). Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (solução à 2% de corante Ponceau em solução aquosa contendo 30% de ácido tricloro acético e 30% de ácido sulfosalicílico). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,2% de caseína diluída em tampão TBS-t pH 7,4 (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0,2% de Tween-20) sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas overnight a 4°C com anticorpo anti-BDNF (rabbit, policlonal, 1:500; [N-20] sc-546, Santa Cruz Biotechnology, USA) que é capaz de detectar as isoformas precursora (pró-BDNF [32 kDa]), truncada (BDNF truncado [28 kDa]) e madura (mad-BDNF [14 kDa]) do BDNF e com anticorpo anti-tPA (rabbit, policlonal, 1:500, ab62763, Abcam, USA), diluídos em tampão 1 ml TBS-t, Azida 0,01 g, BSA 0,35 g, Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (3 vezes durante 5 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundário anti-rabbit conjugado com peroxidase (HRP, feito em cabra e diluído 1:2000 em TBS-t), durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência em filme de Raio-X mediante um kit de revelação (Super Signal West pico, Thermo Scientific, USA).

Após a revelação as membranas foram lavadas duas vezes por 10 min em TBS-t e em seguida, incubadas 10 min, em temperatura ambiente com 10 ml de solução “stripping” pH 2,2 para a retirada do anticorpo BDNF e posterior incubação com o controle interno (β -actina) . A solução “stripping” é constituída de 1,5% de glicina, 0,1% de SDS e 1% de Tween-20. A seguir, as membranas foram lavadas novamente duas vezes em TBS-t e submetidas a novo bloqueio e finalmente ao anticorpo anti β -actina (rabbit, policlonal, 1:500, orb10033, BIORBYT, USA), diluído em tampão 1 ml TBS-t, Azida 0,01 g, BSA 0,35 g). A intensidade das bandas (como medida do grau de expressão da proteína) foi determinada por análise com o uso do software ImageJ Launcher (version 1.45; Bethesda, Maryland, USA).

3.3.12. Análise das células BDNF-positivas por Imunofluorescência: Os cérebros foram fixados em uma forma plástica com TissueTek, congelados em um criostato e seccionados a uma espessura de 30 μ m, no plano estereotático coronal. Os cortes foram coletados em recipientes contendo solução de PFA a 4%, em TF 0,1M, pH 7,4 e distribuídos igualmente em seis compartimentos onde foram mantidos a 4° C. Posteriormente foi realizado tratamento de imunofluorescência do tecido cerebral. Foram selecionados cortes em níveis semelhantes, de acordo com o atlas de Karten e Hodos (1967), e tomados 6 cortes de cada cérebro das medidas AP de 5 à 7.5 do atlas de Karten e Hodos (1967), correspondentes às regiões anterior, média e posterior do hipocampo e amígdala, para o ensaio de imunofluorescência. Os cortes foram transferidos para placas de 24 poços e lavados em PBS por 5 vezes de 5 min antes de serem colocados em solução de bloqueio (PBS, NGS - normal goat serum - 5%, albumina 0,2% e de Triton X100 0,1%). Após o bloqueio, realizado por 1h, os cortes foram incubados com anti-BDNF (rabbit,

policlonal, 1:500; ab6201, abcam, USA), diluídos 1:500 em PBS, albumina 0,2% e Triton X100 0,05%, onde permaneceram sob agitação por 48h a 4°C. Os cortes foram lavados 6 vezes de 10min em PBS+Triton X-100 0,05% e posteriormente incubados no anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo na diluição de 1:1000 (Alexa Fluor 488, anti-rabbit IgG, A-21206, Invitrogen, Eugene, USA). O anticorpo secundário fluorescente foi diluído em PBS, albumina 0,2% e Triton X100 0,05%. A incubação em anticorpo secundário foi realizada overnight, sob agitação, a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados 6 vezes de 10min em PBS+Triton X-100 0,05%. Finalmente, as lâminas foram montadas com glicerol 50% em PBS e seladas. Antes do ensaio de imunofluorescência, as lâminas foram gelatinizadas para melhor adesão dos cortes às lâminas. As imagens da imunomarcação foram obtidas através de microscopia de fluorescência (Leica DFC360 FX), em aumentos de 40X, para análise celular. A análise das células BDNF-positivas foram feitas com o uso do software ImageJ Launcher (version 1.45; Bethesda, Maryland, USA).

3.3.13. Análise estatística: Os valores obtidos para a duração de cada tipo de comportamento registrados durante a sessão de condicionamento foram analisados com uma ANOVA one-way no experimento 1 e ANOVA two-way no experimento 2. Os valores de comportamento / bloco (blocos de 1 min), durante os primeiros 5 min (blocos: 1 ao 5) e os últimos 5 min (blocos: 16 ao 20) da sessão foram analisados com uma ANOVA two-way nos experimentos 1 e 2. Foi utilizado o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas post hoc, quando apropriado. Os dados moleculares de Western Blot dos experimentos 1 e 2 e Imunofluorescência do experimento 1 foram analisadas com um ANOVA one-way seguida pelo teste de

Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Significância foi definida quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

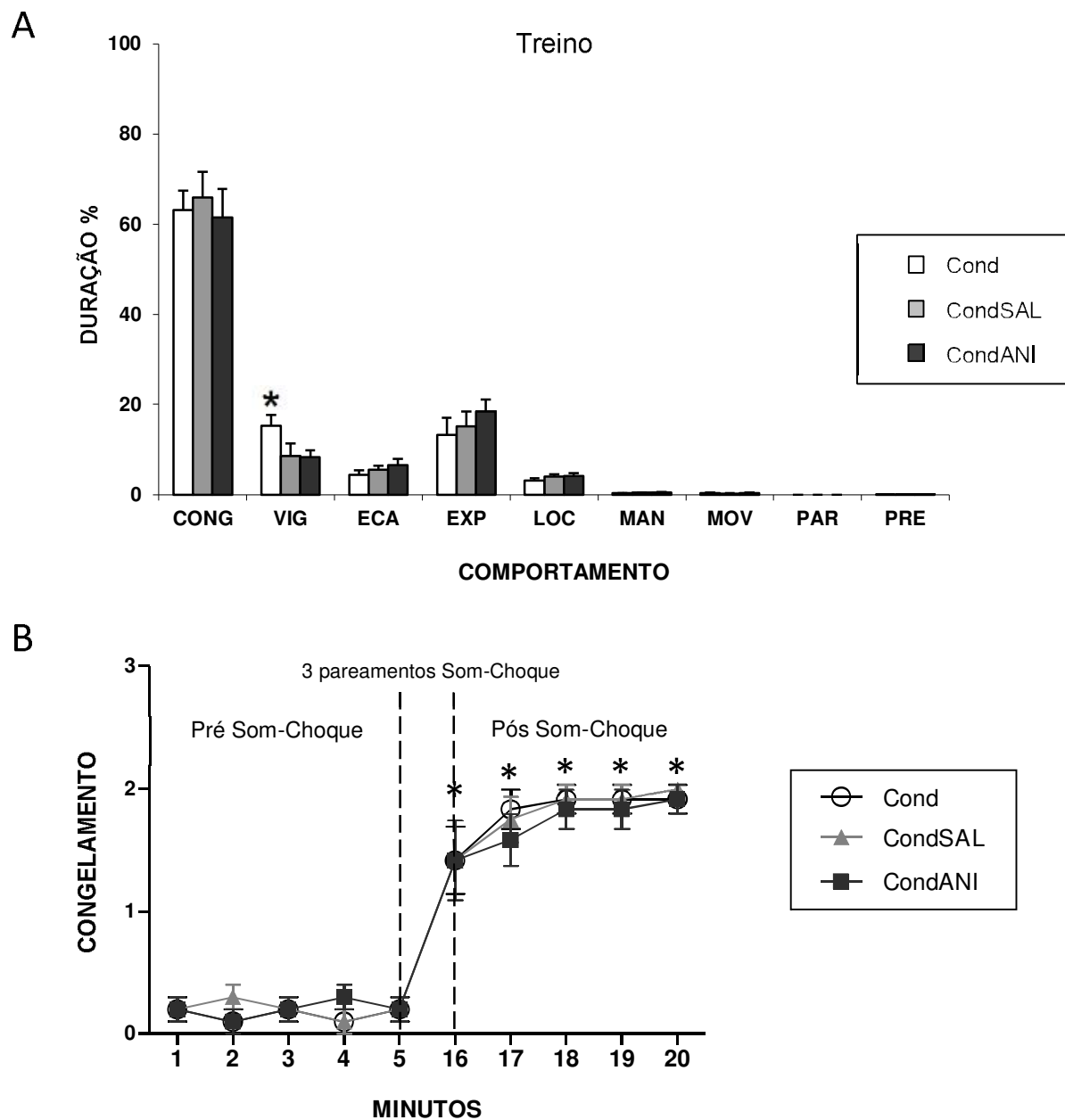
4.1. Experimento 1

4.1.1. Análise dos comportamentos durante a sessão de Condicionamento

Clássico Aversivo: A Figura 8A mostra os dados da duração média percentual de cada tipo de comportamento registrado durante a sessão de treino em condicionamento clássico aversivo para os grupos Cond, CondSAL e CondANI. O valor percentual de cada comportamento foi calculado em relação à somatória da duração de todos os comportamentos (100%). A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos para os comportamentos ($p > 0,05$), congelamento ($F_{2,33} = 1,05$; $P = 0,3609$); exploração cautelosa ($F_{2,33} = 2,05$; $P = 0,1452$); exploração ($F_{2,33} = 2,43$; $P = 0,1032$); locomoção ($F_{2,33} = 2,86$; $P = 0,0713$); manutenção ($F_{2,33} = 2,37$; $P = 0,1090$); movimentos discretos ($F_{2,33} = 1,00$; $P = 0,3798$); parado ($F_{2,33} = 1,000$; $P = 0,3911$); pré-exploratórios ($F_{2,33} = 0,05$; $P = 0,9547$). Apenas a vigilância mostrou diferença estatística entre os grupos; ($F_{2,33} = 14,18$; $p < 0,05$), com diferenças significativas entre os grupos Cond e CondANI ($p < 0,05$, teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas). A Figura 8B mostra a ocorrência média do comportamento de congelamento registrado durante cinco intervalos de 60 segundos (blocos) no início da sessão de treino (antes da apresentação do primeiro emparelhamento som-choque, blocos de 1 a 5) e durante o final do treino (após a apresentação do último emparelhamento som-choque, blocos de 16 a 20) para os grupos Cond, CondSAL e CondANI. A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos para o comportamento de congelamento durante o treino ($F_{2,33} = 0,006$; $P = 0,9940$), exceto para os blocos que

mostrou diferenças entre o início do treino e final do treino ($p < 0,001$, teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

Figura 8 - Duração da porcentagem de cada tipo de comportamento durante a sessão de treinamento em Condicionamento Clássico Aversivo.



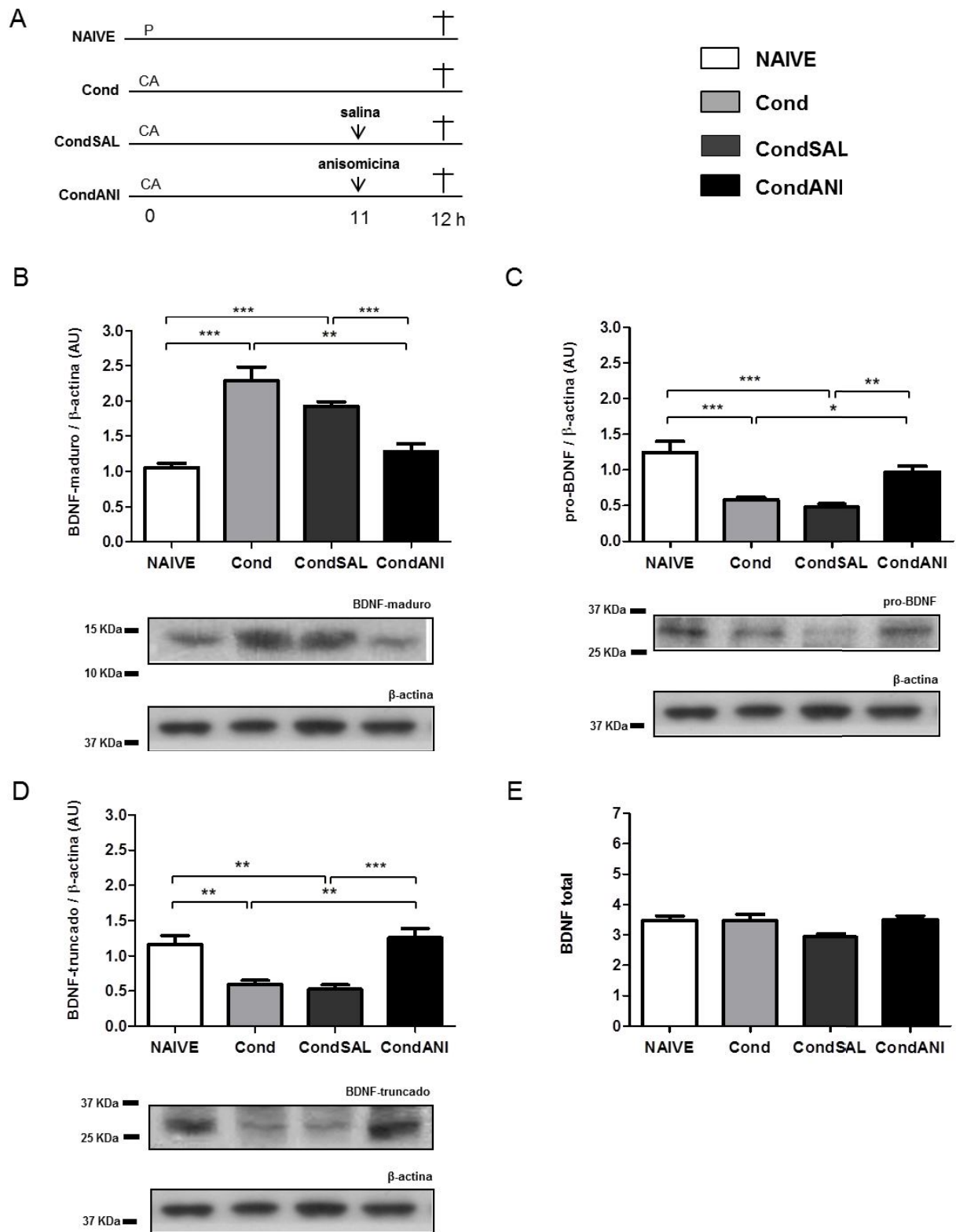
(A) Duração da porcentagem de cada tipo de comportamento durante a sessão de treinamento em Condicionamento Clássico Aversivo, para os grupos Cond, CondSAL e CondANI. Categorias comportamentais: GONG = Congelamento, VIG = Vigilância, ECA = Exploração Cautelosa, EXP = Exploração, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção, MOV = Movimentos Discretos, PAR = Parado, PRE = Pré-exploratórios. Análises com ANOVA one-way não revelou diferenças significativas entre os grupos para a ocorrência dos comportamentos ($p > 0,05$), com exceção da vigilância que mostrou diferenças entre os grupos Cond e CondANI ($p < 0,05$, teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas). (B) Ocorrência do comportamento de congelamento durante o início e o final da sessão de treinamento. O congelamento foi analisado em intervalos de 30 segundos e cada ponto representa dados agrupados em blocos de dois intervalos de 30 segundos (1 minuto). A análise estatística não revelou diferenças significativas entre os grupos para o comportamento de congelamento durante o treino ($p > 0,05$), exceto para os blocos que mostrou diferenças entre o início do treino e final do treino ($p < 0,001$, teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

4.1.2. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão

proteica das isoformas do BDNF no hipocampo: A Figura 9 apresenta os dados obtidos pela análise de Western blotting, expressos por valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas em relação à β -actina, para o BDNF-maduro, pró-BDNF e BDNF-truncado no hipocampo de pombos dos grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Observa-se que 12 h após o condicionamento os pombos dos grupos Cond e CondSAL expressaram maior quantidade de BDNF-maduro (Figura 9B), e menores valores de pró-BDNF (Figura 9C), e de BDNF-truncado (Figura 9D) no hipocampo, quando comparados aos pombos dos grupos NAIVE e CondANI. As análises com ANOVA one-way confirmaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para os valores das isoformas do BDNF-maduro, 14 kDa ($F_{3,16} = 22,18$; $p < 0,001$), pró-BDNF, 32 kDa ($F_{3,16} = 14,58$; $p < 0,05$) e BDNF-truncado, 28 kDa ($F_{3,16} = 14,84$; $p < 0,01$). Por outro lado, o valor total do conteúdo de BDNF total para as três isoformas não mostrou diferenças entre os grupos ($F_{3,16} = 1,36$; $P = 0,4520$) (Figura 9E). As análises *post hoc* do teste de comparações múltiplas de Tukey indicaram que os pombos dos grupos Cond e CondSAL diferiram significativamente dos grupos NAIVE e CondANI ($p < 0,05$).

Figura 9 - Expressão no hipocampo das isoformas do BDNF 12 h após o Condicionamento

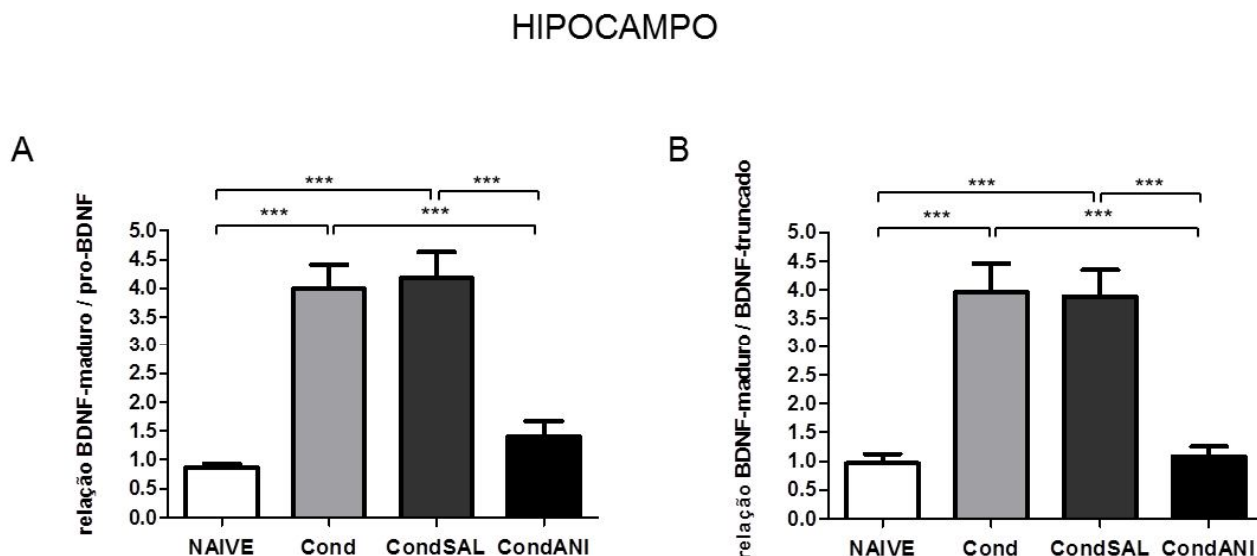
Clássico Aversivo.



(A) Esquema dos procedimentos experimentais: os animais do grupo NAIVE não foram condicionados, apenas pesados (P), e sacrificados (†) 12 h após a pesagem. Os grupos condicionados passaram por Condicionamento Clássico Aversivo (CA), e receberam infusões intra-hipocampal de anisomicina (CondANI) ou salina (CondSAL) 1 h antes de sofrerem eutanásia, 12 h após o condicionamento; o grupo Cond não teve tratamento. Os valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas com β -actina para o BDNF-maduro (B), pró-BDNF (C), BDNF-truncado (D) e o conteúdo BDNF total (E). Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ pombos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

A Figura 10 mostra a (Fig. 10A) e as proporção do BDNF-maduro com o BDNF-truncado (Fig. 10B). Análises com ANOVA one-way revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as proporções de BDNF-maduro e pró-BDNF ($F_{3,16} = 26.42$; $p < 0.001$), e para BDNF-maduro e BDNF-truncado ($F_{3,16} = 22.23$; $p < 0.001$).

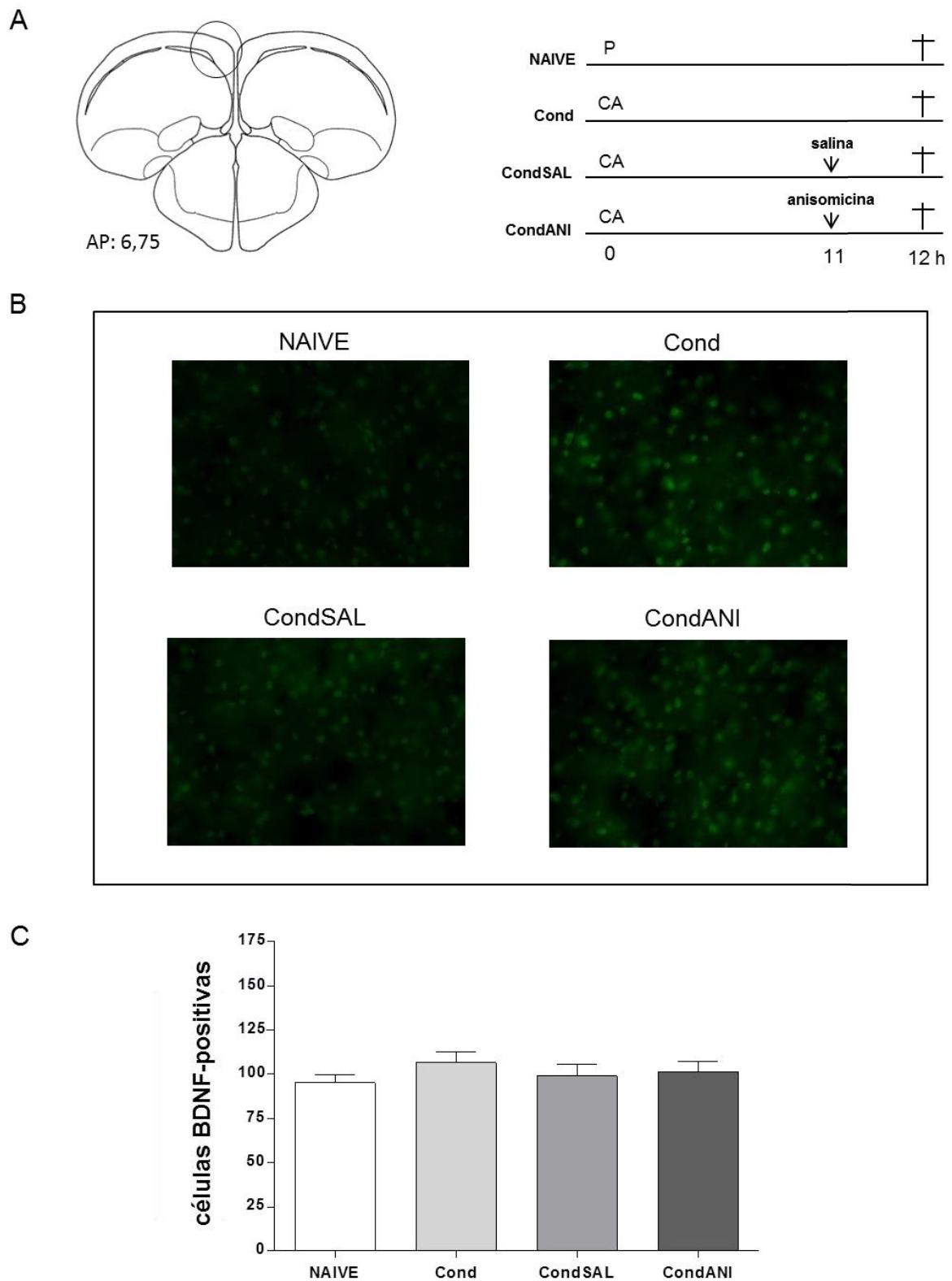
Figura 10 – Relação dos valores de BDNF-maduro para pró-BDNF e de BDNF-maduro para BDNF-truncado no hipocampo de pombos 12 h após Condicionamento Clássico Aversivo.



(A) proporção entre o BDNF-maduro com o pró-BDNF no hipocampo, (B) proporção entre o BDNF-maduro com o BDNF-truncado no hipocampo. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ pombos por grupo. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

A Figura 11 apresenta os dados obtidos pela análise de Imunofluorescência para células BDNF-positivas, expressas pela marcação citoplasmática do BDNF-total no hipocampo de pombos dos grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Observa-se que 12 h após o condicionamento clássico aversivo as análises com ANOVA one-way seguida das análises *post hoc* do teste de comparações múltiplas de Tukey não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para os valores da marcação das células BDNF-positivas ($p > 0,05$).

Figura 11 - Expressão no hipocampo das células BDNF-positivas 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo.

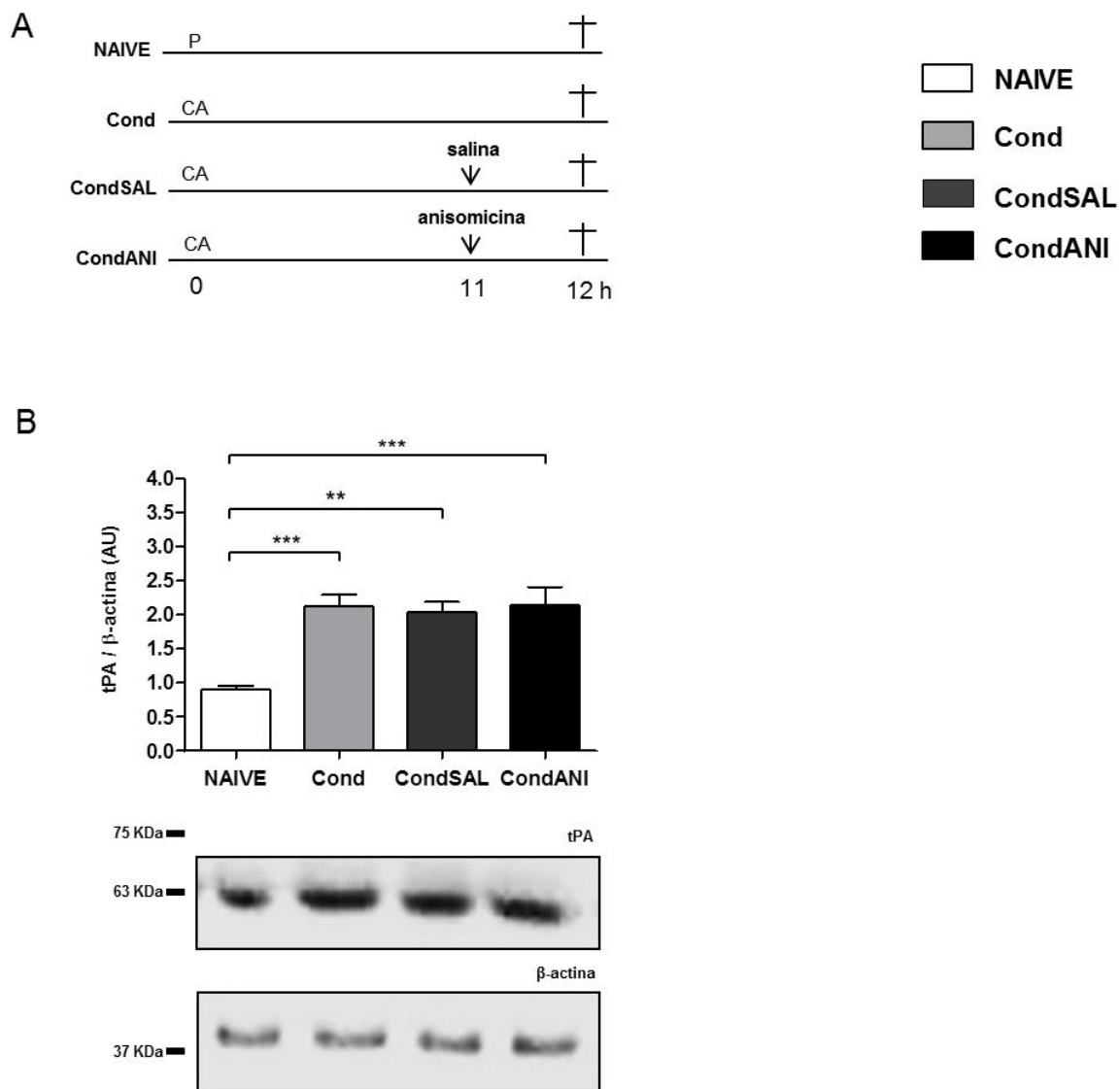


(A) Representação esquemática de um corte transversal na medida AP = 6,75 do encéfalo de pombo, em destaque o hipocampo. Esquema dos procedimentos experimentais: os animais do grupo NAIVE não foram condicionados, apenas pesados (P), e sacrificados (†) 12 h após a pesagem. Os grupos condicionados passaram por Condicionamento Clássico Aversivo (CA), e receberam infusões intra-hipocampal de anisomicina (CondANI) ou salina (CondSAL) 1 h antes de sofrerem eutanásia, 12 h após o condicionamento; o grupo Cond não teve tratamento. (B) representação da imunomarcagem das células BDNF-positivas para os grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. (C) Valores médios da contagem das células BDNF-positivas para os grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ pombos por grupo. Análises com ANOVA one-way não revelou diferenças significativas entre os grupos para a ocorrência dos comportamentos ($p > 0,05$),

4.1.3. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão

proteica da tPA no hipocampo: A Figura 12 apresenta os dados obtidos pela análise de Western blotting, expressos por valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas em relação à β -actina, para a tPA no hipocampo de pombos dos grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Observa-se que 12 h após o condicionamento os pombos dos grupos Cond, CondSAL e CondANI expressaram maior quantidade de tPA no hipocampo, quando comparados aos pombos do grupo NAIVE. As análises com ANOVA one-way confirmaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para os valores da tPA ($F_{3,20} = 11,48$; $p < 0.01$). As análises *post hoc* do teste de comparações múltiplas de Tukey indicaram que os pombos dos grupos Cond, CondSAL e CondANI diferiram significativamente do grupo NAIVE ($p < 0,05$).

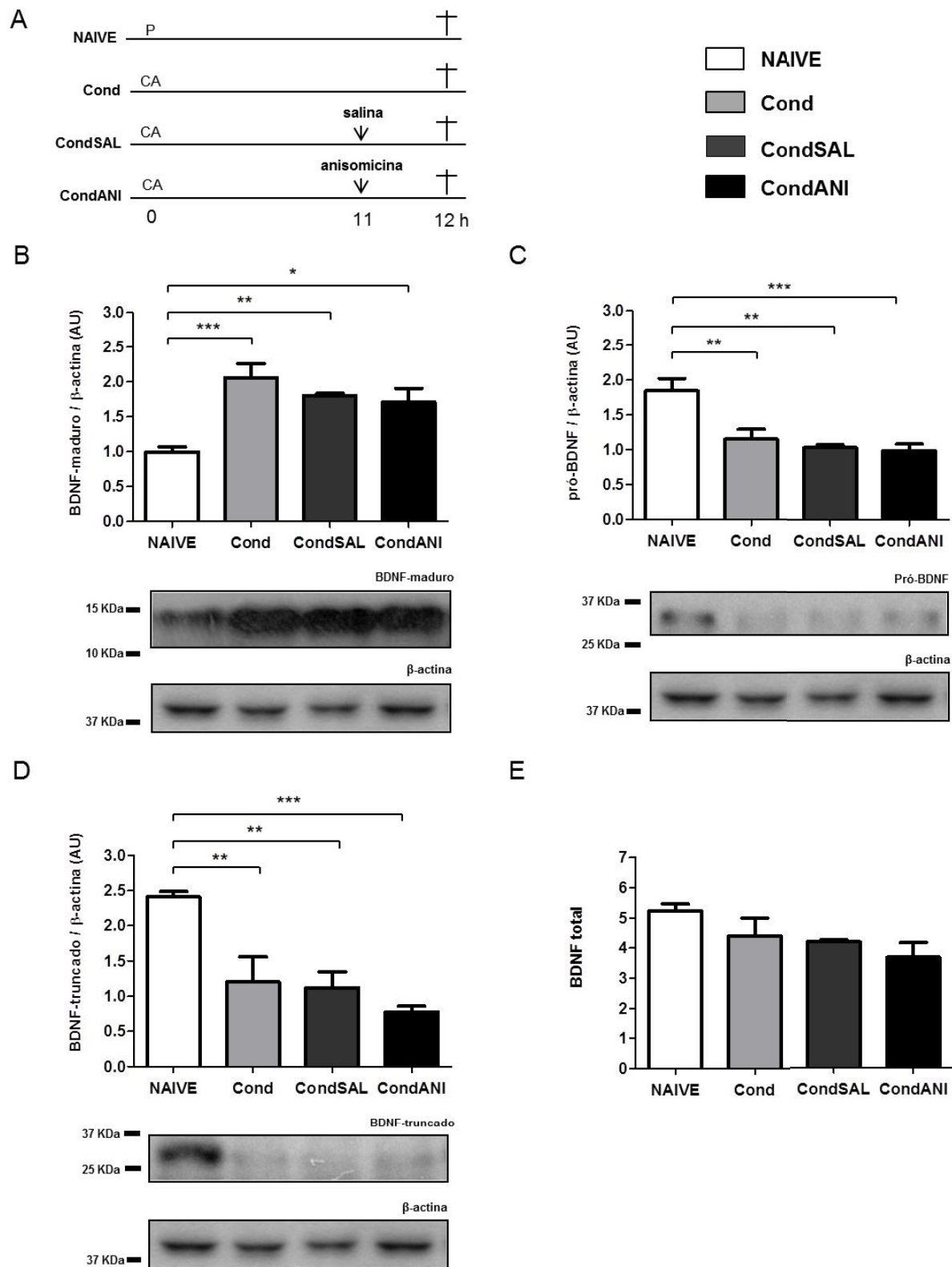
Figura 12 - Expressão no hipocampo da tPA 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo.



(A) Esquema dos procedimentos experimentais: os animais do grupo NAIVE não foram condicionados, apenas pesados (P), e sacrificados (+) 12 h após a pesagem. Os grupos condicionados passaram por Condicionamento Clássico Aversivo (CA), e receberam infusões intra-hipocampal de anisomicina (CondANI) ou salina (CondSAL) 1 h antes de sofrerem eutanásia, 12 h após o condicionamento; o grupo Cond não teve tratamento. Os valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas com β -actina para o tPA (B). Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 6$ pombos por grupo. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

4.1.4. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão proteica das isoformas do BDNF na amígdala: A Figura 13 apresenta os dados obtidos pela análise de Western blotting, expressos por valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas em relação à β -actina, para o BDNF-maduro, pró-BDNF e BDNF-truncado na amígdala de pombos dos grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Observa-se que 12 h após o condicionamento os pombos dos grupos Cond, CondSAL e CondANI expressaram maior quantidade de BDNF-maduro na amígdala, quando comparados aos pombos do grupo NAIVE (Figura 13B). Os grupos Cond, CondSAL e ConANI apresentam valores de pró-BDNF (Figura 13C), e de BDNF-truncado (Figura 13D), menores que os do grupo Naive. As análises com ANOVA one-way confirmaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas isoformas BDNF-maduro, 14 kDa ($F_{3,16} = 9,20$; $p < 0.05$), pró-BDNF, 32 kDa, ($F_{3,16} = 10,19$; $p < 0.01$), BDNF-truncado, 28 kDa ($F_{3,16} = 13,16$; $p < 0.01$). Por outro lado, o valor total do conteúdo de BDNF total para as três isoformas não mostrou diferenças entre os grupos ($F_{3,16} = 0,3635$; $P = 0.3635$) (Figura 13E). As análises *post hoc* do teste de comparações múltiplas de Tukey indicaram que os pombos dos grupos Cond, CondSAL e CondANI diferiram significativamente do grupo Naive ($p < 0,05$).

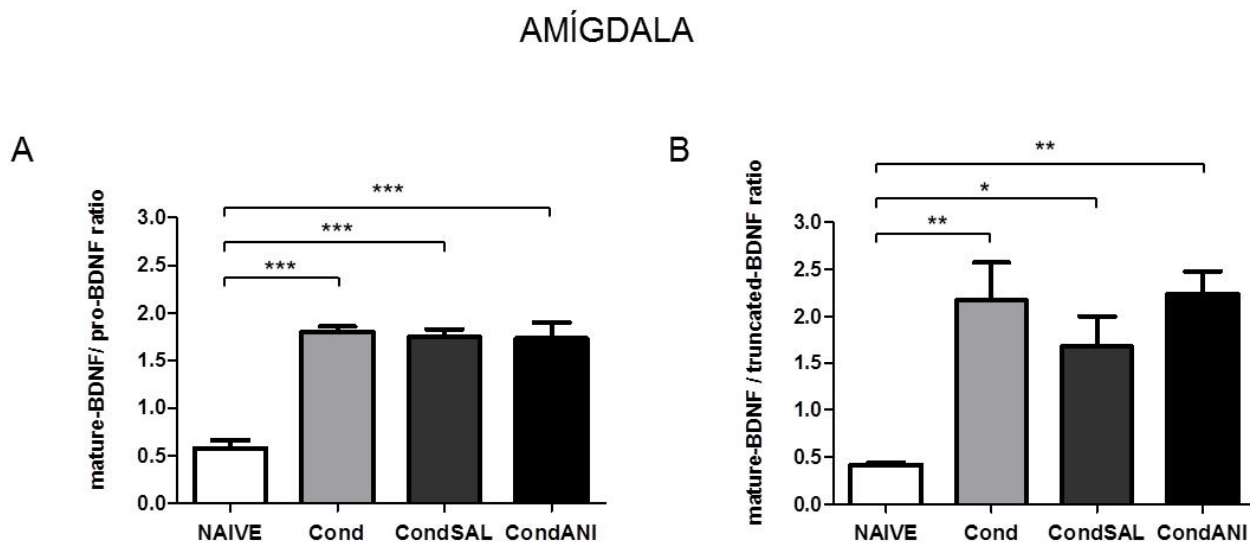
Figura 13 - Expressão na amígdala das isoformas do BDNF 12 h após o Condicionamento
Clássico Aversivo.



(A) Esquema dos procedimentos experimentais: os animais do grupo NAIVE não foram condicionados, apenas pesados (P), e sacrificados (†) 12 h após a pesagem. Os grupos condicionados passaram por Condicionamento Clássico Aversivo (CA), e receberam infusões intra-hipocampal de anisomicina (CondANI) ou salina (CondSAL) 1 h antes de sofrerem eutanásia, 12 h após o condicionamento; o grupo Cond não teve tratamento. Os valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas com β -actina para o BDNF-maduro (B), pró-BDNF (C), BDNF-truncado (D) e o conteúdo BDNF total (E). Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ pombos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

A Figura 14 mostra a proporção entre o BDNF-maduro com o pró-BDNF (Fig. 14A) e as proporção do BDNF-maduro com o BDNF-truncado (Fig. 14B). Análises com ANOVA one-way revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para as proporções de BDNF-maduro e pró-BDNF ($F_{3,16} = 32.11$; $p < 0.001$), e para BDNF-maduro e BDNF-truncado ($F_{3,16} = 8.94$; $p < 0.05$).

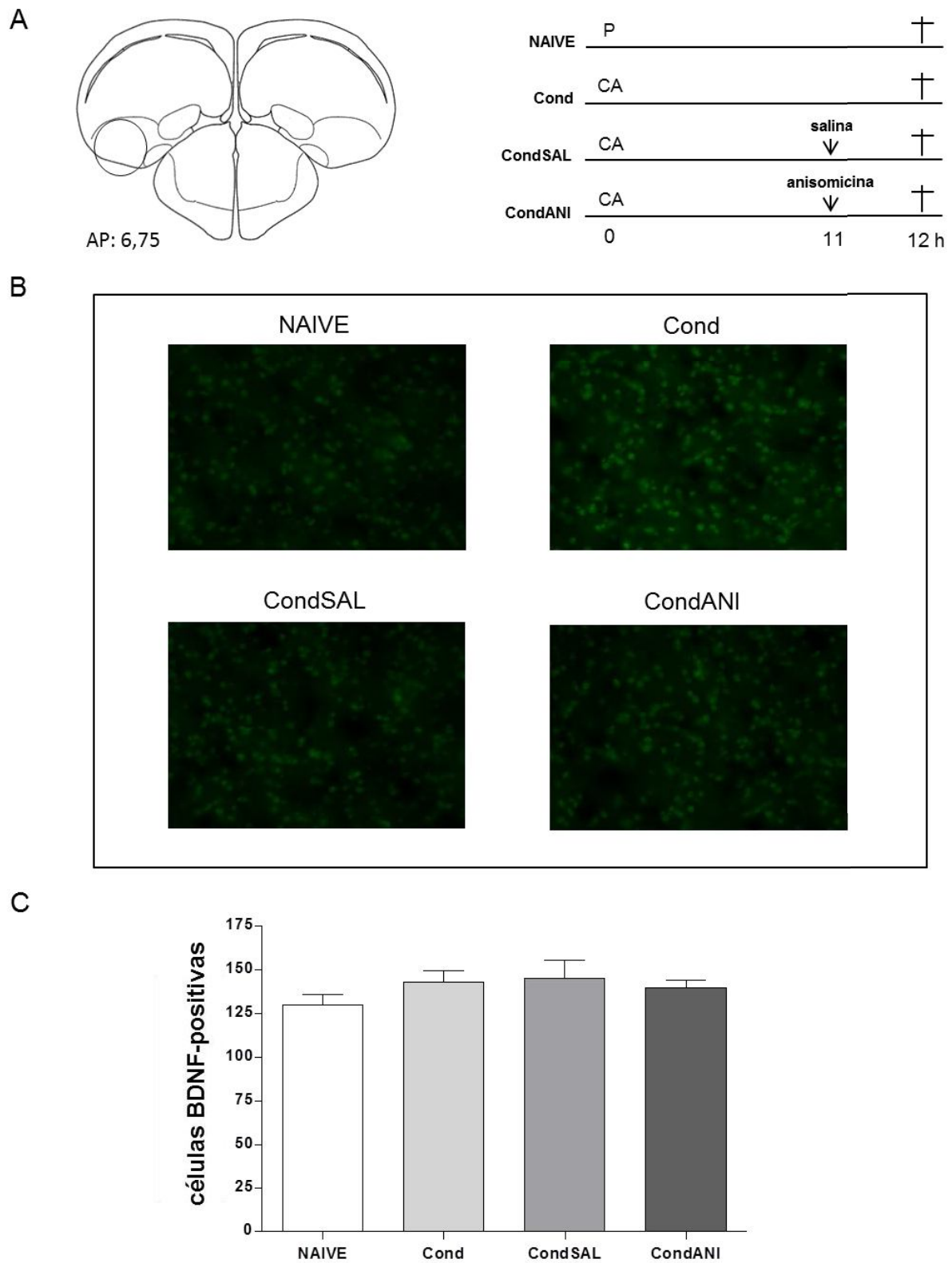
Figura 14 – Relação dos valores de BDNF-maduro para pró-BDNF e de BDNF-maduro para BDNF-truncado na amígdala de pombos 12 h após Condicionamento Clássico Aversivo.



(A) proporção entre o BDNF-maduro com o pró-BDNF na amígdala, (B) proporção entre o BDNF-maduro com o BDNF-truncado na amígdala. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ pombos por grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

A Figura 15 apresenta os dados obtidos pela análise de Imunofluorescência para células BDNF-positivas, expressas pela marcação citoplasmática do BDNF na amígdala de pombos dos grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Observa-se que 12 h após o condicionamento clássico aversivo as análises com ANOVA one-way seguida das análises *post hoc* do teste de comparações múltiplas de Tukey não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para os valores da marcação das células BDNF-positivas ($p > 0,05$).

Figura 15 - Expressão na amígdala das células BDNF-positivas 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo.

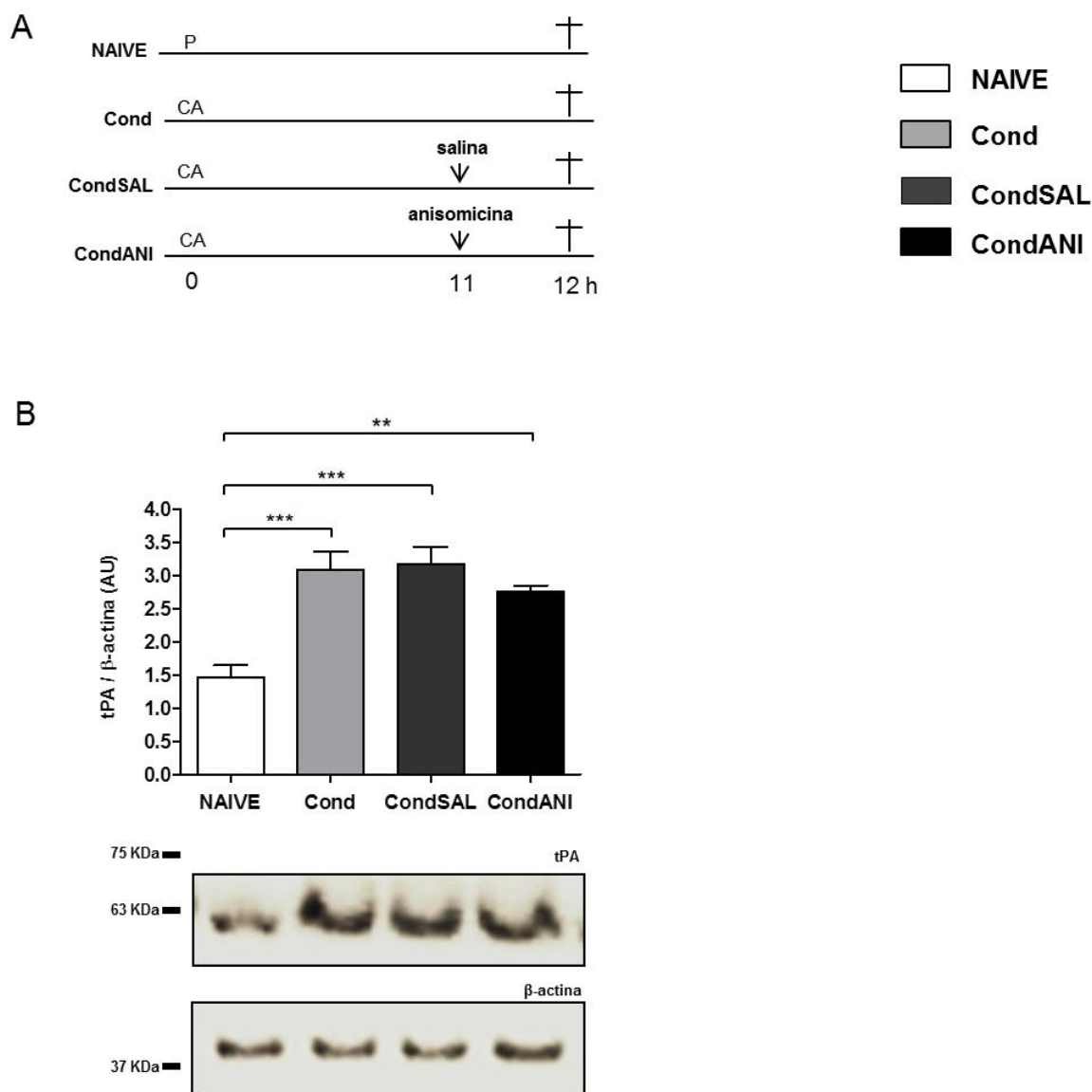


(A) Representação esquemática de um corte transversal na medida AP = 6,75 do encéfalo de pombo, em destaque a amígdala. Esquema dos procedimentos experimentais: os animais do grupo NAIVE não foram condicionados, apenas pesados (P), e sacrificados (†) 12 h após a pesagem. Os grupos condicionados passaram por Condicionamento Clássico Aversivo (CA), e receberam infusões intra-hipocampal de anisomicina (CondANI) ou salina (CondSAL) 1 h antes de sofrerem eutanásia, 12 h após o condicionamento; o grupo Cond não teve tratamento. (B) representação da imunomarcagem das células BDNF-positivas para os grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. (C) Valores médios da contagem das células BDNF-positivas para os grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ pombos por grupo. Análises com ANOVA one-way não revelou diferenças significativas entre os grupos para a ocorrência dos comportamentos ($p > 0,05$).

4.1.5. Efeito do Condicionamento Clássico Aversivo sobre a expressão

proteica da tPA na amígdala: : A Figura 16 apresenta os dados obtidos pela análise de Western blotting, expressos por valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas em relação à β -actina, para a tPA na amígdala de pombos dos grupos NAIVE, Cond, CondSAL e CondANI. Observa-se que 12 h após o condicionamento os pombos dos grupos Cond, CondSAL e CondANI expressaram maior quantidade de tPA na amígdala, quando comparados aos pombos do grupo NAIVE. As análises com ANOVA one-way confirmaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para os valores da tPA ($F_{3,20} = 13,66$; $p < 0.01$). As análises *post hoc* do teste de comparações múltiplas de Tukey indicaram que os pombos dos grupos Cond, CondSAL e CondANI diferiram significativamente do grupo NAIVE ($p < 0,05$).

Figura 16 - Expressão na amígdala da tPA 12 h após o Condicionamento Clássico Aversivo.



(A) Esquema dos procedimentos experimentais: os animais do grupo NAIVE não foram condicionados, apenas pesados (P), e sacrificados (†) 12 h após a pesagem. Os grupos condicionados passaram por Condicionamento Clássico Aversivo (CA), e receberam infusões intra-hipocampal de anisomicina (CondANI) ou salina (CondSAL) 1 h antes de sofrerem eutanásia, 12 h após o condicionamento; o grupo Cond não teve tratamento. Os valores médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas, normalizadas com β-actina para o tPA (B). Os dados são apresentados como a média ± SEM para n = 6 pombos por grupo. ** p < 0,01, *** p < 0,001 (One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas).

5. DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1

Os dados do presente estudo revelam que os pombos treinados com pareamentos som-choque apresentaram aumento da resposta de congelamento em relação aos outros comportamentos, evidenciando alterações comportamentais características do condicionamento de medo. Essa observação está em acordo com estudos com condicionamento de medo em roedores (Bekinschtein et al., 2007; Mizuno et al., 2012; Mchugh et al., 2013; Nasser et al., 2013) e com os relatos de Reis et al. (1999) e Brito et al. (2006; 2011) sobre o aumento da exibição da resposta de congelamento em pombos treinados com pareamentos som-choque.

Os dados também demonstram que a experiência do condicionamento induziu alterações na expressão do BDNF-maduro no hipocampo e na amígdala, estruturas envolvidas no circuito neural do condicionamento clássico aversivo. Esse aumento de BDNF-maduro foi detectado no hipocampo dos animais dos grupos Cond e CondSAL, mas não no hipocampo de animais tratados com infusão intra-hipocampal de anisomicina, grupo CondANI, e nem nos animais do grupo NAIVE. Esses dados concordam com o aumento na expressão do BDNF-maduro observado no hipocampo de roedores após o treino em tarefas de aprendizagem (Pang et al., 2004; Rattiner et al., 2004; Ou e Gean, 2007; Lubin et al., 2008; Bekinschtein et al., 2008; Bekinschtein et al., 2010; Mizuno et al., 2012; AN et al., 2012). Pode-se considerar que o aumento do BDNF-maduro observado nos animais condicionados, Cond e CondSAL, teria ocorrido por volta de 12 h após o condicionamento, visto que os animais CondANI que receberam a infusão intra-hipocampal de anisomicina 11 h

após o treino não apresentaram o aumento do BDNF-maduro no hipocampo. Assim, os dados sugerem que em pombos também ocorre um aumento tardio de BDNF-maduro por volta de 12 h após o fim do treino tal como já foi relatado em estudos com roedores (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2010). De fato, consistente com nossos resultados, Bekinschtein et al. (2007) mostraram que o pico da expressão do BDNF-maduro no hipocampo de ratos que ocorre 12 h após o treino de condicionamento operante de esquiva inibitória é essencial para a persistência da memória. Slipczuk et al. (2013) também mostraram um aumento da expressão do BDNF-maduro no hipocampo de ratos nas 12 h após o treino de condicionamento de esquiva inibitória. Nagappan, et al. (2009) encontraram um aumento da expressão do BDNF-maduro 12 h após estimulação elétrica em culturas de neurônios do hipocampo de roedores. Além disso, vale a pena considerar que o condicionamento do medo induz aumento da expressão de BDNF que apresenta um padrão bifásico, com picos ocorrendo 1 e 12 h após o treinamento (Ou et al., 2010). O significado funcional de tal padrão bifásico pode estar relacionado tanto com a consolidação quanto com e a persistência da memória (Ou et al., 2010).

Na amígdala, observou-se que os três grupos condicionados, Cond, CondSAL e CondANI apresentaram maior expressão de BDNF-maduro do que o grupo NAIVE. Este aumento na expressão do BDNF-maduro, foi também identificado na amígdala de ratos 12 h após o condicionamento aversivo, como foi relatado por Ou et al. (2010). Outro resultado interessante do presente estudo é o fato de que a expressão desta proteína na amígdala dos pombos condicionados, não foi afetada pela infusão intra-hipocampal de anisomicina e seu consequente efeito sobre as várias isoformas do BDNF no hipocampo do grupo CondANI. Além disso, pode-se considerar que os dados sobre os valores do BDNF-maduro, na amígdala reforçam a ocorrência de

uma expressão tardia do BDNF-maduro como também confirmam que a interrupção deste processo no hipocampo dos pombos do grupo CondANI foi devido ao efeito da anisomicina.

Assim, os dados indicam que, apesar do fato de que tanto o hipocampo quanto a amígdala fazem parte do circuito neural do condicionamento aversivo para o processamento da memória do medo (Kim and Jung, 2006; Toyoda et al., 2011; Maren et al., 2013), a manipulação farmacológica no hipocampo não afetou a expressão do BDNF na amígdala. Dados anteriores da literatura em roedores mostraram que lesões nas projeções do hipocampo para a amígdala basolateral anterior atenua a aprendizagem ao contexto, mas não som durante o condicionamento aversivo em ratos (Maren e Fanselow, 1995). Por outro lado, a estimulação de alta frequência nas vias neurais de projeção do hipocampo para a amígdala produz potenciação de longa duração (LTP) (Maren e Fanselow, 1995). Juntas, essas observações estão relacionadas com as complexas relações entre hipocampo e amígdala subjacentes ao condicionamento aversivo.

As primeiras evidências sobre o papel do hipocampo e da amígdala no medo condicionado levaram à sugestão de que o hipocampo seria crucialmente envolvido com o processamento da representação contextual, enquanto o processamento de outros elementos da associação som-choque que são necessários para o condicionamento do medo seria atributo da amígdala (Kim e Fanselow, 1992). Este ponto de vista foi modificada por outra evidência que indica que a atividade neuronal do hipocampo ventral é necessária para a formação do medo condicionado tanto ao contexto quanto ao som (Bast et al, 2001; Zhang et al, 2001). Assim, podemos dizer que o nosso trabalho acrescenta informações interessantes para o conjunto das relações complexas (Fanselow, 2010), sobre os mecanismos moleculares que são

acionados no hipocampo e amígdala de pombos após a aquisição do medo condicionado. Além disso, pode-se dizer que os nossos dados, podem contribuir para a análise das relações funcionais entre hipocampo e amígdala de mamíferos e de aves, na medida em que indicam que, apesar das diferentes características anatômicas entre os encéfalos dos roedores e os dos pombos, os eventos moleculares induzidos pelo condicionamento aversivo mostram ser equivalentes entre essas espécies.

Em conjunto, os dados deste estudo mostram um aumento tardio nos valores de BDNF-maduro após o condicionamento clássico aversivo som-choque. Estes dados contribuem para a discussão sobre os processos de aprendizagem e memória, mostrando que a atividade neuronal no hipocampo e na amígdala durante a aquisição medo condicionado por pombos implicam em mecanismos moleculares relacionados com BDNF. Além de que os mecanismos moleculares envolvidos na expressão do BDNF estão relacionadas com processos sinápticos glutamatérgicos que envolvem a ativação do receptor NMDA, o seu consequente aumento do influxo de cálcio e a ativação da via de sinalização que resulta em fosforilação da CREB, ativando a transcrição e tradução do pró-BDNF, que será posteriormente clivado pela tPA em BDNF-maduro (Martinowich et al., 2003; Frankland et al., 2005; Tongiorgi et al, 2008; Yang et al., 2009; Barker, 2009; Cunha et al., 2010; Roth et al., 2011; Hawk e Abe , 2011; Zheng et al., 2012; Park e Poo, 2013). No entanto, não existem estudos que demonstram que a clivagem do BDNF-truncado gere BDNF-maduro, ou que indiquem o seu papel nos processos da memória.

Os resultados do presente trabalho indicam que houve uma diminuição do conteúdo de pró-BDNF e de BDNF-truncado no hipocampo dos pombos dos grupos Cond e CondSAL, mas não do grupo CondANI. Por outro lado, na amígdala todos os

três grupos condicionados (Cond, CondSAL e CondANI) apresentaram uma diminuição do conteúdo de pró-BDNF e de BDNF-truncado. Esses dados mostram que o aumento do conteúdo de BDNF-maduro induzido pelo condicionamento apresentou uma relação inversa com o conteúdo do pró-BDNF e do BDNF-truncado. Os dados que revelam a diminuição do conteúdo de BDNF-truncado permitem considerar que esta isoforma teria uma função em processos de aprendizagem fornecendo uma via de suprimento de BDNF-maduro. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender melhor quais são os mecanismos envolvidos com esta expressão tardia de BDNF-maduro e qual é o papel do BDNF-truncado em processos de aprendizagem e memória.

Além disso, o condicionamento clássico aversivo não promoveu aumento da síntese do BDNF nas 12 h após treino tanto no hipocampo quanto na amígdala, como demonstrado pelos dados do Western Blotting referentes ao conteúdo de BDNF total, que foi semelhante entre todos os grupos. De modo relacionado, os dados da marcação das células BDNF-positivas por Imunofluorescência para os quatro grupos NAIVE, Cond, CondSAL, CondANI também, não mostraram diferenças estatísticas no hipocampo e amígdala. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que essa marcação indica BDNF total, não discriminando entre as três isoformas. O conteúdo de BDNF total nas 12 h após o treino, tanto no hipocampo quanto na amígdala, também não foi alterado pela infusão intra-hipocampal de anisomicina 11 h após o treino. Contudo, a infusão intra-hipocampal de anisomicina evitou o aumento do conteúdo de BDNF maduro e a diminuição do conteúdo das isoformas pró-BDNF e BDNF-truncado no hipocampo. Diante destes dados é razoável considerar que a anisomicina poderia ter afetado o processo de clivagem

dos precursores do BDNF, determinando aumento do BDNF maduro, independente de nova síntese.

Nesse contexto, parece adequado supor assim que a anisomicina poderia ter afetado a expressão da tPA, enzima que participa do processo de clivagem do precursor do BDNF, gerando BDNF-maduro. De fato, trabalhos anteriores associam o aumento da expressão do BDNF-maduro ao aumento e ativação da tPA (Pang et al., 2004; Lochner et al., 2008; Cunha et al., 2010). Aproximadamente 80% das vesículas que estão sofrendo exocitose e liberando o pró-BDNF também contém a tPA e o plasminogênio (Lochner et al., 2008). Outros estudos evidenciaram que estímulos externos que promovem aumento da atividade neuronal também regulam a transcrição e expressão da tPA (Melchor e Strickland, 2005; Obiang et al., 2012; Cassé et al., 2012). Além disso, o aumento da expressão de ambos BDNF-maduro e da tPA foram observados após estimulação elétrica em culturas de neurônios hipocampais (Nagappan et al., 2009) e um aumento na expressão e a transcrição de tPA em culturas de neurônios corticais foi observada cerca de 2 h após a estimulação (Hwang et al., 2011).

No presente estudo também demonstramos que a experiência do condicionamento clássico aversivo induziu aumento na expressão da tPA no hipocampo e na amígdala de pombos dos grupos Cond, CondSAL e também no grupo CondANI, mas não nos pombos do grupo NAIVE. Esses dados sugerem que a anisomicina não afetou a expressão proteica da tPA 12 h após o treino de condicionamento clássico. Desta forma, com base nos achados do presente trabalho, podemos considerar que as alterações na expressão proteica do BDNF-maduro induzidas pelo treino de condicionamento clássico, e bloqueadas pela infusão de anisomicina, não foram mediadas exclusivamente pela tPA. Essas

observações parecem indicar que o aumento da expressão do BDNF-maduro observado no hipocampo e na amígdala 12 h após o condicionamento clássico aversivo resultaria de uma série de eventos moleculares que são ativados pela experiência do treino e que garantem a regulação fina da plasticidade neuronal necessária para a memória. Entre esses eventos moleculares teríamos a expressão e ativação de outras proteínas que podem participar do processamento pós-transcricional dos precursores do BDNF-maduro. Uma destas proteínas que participam da clivagem do BDNF-maduro é a p11, proteína presente na membrana plasmática celular (Sartori et al., 2011). Lochner et al. (2008) mostraram que aproximadamente 80% das vesículas que sofrem exocitose e liberam pro-BDNF também contêm tPA e plasminogênio. O interessante nesse estudo é que foi indicado que não ocorre a clivagem do pro-BDNF em BDNF-maduro dentro das vesículas, embora ali haja a presença das moléculas de tPA, plasminogênio e pro-BDNF juntas. Portanto é plausível considerar que, após a exocitose da vesícula, se faz necessária a interação da p11 com a tPA para que esta ative o plasminogênio e plasmina que, por sua vez, cliva o pro-BDNF gerando BDNF-maduro. Assim é sugestivo que a p11 também tenha participação no processamento pós-transcricional dos precursores do BDNF-maduro.

Essas observações parecem indicar que o aumento da expressão do BDNF-maduro observado no hipocampo e na amígdala em nosso estudo resultaria de uma série de eventos moleculares que são ativados pela experiência do condicionamento e que garantem a regulação fina da plasticidade neuronal necessária para a memória. Entre esses eventos moleculares teríamos a ativação de diversas enzimas que clivam o pró-BDNF e o BDNF-truncado promovendo o aumento da expressão do BDNF-maduro, sendo que para esses processamentos a tPA não apresenta um

aumento de expressão próximo ao pico do BDNF-maduro nas 12 h após o treino. Podemos, então, dizer que o presente estudo contribui com informações interessantes a respeito das investigações sobre estas questões no contexto do condicionamento clássico aversivo.

6. RESULTADOS

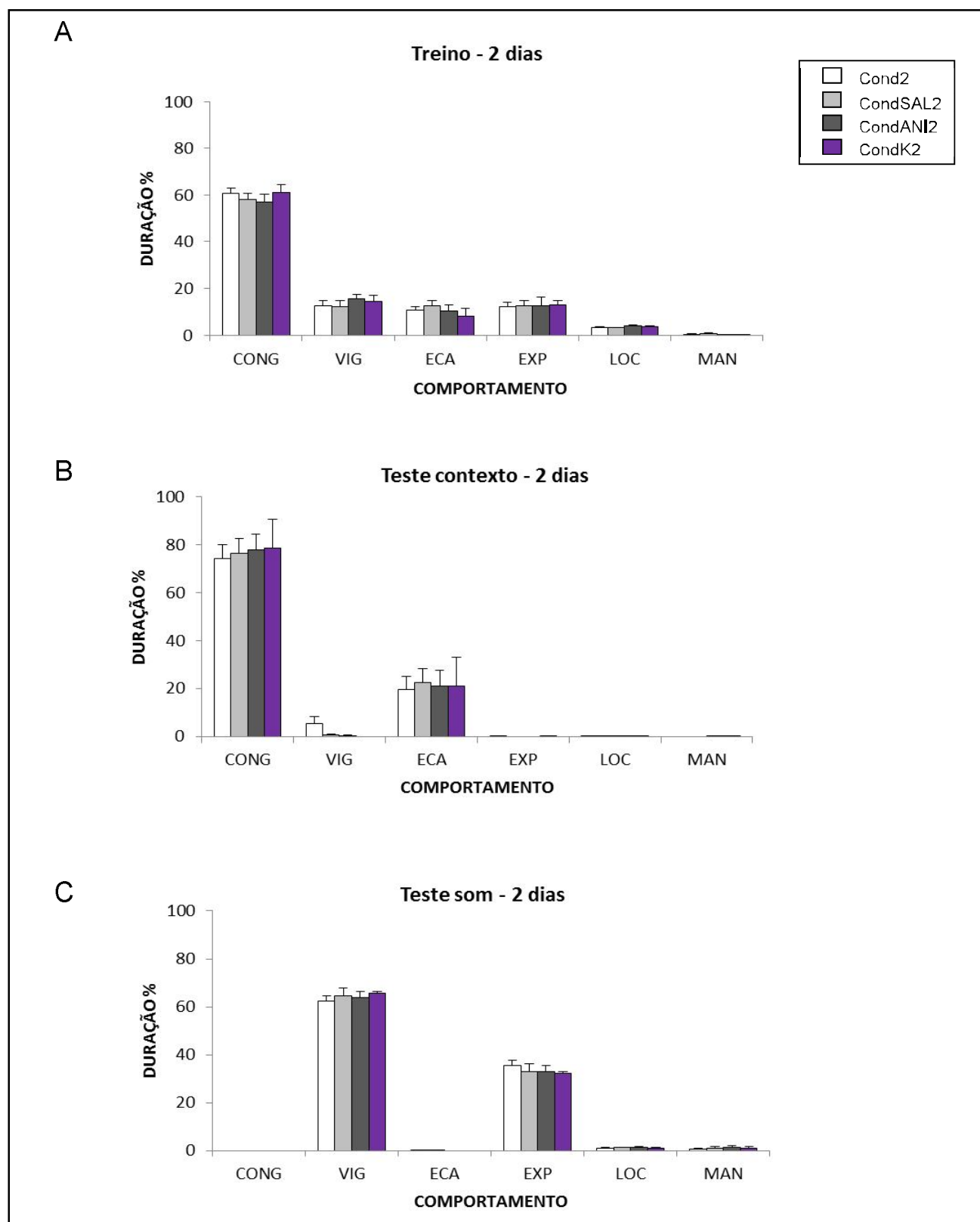
6.1. Experimento 2

6.1.1. Efeitos da anisomicina e da K252a sobre o comportamento de pombos em situação de condicionamento clássico aversivo: Na Figura 17 são apresentados resultados da duração média de cada um dos comportamentos registrados durante as sessões de treino, teste ao contexto e teste ao som realizados 2 dias após o treino, para os pombos dos grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. Observa-se que nos três grupos o comportamento de congelamento destaca-se com duração média relativamente maior tanto na sessão de treino (Cond2 = 60,63%, CondSAL2 = 58,07%, CondANI2 = 56,85% e CondK2 = 60,94%; **Figura 17A**), quanto durante na sessão de teste ao contexto (Cond2 = 74,17%, CondSAL2 = 76,31%, CondANI2 = 77,84% e CondK2 = 78,61%; **Figura 17B**). Durante o teste ao som (**Figura 17C**) o comportamento de vigilância foi o que apresentou a maior duração média, independentemente do tratamento (Cond2 = 62,41%, CondSAL2 = 64,57%, CondANI2 = 64,00 % e CondK2 = 65,68%).

O teste ANOVA de duas vias confirmou que não houve diferença significativa entre os grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2 quanto à duração média dos comportamentos de congelamento ($F_{3,21} = 0,160$; $P = 0,9223$), vigilância ($F_{3,21} = 0,320$; $P = 0,8088$), exploração cautelosa ($F_{3,21} = 0,240$; $P = 0,8669$), exploração ($F_{3,21} = 0,03$; $P = 0,9911$), locomoção ($F_{3,21} = 1,270$; $P = 0,3102$) e manutenção ($F_{3,21} = 0,60$; $P = 0,6222$). Contudo, foi indicado um efeito significativo de sessão sobre a duração média dos comportamentos apresentados pelos grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. Assim, foram confirmadas diferenças entre as sessões de

treino, teste ao contexto e teste ao som quanto ao comportamento de congelamento ($F_{3,21} = 296,18$ $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 334,33$; $p < 0,001$), exploração cautelosa ($F_{3,21} = 12,30$; $p < 0,001$), exploração ($F_{3,21} = 130,88$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,21} = 282,32$; $p < 0,001$) e manutenção ($F_{3,21} = 12,10$; $p < 0,001$). As análises *post hoc* com o teste Tukey-Kramer indicaram que embora não houvesse diferença entre os grupos ($p > 0,05$), as durações médias desses comportamentos durante a sessão de teste ao contexto diferiram significativamente daquelas registradas nas sessões de treino e de teste ao som ($p < 0,05$).

Figura 17- Duração média (+EPM) dos comportamentos exibidos durante as sessões de treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 2 dias e teste ao som 2 dias.



Categorias comportamentais: GONG = Congelamento, VIG = Vigilância, ECA = Exploração Cautelosa, EXP = Exploração, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção. (A) Treino dos animais pertencentes aos grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. (B) Teste ao contexto dos animais pertencentes aos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. (C) Teste ao som dos animais pertencentes aos grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. As análises com ANOVA de duas vias não revelaram diferenças significativas entre os grupos para a ocorrência de comportamentos ($p > 0,05$). Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ a 8 pombos por grupo.

Na Figura 18 são apresentados valores da duração média de cada um dos comportamentos registrados durante as sessões de treino, teste ao contexto e teste ao som realizados 7 dias após o treino, para os pombos dos grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. Observa-se que durante a sessão de treino (Figura 18A), os pombos desses grupos apresentaram valores percentuais mais elevados para o comportamento de congelamento (Cond7 = 57,15%, CondSAL7 = 57,83%, CondANI7 = 59,34% e CondK7 = 60,19%). Durante o teste ao contexto (Figura 18B) os grupos Cond7 (78,05%) e CondSAL7 (73,64%) apresentaram duração média elevada de congelamento, enquanto que houve uma diminuição na duração média do congelamento nos grupos CondANI7 (14,93%) e CondK7 (25,00%), paralelamente ao aumento no comportamento de vigilância nos grupos CondANI7 (28,88%) e CondK7 (51,21%), e exploração nos grupos CondANI7 (35,00%) e CondK7 (22,80%). Já no teste ao som (Figura 18C) os três grupos apresentaram maior duração média do comportamento de vigilância (Cond7 = 66,00%, CondSAL7 = 63,81%, CondANI7 = 63,12% e CondK7 = 66,01%).

O teste ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre os grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7 quanto à duração média dos comportamentos de congelamento ($F_{3,21} = 3,69$; $p < 0,05$), vigilância ($F_{3,21} = 4,82$; $p < 0,05$), exploração ($F_{3,21} = 3,47$; $p < 0,05$), porém não diferiram significativamente na duração médias dos comportamentos de exploração cautelosa ($F_{3,21} = 1,50$; $P =$

0,2431), locomoção ($F_{3,21} = 0,470$; $P = 0,7066$) e manutenção ($F_{3,21} = 1,65$; $P = 0,2084$).

As análises com ANOVA também indicaram um efeito significativo da sessão sobre a duração média dos comportamentos apresentados pelos grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. Assim, foram confirmadas diferenças entre as sessões de treino, teste ao contexto e teste ao som quanto ao comportamento de congelamento ($F_{3,21} = 185,92$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 58,18$; $p < 0,001$), exploração cautelosa ($F_{3,21} = 16,88$; $p < 0,001$), exploração ($F_{3,21} = 14,58$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,21} = 126,49$; $p < 0,001$), manutenção ($F_{3,21} = 4,58$; $p < 0,05$). Houve uma interação significativa entre grupo e sessão para o comportamento de congelamento ($F_{3,3} = 4,88$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,3} = 4,63$; $p < 0,001$) e exploração ($F_{3,3} = 4,69$; $p < 0,001$).

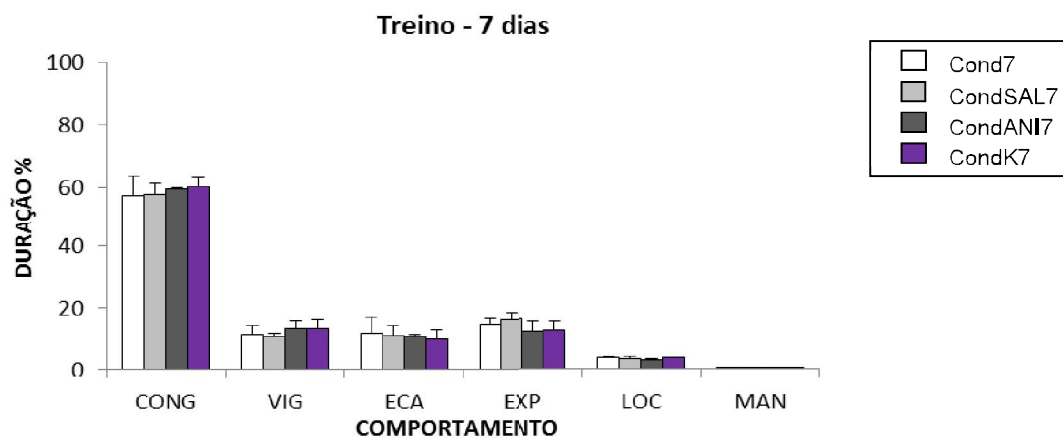
As análises *post hoc* com o teste Newman-Keuls indicaram diferenças significativas entre os grupos CondANI7 e CondK7 e os grupos Cond7 e CondSAL7 ($p < 0,05$) no teste ao contexto 7 dias. Houve diferenças significativas entre as durações médias dos comportamentos de congelamento, vigilância, exploração cautelosa, exploração, locomoção e manutenção durante a sessão de teste ao contexto e as sessões de treino e de teste ao som ($p < 0,05$).

As análises *post hoc* com o teste Newman-Keuls indicaram, ainda, que para os comportamentos de congelamento e exploração a sessão de teste ao contexto dos grupos CondANI7 e CondK7 foram diferentes de todas as sessões dos grupos Cond7 e CondSAL7, como também no teste ao som deles mesmos ($p < 0,05$). Para o comportamento de vigilância a sessão de teste ao contexto do grupo CondANI7 foi diferente das sessões do teste ao contexto e do teste ao som dos grupos Cond7 e CondSAL7, como também no teste ao som deles mesmos, enquanto que para o

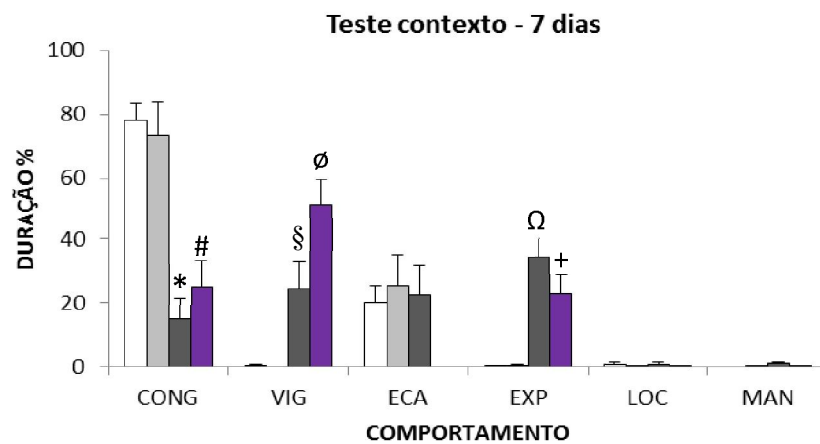
grupo CondK7 houve diferenças significativas apenas entre as sessões do teste ao contexto dos grupos Cond7 e CondSAL7 ($p < 0,05$).

Figura 18 - Duração média (+EPM) dos comportamentos exibidos durante as sessões de treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 7 dias e teste ao som 7 dias.

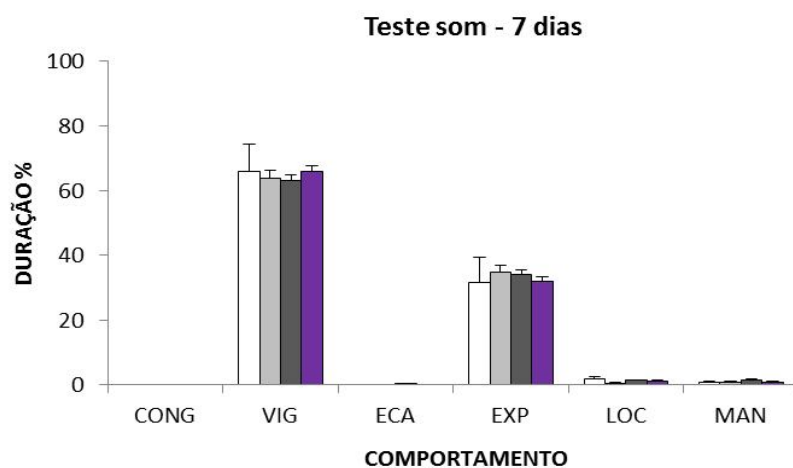
A



B



C



Categorias comportamentais: GONG = Congelamento, VIG = Vigilância, ECA = Exploração Cautelosa, EXP = Exploração, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção. (A) Treino dos animais pertencentes a Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. (B) Teste ao contexto dos animais pertencentes a Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. (C) Teste ao som dos animais pertencentes a Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. *p < 0,05 versus Cond7 e CondSAL7; #p < 0,05 versus Cond7 e CondSAL7; §p < 0,05 versus Cond7 e CondSAL7; °p < 0,05 versus Cond7 e CondSAL7; ˆp < 0,05 versus Cond7 e CondSAL7; ˜p < 0,05 versus Cond7 e CondSAL7; ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls. Os dados são apresentados como a média ± SEM para n = 5 a 8 pombos por grupo.

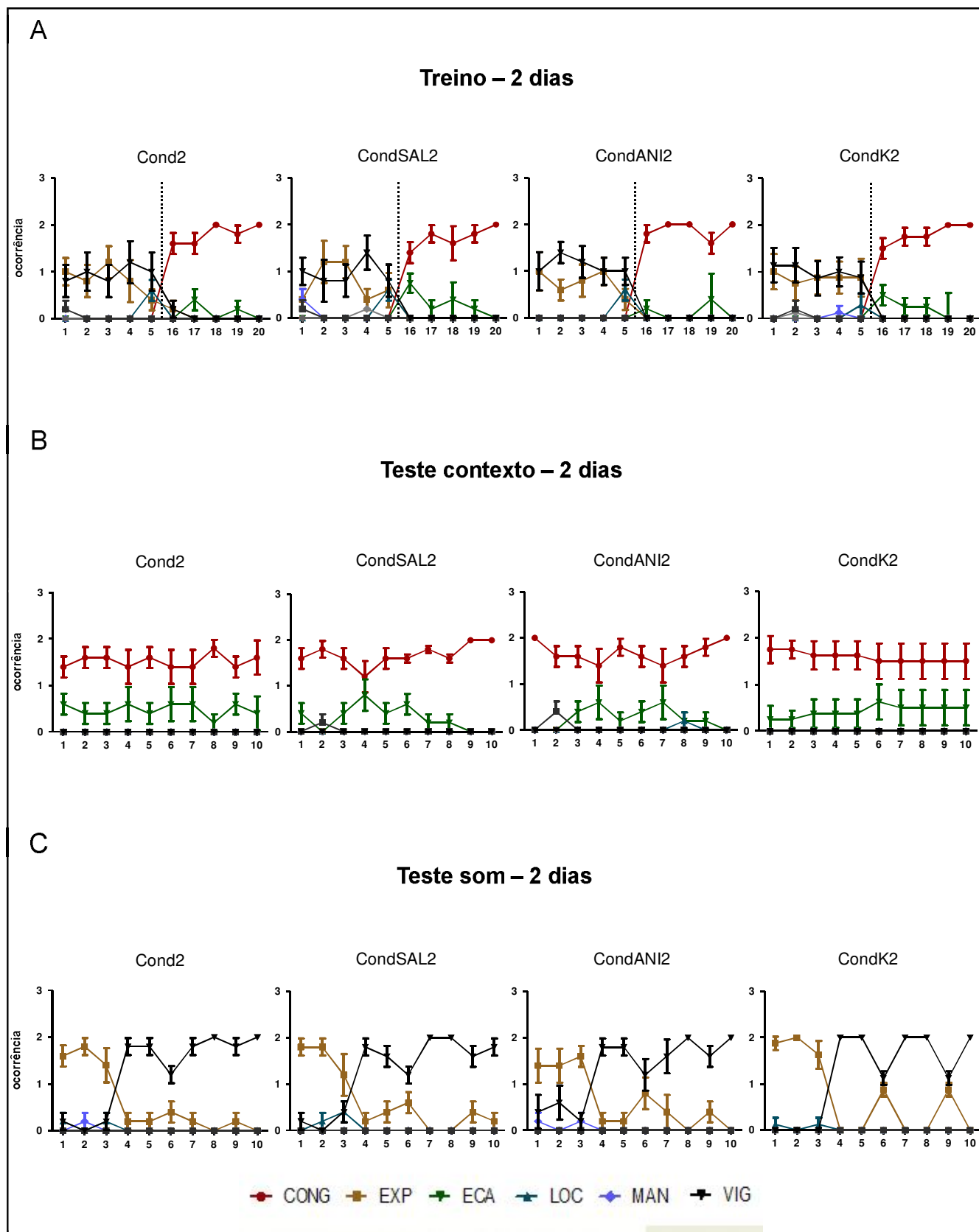
As Figuras 19 e 20 apresentam os valores médios da ocorrência dos comportamentos de congelamento, vigilância, exploração cautelosa, exploração, locomoção e manutenção registrados durante os cinco minutos do início da sessão de treino (antes da apresentação do pareamento som-choque), durante os cinco minutos do final da sessão de treino (após a apresentação do último pareamento som-choque), durante os 10 minutos da sessão de teste ao contexto, durante os 10 minutos da sessão de teste ao som para os grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2, CondK2, Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. Os comportamentos foram registrados a cada intervalo de 30 seg e cada ponto representa o valor computado para blocos de dois intervalos de registros (60 segundos). Observa-se na Figura 19 que os quatro grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2, apresentaram um aumento de congelamento e uma diminuição da vigilância e exploração nos últimos 5 blocos da sessão de treino quando comparados com os 5 blocos iniciais (Figura 19A). Na sessão de teste ao contexto, todos os grupos apresentaram uma ocorrência elevada de congelamento, durante toda sessão de teste (Figura 19B). Na sessão de teste ao som houve um aumento da vigilância e uma diminuição da exploração nos últimos 7 blocos da sessão de teste quando comparados com os 3 blocos iniciais (Figura 19C).

O teste ANOVA de duas vias indicou que não houve diferença entre os grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2 quanto à duração média dos

comportamentos de congelamento ($F_{3,21} = 0,02$; $P = 0,9958$), vigilância ($F_{3,21} = 0,29$; $P = 0,8353$), exploração cautelosa ($F_{3,21} = 0,08$; $P = 0,9724$), exploração ($F_{3,21} = 0,67$; $P = 0,5802$), locomoção ($F_{3,21} = 1,17$; $P = 0,3446$), manutenção ($F_{3,21} = 0,11$; $P = 0,9553$).

A análise com ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo da sessão sobre a duração média dos comportamentos apresentados pelos grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. Assim, foram confirmadas diferenças entre as sessões de treino, teste ao contexto e teste ao som quanto ao comportamento de congelamento ($F_{3,21} = 217,66$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 472,24$; $p < 0,001$), exploração cautelosa ($F_{3,21} = 12,26$; $p < 0,001$), exploração ($F_{3,21} = 89,07$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,21} = 9,03$; $p < 0,001$). Também foi indicado um efeito significativo da variável bloco apresentados pelos grupos Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2 quanto à duração média dos comportamentos de congelamento ($F_{3,21} = 71,54$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 22,50$; $p < 0,001$), exploração cautelosa ($F_{3,21} = 2,60$; $p < 0,01$), exploração ($F_{3,21} = 56,27$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,21} = 6,75$; $p < 0,001$), manutenção ($F_{3,21} = 3,44$; $p < 0,001$). As análises *post hoc* com o teste Tukey-Kramer indicaram que as durações médias dos comportamentos de congelamento, vigilância, exploração, exploração cautelosa e locomoção durante a sessão de teste ao contexto diferiram significativamente. As durações médias dos comportamentos de congelamento, vigilância, exploração cautelosa, exploração, locomoção e manutenção durante os 3 blocos iniciais de teste ao contexto diferiram significativamente da duração média observada nos 3 blocos iniciais de treino e de teste ao som ($p < 0,05$).

Figura 19 - Duração média (+EPM) dos comportamentos por bloco exibidos durante as sessões de treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 2 dias e teste ao som 2 dias.



Categorias comportamentais: GONG = Congelamento, VIG = Vigilância, ECA = Exploração Cautelosa, EXP = Exploração, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção. (A) Treino dos animais pertencentes a Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. (B) Teste ao contexto dos animais pertencentes a Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. (C) Teste ao som dos animais pertencentes a Cond2, CondSAL2, CondANI2 e CondK2. As análises com ANOVA de duas vias não revelaram diferenças significativas entre os grupos para a ocorrência de comportamentos ($p > 0,05$). Os dados são apresentados como a média $\pm$ SEM para $n = 5$ a 8 pombos por grupo.

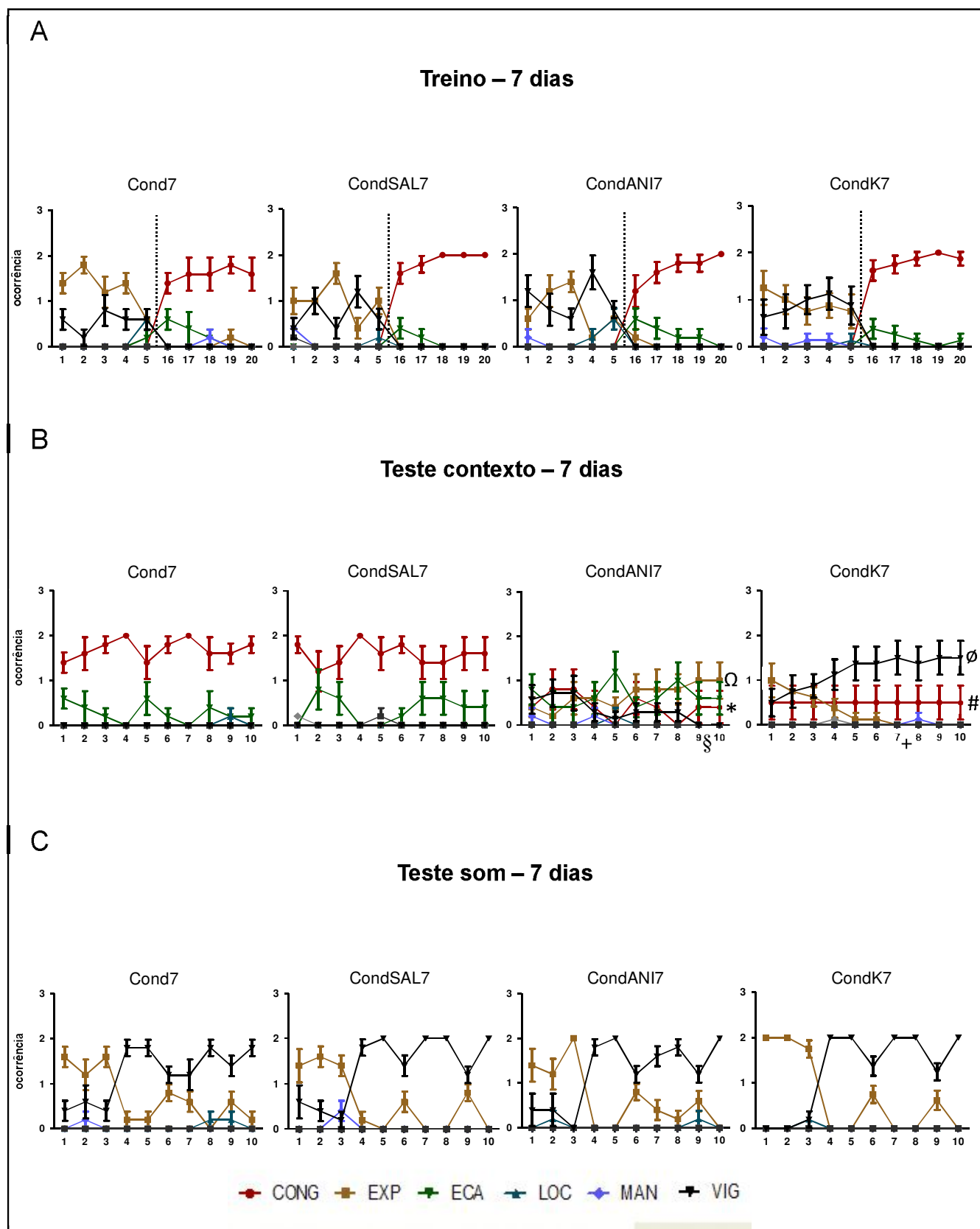
A Figura 20 mostra que os quatro grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7, apresentaram um aumento de congelamento e uma diminuição da vigilância e exploração nos últimos 5 blocos da sessão de treino quando comparados com os 5 blocos iniciais (Figura 20A), enquanto que durante toda a sessão de teste ao contexto, os grupos Cond7 e CondSAL7 apresentaram uma ocorrência de congelamento, com valores maiores do que os grupos CondANI7 e CondK7 (Figura 20B). Na sessão de teste ao som, todos os grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7, apresentaram um aumento da vigilância e uma diminuição da exploração nos últimos 7 blocos da sessão de teste quando comparados com os 3 blocos iniciais (Figura 20C).

O teste ANOVA de duas vias indicou que houve diferença entre os grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7 quanto à duração média dos comportamentos de congelamento . ($F_{3,21} = 14,60$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 12,31$; $p < 0,001$), exploração ($F_{3,21} = 7,75$; $p < 0,01$), porém não diferiram significativamente na duração do comportamento de exploração cautelosa ($F_{3,21} = 2,12$; $P = 0,1287$), locomoção ($F_{3,21} = 0,68$; $P = 0,5759$), manutenção ($F_{3,21} = 0,09$; $P = 0,9672$). A análise com ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo da sessão sobre a duração média dos comportamentos apresentados pelos grupos Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. Assim, foram confirmadas diferenças entre as sessões de treino, teste ao contexto e teste ao som quanto ao comportamento de congelamento ($F_{3,21} = 71,04$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 54,94$; $p < 0,001$),

exploração cautelosa ($F_{3,21} = 9,58$; $p < 0,001$), exploração ($F_{3,21} = 12,99$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,21} = 8,01$; $p < 0,01$). O teste ANOVA também indicou um efeito significativo da variável bloco à duração média dos comportamentos de congelamento ($F_{3,21} = 85,72$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,21} = 18,21$; $p < 0,001$), exploração ($F_{3,21} = 42,88$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,21} = 6,27$; $p < 0,01$), manutenção ($F_{3,21} = 2,48$; $p < 0,05$). Houve uma interação significativa entre grupo e sessão para o comportamento de congelamento ($F_{3,3} = 13,02$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,3} = 11,90$; $p < 0,001$) e exploração ($F_{3,3} = 3,96$; $p < 0,01$).

As análises *post hoc* com o teste Newman-Keuls indicaram diferenças significativas entre os grupos CondANI7 e CondK7 e os grupos Cond7 e CondSAL7 ($p < 0,05$) na ocorrência de congelamento e da exploração no teste ao contexto 7 dias ($p < 0,05$). Também houve diferenças significativas entre a ocorrência de vigilância do grupo CondANI7 e os grupos Cond7, CondSAL7 e CondK7 ($p < 0,05$). Houve diferenças significativas entre a sessão de teste ao contexto e as sessões de treino e de teste ao som ($p < 0,05$), sendo que a sessão de teste ao contexto dos grupos CondANI7 e CondK7 diferiram das sessões de treino e de teste ao contexto dos grupos Cond7 e CondSAL7 ($p < 0,05$). As durações médias dos comportamentos de congelamento, vigilância, exploração, locomoção e manutenção durante os 3 blocos iniciais de teste ao contexto diferiram significativamente da duração média observada nos 3 blocos iniciais de treino e de teste ao som ($p < 0,05$).

Figura 20 - Duração média (+EPM) dos comportamentos por bloco exibidos durante as sessões de treino em condicionamento clássico aversivo, teste ao contexto 7 dias e teste ao som 7 dias.



Categorias comportamentais: GONG = Congelamento, VIG = Vigilância, ECA = Exploração Cautelosa, EXP = Exploração, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção. (A) Treino dos animais pertencentes a Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. (B) Teste ao contexto dos animais pertencentes a Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. (C) Teste ao som dos animais pertencentes a Cond7, CondSAL7, CondANI7 e CondK7. *p < 0,001 versus Cond7 e CondSAL7; #p < 0,001 versus Cond7 e CondSAL7; §p < 0,001 versus Cond7, CondSAL7 e CondANI7; °p < 0,001 versus Cond7, CondSAL7 e CondANI7; Ωp < 0,01 versus Cond7 e CondSAL7; *p < 0,01 versus Cond7 e CondSAL7. ANOVA duas vias, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls. Os dados são apresentados como a média ± SEM para n = 5 a 8 pombos por grupo.

7. DISCUSSÃO

7.1. Experimento 2

Os dados do Experimento 2 indicam que o condicionamento Clássico Aversivo resultou na expressão de medo condicionado durante os testes ao contexto e ao som, realizados 2 dias ou 7 dias após o treino. Essas alterações comportamentais são indicativas de consolidação da memória de medo condicionado e da persistência dessa memória ao contexto e ao som. Assim, o presente trabalho permitiu verificar que os pombos condicionados com pareamentos som-choque, seja dos grupos Cond2 e Cond7, que não receberam tratamento farmacológico, ou aqueles dos grupos CondSAL2 e CondSAL7, tratados com salina, mostraram a aquisição do condicionamento, a consolidação e a persistência da memória do valor aversivo condicionado do contexto e do som, conforme indicado pela ocorrência de congelamento tanto no teste ao contexto realizado 2 dias após o treino como no teste realizado 7 dias após o treino. Contudo, os pombos dos grupos que receberam a infusão intra-hipocampal de anisomicina e de K252a mostraram uma dissociação entre os efeitos do tratamento na memória do contexto aversivo. Embora no teste ao contexto realizado 2 dias após o treino, os pombos tratados tenham apresentado elevada ocorrência de congelamento, tal como observado para os grupos Cond2 e CondSAL2, durante teste ao contexto realizado 7 dias após o treino a ocorrência de congelamento para os pombos tratados foi menor em relação aos pombos Cond7 e CondSAL7.

Esses dados fundamentam a interpretação de que a infusão intra-hipocampal de anisomicina 11 h após o treino não comprometeu a consolidação da memória

contextual, porém interferiu na persistência da memória de longo prazo (LTM) ao contexto aversivo. De fato, consistente com esses resultados, Bekinschtein et al. (2007) mostraram que a anisomicina, aplicada na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 11,5 h após os treinos de esquiva inibitória não afetou a retenção da memória quando os ratos eram testados ao contexto 48 horas após o treino, e que os animais testados 7 dias após o treino apresentaram um prejuízo na persistência da LTM (menor porcentagem de congelamento no teste). Slipczuk et al. (2013) também mostraram um aumento da expressão do BDNF-maduro no hipocampo de ratos nas 12 h após o treino de condicionamento de esquiva inibitória e que o uso do antidepressivo venlafaxine, aplicada na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 11 h após os treinos de esquiva inibitória não afetou a retenção da memória quando os ratos eram testados ao contexto 48 horas após o treino, mas apresentaram um prejuízo na persistência da memória quando testados em 7 dias após o treino. Assim, como o Experimento 1 do presente estudo demonstrou o aumento da expressão do BDNF-maduro nas 12 h após o treino, os dados do Experimento 2 sugerem que o bloqueio do aumento da expressão do BDNF-maduro pela infusão intra-hipocampal de anisomicina, teria afetado os processos moleculares que garantem a persistência da memória.

Consistente com essas observações, a infusão intra-hipocampal de K252a, também não comprometeu a consolidação da memória contextual aversiva, mas interferiu na sua persistência. Desse modo, podemos supor que o tratamento com K252a através do efeito antagonista no receptor TrkB, bloqueou a ação do BDNF-maduro que seria essencial para a persistência da memória contextual aversiva. Esses dados são coerentes com os inúmeros estudos que indicam que os processos moleculares desencadeados pelo treino seguem um curso temporal de algumas

horas que culmina com a síntese de proteínas necessárias para a consolidação de memória. Assim, pode-se considerar que esses processos moleculares que ocorrem nas primeiras horas após a aprendizagem (Rose, 2000) não foram prejudicados pela infusão de anisomicina 11 h após o treino, de modo que a consolidação da memória teria ocorrido sem interferência. Dentre essas proteínas o BDNF-maduro apresenta um aumento de expressão 1 h após o treino, o qual já foi relacionado com a consolidação da memória (Ou et al., 2010). Por outro lado, também já foi demonstrado (Bekinschtein et al., 2007; Ou et al., 2010; Faria et al., 2013) que o BDNF-maduro apresenta um aumento tardio de expressão que seria necessário para a persistência da memória do condicionamento ao contexto. Nossos dados corroboram tais considerações uma vez que tanto a inibição da síntese proteica pela anisomicina, que bloqueia o aumento expressão do BDNF-maduro, quanto o bloqueio de sua ação no receptor TrkB, 11 horas após o treino interfere na persistência da memória, ou seja, essa inibição não altera uma memória já consolidada, mas prejudica a sua manutenção/persistência (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2010; Medina et al., 2008; Slipczuk et al., 2013).

Contrariamente ao observado para a memória do medo condicionada ao contexto, a memória aversiva ao som dos pombos CondANI7 e CondK7 foi preservada, indicando que as interferências realizadas no hipocampo não afetaram a persistência da memória ao som. Os dados mostraram que durante o teste ao som não houve diferenças estatísticas comportamentais entre os grupos. Os pombos dos grupos Cond2 e Cond7 que não receberam tratamento farmacológico das drogas anisomicina ou K252a mostraram a consolidação e a persistência da memória ao som com valor aversivo condicionado. Do mesmo modo, tanto os pombos tratados com anisomicina, quanto os pombos tratados com K252a, também mostraram a

consolidação e a persistência da memória do medo condicionado ao som. Os dados do nosso estudo indicam, assim, que o treino de condicionamento clássico aversivo foi capaz de provocar alterações comportamentais nos animais que evidenciaram a memória do medo condicionado ao som. Esses resultados são consistentes com o trabalho de Ou et al. (2010), que mostrou que ratos que passaram pelo condicionamento clássico aversivo som-choque tiveram um aumento na expressão do BDNF-maduro 12 horas após o treino, e quando foram testados ao som foram capazes de evocar a memória 24 h e 7 dias após o treino. Contrariamente, a infusão de K252a na amígdala lateral desses animais 9 h após o treino repercutiu em prejuízos na memória ao teste ao som em 7 dias.

Portanto, além das evidências quanto à importância de um ciclo tardio da expressão do BDNF na persistência da memória contextual aversiva, os dados do presente estudo nos remetem a questões relacionadas ao papel do hipocampo na memória de medo condicionado ao contexto e medo condicionado ao som. A participação essencial do hipocampo na aquisição e consolidação da memória de medo contextual em ratos foi demonstrada pelo trabalho pioneiro de Kim e Fanselow (1992) que utilizaram o pareamento som e choque elétrico, e lesões no hipocampo 1, 7, 14, ou 28 dias após o treino. Os animais com lesão 1 dia pós-treino tiveram menor ocorrência de resposta de congelamento quando re-expostos ao ambiente em que receberam o choque (contexto), mas não quando testados em outro contexto com reapresentação do som. Todos os animais dos grupos que tiveram lesões mais tardiamente apresentaram congelamento tanto ao contexto quanto ao som. Esse estudo evidenciou uma dissociação nas vias de processamento das informações contextuais e sonoras no medo condicionado, e que o hipocampo pode ter um papel limitado no tempo em memórias do medo contextual, mas não a

estímulos discretos, como o som. Assim, em acordo com esses dados, os nossos resultados de que a infusão intra-hipocampal tanto da anisomicina, quanto da K252a causaram alterações apenas na memória ao contexto, mas não na memória ao som, evidenciam que os diferentes estímulos, som e contexto são processados por diferentes circuitos no condicionamento do medo (Kim e Fanselow, 1992; Eichenbaum et al., 1992; Canteras et al., 2012). Essas observações estão em acordo com os dados do Experimento 1, que mostraram que a infusão intra-hipocampal de anisomicina 11 h após o condicionamento provocou o bloqueio no aumento da expressão do BDNF-maduro apenas no hipocampo, não afetando a expressão na amígdala. Como bem demonstrado pela literatura o hipocampo e a amígdala são estruturas neurais que desempenham um papel essencial nos processos de aprendizagem e memória do medo condicionado, sendo a amígdala responsável pela memória emocional aversiva sinalizada ou discriminativa, e o hipocampo, por sua vez, sendo fundamental para memória contextual (Kim e Fanselow, 1992; Eichenbaum et al., 1992; Izquierdo e Medina, 1993; LeDoux, 2000; Maren, 2001; Zhang et al., 2001; An et al., 2012;). De fato, o hipocampo, tal como a amígdala, participa de uma rede neural, que envolve vias paralelas (Canteras et al., 2012) que convergem para as estruturas efectoras que garantem a expressão da resposta comportamental. Nesta rede neural tanto o hipocampo, quanto a amígdala, estabelecem conexões diretas ou indiretas com outras estruturas corticais, diencefálicas e mesencefálicas (Izquierdo e Medina, 1997; Brandão et al., 2008; Canteras et al., 2012).

Outro ponto a ser considerado é que embora os pombos tivessem apresentado elevada ocorrência de congelamento durante o treino e no teste ao contexto, durante o teste ao som exibiram maior ocorrência de viglância do que de congelamento.

Tanto a vigilância quanto o congelamento são comportamentos que fazem parte do repertório de defesa de diferentes espécies de animais. De acordo com os critérios de topografia comportamental usada em nosso estudo, a vigilância difere do congelamento pela exibição de escaneamento visual, o que pode ser considerado como a expressão da avaliação da ameaça no ambiente. No caso do congelamento a imobilidade motora tensa e total, que em condições naturais teria a função de impedir a detecção visual ou auditiva pelo predador, indicaria que o animal já identifica a situação como perigosa e ameaçadora (Shuhama et al., 2007). Esses dados relacionam-se com o fato de que existem níveis de defesa que são exibidos por animais em situação de perigo ou ameaça. De acordo com a proposta de Blanchard, 1978, existe uma hierarquia na organização dos diferentes níveis de defesa que podem ser exibidos nessas situações, que de acordo a situação envolveriam desde a avaliação de risco, fuga, imobilidade tensa, ameaça defensiva até o ataque defensivo. A vigilância exibida pelos pombos durante o teste ao som pode ser relacionada com o primeiro nível de hierarquia de defesa, ou seja, a avaliação de risco. O som que foi previamente associado ao choque, mesmo quando apresentado em um ambiente diferente daquele em que o animal foi condicionado, teria uma função de sinalizar a possibilidade de ocorrência do evento aversivo. Assim, durante o teste ao som em nosso estudo o som atuaria como um estímulo condicionado, sinalizador do perigo em um ambiente potencialmente aversivo, levando à avaliação visual do ambiente expressa pelo comportamento de vigilância (Shuhama et al., 2007). De fato o escaneamento visual já foi descrito como um tipo de avaliação de risco exibido por macacos e esquilos (Hanson e Coss, 1997; Coss e Ramakrishnan 2000) diferindo das respostas de farejar em camundongos e ratos (Zangrossi e File, 1994; Berton et al., 1998) e alongamento em ratos (Blanchard e

Blanchard, 1988). Por outro lado, o aumento do congelamento no teste ao contexto ocorre em função de que o contexto é um ambiente fechado, sem possibilidade de fuga e que oferece um conjunto de estímulos que foram associados à apresentação do estímulo aversivo, tais como o cheiro, a temperatura, a claridade os quais estão continuamente presentes durante todo o teste. Essa situação caracterizaria uma real possibilidade de nova ocorrência do estímulo aversivo, sobre a qual o animal não tem previsão e nem controle (Shuhama et al., 2007).

Em resumo, os dados do Experimento 2 demonstram que interferências na ação BDNF-maduro realizadas 11 h após o condicionamento prejudicaram a persistência da memória de longo prazo (LTM) ao contexto aversivo, evidenciando o papel do BDNF-maduro na persistência da memória do medo condicionado ao contexto. Assim, os dados deste Experimento 2 confirmam e ampliam as observações apresentadas no Experimento 1, que indicaram que o aumento da expressão do BDNF-maduro observado no hipocampo e na amígdala em nosso estudo resultaria de uma série de eventos moleculares que são ativados pela experiência do condicionamento e que garantem a regulação fina da plasticidade neuronal necessária para a memória.

8. CONCLUSÕES

- 1- O Condicionamento Clássico Aversivo resultou em alterações comportamentais características do condicionamento de medo ao contexto de pareamento som-choque e ao som que foi associado ao choque, bem como na ativação de eventos moleculares que resultaram no aumento do BDNF-maduro 12 h após o treino, tanto no hipocampo como na amígdala. De modo correlacionado, o Condicionamento Clássico Aversivo também promoveu aumento da síntese da tPA nas 12 h após treino tanto no hipocampo quanto na amígdala.
- 2- A infusão de anisomicina intra-hipocampal, 11 h após o treino, bloqueou as alterações de expressão das isoformas do BDNF-maduro, BDNF-truncado e pró-BDNF no hipocampo, mas não interferiu na expressão dessas proteínas na amígdala, fato que favorece interpretações da dissociação entre o hipocampo e a amígdala no processamento do medo condicionado.
- 3- Como a infusão de anisomicina intra-hipocampal, 11 h após o treino, não bloqueou as alterações de expressão da tPA tanto no hipocampo quanto na amígdala, deve-se considerar que o aumento tardio da expressão do BDNF-maduro teria o envolvimento de outros mecanismos além daqueles envolvidos com o aumento da expressão da tPA próximo ao pico do BDNF-maduro nas 12 h após o treino.

- 4- Os pombos treinados em Condicionamento Clássico Aversivo resultou alterações comportamentais características do condicionamento de medo ao contexto de pareamento som-choque e ao som que foi associado ao choque, indicando a aquisição do medo condicionado ao contexto e ao som, a consolidação da memória de medo condicionado e a persistência dessa memória, num período de 7 dias após o treino.
- 5- A infusão intra-hipocampal 11 h após o treino, seja de anisomicina ou do antagonista do receptor TrkB, K252a, não comprometeu a consolidação da memória seja ao contexto ou ao som, porém interferiu na persistência da memória de medo ao contexto. Esses dados corroboram os dados do Experimento 1 que mostraram o aumento na expressão do BDNF-maduro 12 h após o treino em Condicionamento Clássico Aversivo e indicam que a persistência da memória do medo condicionado ao contexto depende de um ciclo tardio da expressão do BDNF-maduro no hipocampo, independentemente da expressão do BDNF-maduro que ocorre na amígdala. Por outro lado, a persistência da memória do medo condicionado ao som, independeria da expressão tardia do BDNF-maduro no hipocampo. Essas observações comportamentais corroboram as interpretações da dissociação entre o hipocampo e a amígdala no processamento do medo condicionado.
- 6- Em conjunto, nossos resultados evidenciam que a experiência do condicionamento ativa uma série de eventos moleculares que levam à expressão do BDNF-maduro no hipocampo e na amígdala, os quais garantem a regulação fina da plasticidade neuronal necessária para a os processos de

memória. Além disso, demonstram que apesar das diferentes características anatômicas entre os encéfalos dos roedores e os dos pombos, os eventos moleculares induzidos pelo condicionamento aversivo mostram ser equivalentes entre essas espécies.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. An B, Hong I, Choi S (2012) Long-term neural correlates of reversible fear learning in the lateral amygdala. *J Neurosci* 32(47):16845-16856.
2. Anagnostaras SG, Gale GD, Fanselow MS (2001) Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11(1):8-17.
3. Atoji Y, Saito S, Wild JM (2002) Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 447(2):177-199.
4. Atoji Y, Wild J (2006) Anatomy of the avian hippocampal formation. *Rev Neurosci* 17(1-2):3-15.
5. Barker PA (2009) Whither proBDNF? *Nature neuroscience* 12(2):105-106.
6. Bast T, Zhang WN, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol. *Exp Brain Res* 139(1):39-52.
7. Bast T, Zhang WN, Feldon J (2003) Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus* 13(6):657-675.
8. Bear MF, Connors BWE, Paradiso MA (2002) *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. 2ª. Edição, Porto Alegre: Artmed Editora.
9. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LRM, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53(2):261-277.
10. Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk L, Gonzalez C, Dorman G, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2010) Persistence of long-term memory storage: new

insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures.

Neurotox Res 18(3-4):377-385.

11. Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH (2013) BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 1-7.
12. Berton F, Vogel E, Belzung C (1998) Modulation of mice anxiety in response to cat odor as a consequence of predators diet. *Physiol Behav* 65:247-254.
13. Binder DK, Scharfmann HE (2004) Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 22(3):123-131.
14. Blanchard DC, Blanchard RJ (1988) Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 39:43-68.
15. Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999) Timedependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400(6745):671-675.
16. Brito I (2002) Análise da expressão de produto do proto-oncogene Zif/268 no hipocampo de pombos após o treino em condicionamento clássico aversivo. 39 f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
17. Brito I, Britto LRG, Ferrari EAM (2006) Classical tone-shock conditioning induces Zenk expression in the pigeon (*Columba lívia*) hippocampus. *Behav Neuroscience* 120(2):353-361.
18. Brito I, Britto LRG, Ferrari EAM (2011) Induction of Zenk protein expression within the nucleus taeniae of the amygdala of pigeons following tone and shock stimulation. *Braz J Med Biol Res* 44:762-766.
19. Campbell CB, Hodos W (1970) The concept of homology and the evolution of the nervous system. *Brain Behav Evol* 3:353-367.

20. Canova F (2009) Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos (*C. livia*). (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, Fisiologia) - UNICAMP - São Paulo.
21. Canteras NS, Mota-Ortiz SR, Motta SC (2012) What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. *Braz J Med Biol Res* 45:321-327.
22. Cardenas-Aguayo Mdel C, Kazim SF, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2013) Neurogenic and neurotrophic effects of BDNF peptides in mouse hippocampal primary neuronal cell cultures. *PLoS One* 8(1):e53596.
23. Carlino D, Leone E, Di Cola F, Baj G, Marin R, Dinelli G, Tongiorgi E, De Vanna M (2011) Low serum truncated-BDNF isoform correlates with higher cognitive impairment in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 45(2):273-279.
24. Cassé F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F (2012) Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* 32(15):5186-99.
25. Catania AC (1999) In: *Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição*. P. Alegre: Artmed Editora.
26. Coss RG, Ramakrishnan U (2000) Perceptual aspects of leopard recognition by wild bonnet macaques (*Macaca radiata*). *Behaviour* 137:315-335.
27. Cui Z, Wang H, Tan Y, Zaia KA, Zhang S, Tsien JZ (2004) Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial roles of the NMDA receptor preserving in remote memories in the brain. *Neuron* 41(5):781-793.
28. Cunha C, Brambilla RL, Thomas LK (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3:1-14.

29. Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012) BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196(6):775-788.
30. Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ (1992) The Hippocampus-What does it do? *Behav Neural Biol* 57(1):2-36.
31. Eckel-Mahan KL, Phan T, Han S, Wang H, Chan GCK, Scheiner ZS, Storm DR (2008) Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications of memory persistence. *Nature Neurosci* 11:1074-1082.
32. Fanselow MS (2010) From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends in Cognitive Sciences* 14(1):7-15.
33. Faria RS, Sartori C R, Canova F, Ferrari EA (2013) Classical aversive conditioning induces increased expression of mature-BDNF in the hippocampus and amygdala of pigeons. *Neuroscience* 26:122-133.
34. Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23(5):743-760.
35. Ferrari EA, Faleiros L, Cerutti SM, Oliveira AM (1999) The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. *Behav Brain Res* 101:93-103.
36. Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6(2):119-130.
37. Garcia KL, Yu G, Nicolini C, Michalski B, Garzon DJ, Chiu VS, Tongiorgi E, Szatmari P, Fahnstock M (2012) Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism. *J Neuropathol Exp Neurol* 71(4):289-297.

- 38.Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neuroscience* 29(41):12764–12767.
- 39.Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3(6):533-535.
- 40.Hanson MT, Coss RG (1997) Age differences in the response of California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) to avian and mammalian predators. *J Com Psychol* 111:174–184.
- 41.Hawk JD, Abel T (2011) The role of NR4A transcription factors in memory formation. *Brain Res Bull* 85(1-2):21-29.
- 42.Hwang IY, Sun ES, An JH, Im H, Lee SH, Lee JY, Han PL, Koh JY, Kim YH (2011) Zinc-triggered induction of tissue plasminogen activator by brain-derived neurotrophic factor and metalloproteinases. *J Neurochem* 118(5):855-863.
- 43.Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi PG, Pereira P, Rodrigues C, Choi H, Medina JH, Izquierdo I (2000) Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behav Brain Res* 111(1-2):93-98.
- 44.Izquierdo I, Medina JH (1993) Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz J Med Biol Res* 26:573-589.
- 45.Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29(9):496-505.

46. Iwaniuk AN, Hurd PL (2005) The evolution of cerebrotypes in birds. *Brain Behav Evol* 65(4):215-30.
47. Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294(5544):1030.
48. Kahn MC, Hough GE, Ten EGR, Bingman VP (2003) Internal connectivity of the homing pigeons (*Columba Livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. *J. Comp. Neurol* 459:127-141.
49. Karten HJ, Hodos W (1967) A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*) The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
50. Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Jackson T, Jackson S, Toba M, Shinomiya A, Waisman DM (1998) The Role of Annexin 5 II Tetramer in the Activation of Plasminogen. *Journal of Biological Chemistry*, 273(8):4790-4799.
51. Kim J, Hajjar KA (2002) Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front. Biosci* 7:341-348.
52. Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256(5057):675-7.
53. Kim JJ, Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30(2):188-202.
54. Krebs JR, Erichsen JT, Bingman VP (1991) The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 314(3):467-477.
55. Landeira-Fernandez J (1996) Context and Pavlovian conditioning. *Braz J Med Biol Res* 29(2):149-173.

56. Leal G, Comprido D, Duarte CB (2013) BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 1-18.
57. LeDoux JE (2000) Emotions circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-
58. Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL (2004) Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843.
59. Lee JL, Hynds RE (2013) Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 23(3):233-244.
60. Liu IY, Lyons WE, Mamounas LA, Thompson RF (2004) Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. *J Neurosci* 24(36):7958-7963.
61. Lochner JE, Spangler E, Chavarha M, Jacobs C, Mcallister K, Schuttner LC, Scalettar BA (2008) Efficient Copackaging and Cotransport Yields Postsynaptic Colocalization of Neuromodulators Associated with Synaptic Plasticity. *Dev Neurobiol* 68(10):1243-1256.
62. Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The Yin and Yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6(8):603-614.
63. Lu Y, Christian K, Lu B (2008) BDNF: A Key Regulator for Protein-synthesis Dependent LTP and Long-term Memory? *Neurobiol Learn Mem* 89(3):312-323.
64. Lubin FD, Roth TL, Sweatt JD (2008) Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *J Neurosci* 28(42):10576-10586.
65. Machado ABM (2004) *Neuroanatomia funcional*. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu.
66. Markowitsch H (1997) The functional neuroanatomy of episodic memory retrieval. *Trends Neurosci* 20(12):557-558.

67. Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* 24:897-931.
68. Maren S, Baudry M (1995) Properties and mechanisms of long term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 63(1):1-18.
69. Maren S, Fanselow MS (1995) Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. *J Neurosci* 15(11):7548-64.
70. Ma L, Wang DD, Zhang TY, Yu H, Wang Y, Huang SH, Lee FS, Chen ZY (2011) Region-specific involvement of BDNF secretion and synthesis in conditioned taste aversion memory formation. *J. Neuroscience* 31(6):2079-2090.
71. Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res* 88:261-274.
72. Maren S, Phan KL, Liberzon I (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 14(6):417-428.
73. Martinez RC, Carvalho-Netto EF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MV, Canteras NS (2011) Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. *Neuroscience* 172: 314-328.
74. Martínez-Moreno A, Durán LFR, Escobar ML (2011) Late protein synthesis-dependent phases in CTA long-term memory: BDNF requirement. *Front Behav Neurosci* 5:1-6.

75. Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302(5646):890-893.
76. Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144:97-112.
77. McGaugh JL (2000) Memory - a century of consolidation. *Science* 287(5451):248-251.
78. McKenzie S, Eichenbaum H (2011) Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories *Neuron* 28(71):224-233.
79. Melchor JP, Strickland S (2005) Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb Haemost* 93(4):655-660.
80. Mercerón-Martínez D, Almaguer-Melian W, Serrano T, Lorigados L, Pavón N, Bergado JA (2012) Hippocampal neurotrophins after stimulation of the basolateral amygdala, and memory improvement in lesioned rats. *Restor Neurol Neurosci* 31(2):189-197.
81. Mizoguchi H, Nakade J, Tachibana M, Ibi D, Someya E, Koike H, Kamei H, Nabeshima T, Itohara S, Takuma K, Sawada M, Sato J, Yamada K (2011) Matrix metalloproteinase-9 contributes to kindled seizure development in pentylenetetrazole-treated mice by converting pro-BDNF to mature BDNF in the hippocampus. *J Neurosci* 31(36):12963-12971.
82. Mizuno K, Dempster E, Mill J, Giese KP (2012) Long-lasting regulation of hippocampal BDNF gene transcription after contextual fear conditioning. *Genes Brain Behav* 11(6):651-659.

83. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276(16):12660-12666.
84. Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B (2009) Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Pnas* 106(4):1267-1272.
85. Nasser HM, McNally GP (2013) Neural correlates of appetitive-aversive interactions in Pavlovian fear conditioning. *Learn Mem* 19;20(4):220-8.
86. Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C (2011) The lighter side of BDNF. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300(5):1053-1069.
87. Obiang P, Macrez R, Jullienne A, Bertrand T, Lesept F, Ali C, Maubert E, Vivien D, Agin V (2012) GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *J Neurosci* 32(37):12726-34.
88. Ottoni EB (2000) EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput* 3:446-449.
89. Ou LC, Gean PW (2007) Transcriptional regulation of brain derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol* 72:350-358.
90. Ou LC, Yeh SH, Gean PW (2010) Late expression of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala is required for persistence of fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 93(3):372-382.
91. Pang PT, Lu B (2004) Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev* 3(4):407-430.

92. Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/Plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
93. Park H, Poo MM (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14(1):7-23.
94. Power AE, Berlau DJ, Mcgaugh JL, Steward O (2006) Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learn Mem* 13(1):27-34.
95. Rattiner LM, Davis M, Ressler KJ (2004) Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor transcripts during the consolidation of fear learning. *Learn Mem* 11(6):727-731.
96. Reis F, Schenka AA, Melo LL, Ferrari EAM (1999) Role of the hippocampus in the contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). *Braz J Med Biol Res* 32(9):1127-1131.
97. Rescorla RA (1968) Probability of shock in the presence and absence of CS in fear conditioning. *J Comp Physiol Psychol* 66(1):1-5.
98. Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JN, Feldon J, Bannerman DM (1999) Dissociating context and space within the hippocampus: Effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci* 113(6):1189-1203.
99. Rose SRP (2000) God's Organism? The Chick as a Model System for Memory Studies. *Learn Mem* 7:1-17.
100. Rosinha UM (2003) Distribuição de neuromarcadores na formação hipocampal de aves. 70 f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular)-Universidade Estadual de Campinas -São Paulo.

101. Roth TL, Zoladz PR, Sweatt JD, Diamond DM (2011) Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 45(7):919-926.
102. Salih DA, Rashid AJ, Colas D, de la Torre-Ubieta L, Zhu RP, Morgan AA, Santo EE, Ucar D, Devarajan K, Cole CJ, Madison DV, Shamloo M, Butte AJ, Bonni A, Josselyn SA, Brunet A (2012) FoxO6 regulates memory consolidation and synaptic function. *Genes Dev* 26(24):2780-27801.
103. Sanchez MM, Das D, Taylor JL, Noda A, Yesavage JA, Salehi A (2011) BDNF polymorphism predicts the rate of decline in skilled task performance and hippocampal volume in healthy individuals. *Transl Psychiatry* 1:1-8.
104. Sartori CR, Pelágio FC, Teixeira SA, Valentinuzzi VS, Nascimento AL, Rogério F, Muscará MN, Ferrari EA, Langone F (2009) Effects of voluntary running on spatial memory and mature brain-derived neurotrophic factor expression in mice hippocampus after status epilepticus. *Behav Brain Res* 203(2):165-172.
105. Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA (2011) The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature bdnf, and probdnf proteolytic cleavage-related genes, p11 and tpa. *J Neuroscience* 180:9-18.
106. Scarpim BV, Siqueira LO, Melo LL, Ferrari EAM (2007) Effects of intrahippocampal infusions of the AMPA antagonist, DNQX, on classical aversive conditioning in pigeons (C. Livia). (2007, em revisão).
107. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, Mamarbachi AM, Benjannet S, Touré BB, Basak A, Munzer JS, Marcinkiewicz J, Zhong M, Barale JC, Lazure C, Murphy RA, Chrétien M, Marcinkiewicz M (1999) Mammalian subtilisin/kexin

- isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1321-1326.
108. Shuhama R, Del-Ben CM, Loureiro SR, Graeff FG (2007) Animal defense strategies and anxiety disorders. *An Acad Bras Cienc* 79(1):97-109.
109. Slipczuk L, Tomaiuolo M, Garagoli F, Weisstaub N, Katche C, Bekinschtein P, Medina JH (2013). Attenuating the persistence of fear memory storage using a single dose of antidepressant. *Molecular Psychiatry* 18:7-8.
110. Sperandéo MLA (2005) Evocação da memória aversiva: participação do receptor NMDA e análise da ativação de Zenk no hipocampo de pombos. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas.
111. Squire LR, Kandel ER (2003) Memória. Da mente às moléculas. São Paulo: Artmed.
112. Svenningsson P, Chergui K, Rachleff I, Flajolet M, Zhang XEL, Yacoubi M, Vaugeois JM, Nomikos GG, Greengard P (2006) Alterations in 5-HT_{1B} receptor function by p11 in depression-like states. *Science* 311:77-80.
113. Székely AD (1999) The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. *Behav Brain Res* 98(2):219-225.
114. Tongiorgi E (2008) Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res* 61(4):335-346.
115. Toyoda H, Li XY, Wu LJ, Zhao MG, Descalzi G, Chen T, Koga K, Zhuo M (2011) Interplay of amygdala and cingulate plasticity in emotional fear. *Neural Plast* 1-9.

116. Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG (2007) Schemas and memory consolidation. *Science* 316(5821):76-82.
117. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD (2002) From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 9(5):224-237.
118. von Herten LS, Giese KP (2005) Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* 25(8):1935-1942.
119. Wang ME, Fraize NP, Yin L, Yuan RK, Petsagourakis D, Wann EG, Muzzio IA (2013) Differential roles of the dorsal and ventral hippocampus in predator odor contextual fear conditioning *Hippocampus* 23(6):451-466.
120. Wang Y, Dong Q, Xu XF, Feng X, Xin J, Wang DD, Yu H, Tian T, Chen ZY (2013) Phosphorylation of Cofilin Regulates Extinction of Conditioned Aversive Memory via AMPAR Trafficking. *J Neurosci* 33(15):6423-33.
121. Willemet R (2013) Reconsidering the evolution of brain, cognition, and behavior in birds and mammals. *Front Psychol* 4(396):1-26.
122. Xu ZQ, Li J, Deng J, Jiang XJ, Zhou HD (2010) Effects of proBDNF on cell proliferation and differentiation in hippocampal dentate gyrus in Alzheimer' disease rat model. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 90(19):1353-1356.
123. Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, Mcgrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee SF, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci* 12:113-115.

124. Zangrossi H, File SE (1994) Habituation and generalization of phobic responses to cat odor. *Brain Res Bull* 33:189-194.
125. Zhang WN, Bast T, Feldon J (2001) The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behav Brain Res* 126(1-2):159-174.
126. Zheng F, Zhou X, Moon C, Wang H (2012) Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4(4):188-200.

10. ANEXOS



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

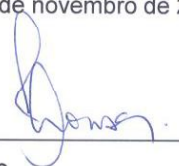
Certificamos que o projeto "Consolidação e persistência da memória aversiva ao contexto e ao som após o condicionamento som-choque: investigação dos efeitos do bloqueio da síntese proteica no hipocampo. Espécie: Pombos, Columba lívia, machos, adultos" (protocolo nº 2928-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari / Rodolfo Souza de Faria, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de novembro de 2012.

Campinas, 21 de novembro de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnaldi
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada **Investigação sobre as relações entre a persistência da memória do medo após condicionamento clássico aversivo e a expressão do BDNF no hipocampo e na amígdala.**

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

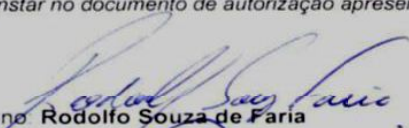
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(x) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. **2928-1**, Instituição: Universidade Estadual de Campinas - Unicamp.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

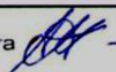

Aluno: Rodolfo Souza de Faria


Orientador: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

 - STEPHEN HYSLOP - VICE PRESIDENTE

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP