

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINE VILAR DA SILVA MACHADO

**“VARIAÇÃO CIRCADIANA DA EXPRESSÃO DA SINTASE
NEURONAL DE ÓXIDO NÍTRICO (nNOS) NO HIPOCAMPO E O
CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL AVERSIVO EM POMBOS
(*Columba livia*)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

Aline Vilar da Silva Machado

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Elenice".

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M18v

Machado, Aline Vilar da Silva

Varição circadiana da expressão da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) no hipocampo e o condicionamento contextual aversivo em pombos (*Columba livia*) / Aline Vilar da Silva Machado – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

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

1. Ritmos circadianos. 2. Óxido nítrico sintase. 3. Hipocampo (Cérebro). 4. Condicionamento clássico aversivo. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Circadian variation in expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in the hippocampus and contextual aversive conditioning in pigeons (*Columba livia*).

Palavras-chave em inglês: Circadian rhythms; Nitric oxide synthase; Hippocampus (Brain); Classical aversive conditioning.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Cláudio Antônio Barbosa de Toledo, Gilberto Fernando Xavier.

Data da defesa: 29/03/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 29 de março de 2011

BANCA EXAMINADORA

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


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Antônio Barbosa de Toledo


Assinatura

Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier


Assinatura

Profa. Dra. Miriam Mendonça Morato de Andrade

Assinatura

Profa. Dra. Maria Filomena Ceolim

Assinatura

“Meus objetos estão desaparecendo e meus amanhã são incertos. Então para que eu vivo? Vivo para cada dia. Vivo o presente. Num amanhã próximo, esquecerei que estive aqui diante de vocês e que fiz este discurso. Mas o simples fato de eu vir a esquecê-lo num amanhã qualquer não significa que hoje eu não tenha vivido cada segundo dele. Esquecerei o hoje, mas isso não significa que o hoje não tem importância”.

Para sempre Alice – Lisa Genova (2009)

Tese dedicada a minha avó

Maria Martins Machado

Sua frágil memória me instigou e inspirou.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Adélcio e Sueli e meu irmão Alan, que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei em minha vida e se dedicaram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos.

Ao meu noivo André, que além de me acompanhar nos fins de semana de experimentos, suportou as minhas crises de ansiedade durante as fases de aperto dos prazos.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório Fernando Canova, Grazielle Fraga-Souza, Jéssica Ianof, Larissa Faria, Ricardo Aguiar, obrigada pela colaboração nos experimentos e pelos momentos de alegria que vocês me proporcionaram durante esse tempo de convívio. E ao técnico de laboratório Washington Luiz Gomes, por sempre estar disponível a me ajudar nos momentos necessários.

A Dra. Miriam Mendonça Morato de Andrade, por ter me apresentado a essa ciência que tanto me instiga a Cronobiologia, sempre lhe serei grata pelos primeiros ensinamentos que recebi.

Ao André S. Vieira, por ter me auxiliado e ensinado a técnica de *Western Blotting* e por juntamente com os outros companheiros de laboratório, Carlos Assis, Elayne Vieira e Rafaela Ignarro, sempre foram prestativos nos momentos que necessitei de ajuda.

Ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada, por ter cedido espaço em seu laboratório para realização dos experimentos de *western blotting*.

Ao Prof. Dr. Marcelo Muscará que cedeu espaço em seu laboratório para realização dos experimentos de atividade enzimática e a Dra. Simone Teixeira por ter me auxiliado na realização desses

experimentos.

A Dra. Ione Salgado por ter cedido alicotas de L-arginina e NADPH para realização dos experimentos de atividade enzimática.

Ao Prof. Cláudio Barbosa de Toledo e aos alunos do Laboratório de Neurociências da Universidade Cidade de São Paulo, que me auxiliaram na padronização da técnica de imunistoquímica.

Ao Dr. Eduardo Rosa Santos e a Clarissa Bueno, pelo auxílio com a estatística do método Cosinor. E aos demais amigos do Grupo Multidisciplinar de Ritmos Biológicos e Desenvolvimento, pelas produtivas discussões na área de Cronobiologia.

E especialmente a Prof. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, pela amizade, orientação, conselhos, carinho e incentivo em sempre buscar o máximo que se pode extrair dos experimentos e de mim mesma.

A FAPESP, que concedeu apoio financeiro através da bolsa de mestrado e de auxílio a projeto regular.

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	xv
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Ritmicidade circadiana	1
1.2 - Aprendizagem e Memória	4
1.2.1 - Condicionamento Contextual Aversivo	5
1.2.2 – Hipocampo de aves e mamíferos	6
1.3 - Glutamato, Sintase Neuronal de Óxido Nítrico, Óxido nítrico e Memória.....	10
1.4 - Ritmicidade, aprendizagem e memória.....	15
2 - OBJETIVOS	19
2.1 - Objetivo geral.....	19
2.2 - Objetivos específicos	19
3 – ETAPA I	20
3.1 – OBJETIVOS	20
3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.2.1 - Sujeitos.....	20
3.2.2 – Fotoperíodo esqueleto.....	21
3.2.3 - Habituação ao contexto do laboratório	22
3.2.4– Decapitação e dissecação do hipocampo	23
3.2.5 – Expressão protéica da nNOS	24
3.1.6- Atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+}	26
3.1.7 – Análise Estatística.....	27

3.3 – RESULTADOS	28
3.3.1 - Densitometria óptica das bandas imunorreativas para nNOS.	28
3.3.2 - Atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+}	30
3.3.3- Oscilação circadiana da expressão protéica da nNOS da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+}	30
3.4- DISCUSSÃO	31
4 – ETAPA II	36
4.1 - OBJETIVOS	36
4.2 - MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.2.1 – Sujeitos	36
4.2.2 – Implante de eletrodos púbicos	37
4.2.3 – Habituação ao Contexto do Laboratório	38
4.2.4 – Treino em Condicionamento Contextual Aversivo	39
4.2.5 – Teste em Condicionamento Contextual Aversivo	40
4.2.6 – Análise comportamental	41
4.2.7 – Perfusão	42
4.2.8 – Imunoistoquímica para células nNOS-positivas	43
4.2.9 – Contagem de células nNOS-positivas	44
4.2.9 - Análise estatística	46
4.3 - RESULTADOS	47
4.3.1 – Análise dos diferentes tipos de comportamentos durante o treino e o teste de condicionamento aversivo ao contexto nos horários ZT4 e ZT16.	47
4.3.2 – Análise da distribuição das células nNOS-positivas	53
4.3 – DISCUSSÃO	61

6 – CONCLUSÕES	70
7 - REFERÊNCIAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

%R	porcentagem rítmica
ADP	difosfato de adenosina
AMPA	α -amino-3-hidroxi 5-metil-4-isoxazol
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
APS	persulfato de amônia
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BH ₄	tetrahidrobiopterina
BL	bloco
BMAL1	gene do receptor translocador nuclear no cérebro e no músculo de hidrocarboneto aromático
CA	Corno de Amon
Ca ²⁺	íon cálcio
Ca ²⁺ /CaM	complexo cálcio-calmodulina
cADPR	difosfato de adenosina ribose cíclica
CaM	calmodulina
CAU	exploração cautelosa
CCK	colecistocinina
cGMP	monofosfato de guanosina cíclica
CLOCK	gene CLOCK

LISTA DE ABREVIATURAS

CONG	congelamento
CREB	elemento responsivo de ligação ao sítio de transcrição de AMPc
DAB	diaminobenzidina
DG	giro denteado
DL	área dorsolateral
DMd	área dorsomedial dorsal
DMv	área dorsomedial ventral
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	ácido etilenoglicoltetracético
eNOS	sintase endotelial de óxido nítrico
EXP	exploração
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FtEn	fotorreceptores encefálicos
FMN	flavina mononucleotídeo
GC	guanilil ciclase
GLU	glutamato
GLUR	receptor de glutamato
GTP	guanosina trifosfato
HpD	hipocampo dorsal
HpV	hipocampo ventral

LISTA DE ABREVIATURAS

HpVL	hipocampo ventrolateral
HpVM	hipocampo ventromedial
iNOS	sintase induzível de óxido nítrico
LENK	leucina encefálica
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
LOC	locomoção
LTP	potenciação de longa duração
MAN	manutenção
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
mNSQ	núcleo supraquiasmático medial
MOV	movimentos isolados
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
Na ⁺	íon sódio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NEWm	núcleo media Edinger Westphal
NGd	núcleo geniculado dorsal
NGv	núcleo geniculado ventral
NMDA	N-metila-D-aspartato
nNOS	sintase neuronal de óxido nítrico
NO	óxido nítrico

LISTA DE ABREVIATURAS

NOS	sintase de óxido nítrico
NPV	núcleo paraventricular
NPY	neuropeptídeo Y
NSQ	núcleo supraquiasmático
PAR	parado
PB	tampão fosfato
PBS	tampão fosfato salina
PER	gene <i>period</i>
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonil
PTIO	2-Fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
Ras	proteína com atividade estimulada extracelularmente
SDS	dodecil sulfato de sódio
SubsP	sustância P
TGH	trato geniculo-hipotalâmico
TRH	trato retino-hipotalâmico
TXPB	tampão fosfato com triton-X100
V	ventrículo
VC	área ventral central

LISTA DE ABREVIATURAS

VIG	vigilância
VIP	polipeptídeo vasoativo intestinal
VL	área ventral lateral
VM	área ventral medial
vNSQ	núcleo supraquiasmático visual
Zenk	acrônimo das primeiras letras das proteínas Zif-268, EGR-1, NGFI-A e Krox24.
ZT	zeitgeber

INDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Esquema da interação entre os osciladores circadianos no sistema temporizador de aves. O modelo resume os papéis do núcleo supraquiasmático medial (mNSQ) e núcleo supraquiasmático ventral (vNSQ) e as interações com as outras estruturas responsáveis pelo sistema temporizador aviário e fatores rítmicos do organismo, como a pineal, fotoreceptores encefálicos (FtEn) e núcleo paraventricular (NPV). As linhas tracejadas representam interações indicadas por evidências indiretas. Linha de astrócitos indicada por corrente cinza de estrelas. NEWm – Núcleo medial Edinger-Westphal, NGd – núcleo geniculado dorsal, NGv – núcleo geniculado ventral, TGH – Trato geniculado-hipotalâmico, TRH – trato retino-hipotalâmico (modificado de CANTWELL & CASSONE, 2006).3

Figura 2 - Secções coronais ilustrando a posição relativa (acima) do hipocampo em macaco (painel da esquerda), rato (painel central) e pombo (painel da direita) e ampliações dessa área (abaixo). Coordenadas antero-posteriores das secções coronais para macaco é A6.6 (SZABO & COWAN, 1984), para ratos é – 4.16 mm para Bregma (PAXINOS & WATSON, 1998), e para pombos é A6.50 (KARTEN & HODOS, 1967). As barras de escala representam uma distância de 2 mm. APH: área parahipocampal; CA1: área CA1 do hipocampo; CA2: área CA2 do hipocampo; CA3: área CA3 do hipocampo; DL: área dorsolateral; DG: giro denteado; DMd: área dorsomedial dorsal; DMv: área dorsomedial ventral; H: hipocampo; HV: hiperestriado ventral; V: ventrículo; VC: área ventral central; VL: área ventral lateral; VM: área ventral medial (Modificado de COLOMBO & BROADBEND, 2000; KAHN et al., 2003).10

- Figura 3 - Esquema ilustrativo da cascata de ativação da nNOS para a síntese do NO. A ativação do neurônio pré-sináptico, resultante do processamento de estímulo, induz a liberação de neurotransmissor glutamato que interage com receptores NMDA na membrana pós-sináptica (1), causando uma alteração na concentração de Cálcio $[Ca^{2+}]$ (2), o que por sua vez interage com a proteína CaM (3). O complexo Ca^{2+}/CaM se liga no seu sítio ativo na proteína nNOS e com os co-fatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH_4), ocorre a doação de elétrons a partir de uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), o que implica na desfosforilação da nNOS pela Calcineurina (5). Sob a ação catalítica da nNOS ativa a partir do nitrogênio da guanidina, presente na L-arginina, são geradas concentrações equimolares de L-citrulina e de NO (6). O NO irá agir em aumentando a produção de cGMP (7), que atua na regulação da neurotransmissão no neurônio pré-sináptico, entre outras coisas. A Proteína quinase A (PKA) e PKC, entre outras proteínas regulam a atividade catalítica fosforilando diversos sítios da nNOS (8)(Modificado de DAWSON *et al.*, 1998).13
- Figura 4 - Fotoperíodo esqueleto: Introdução gradual, caracterizado por iluminação tênue contínua (Luz Vermelha), 01 pulso de luz branca (ZT 0) e 01 pulso de luz branca (ZT 12).22
- Figura 5 - Fotografia do encéfalo de pombo. A área demarcada pelo retângulo corresponde a região do hipocampo dissecada nas coordenadas do Atlas de KARTEN e HODOS (1967), posição ântero-posterior A8.00 a 3.25 com 2 milímetros lateralmente. ..23
- Figura 6 - Médias e erro padrão das análises densitométricas das bandas imunorreativas para nNOS em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a

quantidade total de proteínas. O símbolo * indica diferença significativa comparado com ZT12, ZT16 e ZT20; o símbolo # indica diferença significativa comparado com ZT16 e ZT20. Os dados foram calculados em referência aos valores de ZT0 (ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey-Kramer).29

Figura 7 - Bandas imunorreativas representativas para nNOS e proteínas totais detectadas por coloração com Ponceau S.29

Figura 8 - Média e Erro padrão da quantidade de L-citrulina produzida por pmol/min/mg através da reação da atividade catalítica da NOS dependente de CA^{2+} em amostras de homogenato de hipocampo expressa em razão a média do grupo de ZT0. Não houve diferença significativa entre os horários (ANOVA de uma via).30

Figura 9 A – Esquema ilustrativo do colete de tecido (1) fixado a um plugue de tomada elétrica fêmea (2) para conexão na caixa experimental. As pontas livres dos fios elétrico ligados no plugue (3) eram conectadas aos eletrodos implantados na região púbica dos pombos, em 4 é mostrado a abertura para as asas. B – Esquema ilustrativo de um pombo com colete e eletrodo implantados aos ossos púbicos (CANOVA, 2009).....38

Figura 10 - Esquema representativo da caixa de habituação com paredes brancas e porta lateral; lado frontal construído com um espelho de visão unidirecional emoldurado com madeira (medidas 50x50x50 cm), iluminação fluorescente 9W, onde os animais foram colocados por 4 dias seguidos durante 40 min. (CANOVA, 2009).....39

Figura 11 - Esquema ilustrativo da caixa experimental de condicionamento (medidas 30x40x40) com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira, iluminação luz vermelha 15 W, onde os animais eram colocados e conectados a

uma tomada elétrica macho e então eram apresentados os estímulos referentes a cada grupo experimental. (CANOVA, 2009).....40

Figura 12 - Esquema de cortes frontais de encéfalos de pombos nos níveis A5. 75, A 6.75 e A8.00, onde as áreas coloridas demarcam o hipocampo: o cinza claro indica o hipocampo dorsal, o cinza médio indica o hipocampo ventro-medial e o preto indica o hipocampo ventro-lateral; V indica a localização de Ventrículo (KARTEN & HODOS, 1967). (Modificado de BRITO *et al.*, 2006).....45

Figura 13 - Imagem digitalizada de uma região do hipocampo de pombos onde é demonstrada marcação de células nNOS-positivas utilizada na contagem. Ampliação de 200x. Barra de escala = 100 µm. Setas pretas indicam alguns tipos de marcação considerados para contagem; setas brancas ilustram elementos não considerados para contagem.46

Figura 14 - Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais congelamento, exploração, exploração cautelosa e vigilância durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos Grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. § Diferença significativa em comparação ao grupo CZT4 ($p < 0,0001$); # diferença significativa com CZT16 ($p < 0,0001$); * diferença significativa em comparação ao grupo EZT16 ($p < 0,002$). ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer.48

Figura 15 - Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais manutenção e parado durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os Grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. § diferença significativa em

comparação aos grupos EZT4 ($p < 0,05$). ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer.49

Figura 16 - Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais pré-exploratório, locomoção, movimento isolado durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os Grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. + diferença significativa entre as sessões de treino e teste. ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer.50

Figura 17 - Ocorrência média e erro padrão do congelamento por amostragem de tempo a cada 30 segundos nas sessões de treino e teste para os grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. * diferença significativa em comparação à sessão de teste dos grupos EZT16 e CZT4 ($p < 0,001$). ** significa diferença em comparação as sessões de teste dos grupos CZT4 ($p < 0,001$). # significa diferença significativa em relação ao grupo CZT16. (ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer)51

Figura 18 - Ocorrência média e erro padrão do congelamento distribuído em blocos de 300 segundos durante as sessões treino e teste de condicionamento aversivo ao contexto para os grupos Controle-contexto CZT4 e CZT16 e Condicionados EZT4 e EZT16. Cada ponto representa a ocorrência do comportamento em quatro blocos de registros 5min, 10min, 15min e 20min, mais EPM. (ANOVA para medidas repetidas, seguida de teste de Tukey Kramer).....53

Figura 19 - Média e erro padrão do número de células nNOS-positivas marcadas na área total do hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto. Grupo Condicionado EZT4 e EZT16, Controle Contexto CZT4 e CZT16,

Controle Manutenção MZT4 e MZT16. # significa diferença significativa em comparação aos CZT4 e MZT4. * significa diferença comparativa em relação a CZT16 e MZT16 ($p < 0,05$). (ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni).

.....54

Figura 20 - Média e erro padrão do número de células nNOS-positivas marcadas nas áreas dorsal (HpD) e ventral (HpV) do hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto. Grupo Condicionado EZT4 e EZT16, Controle Contexto CZT4 e CZT16, Controle Manutenção MZT4 e MZT16. *diferença em comparação a HpD de EZT4, CZT16 e MZT6 e HpV de EZT16. # diferença em comparação a HpV de CZT16. (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Newman-Keuls).....55

Figura 21 - Média e erro padrão do número de células nNOS-positivas marcadas nas áreas dorsal (HpD), ventrolateral (HpVL) e ventromedial (HpVM) do hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto. Grupo Condicionado EZT4 e EZT16, Controle Contexto CZT4 e CZT16, Controle Manutenção MZT4 e MZT16. * diferença em comparação as áreas HpD dos grupos EZT16, CZT4, MZT4. # diferença em comparação as áreas HpV de MZT4. ** diferença em comparação a área HpD de EZT4, CZT16, MZT16. *** diferença em comparação a área HpD de EZT16, CZT16, MZT4. ▲ significa diferença em relação a HpVL e HpVM (ANOVA de duas vias, seguido de Teste de Newman-Keuls).....56

Figura 22 - Imagem digitalizada dos tipos neurais marcados positivamente para nNOS no hipocampo de pombos. Ampliação de 200x. Barra de escala = 50 μ m.....57

Figura 23 A - representação esquemática de corte coronal do hipocampo de pombos dividido nas áreas dorsal (HpD) e ventral (HpV). Barra de escala = 1 mm. B - Imagem

digitalizada de secção frontal do hipocampo de pombos marcado positivamente para nNOS. Ampliação de 50x. Barra de escala = 500 μm58

Figura 24 - No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). Barra de escala = 1mm. As imagens digitalizadas são de secções frontais, de uma região do HpD, mostrando o padrão de marcação de células nNOS-positivas para os Grupos Condicionado (EZT4 e EZT16), Grupos Controle-Contexto (CZT4 e CZT16) e Grupos Controle-Manipulação (MZT4 e MZT16). Ampliação 200x. Barra de escala = 100 μm59

Figura 25 - No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). Barra de escala = 1mm. As imagens digitalizadas são de secções frontais, de uma região do HpV, mostrando o padrão de marcação de células nNOS-positivas para os Grupos Condicionado (EZT4 e EZT16), Grupos Controle-Contexto (CZT4 e CZT16) e Grupos Controle-Manipulação (MZT4 e MZT16). Ampliação 200x. Barra de escala = 100 μm60

Tabela 1 -Valores fornecidos pelo método Cosinor (NELSON *et al.*, 1979) para ajuste senoidal da curva aos dados.31

RESUMO

MACHADO, AVS. VARIACÃO CIRCADIANA DA EXPRESSÃO DA SINTASE NEURONAL DE ÓXIDO NITRICO (nNOS) NO HIPOCAMPO E O CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL AVERSIVO EM POMBOS (*Columba livia*); 2011.

A ritmicidade circadiana, expressa na alteração do comportamento e em aspectos morfofisiológicos e moleculares ao longo das 24 horas do dia, é uma das funções básicas dos organismos vivos. Os processos comportamentais e os mecanismos moleculares no hipocampo, que estão envolvidos na aprendizagem e memória, demonstram oscilação circadiana. Vários estudos sugeriram que o condicionamento clássico aversivo é afetado pelo sistema de temporização circadiana e que a oscilação circadiana de vias moleculares específicas é requerida para a consolidação da memória aversiva. O presente trabalho investigou a oscilação circadiana da expressão da nNOS e da atividade da proteína NOS no hipocampo de pombos e as suas relações com a modulação temporal do condicionamento contextual aversivo. Na Parte I, caracterizou-se o padrão temporal da expressão da nNOS, que foi detectada por *Western Blotting* e o padrão temporal da atividade enzimática da NOS, determinada pela quantidade de L-citrulina produzida por minuto e por micrograma de proteína na reação. Na Parte II, nos horários de mínima e máxima atividade enzimática da proteína, pombos foram treinados e testados em condicionamento aversivo ao contexto. As sessões foram gravadas para posterior análise comportamental. Após o teste foi realizada a imunoistoquímica para marcação da nNOS em neurônios do hipocampo. Foi evidenciada ritmicidade circadiana significativa ($p < 0,05$) na expressão proteica da nNOS e na atividade enzimática da NOS, segundo os valores fornecidos pelo método Cosinor para caracterização do padrão temporal. As médias da densitometria óptica dos grupos com horários mais próximos da acrofase – ZT04 (10hs; $0,944 \pm 0,12$) e a batifase - ZT16-(22hs; $0,572 \pm 0,16$) foram significativamente diferentes ($F_{5,18} p < 0,0001$). Os grupos condicionados, em ambos os horários, mostraram maior duração e maior ocorrência do comportamento de congelamento do que os controles ($p < 0,05$). Houve uma variação dia-noite para o comportamento de congelamento nos grupos controles ($p < 0,05$). A marcação de células nNOS-positivas foi maior no hipocampo dos grupos condicionados sendo que o total de células nNOS-positivas na área dorsal do grupo experimental testado à noite foi maior do que aquele observado nos grupos controles e no experimental da manhã ($p < 0,05$). Os dados mostraram que a expressão proteica da nNOS e da atividade enzimática da NOS no hipocampo de pombos mostram uma oscilação que caracteriza um padrão temporal circadiano. Tanto no horário de máxima como no de mínima atividade da nNOS, o condicionamento contextual aversivo resultou em medo condicionado ao contexto e em expressão de células nNOS-positivas no hipocampo que foi maior nos pombos condicionados do que nos controles. Contudo, no hipocampo do grupo testado à noite houve um maior número de células nNOS-positivas. Esse dado estimula questionamento sobre se ocorreria a ativação de mecanismos compensatórios para o aumento da expressão da proteína nNOS, quanto essa é requisitada em situações de baixa disponibilidade.

Palavras Chave: Ritmos circadianos, óxido nítrico sintase; Hipocampo; condicionamento clássico aversivo.

ABSTRACT

MACHADO, AVS. CIRCADIAN VARIATION IN EXPRESSION OF NEURONAL NITRIC OXIDE SYNTHASE (nNOS) IN HIPPOCAMPUS AND CONTEXTUAL AVERSIVE CONDITIONING IN PIGEONS (*Columba livia*); **2011.**

The circadian rhythm, expressed in changing behavior and the morphophysiological and molecular aspects over 24 hours of the day is one of the basic functions of living organisms. The behavioral processes and molecular mechanisms in the hippocampus, which are involved in learning and memory, show circadian oscillation. Several studies have suggested that classical fear conditioning is affected by the circadian timing system and the circadian oscillation of specific molecular pathways is required for the consolidation of aversive memory. This study investigated the circadian oscillation of nNOS expression and activity of NOS protein in the hippocampus of pigeons and their relationship with the temporal modulation of aversive contextual conditioning. In Part I, we have characterized the temporal pattern of nNOS expression, which was detected by Western blotting and temporal pattern of NOS enzyme activity, determined by the amount of L-citrulline produced per minute and per microgram of protein in the reaction. In Part II, at the times of minimum and maximum activity of the protein, pigeons were trained and tested in aversive conditioning to context. The sessions were taped for later behavioral analysis. After the test was performed immunohistochemical for labeling of nNOS in neurons in the hippocampus. Circadian rhythm was evident ($p < 0.05$) in nNOS protein expression and enzyme activity of NOS, according to figures provided by Cosinor method to characterize the temporal pattern. The mean optical density of groups with times closer to the acrophase - ZT04 (10hrs; 0.944 ± 0.12) and nadir - ZT16-(22hs; 0.572 ± 0.16) were significantly different ($F_{5, 18} p < 0.0001$). The groups conditioned in both schedules, showed more frequent and longer duration of freezing behavior than controls ($p < 0.05$). There was a day-night variation for freezing behavior in control groups ($p < 0.05$). Labeling of nNOS-positive cells was higher in the hippocampus of the groups conditioned with total nNOS-positive cells in the dorsal area of the experimental group tested at night was higher than that observed in control groups and experimental group in the morning ($p < 0.05$). The data showed that nNOS protein expression and enzymatic activity of NOS in the hippocampus of pigeons show an oscillation that characterizes a circadian temporal pattern. Both at the time of maximum as the low activity of nNOS, the aversive contextual conditioning resulted in fear conditioning to context and expression of nNOS-positive cells in the hippocampus was higher in pigeons conditioned than in controls. However, in the hippocampus of the group tested in the evening there was a greater number of nNOS-positive cells. This fact encourages questioning of whether there would be activation of compensatory mechanisms for the increased expression of nNOS protein, as this is required in situations of low availability.

Key-words: Circadian rhythms, nitric oxide synthase, hippocampus, classical aversive conditioning.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Ritmicidade circadiana

A organização temporal de um ser vivo se expressa de duas formas: enquanto reação a estímulos externos e enquanto a ritmicidade. Essa segunda forma é menos evidente, mas nem por isso menos importante (MENNA-BARRETO, 1997). A ritmicidade biológica surge como manifestação de propriedades antecipatórias nos organismos a ciclos geofísicos, conferindo um valor adaptativo (PALUDETTI, 1988).

A ritmicidade circadiana, expressa na alteração do comportamento, em aspectos morfofisiológicos e moleculares ao longo das 24 horas do dia (MARQUES, 1987) é uma das funções básicas dos organismos vivos. Constitui um mecanismo antecipatório aos eventos ambientais, desenvolvido ao longo da evolução em um ambiente no qual a adaptação aos ciclos de rotação e translação da Terra é fundamental.

A oscilação circadiana está presente nos diferentes tecidos e células dos organismos, que respondem a um nível hierárquico de organização (REPERT & WEAVER, 2002). Em mamíferos, o principal marca-passo circadiano gerador da ritmicidade são os núcleos supraquiasmáticos (NSQ), que se localizam no hipotálamo, bilateralmente ao terceiro ventrículo (MOORE *et al.*, 2000). Os NSQs possuem três divisões: a divisão dorsomedial, nuclear e ventrolateral e têm como principal sinal para os ajustes de sua função de marca-passo circadiano o ciclo claro - escuro (MOORE *et al.*, 2000). A remoção cirúrgica dos NSQs leva a dessincronização circadiana da atividade locomotora, sono-vigília, temperatura e níveis plasmáticos de hormônios de ratos (INOUE & KAWAMURA, 1982; MOORE *et al.*, 1979; RUSAK & ZUCKER, 1979). Outras estruturas neurais envolvidas no controle da

variação circadiana são as retinas, como uma importante via aferente e a pineal, como via de eferência de sinalização de ritmicidade para o organismo (PITTENDRIGH, 1993).

Diferentes dos mamíferos, as aves recebem informação fóptica pela retina, pineal e fotorreceptores encefálicos os quais interagem através de via de entrada e saída e através da sinalização neuroendócrina por meio da melatonina com o hipotálamo atuando na sincronização rítmica (CASSONE & MENAKER, 1984; OLCESE, 2003; TAKAHASHI & MENAKER, 1982; TUREK, 1994). Há assim três osciladores circadianos autônomos e anatomicamente distintos: retina (BINKLEY, *et al.*, 1980), glândula pineal (TAKAHASHI *et al.*, 1980) e o oscilador hipotalâmico (TAKAHASHI & MENAKER, 1982). Esse último, que está localizado na região lateral do hipotálamo, parece desempenhar um papel crucial, pois pardais perdem gradativamente a oscilação em condições constantes após lesão nessa região. Além disso, animais cegos e sem a pineal ainda mostram sincronização residual antes de se tornarem arrítmicos (BRANDSTÄTTER & ABRAHAM, 2003).

Estudos anatômicos do cérebro de aves descreveram um grupo de células adjacentes à base do terceiro ventrículo, diretamente acima do quiasma óptico, essa estrutura é referida na literatura por diversos nomes, entre os quais o de núcleo supraquiasmático medial (mNSQ). Há também um núcleo lateral no hipotálamo, que é o primeiro, se não o único a receber projeções da retina, que é chamado de núcleo supraquiasmático visual (vNSQ). Em conjunto, essas estruturas formam um complexo supraquiasmático em aves (Fig. 1) (CANTWELL & CASSONE, 2006).

Considera-se a atuação de um sistema de temporização com múltiplos osciladores, que também é encontrado em outros vertebrados, sendo que a centralização em uma estrutura organizadora predominante, como ocorre no sistema circadiano em mamíferos é uma exceção (GWINNER & BRANDSTÄTTER, 2001).

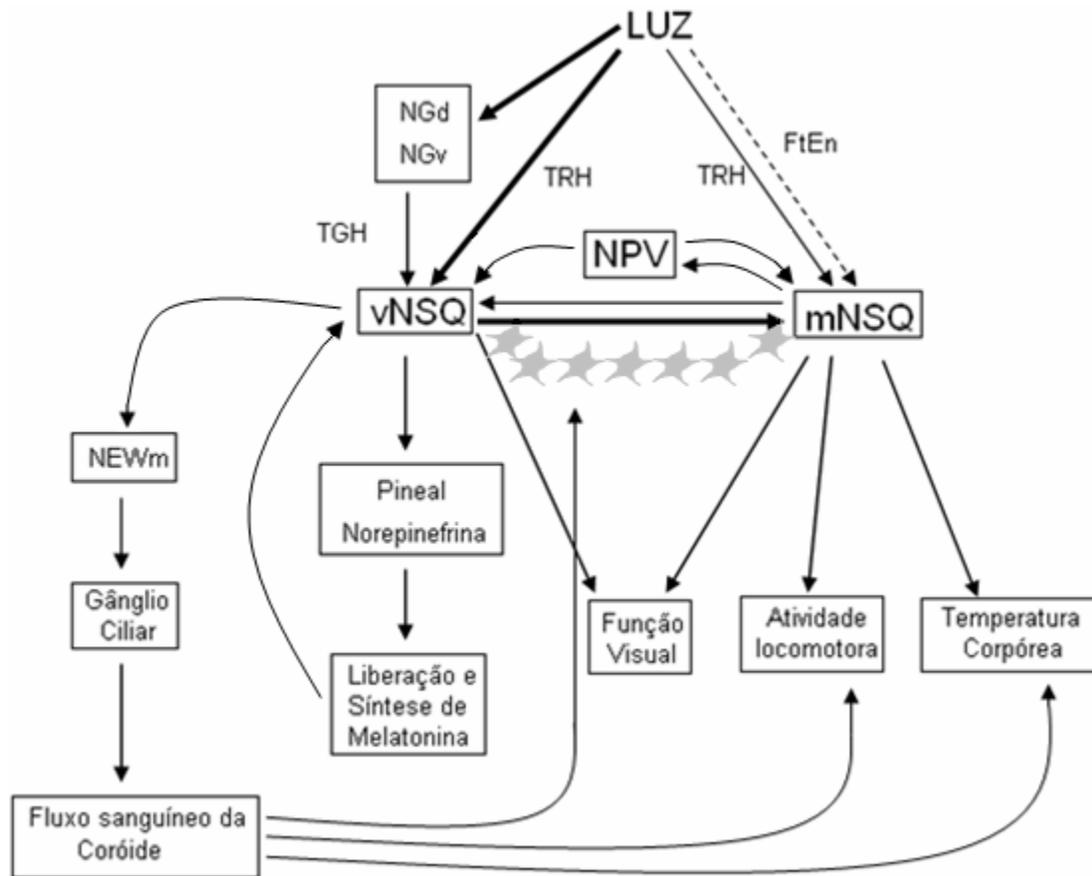


Figura 1- Esquema da interação entre os osciladores circadianos no sistema temporizador de aves. O modelo resume os papéis do núcleo supraquiasmático medial (mNSQ) e núcleo supraquiasmático ventral (vNSQ) e as interações com as outras estruturas responsáveis pelo sistema temporizador aviário e fatores rítmicos do organismo, como a pineal, fotoreceptores encefálicos (FtEn) e núcleo paraventricular (NPV). As linhas tracejadas representam interações indicadas por evidências indiretas. Linha de astrócitos indicada por corrente cinza de estrelas. NEWm – Núcleo medial Edinger-Westphal, NGd – núcleo geniculado dorsal, NGv – núcleo geniculado ventral, TGH – Trato genículo-hipotalâmico, TRH – trato retino-hipotalâmico (modificado de CANTWELL & CASSONE, 2006).

Esse sistema de múltiplos osciladores também é encontrado em outros vertebrados, sendo que a centralização em uma estrutura organizadora predominante, como ocorre no sistema circadiano em mamíferos é uma exceção (GWINNER & BRANDSTÄTTER, 2001).

As bases celulares e moleculares do sistema de temporização são bem conservadas em todas as classes animais e principalmente entre os vertebrados (PANDA *et al.* 2002). As aves compartilham do mesmo mecanismo no sistema de temporização que envolve a interação entre os genes relógio, CLOCK, BMAL1, PER1, PER2 e PER3 com suas alças de

retro alimentação positivas e negativas (YOSHIMURA *et al.*, 2000). E o conjunto dos osciladores temporais das aves, mesmo se organizando de forma diferente dos mamíferos, garante as essas expressar adaptações que permitem seu sucesso frente a diferentes pressões ambientais (CASSONE *et al.*, 2009).

Entre outros fatores, o sistema circadiano é indicado como um dos componentes que regulam a formação e a consolidação da memória (ECKEL-MAHAN & STORM, 2009).

1.2 - Aprendizagem e Memória

A aprendizagem é uma mudança adaptativa do comportamento que resulta de uma experiência. A memória é um processo que, a partir da aquisição gerada por essa experiência, envolve a codificação, o armazenamento (KANDEL *et al.*, 2000, BONINI *et al.*, 2007), a evocação e a persistência da informação sobre as relações organismo-ambiente, sendo que cada fase pode ser caracterizada por alterações nos níveis celular, molecular e comportamental (CAMMAROTA *et al.*, 2007; KANDEL, 2001). Após a codificação, o armazenamento da informação pode ocorrer por um curto período de tempo. A memória de curta duração se refere aos processos de memória que retêm a informação temporariamente, até que seja esuqcida ou se torne incorporada em um armazenamento de longa duração (SQUIRE & KANDEL, 2003). A memória de curta duração pode persistir por alguns segundos, minutos, horas ou mais até que a informação seja mantida estável na memória de longa duração, que pode persistir por horas, dias ou anos (memória de longo prazo ou de longa duração) (KANDEL *et al.*, 2000; SQUIRE & KANDEL, 2003). Para que a memória de curta duração seja transformada em memória de longa duração são necessárias alterações celulares e moleculares que resultam na potenciação sináptica de longo prazo (LTP) (NEUHOFF *et al.*, 1975; HALEY *et al.*, 1993). A LTP é caracterizada pelo aumento

prolongado da resposta sináptica de um neurônio, quando o neurônio pré-sináptico é estimulado por vários disparos curtos de alta frequência. Esse fenômeno é típico de sinapses excitatórias glutamatérgicas, envolvendo principalmente os receptores α -amino-3-hidroxi 5-metil-4-isoxazol (AMPA) e N-metila-D-aspartato (NMDA). Esses são canais iônicos para os íons Na^+ e Ca^{2+} , os quais possuem uma complexa interação com enzimas, como a Calmodulina (CaM), sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS), Proteína quinase C (PKC), entre diversas outras e ativação da transcrição de genes, gerando assim uma plasticidade sináptica nos circuitos das estruturas envolvidas no processamento da memória (KANDEL *et al.*, 2001).

Desse modo, o processo de formação de memórias depende de uma série de eventos bioquímicos, que pode ser dividida em uma fase independente da transcrição de mRNA e de síntese de proteínas e uma fase dependente da transcrição de mRNA e de síntese de proteínas, com duração de horas, dias ou anos (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007). Para consolidação da memória de longa duração é necessário que ocorra a LTP. Acredita-se que o primeiro passo para a formação da memória, que garante a fase tardia da LTP seja mediado pelo óxido nítrico (NO) (MCGAUGH & IZQUIERDO, 2000).

1.2.1 - Condicionamento Contextual Aversivo

No condicionamento clássico aversivo ocorre uma relação de contingência entre um estímulo discreto como, luz ou som, com um estímulo aversivo – como o choque, eliciador de uma série de comportamentos defensivos biologicamente determinados. Com o pareamento dos dois estímulos, o som adquire propriedades de um estímulo condicionado que é capaz de eliciar as respostas incondicionadas ao choque (LANDEIRA-FERNANDES, 1996). Nesta situação o contexto também adquire propriedades condicionadas decorrentes da

apresentação do estímulo aversivo incondicionado. A aprendizagem decorrente desse condicionamento clássico aversivo geralmente é referida como medo condicionado por que é expressa por comportamentos do repertório de defesa, tal como o comportamento de congelamento ao contexto do condicionamento e ao som, como também pela magnitude de respostas de sobressalto ao som, potenciação de comportamentos exploratórios, acompanhados por reações neurovegetativas, como o aumento da pressão sanguínea, taquicardia, elevação da taxa respiratória, midríase, alterações hormonais e alterações na sensibilidade a dor (PILZ & SCHNITZLER, 1996). Após o pareamento choque-contexto, os estímulos contextuais também passam a induzir um estado emocional, expresso pelo aumento do congelamento ao contexto (LE DOUX, 1992). De fato, o condicionamento contextual aversivo já foi caracterizado em diversos filós, tendo sido demonstrado em insetos, anelídeos, moluscos, peixes, aves e mamíferos (LE DOUX, 2000).

O congelamento é um comportamento robusto, bem definido e conservado evolutivamente, caracterizando-se em roedores pela ausência de movimentos, inclusive de movimentos das vibrissas, exceto os movimentos relacionados à respiração, geralmente com uma postura encolhida de encontro com o chão da caixa (FANSELOW & BOLLES, 1979; MARCHAND *et al.*, 2003). Em pombos, o congelamento é definido como uma postura de imobilidade tensa, encolhida ou inclinada, em um dos cantos da caixa, com apoio do peito em um das paredes ou piso da caixa, base alargada, desnivelamento das asas em relação à cauda, extensão restrita do pescoço, cabeça direcionada a um ponto fixo, midríase, e respiração ofegante (BRITO *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 1999).

1.2.2 – Hipocampo de aves e mamíferos

Diversas estruturas e sistemas neurais estão envolvidos no condicionamento

contextual aversivo e com o comportamento de congelamento em roedores e em aves (FENDT & FANSELOW, 1999; BRITO *et al.*, 2006). A amígdala é considerada como o componente central do circuito neural do medo, especialmente pela memória emocional aversiva sinalizada ou discriminada (LE DOUX, 1992), uma vez que o bloqueio farmacológico de sua atividade ou lesão localizada nela prejudicam memória de medo (MISERENDINO *et al.*, 1990; RABINAK *et al.*, 2008). Tendo sido evidenciado a participação da amígdala na recuperação da memória relacionada as associações som - estímulo aversivo (DAVIS, 1992).

Com o trabalho de Kim e Fanselow (1992), identificou-se a participação essencial do hipocampo na aquisição e consolidação da memória de medo contextual em ratos, estimulando estudos com roedores a fim de analisar o papel do hipocampo na memória contextual aversiva por meio de lesões hipocampais. Em pombos também foi comprovado uma redução na ocorrência de congelamento devido a lesões hipocampais realizadas 24 horas após o condicionamento clássico aversivo (REIS *et al.*, 1999). Portanto, o hipocampo revela-se funcionalmente essencial no armazenamento da memória aversiva ao contexto em diferentes espécies, sendo fundamental para a consolidação da representação sensorial e cognitiva do contexto (ANAGNOSTARAS *et al.*, 2001; BAST *et al.*, 2001; IZQUIERDO & MEDINA, 1993; MAREN *et al.*, 1997; PHILLIPS & LE DOUX, 1992; MEI *et al.*, 2005).

A Formação Hipocampal é um conjunto de estruturas bilaterais prosencefálicas localizadas nos lobos temporais que, em mamíferos, inclui o Hipocampo propriamente dito (corno de Ammon), o Giro Denteado, o Subículo e o córtex entorrinal (BUTLER & HODOS, 1996). Em mamíferos, o Hipocampo é dividido em quatro áreas: a região CA1 ocupa a maior parte da região dorsal e a CA3 se estabelece na maior porção da região ventral, enquanto que CA2 fica entre a CA1 e a CA3 e a região CA4, fica na transição entre o Hipocampo e o Giro Denteado (BEAR *et al.*, 2002; CARLSON, 2001; KANDEL *et al.*, 2000). As estruturas

constituintes da formação hipocampal estão interligadas por um circuito excitatório unidirecional, com três vias principais: a via perfurante, constituída por fibras do córtex entorrinal que estabelecem sinapses com células granulares do giro denteado, a via das fibras musgosas que se estendem das células granulares do giro denteado e realizam sinapses com células piramidais da região CA3 do hipocampo e a via das fibras colaterais de Schaffer, constituída por axônios da região CA3 que se conectam por sinapses a CA1. Esse circuito é referido como circuito tri-sináptico do hipocampo. (DOLLER & WEIGHT, 1982; HERRERAS *et al.*, 1987; KANDEL *et al.*, 2000; CARLSON, 2001).

A formação hipocampal de aves é considerada homóloga à de mamíferos, nas características embriológicas, aspectos topográficos e neuroquímicos (COLOMBO & BROADBEND, 2000) (Fig. 2). Tanto em mamíferos quanto em aves o hipocampo margeia o ventrículo lateral; em aves, na porção dorso medial do cérebro anterior encontra-se a área para-hipocampal localizada dorso-lateralmente, e o hipocampo propriamente dito, localizado ventro-medialmente (ATOJI *et al.*, 2002; ATOJI & WILD, 2006; CAMPBELL & HODOS, 1970; SZÉKELY, 1999). O hipocampo de aves apresenta uma região dorsal, subdividida em dorsomedial e dorsolateral e uma região ventral que compreende uma área com colunas de células que formam um “V” e uma área triangular-medial localizada entre os braços da área em “V” (ATOJI & WILD, 2006; ATOJI *et al.*, 2002, ERICHSEN *et al.*, 1991). Na área ventral, originam-se comissuras que se projetam para o Hipocampo contralateral. Conexões intrínsecas no hipocampo de pombos sugerem a existência de um circuito tri-sináptico, comparável ao existente no hipocampo de mamíferos, tendo a entrada sensorial na área dorsolateral, como ocorre no córtex entorrinal. Da área dorsolateral seguem projeções para área dorsomedial, como ocorrem nas projeções pela via perfurante do córtex entorrinal para o giro denteado. Da área dorsomedial seguem projeções para as áreas ventromedial e

ventrolateral, como ocorre do giro denteado para a área CA3. Da área ventrolateral seguem projeções ipsilateral para área ventromedial e para a área ventrolateral contralateral, como ocorrem em mamíferos nas 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 área dorsomedial. O *subiculum* e a área dorsomedial se projetam para fora da formação hipocampal em mamíferos e aves, respectivamente (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, arcopálido, septo lateral e regiões meso-diencefálicas. O hipocampo de aves tem origem embrionária na zona subventricular da eminência ganglionária situada na região dorsomedial do telencéfalo da mesma forma que o hipocampo de mamíferos (PARNAVELAS, 2000). As conexões aferentes e eferentes e a neuroquímica são similares. Krebs *et al.*, (1991) descreveram uma região com terminais de fibras mediais aferentes, na qual se encontram fibras imunorreativas para colecistocinina (CCK), leucina encefalina (LENK), polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP), substância P (SubsP) e neuropeptídeo Y (NPY). Há também a semelhança na distribuição dos neurotransmissores encontrados com presença de fibras colinérgicas, catecolaminérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas e óxido nítrico (NO). Além disso, o posicionamento do hipocampo de pombos o torna um modelo experimental vantajoso em relação aos mamíferos, pois manipulações realizadas através da injeção de drogas intrahipocampal através de cânulas ou lesões podem ser mais eficientemente direcionadas, não lesando os demais tecidos encefálicos ao redor.

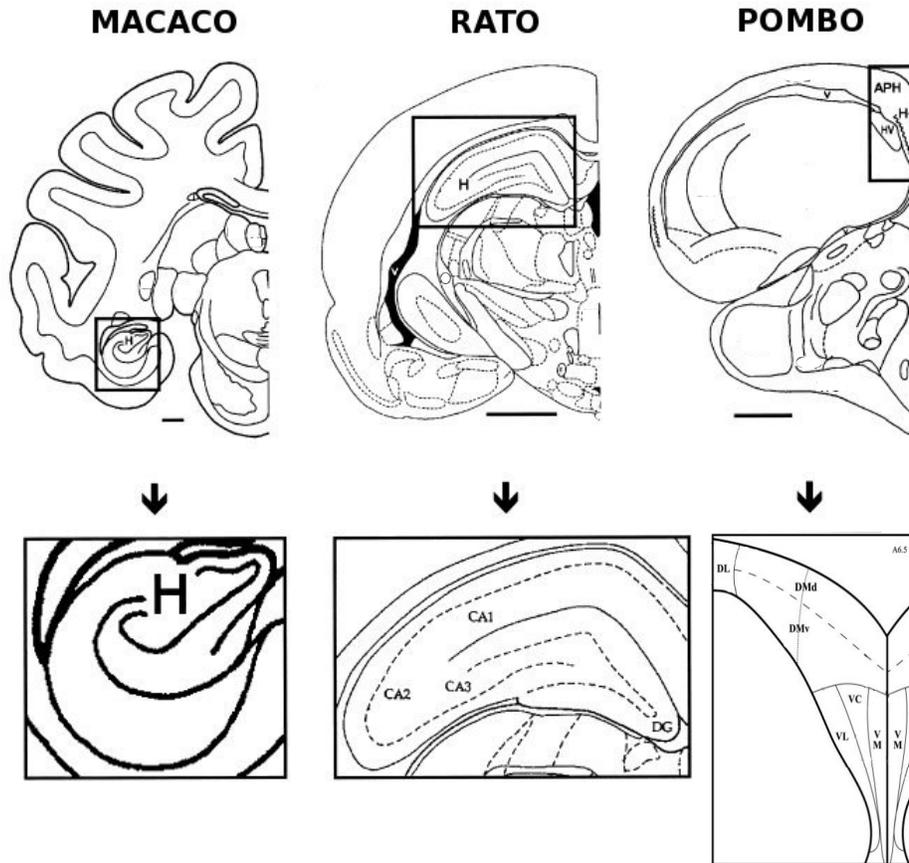


Figura 2 - Secções coronais ilustrando a posição relativa (acima) do hipocampo em macaco (painel da esquerda), rato (painel central) e pombo (painel da direita) e ampliações dessa área (abaixo). Coordenadas antero-posteriores das secções coronais para macaco é A6.6 (SZABO & COWAN, 1984), para ratos é - 4.16 mm para Bregma (PAXINOS & WATSON, 1998), e para pombos é A6.50 (KARTEN & HODOS, 1967). As barras de escala representam uma distância de 2 mm. APH: área parahipocampal; CA1: área CA1 do hipocampo; CA2: área CA2 do hipocampo; CA3: área CA3 do hipocampo; DL: área dorsolateral; DG: giro denticado; DMd: área dorsomedial dorsal; DMv: área dorsomedial ventral; H: hipocampo; HV: hiperestriado ventral; V: ventrículo; VC: área ventral central; VL: área ventral lateral; VM: área ventral medial (Modificado de COLOMBO & BROADBEND, 2000; KAHN et al., 2003).

1.3 - Glutamato, Sintase Neuronal de Óxido Nítrico, Óxido nítrico e Memória.

O glutamato tem três tipos de receptores ionotrópicos, o receptor NMDA, o AMPA e o Ácido Caínico (Kainato) (MAYER & ARMSTRONG, 2004). O receptor NMDA tem características especiais e controla um canal que permite a entrada de íons Na^+ e Ca^{2+} . A abertura do canal ocorre após o deslocamento do íon magnésio, dependente da despolarização da membrana, que resulta da abertura dos canais de Na^+ dos receptores AMPA; o canal do receptor NMDA permite também o influxo de Ca^{2+} e a ativação de

processos de plasticidade celular.

O receptor NMDA tem uma ampla distribuição pela medula espinhal, córtex cerebral e hipocampo, sendo que na região CA1 do hipocampo de ratos é a que apresenta uma maior densidade desses receptores (MONAGHAN & COTMAN, 1985). ROSINHA *et al.* (2009) analisaram as características celulares do hipocampo de pombos, focalizando a marcação de subunidades de receptores de glutamato do tipo AMPA. Verificou que as subunidades desse receptor GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 na formação hipocampal de pombos distribuem-se em populações neuronais na área das fibras mediais, na área em forma de V, na área dorsomedial e na área do hipocampo dorsolateral.

Assim, processos sinápticos mediados por glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório do hipocampo, são indicados como essenciais para a ativação de mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao condicionamento de medo (MACIEJAK *et al.*, 2003; FIGUEREDO *et al.*, 2008). O bloqueio de receptores NMDA por meio de antagonistas administrados intra-hipocampo, pré- ou pós-treino, em ratos e camundongos afetou a aquisição (BAST *et al.*, 2003; BARDGETT *et al.*, 2003; QUINN *et al.*, 2005;) e a consolidação da memória de um contexto aversivo (FRANKLAND *et al.*, 2004). Do mesmo modo, a administração de antagonistas dos receptores AMPA causou prejuízos na memorização de diferentes situações de aprendizagem com estímulos aversivos em roedores (JERUSALINSKY *et al.*, 1992; BIANCHIN *et al.*, 1993; GOULD & LEWIS, 2005) e em aves (BURCHULADZE & ROSE, 1992; RICKARD *et al.*, 1994).

A importância dos processos de plasticidade sináptica mediados pela transmissão glutamatérgica tem sido muito relacionada às evidências que fundamentam o papel dos receptores de glutamato na LTP. O aumento do Ca^{+2} intracelular decorrente da ativação dos

receptores NMDA permite a ativação do complexo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$ e de vias de sinalização envolvidas com o fortalecimento sináptico de longa duração. A fase inicial da LTP caracteriza-se pelo aumento do Ca^{+2} intracelular, formando o complexo $\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$, e assim ativando as vias de sinalização que envolvem a nNOS e por consequência a síntese do NO (KANDEL *et al.*, 2001).

O NO é um gás produzido a partir da reação do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular e de uma família de enzimas chamadas NOS (MONCADA & HIGGS, 1993), agindo como um neurotransmissor retrógrado na LTP hipocampal (HALEY *et al.*, 1993) uma vez que se difunde pelo citosol e atravessa facilmente as membranas lipídicas e atua no neurônio pré-sináptico. Ali, o NO ativa a guanilil ciclase (CG) com subsequente conversão do guanosina trifosfato (GTP) para monofosfato de guanosina cíclica (cGMP), o qual atua nas vias de sinalização intracelular aumentando a liberação do glutamato e conseqüentemente, a resposta pós-sináptica (SZABÓ, 1996). Essa relação do NO com o cGMP pode também afetar a abertura direta de canais de cálcio e sódio, ativação de proteínas quinases dependentes de cGMP, ativação de fosfodiesterases dependentes de cGMP e subsequente efeitos mediados por AMP cíclico (cAMP) e ações do difosfato de adenosina ribose cíclica (cADPR) (GARTHWAITE & BOULTON, 1995).

Como a sua síntese é mediada pela NOS (Fig. 3), a maior parte do conhecimento sobre as funções do NO decorre de investigações sobre a atividade da NOS. São descritas três isoformas de NOS: a NOS neuronal (nNOS) é expressa no sistema nervoso central e periférico (MONCADA *et al.*, 1997), a NOS endotelial (eNOS) inicialmente detectada em células endoteliais, além de miócitos e músculo liso vascular (MAYER *et al.*, 1991; SCHULZ & TRIGGLE, 1994) e a NOS induzível (iNOS) que é induzida por citocinas ou

lipopolissacarídeos (GARTHWAITE, 2008). As isoformas nNOS e eNOS são chamadas de constitutivas porque estão presentes em condições fisiológicas e são dependentes do Ca^{2+} , já a iNOS é expressa em situações patológicas em resposta a estímulos inflamatórios e é independente de Ca^{2+} (PRAST & PHILIPPU, 2001).

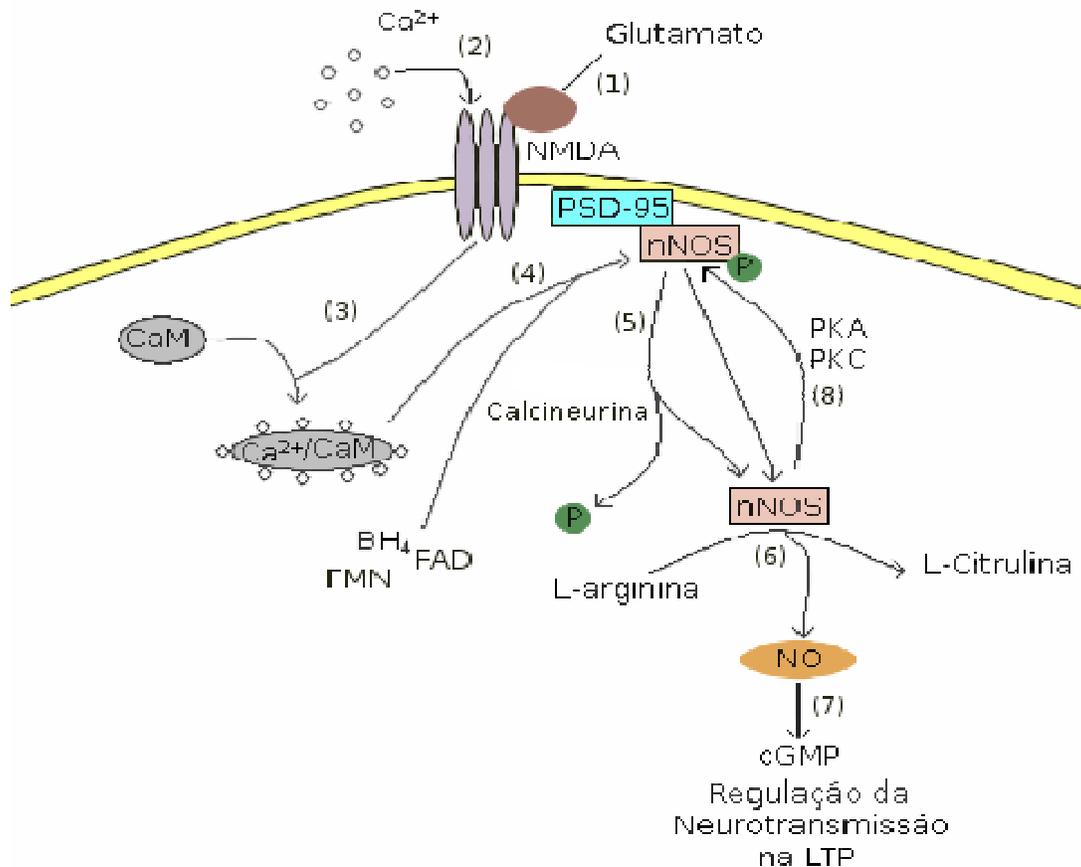


Figura 3 - Esquema ilustrativo da cascata de ativação da nNOS para a síntese do NO. A ativação do neurônio pré-sináptico, resultante do processamento de estímulo, induz a liberação de neurotransmissor glutamato que interage com receptores NMDA na membrana pós-sináptica (1), causando uma alteração na concentração de Cálcio [Ca^{2+}] (2), o que por sua vez interage com a proteína CaM (3). O complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se liga no seu sítio ativo na proteína nNOS e com os co-fatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e tetrahydrobiopterina (BH_4), ocorre a doação de elétrons a partir de uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), o que implica na desfosforilação da nNOS pela Calcineurina (5). Sob a ação catalítica da nNOS ativa a partir do nitrogênio da guanidina, presente na L-arginina, são geradas concentrações equimolares de L-citrulina e de NO (6). O NO irá agir em aumentando a produção de cGMP (7), que atua na regulação da neurotransmissão no neurônio pré-sináptico, entre outras coisas. A Proteína quinase A (PKA) e PKC, entre outras proteínas regulam a atividade catalítica fosforilando diversos sítios da nNOS (8) (Modificado de DAWSON *et al.*, 1998).

A nNOS é uma enzima que tem em seu domínio N-terminal um sítio heme catalisador e um co-fator, tetrahydrobiopterina (BH₄), enquanto o domínio C-terminal que contém FMN, FAD e NADPH e sítios de ligação que servem como doadores de elétrons. Entre os dois domínios funcionais há um sítio de ligação para a CaM. A ligação da CaM permite o fluxo de elétrons das flavinas ao heme (ABU-SOUD & STUEHR, 1993). Portanto, a nNOS é dependente de Ca²⁺/CaM, e se relacionando intimamente com os receptores NMDA (HAYASHI *et al.*, 1999; BAADER & SCHILLING, 1996; GUIMARÃES *et al.*, 2005). A nNOS possui 1434 aminoácidos, com peso molecular de 155 KDa (HALL *et al.*, 1994). O monômero da NNOS é inativo, o dímero é ativo e a dimerização requer a BH₄, heme e a ligação da L-arginina (ZHOU & ZHU, 2009). Nos neurônios são encontradas proteínas solúveis e particuladas (ARBONES *et al.*, 1996), sendo encontradas principalmente nos terminais pós-sinápticos, estando envolvida na liberação de neurotransmissor, desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica e regulação gênica (FORSTERMANN *et al.*, 1998).

Tal como acontece com a administração de antagonistas dos receptores NMDA e AMPA, a administração pré- ou pós-treino de um inibidor de NOS causa déficit na aprendizagem e memória de ratos em diferentes tarefas (CUNHA *et al.*, 2005; CALIXTO *et al.*, 2001). A administração de L-arginina (substrato da NOS) previne os prejuízos causados pelo inibidor (BARATTI & KOPF, 1996; CUNHA *et al.*, 2005), e os doadores de NO facilitam a formação de memória em ratos (ZOU *et al.*, 1998). Camundongos *knockout* para o gene nNOS apresentam prejuízo no desempenho cognitivo (KIRCHNER *et al.*, 2004).

A imunorreação para a nNOS também é encontrada em diversas regiões cerebrais de aves, entre elas o hipocampo (BRÜNING *et al.*, 1994; SUÁREZ *et al.*, 2006). Com a administração de um inibidor seletivo da nNOS, o 7-nitroindazole, imediatamente após a

sessão de treino de condicionamento clássico aversivo ao contexto em pombos, ocorre uma diminuição nas reações comportamentais de defesa (congelamento) (DENADAI, 2008). Silva (2007) demonstrou que uma correlação positiva entre o número de treinos de aprendizagem espacial de escolha alimentar e a distribuição de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos.

1.4 - Ritmicidade, aprendizagem e memória

Os processos de aprendizagem e memória apresentam características de oscilação circadiana, como já descritas na habituação e sensibilização das respostas a estímulos acústicos em função do horário do teste (VALENTINUZZI & FERRARI, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 2004), alterações no condicionamento clássico aversivo, manipulando condições de iluminação e fase do ciclo (FERRARI *et al.*, 1999; VALENTINUZZI *et al.*, 2001); variação da aquisição, retenção e evocação de memória conforme o momento do treino (RALPH *et al.*, 2002, CAIN *et al.*, 2004; CAIN *et al.*, 2008; VALENTINUZZI *et al.*, 2008) e com evidências moleculares de transcrição rítmica de genes receptores de serotonina e corticosteróides (HOLMES *et al.*, 1995), a variação da atividade de proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) e adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (ECKEL-MAHAN *et al.*, 2008), ambos no hipocampo.

O condicionamento em diferentes horários do dia demonstra que o ritmo circadiano do animal e/ou a hora do dia modula os processos de aquisição, retenção e evocação (RALPH *et al.*, 2002). Evidências experimentais suportam argumentos de existência de fases ótimas para a aprendizagem de determinadas tarefas em humanos e animais (MAY & HASHER, 2002) e de déficit de retenção conforme o intervalo entre o treino e a recordação em ratos (KAMIN, 1957), além de déficit de múltipla retenção na esQUIVA inibitória em ratos com lesão

no núcleo supraquiasmático (STEPHAN & KOVACEVIC, 1978).

Os trabalhos com o fenômeno de estampagem temporal revelam que o horário em que foi aprendida uma determinada tarefa passa a fazer parte do conjunto de informações aprendidas, de tal forma que os animais apresentam melhor desempenho quando treinados e testados em um mesmo horário, em comparação com animais que foram treinados e testados em horários diferentes (RALPH *et al.*, 2002; CAIN *et al.*, 2004; CAIN *et al.*, 2008, VALENTINUZZI *et al.*, 2008). O conceito de tempo como um sinal contextual considera que isso ocorre em função do estado de ritmicidade interna e não somente em função de pistas externas (CAIN *et al.*, 2008). Essa estampagem temporal tem um valor adaptativo, garantido que o animal se recorde do momento que será mais provável encontrar um determinado alimento ou predador (DAAN, 2000; VALENTINUZZI *et al.*, 2008).

Os mecanismos e estruturas do encéfalo responsáveis pelas relações temporais do contexto no condicionamento ainda não estão esclarecidos (CAIN *et al.*, 2004, ECKELMAHAN & STORM, 2009). Essa ritmicidade pode estar associada à transmissão de informação endógena dos NSQ através de conexões neuronais diretas e indiretas, neurohormônios, secretados no líquido cerebrospinal ou via neurohumoral, através da glândula pineal (JOLKKONEN *et al.*, 1988; DOLLINS *et al.*, 1993). Porém, na ausência dos NSQ, o animal se torna arritmico, mas ainda é capaz de demonstrar o fenômeno da estampagem temporal na aprendizagem de preferência condicionada por lugar, envolvendo tanto a preferência do lugar associado à recompensa ou esquia associado ao estímulo aversivo (KO, 2001; CAIN *et al.*, 2004).

Os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos, que participam dos circuitos envolvidos em processos de recompensa e de despertar, são possíveis candidatos a mediar essa

sinalização temporal. Alterações crônicas na transmissão dopaminérgica estão relacionadas a alterações no ritmo circadiano de locomoção e de alimentação (CAIN *et al.*, 2004). Mas diversas outras vias também podem estar envolvidas nessa sinalização (CAIN *et al.*, 2008).

Eckel-Mahan *et al.* (2008) demonstraram uma oscilação circadiana da fosforilação de duas isoformas de MAPK e AMPc no hipocampo de camundongo, paralelas a mudanças na atividade das proteínas com atividade estimulada extracelularmente (Ras) e do elemento responsivo de ligação ao sítio de transcrição do AMPc (CREB). Além disso, observaram que em camundongos treinados e testados em horários que correspondiam aos valores mais baixos do ritmo de atividade da MAPK apresentaram déficit no condicionamento aversivo ao contexto. Esses pesquisadores sugeriram que a persistência da memória de longo prazo pode ser dependente da reativação da via de sinalização intracelular envolvendo AMPc/MAPK/CREB no hipocampo. Portanto, as vias bioquímicas básicas para memória teriam que ser reativadas repetidamente para sustentar os níveis de proteínas que são requeridas para a persistência da memória (ECKEL-MAHAN *et al.*, 2008).

Também é interessante colocar que Canova (2009) relatou uma variação dia-noite na expressão da imunorreatividade neuronal para a proteína Zenk, produto da ativação da transcrição do gene de expressão imediata *zenk*, que também envolve processos sinápticos mediados por glutamato, sendo que pombos expressaram déficit de memória aversiva contextual no horário noturno em que houve menor imunomarcagem de células Zenk-positivas no hipocampo.

Embora seja amplamente aceito que os ritmos circadianos em geral, e os ciclos de sono, em especial, regulam a robustez da capacidade de memória, o estudo de Eckel-Mahan e colaboradores (2008) sugere que o ciclo circadiano de vias de sinalização molecular

específicas pode estar subjacente a este fenômeno cognitivo geral (ROTH & SWEATT, 2008). Essa consideração relaciona-se com evidências de que repetidos ciclos de síntese do receptor de glutamato do tipo NMDA seriam requeridos para consolidação da memória e sua manutenção (CUI *et al.*, 2004). A sintase de óxido nítrico (NOS) também apresenta uma atividade enzimática rítmica no hipocampo, hipotálamo, cerebelo, tronco encefálico, participando de mecanismos de regulação do ciclo vigília/sono (AYERS *et al.*, 1996; TUNÇTAN *et al.*, 2002).

O conjunto desses dados indica que processos sinápticos mediados por glutamato que ocorrem no hipocampo são importantes para a aprendizagem e a memória. O recente progresso no conhecimento dos mecanismos moleculares que contribuem para a formação de memória e a geração dos ritmos circadianos chamam a atenção para a necessidade de melhor compreensão da forma de interação desses processos para a consolidação da memória de longa duração (GERSTNER & YIN, 2010). Diversos estudos com mamíferos e invertebrados vêm tentando elucidar o papel da oscilação circadiana das moléculas na formação e persistência da memória. Além disso, apesar da importância funcional atribuída ao glutamato e ao seu papel na ativação da NOS e do NO, poucos estudos se preocuparam em caracterizar a distribuição e as funções do NO e da NOS em aves, mesmo com a correspondência hipocampal existente entre mamíferos e aves. Esse trabalho vem contribuir para a compreensão dos mecanismos de oscilação circadiana de moléculas no hipocampo de aves, utilizando a proteína nNOS, e sua influência sobre a consolidação da memória de longa duração.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a oscilação circadiana da expressão e atividade da proteína nNOS no hipocampo e se esta oscilação apresenta relações com variação dia-noite no condicionamento contextual aversivo em pombos. Pretende-se, assim, discutir o papel da oscilação circadiana da nNOS na consolidação da memória e na modulação temporal do condicionamento aversivo ao contexto.

2.2 - Objetivos específicos

- Analisar a expressão protéica de nNOS no hipocampo de pombos através do método semiquantitativo *Western Blotting* em seis momentos ao longo do período de 24 h.
- Analisar a atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} em homogenatos de hipocampo de pombos, em seis momentos ao longo do período de 24 h.
- Descrever o padrão de oscilação temporal da expressão protéica da nNOS e da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} .
- Analisar a aquisição e a evocação de memória no condicionamento contextual aversivo, durante os horários de máxima e mínima atividade da enzima nNOS no hipocampo de pombos.
- Analisar a distribuição de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento contextual aversivo nos horários de mínima e máxima atividade da enzima nNOS.

3 – ETAPA I

3.1 – OBJETIVOS

Analisar a expressão protéica de nNOS no hipocampo de pombos através do método semi-quantitativo *Western Blotting* em seis momentos ao longo do período de 24 h e descrever o padrão de oscilação temporal. Analisar a atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo de pombos, em seis momentos ao longo do período de 24 h e descrever o padrão de oscilação temporal. Assim, podendo caracterizar a oscilação circadiana da proteína nNOS no hipocampo de pombos nos seus estados inativo e ativo.

3.2 – MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais abaixo descritos foram realizados em acordo com as prescrições do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp (protocolo nº 1732-1).

3.2.1 - Sujeitos

Foram utilizados 48 pombos machos, adultos (12 meses), 400g a 550g, derivação não controlada da espécie *Columba livia*, adquiridos de um mesmo fornecedor. Após a chegada ao biotério de aves, esses animais foram mantidos em quarentena, recebendo banho e tratamento antiparasitas 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 individuais, com água e comida *ad libitum* (mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração especial para aves, areia e farinha de ostra). Os pombos foram identificados

numericamente e catalogados. O peso do animal foi acompanhado durante seis dias antes do experimento. Ventilação higiênica periódica foi promovida por exaustores e o controle de temperatura foi feito pelo uso de condicionadores de ar ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nestas condições foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12h (claro 1000 lux; escuro 0 lux) com luz se acendendo às 6:00h.

3.2.2 – Fotoperíodo esqueleto

Após a quarentena, os animais foram realocados em outra sala de biotério e passaram por um período de pelo menos 15 dias sob ciclo claro-escuro. Após esse período, o ciclo de iluminação foi gradualmente mudado para uma condição de fotoperíodo esqueleto, isto é ao invés de sincronizar os animais a um ciclo de 12 horas de claro 12 horas de escuro, são usados dois pulsos de luz nos extremos da fase ativa dos animais, entremeados por períodos de luz tênue, para sincronizar os animais a um ciclo de 24 horas (PITTERDRING, 1965) (Fig. 4). A fase de escuro foi substituída por 12 horas de luz tênue (5 lux) vermelha, condição que continuou por três ciclos. Imediatamente após três dias, começou um fotoperíodo esqueleto, dado por dois pulsos de luz branca intensa (1000 lux) de 15 minutos de duração, separados por 12 horas de luz tênue vermelha (5 lux) (i.e., 0.15 branca: 11.45 vermelha; 0.15 branca: 11.45 vermelha), condição que continuou por mais 4 dias, chegando ao termino do experimento.

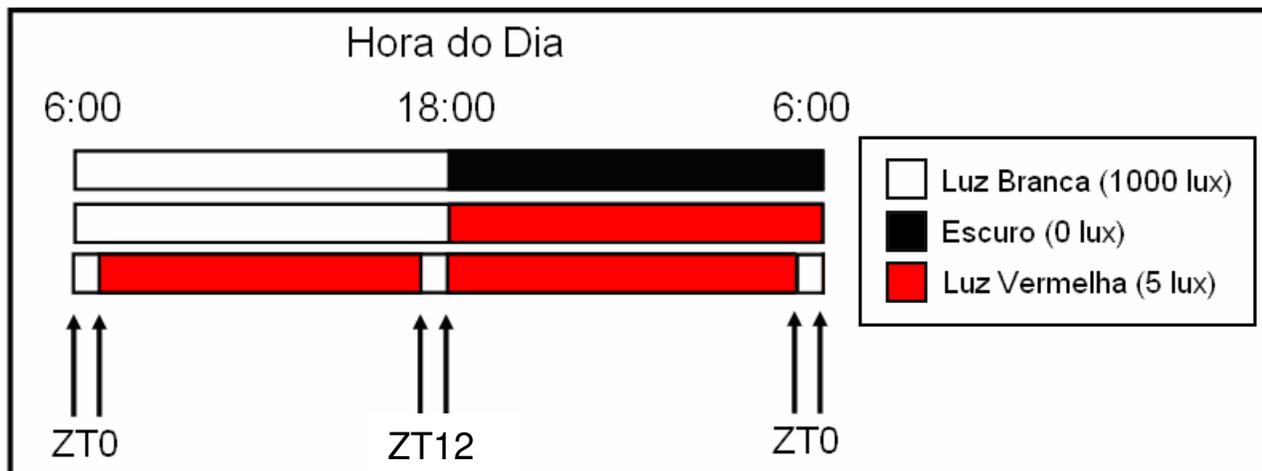


Figura 4 - Fotoperíodo esquelético: Introdução gradual, caracterizado por iluminação tênue contínua (Luz Vermelha), 01 pulso de luz branca (ZT 0) e 01 pulso de luz branca (ZT 12).

Este tipo de esquema de iluminação representa um modelo de arrastamento discreto ou não paramétrico, onde um pulso de luz de poucos minutos, apresentado aproximadamente a cada 12 horas, é suficiente para o arrastamento dos ritmos endógenos (PITTENDRIGH, 1965). Como acontece em todo ciclo ambiental periódico capaz de sincronizar ritmos endógenos, o fotoperíodo esquelético é considerado um *zeitgeber* (ZT) (doador de tempo; ASCHOFF, 1960). Se a sincronização ao fotoperíodo esquelético é adequada, o início da atividade dos pombos deve acontecer perto do ZT0 (*zeitgeber time* 0). O Zeitgeber 0:0 é representado pelo início do primeiro pulso de luz branca.

3.2.3 - Habituação ao contexto do laboratório

Quatro dias antes da instalação do fotoperíodo esquelético, os pombos foram submetidos a um procedimento de habituação à retirada da gaiola-viveiro e transporte ao laboratório. Durante quatro dias os animais foram apenas retirados da gaiola-viveiro, cobertos com tecido preto e transportados no percurso do biotério ao laboratório foram pesados e transportados novamente do laboratório ao biotério.

Os grupos correspondentes aos horários ZT0, ZT4, ZT8 foram habituados no período entre 8h e 10h e os animais dos grupos ZT12, ZT16, ZT20 no período entre 20h e 22h. Esse procedimento visa controlar a interferência de efeitos relacionados com possíveis fatores de estresse resultantes da captura e transporte dos animais.

3.2.4– Decapitação e dissecação do hipocampo

No quinto dia após a habituação, os animais foram transportados para o laboratório e decapitados, cada grupo em seu respectivo horário, representando os grupos ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20. Em períodos de noite subjetiva, os animais foram decapitados em uma luminosidade de 1 a 2 lux.

Os cérebros foram removidos, a dissecação do hipocampo foi realizada de acordo com as coordenadas do Atlas de KARTEN e HODOS (1967), na posição ântero-posterior A8.00 a A3,25 com 2 milímetros lateralmente (Fig. 5). Esse material foi imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado à temperatura de -80°C até sua utilização.

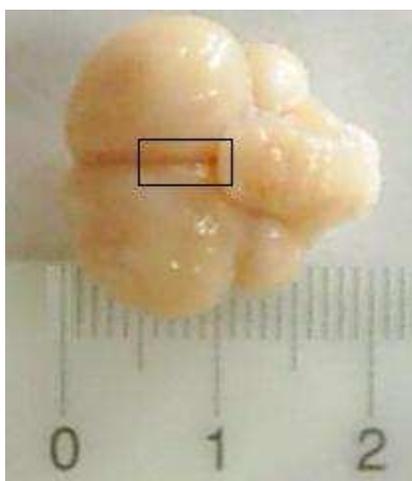


Figura 5 - Fotografia do encéfalo de pombo. A área demarcada pelo retângulo corresponde a região do hipocampo dissecada nas coordenadas do Atlas de KARTEN e HODOS (1967), posição ântero-posterior A8.00 a 3.25 com 2 milímetros lateralmente.

3.2.5 – Expressão protéica da nNOS

A análise da expressão protéica da nNOS foi realizada em homogenatos de hipocampo dos grupos ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20. Para a extração de proteínas, o tecido congelado foi pesado para determinação da quantidade de tampão necessária para homogeneização, sendo que o peso da amostra correspondeu a 10% da quantidade de tampão adicionada ao tecido. O tampão era constituído por 50 mM tampão fostato (PB), 5 mM Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1% de coquetel inibidor de protease (P8340 Sigma), 1% de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), 5% de β -mercaptoetanol. O material foi homogeneizado em tampão a 25 °C, em um gerador 20s Politron PTA (Modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) em velocidade máxima por 15 segundos e, depois, centrifugado a 30 °C, 12000 r.p.m., por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado foi descartado. Nas amostras foi adicionado tampão de amostra Laemmli (LAEMMLI, 1970), numa proporção 1:1 (50 μ l Laemmli/50 μ l de amostra). A seguir, as amostras foram mantidas por 5 min em banho-maria a 95 °C. Foi utilizada uma concentração de 70 μ g de proteína para cada amostra na eletroforese. Para eletroforese, foi utilizado gel bifásico de 1,5mm de espessura: gel de empilhamento (*Stacking* 4%; 4,48ml de água deionizada, 700 μ l de acrilamida 40%, 1,75 ml de tampão Tris-ácido fosfórico 0,5 M pH6,9, 70 μ l de SDS 10%, 35 μ l de Persulfato de Amônia (APS) 10% e 7 μ l de Temed) e gel de resolução (*Resolving* 8%; 4,86ml de água deionizada, 1,8ml de acrilamida 40%, 2,25ml de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,9, 90 μ l de SDS 10%, 45 μ l de APS 10% e 4,5 μ l de Temed). As concentrações protéicas de todas as amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como referencial uma curva padrão de albumina. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan Ex) a 590 nm. A eletroforese ocorreu a 200 V por aproximadamente 1h e 30 min em tampão de corrida

(100 ml de Tris-glicina 0,5 mM, 300 ml de água deionizada e 4 ml de SDS 10%). As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), *overnight* (aproximadamente 12h), 90 mA, banhada com tampão de transferência (200 ml de Tris-glicina 0,5 mM, 440 ml de água deionizada, 160 ml de metanol e 1,4 ml de SDS 10%).

Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (solução aquosa de Ponceau S. 0,1%, ácido acético 5%) para confirmação da presença de bandas com proteínas e para controle interno da membrana, sendo realizada a densitometria óptica de 3 bandas na membrana corada com as proteínas totais para a normalização de cargas igualitárias da proteína. A coloração com Ponceau S. pode vantajosamente substituir o controle de cargas igualitárias no *Western Blotting*, que é classicamente determinado com a marcação de actina, esse método é igualmente eficiente para essa finalidade (ROMERO-CALVO *et al.*, 2010), além de ser mais barato e levar apenas 10 minutos. O corante foi removido através de lavagem da membrana com NaOH 0,1 M. A membrana foi, então, lavada com tampão fosfato (PB) 0,05 M e seus sítios de ligações inespecíficos bloqueados com uma solução de 5% de leite em pó desnatado (0,5 g de leite em pó desnatado em 10 ml de solução de PBS Tween –PB 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,01% Tween 20) por 1h.

A nNOS foi detectada na membrana de nitrocelulose por incubação, *overnight*, à temperatura de 4°C, com anticorpo primário (NOS1 (R-20): sc 648, Santa cruz Biotechnology, INC., CA, EUA), diluição de 1:500 (20 µl de anticorpo diluídos em 10 ml de albumina 0,3% em solução de PBS Tween). No dia seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada por 5 min com solução de PBS Tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax anti-rabbit, Zymed Laboratories, PA, EUA), diluído 1:2000 (5 µl de anticorpo em 10 ml de leite em pó desnatado 0,3% em solução de PBS Tween), por 1h, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com solução

de PBS-Tween, sendo as bandas imunorreativas detectadas por autoradiografia em um filme Kodak GBX2 utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology, USA).

A densidade óptica das bandas imunorreativas foi determinada por densitometria digital (Scion Image Software).

3.1.6- Atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+}

Amostras de hipocampo dos grupos ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20 foram pesadas e homogeneizadas em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF) e 1 mM de L-citrulina. Cinquenta microlitros do homogenato foram incubados na presença de Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) (1 mM), cloreto de cálcio ($CaCl_2$) (2 mM) e 10 μ M de L-arginina contendo 100.000 cpm de [2,3,4,5- 3H]L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100 μ l a temperatura ambiente (25 – 27°C) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5.4 contendo 1mM de ácido etilenoglicol tetracético (EGTA) e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5' a 10.000 rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em viais de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados aos anteriores. Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação a radioatividade foi medida durante 1 min em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do resultado obtido no homogenato de tecido onde foi adicionado após o tampão HEPES. Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes

tubos receberam [2,3,4,5-³H] L-arginina mono hidrocloreto diretamente nos viais de cintilação) pela fórmula:

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times (\text{dpm amostra} - \text{dpm branco}) / \text{dpm totais} / 30$$

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em min).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl₂ e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS), identificando assim a atividade da iNOS e outro controle com a adição de 1 mM de N ω -nitro L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor competitivo das NOS.

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se kit comercial (Bio Rad, EUA). A atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por micrograma de proteína.

3.1.7 – Análise Estatística

A análise dos parâmetros rítmicos da densitometria óptica obtidos pela análise semiquantitativa *Western blotting* da nNOS e de atividade enzimática da NOS dependente de Ca²⁺ foi feito através do método Cosinor (NELSON *et al.*, 1979) com a utilização do programa COSANA (BENEDITO-SILVA, 1988). Essa análise consiste no ajuste de uma curva cosseno a uma série temporal de dados através do método dos quadrados mínimos. Esse ajuste é realizado para comparação dos dados obtidos a uma função periódica, isto é, com uma forma que se repete a cada período. Através desse método é possível avaliar a acrofase, que

é a medida do tempo transcorrido entre um instante de referência na qual é maior a probabilidade de ser encontrado o valor mais elevado, e um vale chamado de batifase que é o intervalo de tempo no qual é mais provável se encontrar o valor mais baixo da curva; a amplitude do ritmo de expressão, e a porcentagem rítmica (%R) que expressa o grau de ajuste do ritmo a uma curva cosseno correspondente a um período de 24 horas. Esses dados são explicados pela curva senoidal ajustada aos dados (MARQUES & MENNA-BARRETO, 1997). Significância $p < 0,05$.

Os dados também foram analisados por meio do teste ANOVA de uma via, tendo horário como fator. O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*. Significância $p < 0,05$.

3.3 – RESULTADOS

3.3.1 - Densitometria óptica das bandas imunorreativas para nNOS.

Na Figura 6 observam-se valores da densitometria óptica das bandas imunorreativas da proteína nNOS (Fig. 7), normalizadas pela quantidade total de proteínas determinada pela solução de Ponceau S (coloração histoquímica Ponceau) no hipocampo de pombos, para os grupos ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20. O teste ANOVA indicou diferença significativa entre grupos ($F_{(5,18)} = 7,6$; $p < 0,0001$). O teste de Turkey-Kramer, para múltiplas comparações *post hoc* indicou que o grupo ZT0 diferiu significativamente dos grupos ZT12, ZT16 e ZT20 e que o grupo ZT4 foi significativamente diferente dos grupos ZT16 e ZT20 ($p < 0,05$).

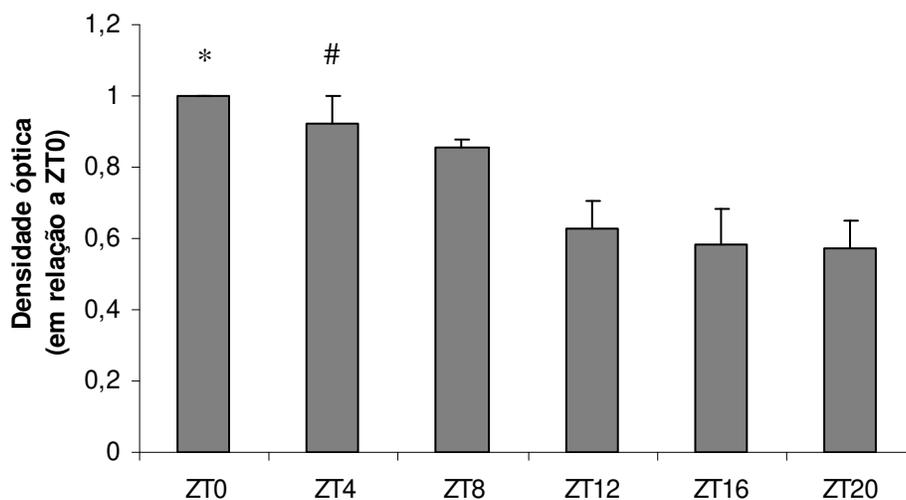


Figura 6 - Médias e erro padrão das análises densitométricas das bandas imunorreativas para nNOS em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas. O símbolo * indica diferença significativa comparado com ZT12, ZT16 e ZT20; o símbolo # indica diferença significativa comparado com ZT16 e ZT20. Os dados foram calculados em referência aos valores de ZT0 (ANOVA de uma via, seguido de teste de Tukey-Kramer).

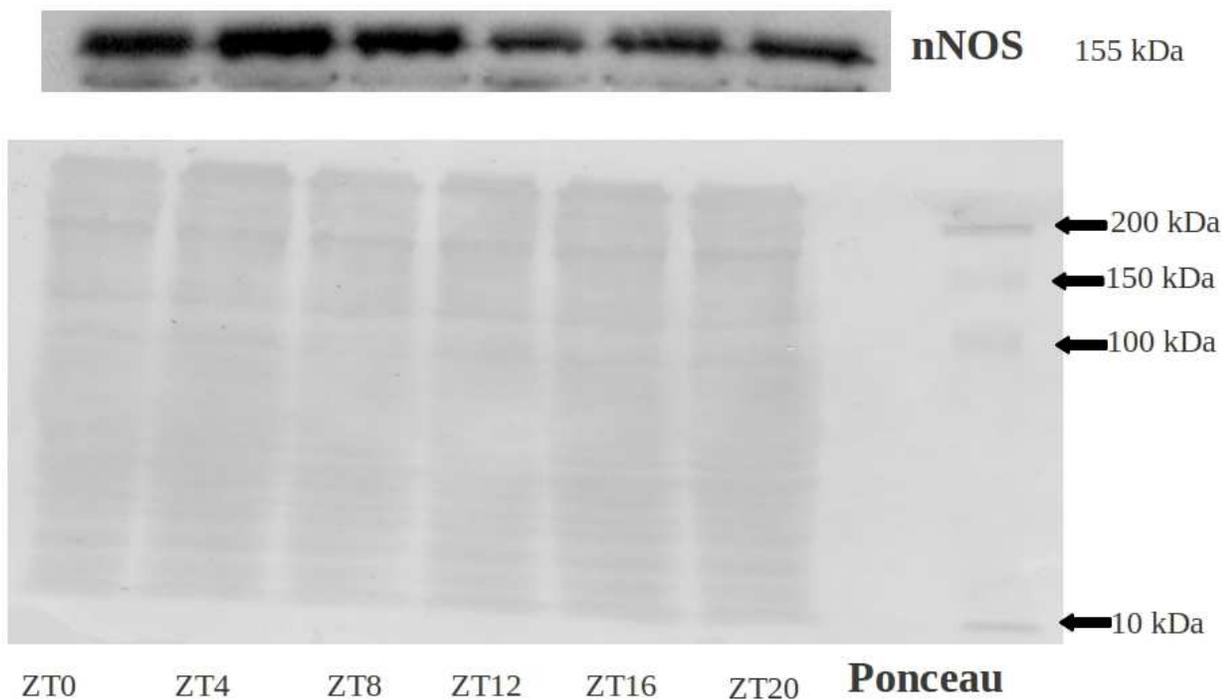


Figura 7 - Bandas imunorreativas representativas para nNOS e proteínas totais detectadas por coloração com Ponceau S.

3.3.2 - Atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+}

Os dados da atividade enzimática de NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo (Fig. 8) foi medido através da quantidade de L-citrulina produzida na reação entre a NOS e a L-arginina por minuto e micrograma da proteína para todos os grupos. Os dados são expressos como razão entre o valor médio de cada grupo e o valor médio do grupo ZT0. A análise estatística com o teste ANOVA não paramétrica de uma via não mostrou diferença significativa entre horários ($F_{(5, 18)} = 0,27$; $p = 0,09$).

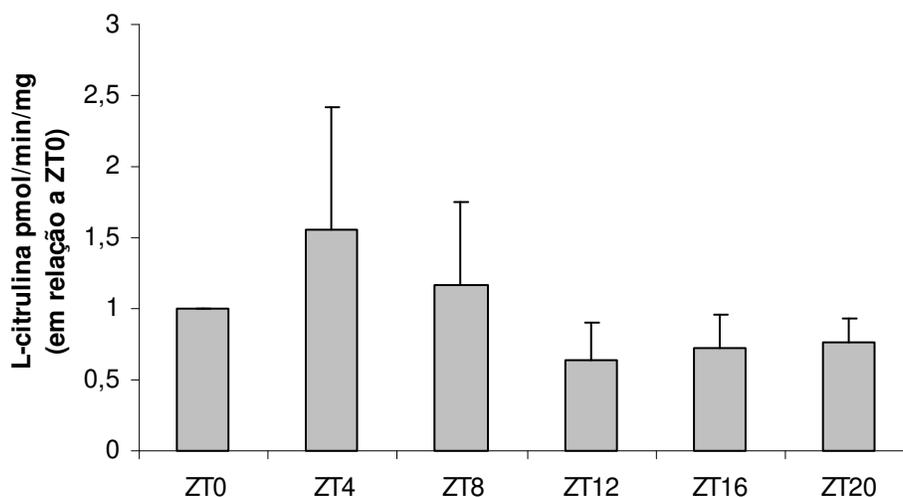


Figura 8 - Média e Erro padrão da quantidade de L-citrulina produzida por pmol/min/mg através da reação da atividade catalítica da NOS dependente de Ca^{2+} em amostras de homogenato de hipocampo expressa em razão a média do grupo de ZT0. Não houve diferença significativa entre os horários (ANOVA de uma via).

3.3.3- Oscilação circadiana da expressão protéica da nNOS da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} .

Os dados da expressão protéica da nNOS e da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} foram analisados através do método Cosinor (NELSON *et al.*, 1979) (Tabela 1).

Tabela 1 -Valores fornecidos pelo método Cosinor (NELSON *et al.*, 1979) para ajuste senoidal da curva aos dados.

	Acrofase	Batifase	Amplitude	Mesor	%R	p
Expressão						
Proteica	9h50 ± 38 min	22h50min ± 38min	0,24 ± 0,07	0,77 ± 0,13	67,57	0,01
Atividade						
Enzimática	10h ± 50min	22h ± 50min	1,22 ± 0,65	1,56 ± 0,11	96,03	0,04

A relação de fase entre as curvas de expressão protéica da nNOS e a atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} , calculada através da subtração entre os horários de ocorrência do pico de cada curva é de 10 minutos. As análises dos dados da expressão protéica e atividade enzimática evidenciaram a presença de ritmicidade circadiana significativa (teste do Cosinor $p < 0,05$).

3.4- DISCUSSÃO

Os resultados apresentados indicaram que a expressão protéica da nNOS varia ao longo das 24 horas, diferindo significativamente entre os horários de coleta, evidenciando uma oscilação circadiana robusta. Também se constatou uma diferença significativa entre os valores de pico (ZT4) e vale (ZT20) da curva de expressão protéica.

A atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo de pombos também demonstra oscilação robusta ao longo de 24 horas demonstrado pelo valor significativo no teste de Cosinor, embora não tenha sido observada uma diferença significativa entre os diferentes horários de coleta pelo teste ANOVA. Isso pode ter ocorrido devido à variabilidade dos dados e ao pequeno número da amostra, não permitindo a visualização da diferença significativa no teste ANOVA, que foi marginalmente significante (p

= 0,09). Contudo, a análise da % R demonstrou a presença de altos valores da % R, que são indicativos de oscilação circadiana robusta da expressão da nNOS e da NOS dependente de Ca^{2+} e de que a ritmicidade está ocorrendo nos estados inativos e ativos da enzima no hipocampo.

Essas observações estão em acordo com os resultados de Ayers *et al.* (1996) que relataram oscilação na atividade da NOS no hipocampo, e em outras regiões encefálicas de ratos. Tal como ocorreu no presente trabalho com os dados da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} , esses pesquisadores também não constataram uma diferença significativa entre os diferentes horários de coleta. Tunçtan *et al.* (2002) analisaram a variação circadiana da atividade da NOS, que incluiu as três isoformas, no cérebro de camundongos e em órgãos periféricos. Demonstraram que, contrariamente ao observado na periferia, a oscilação circadiana da NOS no cérebro persistiu tanto em ciclo claro/escuro como em claro constante, evidenciando uma forte influência do NSQ. A expressão do transcrito de nNOS também apresenta uma oscilação circadiana na glândula pineal de ratos, que é influenciada por diferentes fotoperíodos, o que pode estar relacionado a dinâmica de expressão dos genes relógio (SPESSERT & RAPP, 2001).

A inibição inespecífica da NOS tem efeitos consideráveis sobre a variação circadiana da temperatura, ritmo de atividade/repouso e ritmo alimentar em ratos (KAMERMAN *et al.*, 2002). Trabalhos verificando a interferência de doadores de óxido nítrico e inibidores de NOS sugerem que a NOS e sua oscilação circadiana basal estão envolvidas com a regulação do sono e de outros ritmos circadianos (KÁPAS & KRUEGER, 1994, KÁPAS *et al.*, 1994, AYERS *et al.*, 1996, KAMERMAN *et al.*, 2002).

A atuação do NO, e conseqüentemente da nNOS na regulação dos osciladores

biológicos tem sido relatada em diversos estudos. Plano *et al.* (2007) demonstraram que a injeção via cerebroventricular de hamsters do seqüestrador de NO extracelular, 2-Fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido (PTIO), bloqueia o avanço de fase na noite subjetiva induzido por pulso de luz e também bloqueia a expressão de c-Fos. Agostino *et al.* (2007) relataram que o uso de sildenafil, um bloqueador da degradação de cGMP que prolonga o efeito NO/cGMP, acelera o arrastamento do ritmo de atividade/repouso em camundongos quando colocado numa situação de avanço de fase. Tais evidências demonstram que o NO é um fator envolvido na modulação da ritmicidade circadiana coordenada pelo NSQ, não tendo ainda sido demonstrado se essa função moduladora da ritmicidade também ocorre nos osciladores periféricos por influência direta do NO.

No presente trabalho, foi verificada a relação de fase entre a variação circadiana na expressão protéica da nNOS e na atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} . A relação de fase, que é a distância temporal entre eventos de dois ritmos, foi de 10 min entre as duas curvas, demonstrando que esses ritmos estão em fase, ou seja, seus momentos de máximo e mínimo estão coincidindo em horários muito próximos, evidenciando a íntima relação temporal entre a expressão da nNOS e a sua atividade enzimática. Isso corrobora os dados de um estudo *in vitro* sobre a fosforilação da nNOS pelo complexo Ca^{2+} /CaM II, mostrando um patamar máximo aos 10 minutos após a adição de Ca^{2+} /CaM II (HAYASHI *et al.*, 1999). Além disso, os presentes resultados concordam com evidências experimentais de que o pico da atividade da NOS no hipocampo e em outras regiões encefálicas de ratos também ocorre na fase de atividade desses animais (AYERS *et al.*, 1996; TUNÇTAN *et al.*, 2002). Como visto, as acrofases da expressão protéica e da atividade enzimática ocorrem em horários próximos, $9h50 \pm 38$ min e $10h \pm 50$ min, respectivamente, estando presentes na fase de atividade dos pombos. Em conjunto, esses dados também se relacionam com o

conhecimento de que processos de sincronização ou deslocamento de fase envolvem mecanismos moleculares de fosforilação de proteínas no NSQ, como aquelas da via $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMII-nNOS-GC-cGMP-cGK}$, os quais induzem alterações na expressão de genes relógio (GOLOMBEK *et al.*, 2004).

A análise da atividade enzimática da proteína NOS dependente de Ca^{2+} permitiu, assim, detectar o estado funcional da quantidade de proteína presente no hipocampo e colocar questões sobre suas funções. Por outro lado, os dados também demonstram indiretamente a oscilação circadiana na ação do NO no hipocampo, visto que a síntese do NO depende da oxidação da L-arginina que é realizada pela nNOS e que resulta na formação de L-citrulina e NO (RAMAN *et al.*, 2001). A importância funcional desse dado é que a oscilação circadiana nos processos de expressão e ativação da nNOS e consequente síntese do NO, podem influenciar alterações circadianas em outras proteínas e genes, os quais influenciariam outros processos biológicos, comportamentais e cognitivos.

Além disso, diversos experimentos descreveram ciclos circadianos de atividade sináptica em circuitos específicos do hipocampo de roedores, envolvendo repetidos ciclos de síntese de receptores NMDA, expressão de MAPK e de AMPc (CUI *et al.*, 2004; ECKELMAHAN *et al.*, 2008; LEE & WILSON, 2002). A ativação dessas vias de sinalização intracelular está diretamente relacionada com processos sinápticos mediados pelo glutamato, tal como ocorre com a ativação da nNOS e a síntese do NO. A ação retrógrada do NO no neurônio pré-sináptico promove a potenciação da força sináptica, que garante a fase tardia da LTP, ativando a via do AMPc, PKA e MAPKs, aumentando a atividade da CREB no núcleo, síntese de proteínas, incluindo neurotrofinas como o BDNF (BREDT & SNYDER, 1992; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; KANDEL, 2000). Esses processos moleculares nas fases inicial e tardia da LTP convergem a uma plasticidade sináptica necessária para consolidação

e persistência da memória de longa duração.

Portanto, os dados do presente estudo corroboram e ampliam as evidências da literatura para o hipocampo de aves, sobre a atividade cíclica de moléculas que são requeridas para consolidação e manutenção da memória de longa duração. Pelo fato do hipocampo ser uma estrutura crítica para esses processos de memória (MILNER *et al.*, 1998), esses dados podem estar diretamente relacionados aos relatos sobre a variação circadiana da aprendizagem e memória.

Para verificar essa hipótese na Etapa II foram realizados testes comportamentais de condicionamento aversivo ao contexto nos horários de mínima e máxima atividade da enzima nNOS, a fim de averiguar a relação entre a oscilação circadiana da proteína nNOS e a variação dia-noite na expressão comportamental.

4 – ETAPA II

4.1 - OBJETIVOS

Os objetivos do presente experimento foram analisar a aquisição e a evocação de memória no condicionamento contextual aversivo, durante os horários de máxima e mínima atividade da enzima nNOS no hipocampo de pombos e também analisar a distribuição de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento contextual aversivo nos diferentes horários.

4.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais abaixo descritos foram realizados em acordo com as prescrições do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp (protocolo nº 1732-1).

4.2.1 – Sujeitos

Foram utilizados 48 pombos, os quais foram aleatoriamente atribuídos a grupos matutinos, com intervenções experimentais realizadas às 10 h (Grupo Manhã ZT4) ou às 22 h (Grupo Noite ZT16), respectivamente, os horários de máxima e de mínima atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo de pombos observados na Etapa I. Os cuidados e a manutenção dos animais no biotério ocorreram conforme descrito na Etapa I.

Os animais foram atribuídos aleatoriamente aos seguintes grupos:

1. Grupo Experimental Condicionamento Contextual: (EZT4) $n = 7$ e (EZT16) $n = 7$. Os animais receberam 03 choques elétricos incontroláveis aos 5, 10 e 15 min durante a permanência por 20 minutos na câmara experimental (contexto) e 24h depois foram testados

por meio da reexposição ao contexto.

2. Grupo Controle-Contexto: (CZT4) n = 7 e (CZT16) n = 7. Os animais foram expostos ao contexto durante a sessão de 20 min, sem apresentação de estímulos e 24h depois foram testados por meio da reexposição ao contexto novamente por 20 min.

3. Grupo Controle Manutenção: (MZT4) n = 5 e (MZT16) n = 5. Os animais foram submetidos ao transporte do biotério até o laboratório, foram pesados e retornaram ao biotério, o procedimento foi repetido por 6 dias consecutivos.

4.2.2 – Implante de eletrodos púbicos

Os pombos tiveram a região dos ossos púbicos exposta após a retirada das penas e com auxílio de algodão embebido em álcool etílico 70% era feita a assepsia local. A área era levemente anestesiada utilizando-se cloridrato de lidocaína 5% em pomada. Então, eram implantados fios de aço inoxidável (0,5 mm de espessura e 10 cm de comprimento) cronicamente em cada osso púbico dos animais. Após, os fios de aço eram conectados a uma tomada elétrica (fêmea) fixada a um colete de couro sintético colocada sob o dorso do animal (Fig. 9). Os animais dos grupos MZT4 e MZT16 não tinham implante de eletrodos.

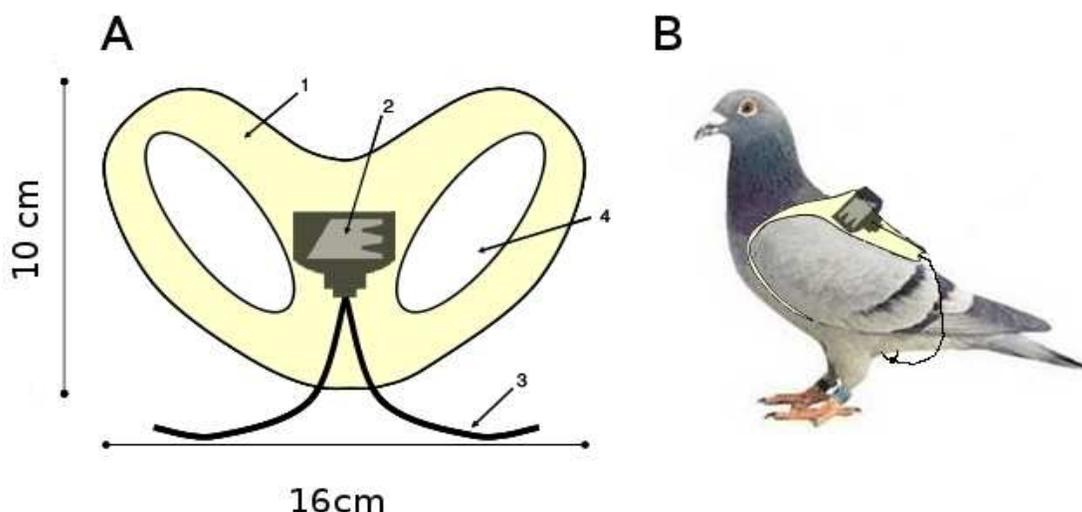


Figura 9 A – Esquema ilustrativo do colete de tecido (1) fixado a um plugue de tomada elétrica fêmea (2) para conexão na caixa experimental. As pontas livres dos fios elétrico ligados no plugue (3) eram conectadas aos eletrodos implantados na região púbica dos pombos, em 4 é mostrado a abertura para as asas. **B** – Esquema ilustrativo de um pombo com colete e eletrodo implantados aos ossos púbicos (CANOVA, 2009).

4.2.3 – Habituação ao Contexto do Laboratório

A habituação ao contexto do laboratório visa diminuir o impacto de fatores estressores ao animal, como o transporte, a manipulação pelo experimentador e a reclusão em um ambiente desconhecido. Os animais eram transportados do biotério até o laboratório em sacos de pano pretos e colocados na câmara de observação (50 x 50 x 50 cm; Fig. 10).

Foi realizada uma sessão diária de 40 min, nos 4 dias que precederam a sessão de treino e no mesmo horário programado para os testes comportamentais. A iluminação era feita com lâmpadas fluorescentes brancas de 9 W, localizadas nas paredes laterais. Os animais do grupo MZT4 e MZT16 apenas foram transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério.

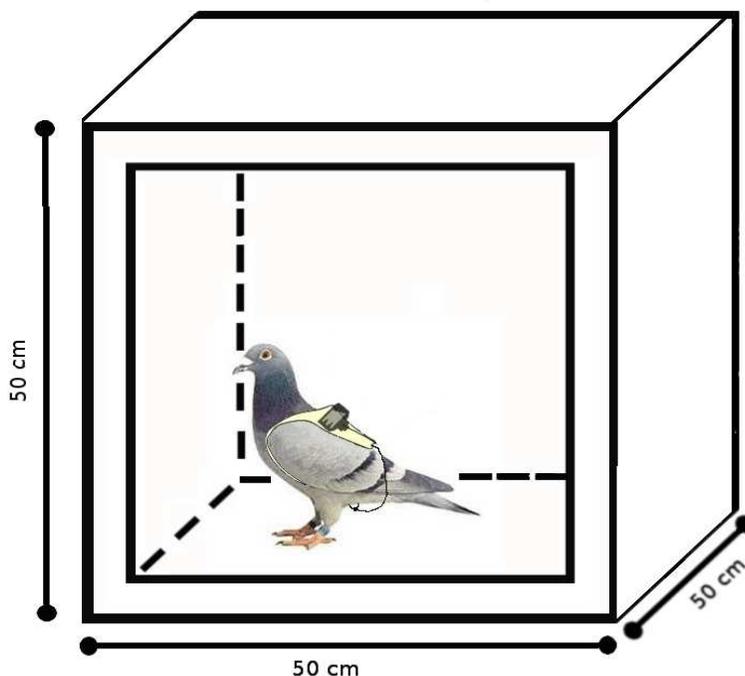


Figura 10 - Esquema representativo da caixa de habituação com paredes brancas e porta lateral; lado frontal construído com um espelho de visão unidirecional emoldurado com madeira (medidas 50x50x50 cm), iluminação fluorescente 9W, onde os animais foram colocados por 4 dias seguidos durante 40 min. (CANOVA, 2009)

4.2.4 – Treino em Condicionamento Contextual Aversivo

As sessões experimentais de condicionamento ao contexto foram realizadas numa câmara experimental (Fig. 11). Após os 4 dias de habituação, os animais dos grupos EZT4 e EZT16 foram transportados até a câmara experimental e tiveram as tomadas elétricas fêmea, que estavam afixadas em seus coletes, conectadas a uma tomada macho da câmara. Foi realizada uma sessão experimental com três apresentações de choque (10mA, 35 ms). Os estímulos foram apresentados durante a sessão de 20 min., respectivamente aos 5, 10 e 15 min. Os choques eram aplicados através dos eletrodos a partir de uma fonte (FORINGER, EUA), controlados por marcadores de tempo eletromecânicos. Os animais dos grupos CZT4 e CZT16 tiveram uma sessão com exposição à câmara experimental e nenhuma

apresentação de estímulo aversivo. Os comportamentos dos pombos foram gravados digitalmente com auxílio do programa WinVDR 3.7.0, para posterior análise comportamental.

Os animais do grupo MZT4 e MZT16 eram retirados da gaiola-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério.

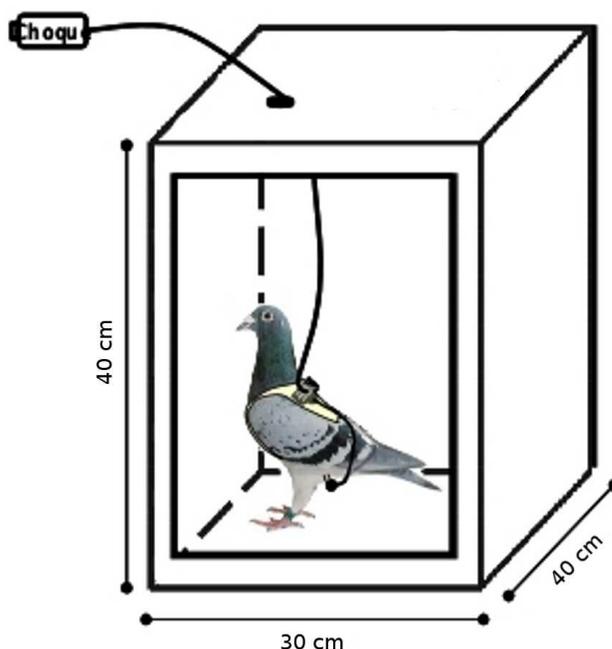


Figura 11 - Esquema ilustrativo da caixa experimental de condicionamento (medidas 30x40x40) com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira, iluminação luz vermelha 15 W, onde os animais eram colocados e conectados a uma tomada elétrica macho e então eram apresentados os estímulos referentes a cada grupo experimental. (CANOVA, 2009)

4.2.5 – Teste em Condicionamento Contextual Aversivo

Os animais dos grupos EZT4, EZT16, CZT4 e CZT16 foram retirados da gaiola-viveiro e colocados novamente na câmara experimental onde ocorreu a sessão de treino. Essa sessão tinha 20 min. de duração e era realizada 24h após o condicionamento. Os comportamentos dos pombos foram gravados digitalmente com auxílio do programa WinVDR 3.7.0, para posterior análise comportamental.

Os animais dos grupos MZT4 e MZT16 eram retirados de suas gaiolas-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério.

4.2.6 – Análise comportamental

As gravações das sessões experimentais de todos os grupos foram transcritas com a utilização do programa Etholog 2.2.5 (OTTONI, 1999), com registros comportamentais durante toda mudança de comportamento e também foi registrada a cada 30 segundos. A descrição dos comportamentos analisados neste trabalho foi baseada na descrição contida no catálogo de comportamentos de pombos (REIS *et al.*, 1999). Para o registro de cada comportamento observado, foram considerados os parâmetros abaixo:

1 - 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 desalinhas; 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.

2 - Exploração (EXP): movimentos relacionados à orientação para investigação de partes ou do ambiente como um todo. Compreende seqüências rápidas e repedidas de extensão do pescoço com movimentos de rotação, inclinação e balanço da cabeça. Postura em pé ou agachada.

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

4 - Exploração cautelosa (CAU): 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.

5 - Vigilância (VIG): Orientação da cabeça para um ponto do ambiente, com extensão restrita do pescoço (ângulo $> 30^\circ$ em relação ao tronco), permanecendo imóvel ou com movimentos de pequena inclinação e oscilação da cabeça.

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

7 - Movimentos isolados (MOV): nesta categoria foram incluídos todos os movimentos que resultam em mudanças restritas e/ou discretas de localização espacial de partes do corpo do animal.

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

9 - 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 $< 60^\circ$.

As gravações do treino e teste ao contexto dos animais foram transcritas por meio do programa Etholog (OTTONI, 2000), o qual permite analisar frequência e duração de cada categoria analisada.

4.2.7 – Perfusão

Os animais foram perfundidos 1h20min após o início da sessão de teste ao contexto.

No final desse período os animais eram transportados ao laboratório onde eram então anestesiados com cetamina 20 mg/Kg e xilasina, 10 mg/Kg, e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl 0,9%) para a remoção do sangue presente no encéfalo, e posteriormente com solução tamponada de paraformaldeído a 4%, para fixação do tecido nervoso. Finalizado esse procedimento, o encéfalo dos animais era retirado e mantido de 4-6 horas na solução de paraformaldeído para pós-fixação. Em seguida os encéfalos eram transferidos para uma solução crio - protetora de sacarose a 30% e mantidos em uma temperatura média de 4°C por um período de 48 horas. Após este período de crioproteção, os cérebros foram congelados em composto para corte em temperatura ótima (Tissue-Tek O.C.T) para processamento imunistoquímico para análise de células nNOS-positivas.

4.2.8 – Imunoistoquímica para células nNOS-positivas

Os cortes de tecido encefálico com 30µm de espessura obtidos em criostato de chão (LEICA CM1900). Foram definidos níveis anatômicos de acordo com o Atlas de Karten e Hodós (1967) para realização das análises, da região antero-posteriores A8.00 a A7.00 foi denominada Nível 1, da região A6.45 a A5.00 – Nível 2, da região A4.45 a A3.45 – Nível 3.

Após a realização dos cortes, os tecidos foram lavados em PB 0,1 M por três vezes, cada lavagem com 10 minutos de duração. Logo após, os cortes eram incubados com anticorpo primário policlonal (NOS1 (R-20): sc 648, Santa cruz Biotechnology, INC., CA, EUA) em solução de triton X-100 0,3% em PB 0,1 M (TXPB) contendo 2% de soro de leite bovino, onde permaneceram durante 18 horas, após este período, eram submetidos a três lavagens de 10 minutos em PB 0,1M e incubados com anticorpo secundário anti-coelho biotinilado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, EUA) em TXPB, durante 120

minutos, em rotor, à temperatura ambiente. Novamente passaram por três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M e, a seguir, incubados no complexo avidina-biotina-peroxidase em TXPB contendo cloreto de sódio, durante 120 minutos, em rotor, à temperatura ambiente. Nova série de três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M antecedeu a colocação em solução de diaminobenzidina (DAB) em PB 0,1 M durante 15 a 20 minutos, onde eram acrescentados 0,2 ml de H₂O₂ 0,03%, os cortes ficavam nesta solução de 2 a 6 minutos. Novamente, eram realizadas três lavagens em PB 0,1 M por 10 minutos cada uma e os cortes eram então montados em lâminas para microscopia silanizadas e gelatinizadas, os cortes eram então desidratados em séries crescentes de alcoóis e, finalmente as lâminas eram cobertas com a lamínula.

4.2.9 – Contagem de células nNOS-positivas

A análise das células nNOS-positivas foi feita através de microscopia de campo claro. A contagem dos neurônios marcados seguiu o critério de delimitação virtual das regiões do hipocampo: dorsal (HpD) e ventral (HpV), o qual ainda foi dividido em ventrolateral (HpVL) e ventromedial (HpVM) (Fig. 12). O HpD tem limite inferior, traçado a partir de uma linha virtual que une a borda do ventrículo lateral e a linha medial do hipocampo, e limite superior, traçado a partir de uma linha virtual que une a borda da curvatura do ventrículo lateral à superfície dorsal do telencéfalo. O teto da região ventral corresponde à linha-limite inferior do HpD, que dividida ao meio, dá origem a uma linha mediana que termina no centro do ângulo da região em V. Essa linha bissetriz divide o hipocampo ventral em região medial, com limite na linha mediana do hipocampo e a região lateral, que margeia o ventrículo lateral.

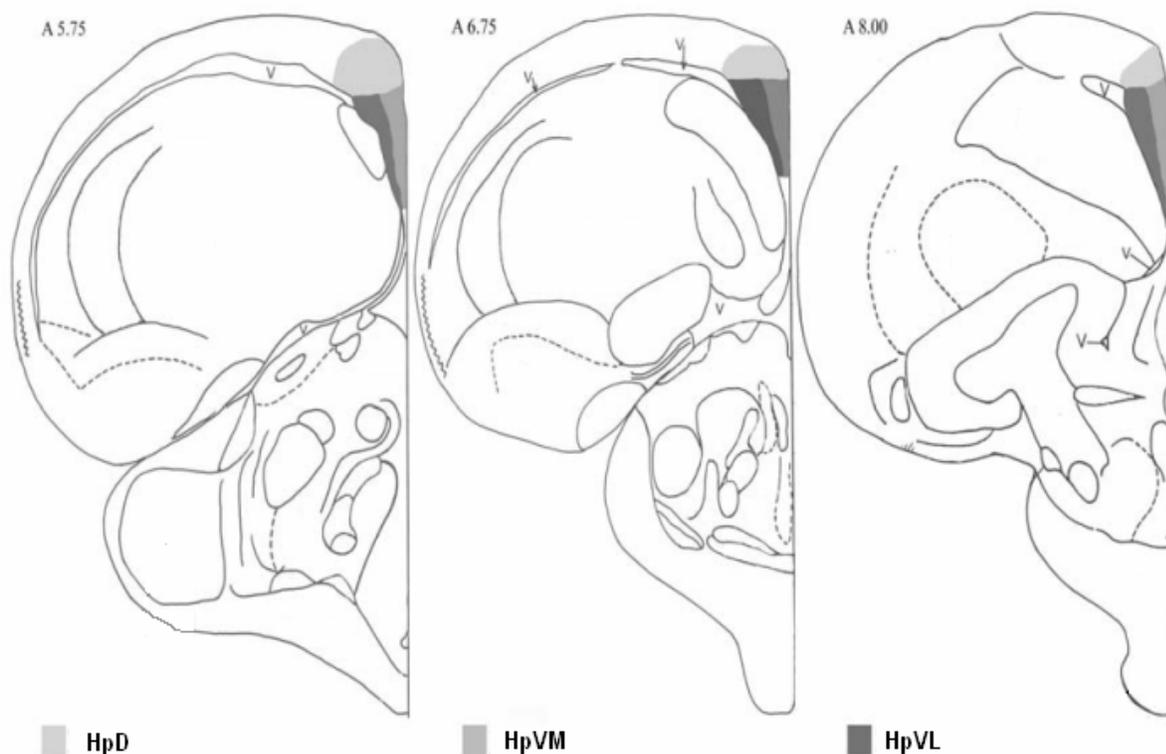


Figura 12 - Esquema de cortes frontais de encéfalos de pombos nos níveis A5.75, A6.75 e A8.00, onde as áreas coloridas demarcam o hipocampo: o cinza claro indica o hipocampo dorsal, o cinza médio indica o hipocampo ventro-medial e o preto indica o hipocampo ventro-lateral; V indica a localização de Ventriculo (KARTEN & HODOS, 1967). (Modificado de BRITO *et al.*, 2006).

Em cada região as células foram aferidas por contagem unitária. Foram computadas células nNOS-positivas com corpos celulares e com ramificações dendríticas ou axonais nítidas com coloração variando entre a cor amendoada até o marrom escuro (Fig. 13). Foi realizado a contagem de 40 secções frontais realizados da região A8.00 até A4.00 segundo o atlas de Karten e Hodos (1967) por animal. A contagem foi discutida e revisada por observadores-controle (duplo-cego), para fins de controle de validade dos dados.

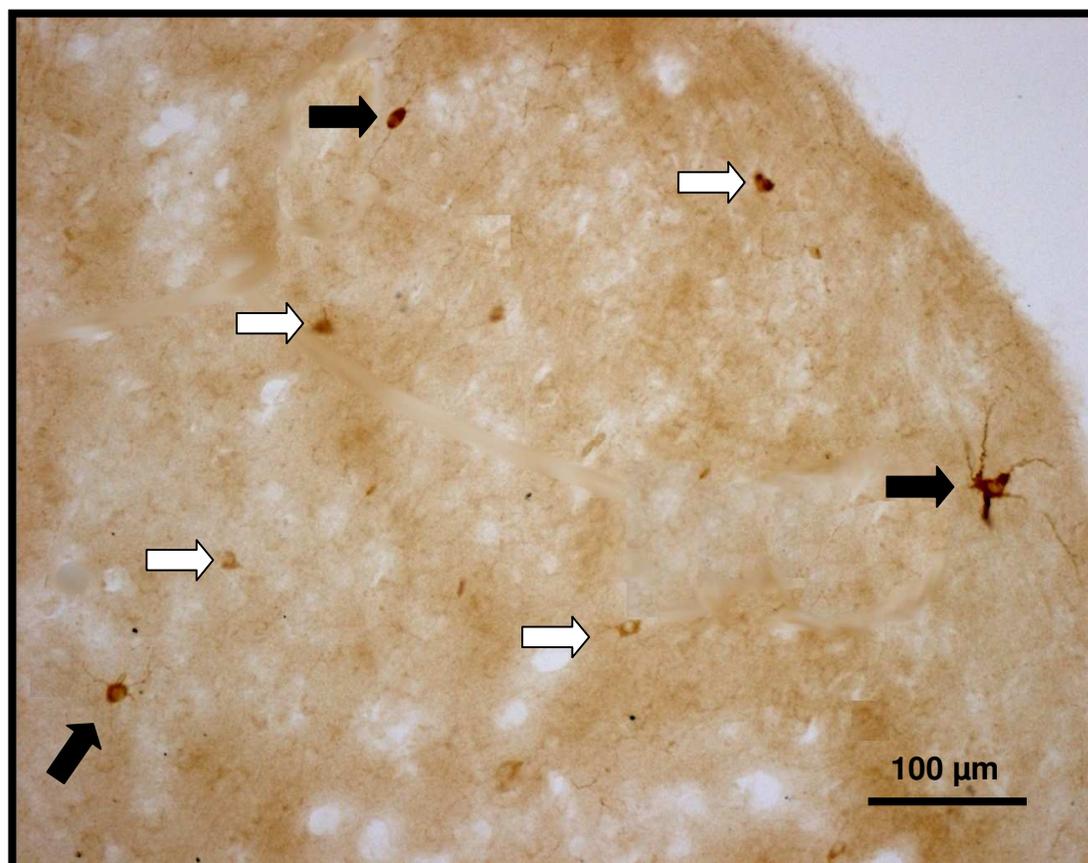


Figura 13 - Imagem digitalizada de uma região do hipocampo de pombos onde é demonstrada marcação de células nNOS-positivas utilizada na contagem. Ampliação de 200x. Barra de escala = 100 μ m. Setas pretas indicam alguns tipos de marcação considerados para contagem; setas brancas ilustram elementos não considerados para contagem.

4.2.9 - Análise estatística

Para a análise dos dados duração percentual dos comportamentos, da ocorrência média de congelamento feito por amostragem de tempo a cada 30 segundos e para a análise da distribuição da ocorrência média de congelamento ao longo das sessões de treino e de teste, foi utilizada ANOVA para medidas repetidas, tendo o comportamento em cada categoria como a variável dependente, o grupo (EZT4, EZT16, CZT4, CZT16) como variável independente e a sessão como medida repetida (treino e teste). As análises *post hoc* foram realizadas com o teste para múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Nas comparações estatísticas da marcação de células nNOS-positivas usou-se

ANOVA de uma via onde a variável dependente foi o número de células totais no hipocampo de pombos e a variável independente foi o grupo (EZT4, EZT16, CZT4, CZT16, MZT4, MZT16). O teste de Bonferonni foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*. Para comparar as diferentes áreas hipocampais utilizou-se ANOVA de duas vias tendo como variável dependente o número de células e como fatores grupo e áreas do hipocampo. O teste Newman-Keuls foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

4.3 - RESULTADOS

4.3.1 – Análise dos diferentes tipos de comportamentos durante o treino e o teste de condicionamento aversivo ao contexto nos horários ZT4 e ZT16.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram as distribuições de duração total percentual entre as diferentes categorias comportamentais – congelamento, exploração, comportamentos pré-exploratórios, exploração cautelosa, vigilância, locomoção, manutenção, movimentos isolados e parado - nos grupos CZT4, CZT16, EZT4 e EZT16. Devido as diferentes durações das categorias comportamentais as figuras são representadas em escalas diferentes para assim garantir melhor visualização.

A análise com ANOVA indicou diferenças significativas entre os grupos para as categorias congelamento ($F_{3,25} = 11,52$; $p < 0,0001$), vigilância ($F_{3,25} = 6,19$; $p < 0,002$) e parado ($F_{3,25} = 5,33$; $p < 0,005$). Houve diferença significativa entre sessões apenas para a categoria locomoção ($F_{1,27} = 28,40$; $p < 0,001$) e um valor marginalmente significativo para a categoria de exploração cautelosa ($F_{1,27} = 3,34$; $p = 0,07$).

As análises com múltiplas comparações realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a percentagem de duração total de congelamento do grupo EZT4 diferiu significativamente do grupo CZT4 e entre os grupos EZT16 e CZT16 ($p < 0,05$). Na categoria

vigilância houve para CZT16 uma diferença significativa do grupo EZT16. A percentagem da duração total de parado apresentou uma diferença significativa entre os CZT4 e EZT4. Foram observadas diferenças significativas entre as sessões de treino e teste para a categoria locomoção.

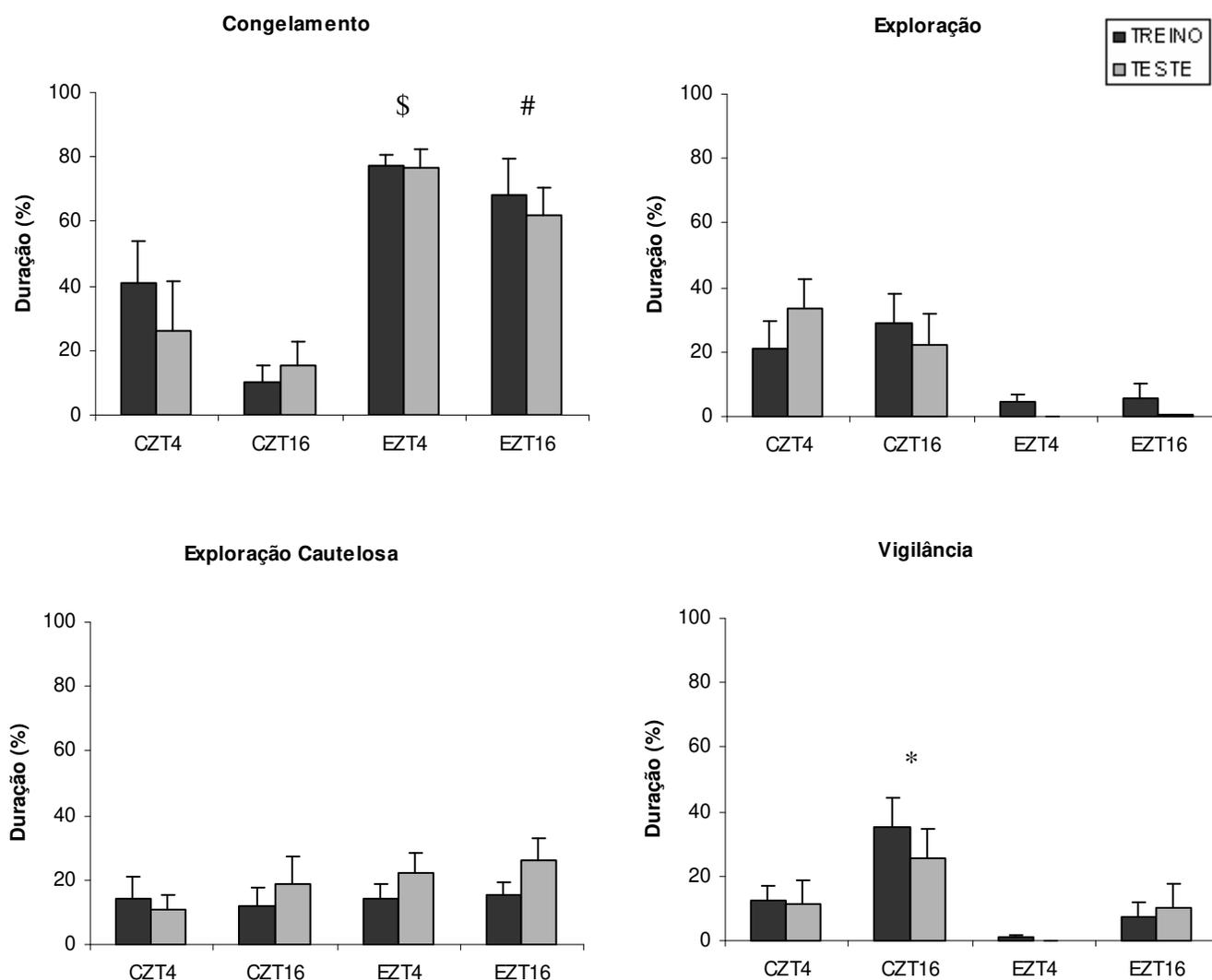


Figura 14 - Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais congelamento, exploração, exploração cautelosa e vigilância durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos Grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. \$ Diferença significativa em comparação ao grupo CZT4 ($p < 0,0001$); # diferença significativa com CZT16 ($p < 0,0001$); * diferença significativa em comparação ao grupo EZT16 ($p < 0,002$). ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer.

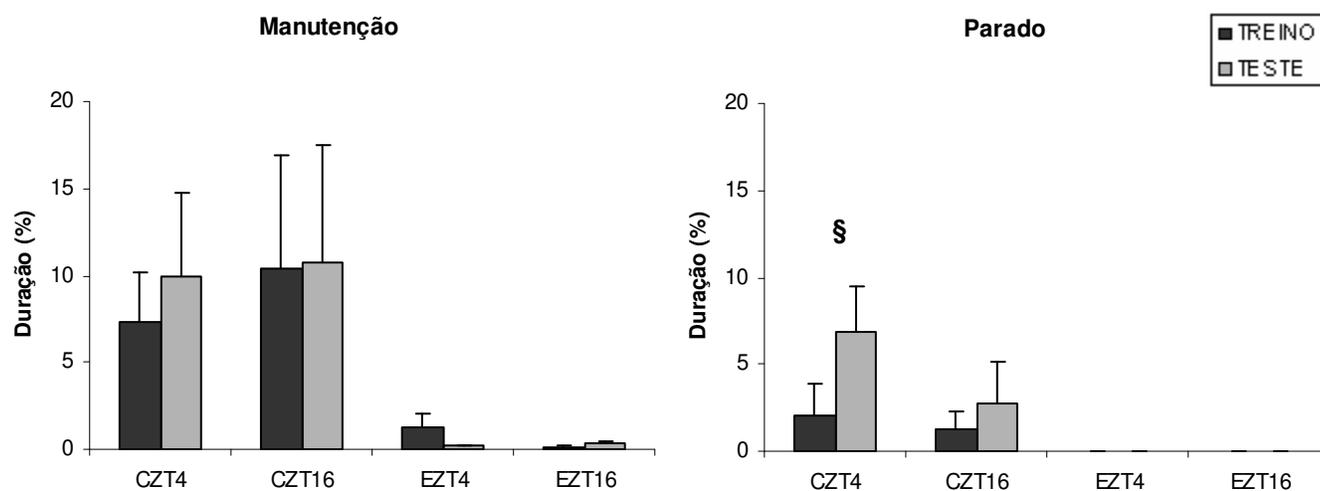


Figura 15 - Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais manutenção e parado durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os Grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. § diferença significativa em comparação aos grupos EZT4 ($p < 0,05$). ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer.

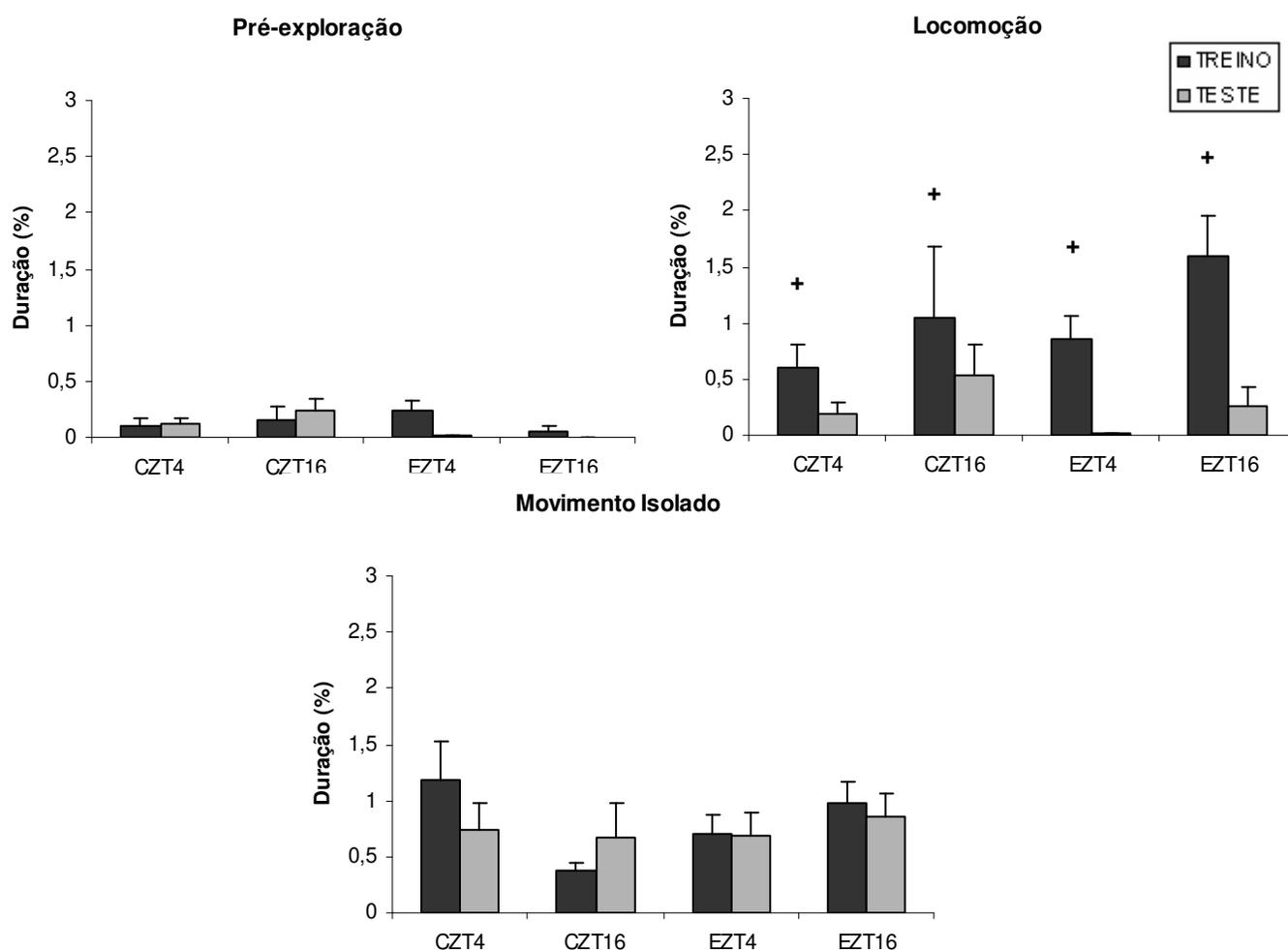


Figura 16 - Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais pré-exploratório, locomoção, movimento isolado durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os Grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. + diferença significativa entre as sessões de treino e teste. ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer.

A Figura 17 mostra dados referentes ao número de ocorrência do comportamento de congelamento obtidos por amostragem de tempo a cada 30 segundos durante as sessões de treino e teste em condicionamento aversivo ao contexto para os grupos CZT4, CZT16, EZT4 e EZT16. Os grupos EZT4 e EZT16 tiveram maior ocorrência de congelamentos tanto no treino quanto no teste quando comparados respectivamente aos grupos CZT4 e CZT16, com valores significativamente diferentes segundo o teste ANOVA ($F_{3,25} = 8,18; p < 0,001$). O

teste de Tukey-Kramer indicou que a sessão de treino do grupo CZT16 foi diferente das sessões de treino do grupo EZT16 e uma diferença de horário entre a sessão de treino do grupo CZT4 e CZT16. As sessões de teste dos grupos condicionados foram significativamente diferentes das sessões de teste dos grupos controles.

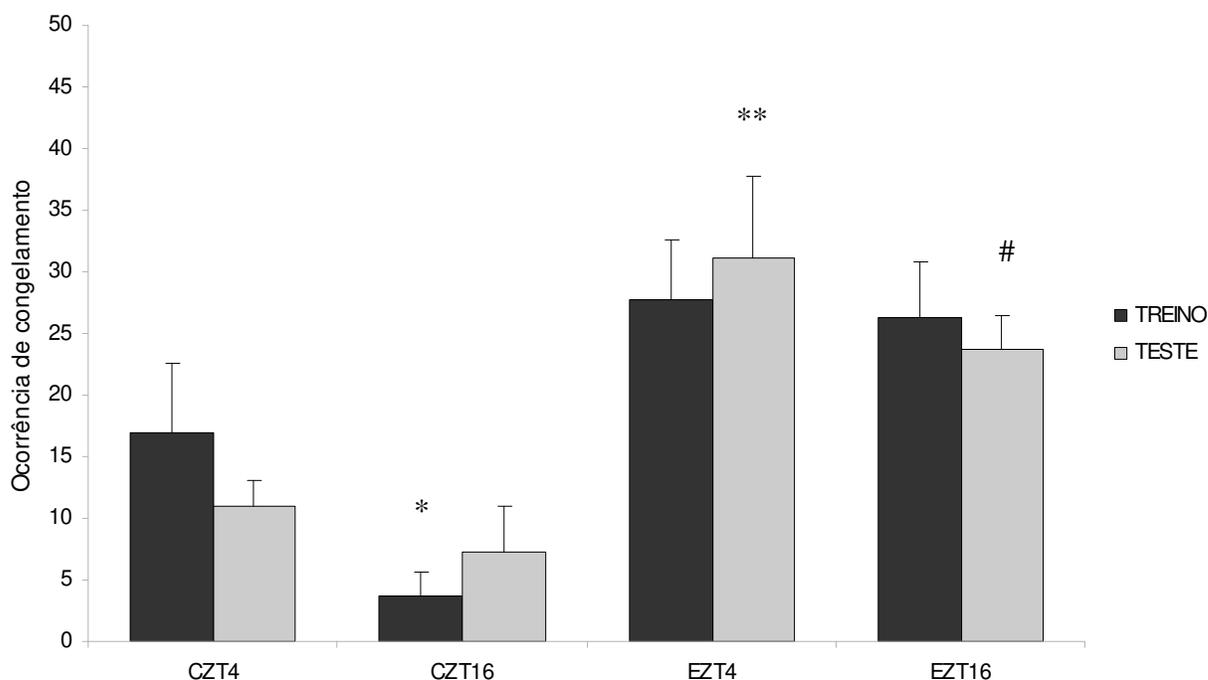


Figura 17 - Ocorrência média e erro padrão do congelamento por amostragem de tempo a cada 30 segundos nas sessões de treino e teste para os grupos Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Grupos Condicionados EZT4 e ZT16. * diferença significativa em comparação à sessão de teste dos grupos EZT16 e CZT4 ($p < 0,001$). ** significa diferença em comparação as sessões de teste dos grupos CZT4 ($p < 0,001$). # significa diferença significativa em relação ao grupo CZT16. (ANOVA para medidas repetidas, seguido de teste de Tukey-Kramer)

A análise da distribuição do comportamento de congelamento ao longo das sessões de treino e teste foi feita considerando-se a média da ocorrência de congelamento acumulada em blocos 4 blocos de 300 segundos cada. A Figura 18 apresenta as curvas de ocorrência de congelamento nas sessões de treino e de teste.

Os animais do grupo condicionado apresentaram elevada ocorrência de congelamento que foi mantida ao longo da sessão de treino e teste, a qual foi maior do que a verificada nos grupos controles. Os grupos controles exibiram ocorrência de congelamento nos primeiros blocos, com redução ao longo de ambas as sessões. O teste ANOVA para medidas repetidas evidenciou uma diferença significativa entre os grupos ($F_{3,21} = 15,12$; $p < 0,001$) e uma interação significativa entre grupo x blocos ($F_{9,116} = 5,36$; $p < 0,001$), a qual está relacionada com diferenças observadas entre alguns blocos do mesmo grupo ou entre blocos dos grupos. O teste de Tukey-Kramer indicou que o grupo EZT4 foi significativamente diferente do grupo controle CZT4, enquanto que o grupo EZT16 foi significativamente diferente do grupo CZT16, ou seja, o desempenho dos grupos controles e experimentais foi significativamente diferente em ambos horários. Somente o grupo EZT4 mostrou uma diferença entre seus próprios blocos, com o bloco 1 (5min) sendo significativamente diferente dos blocos 2 (10min), 3(15min) e 4(20min). O grupo EZT16 não mostrou aumento significativo de congelamento após os primeiros 5 min da sessão, momento a partir do qual os choques foram administrados não ocorrendo diferenças significativas em relação aos demais blocos da sessão de treino ($p > 0,05$).

O teste de Tukey-Kramer indicou que o grupo CZT4 foi significativamente diferente do grupo CZT16 para o primeiro bloco e significativamente diferente do grupo EZT4 para o segundo, terceiro e quarto blocos. Enquanto que o grupo CZT16 foi significativamente diferente do grupo EZT16 em todos os blocos das sessões, ou seja, o desempenho dos grupos controles e experimentais foi significativamente diferente em ambos horários. Os grupos EZT4 e EZT16 não diferiram entre si em nenhum dos blocos.

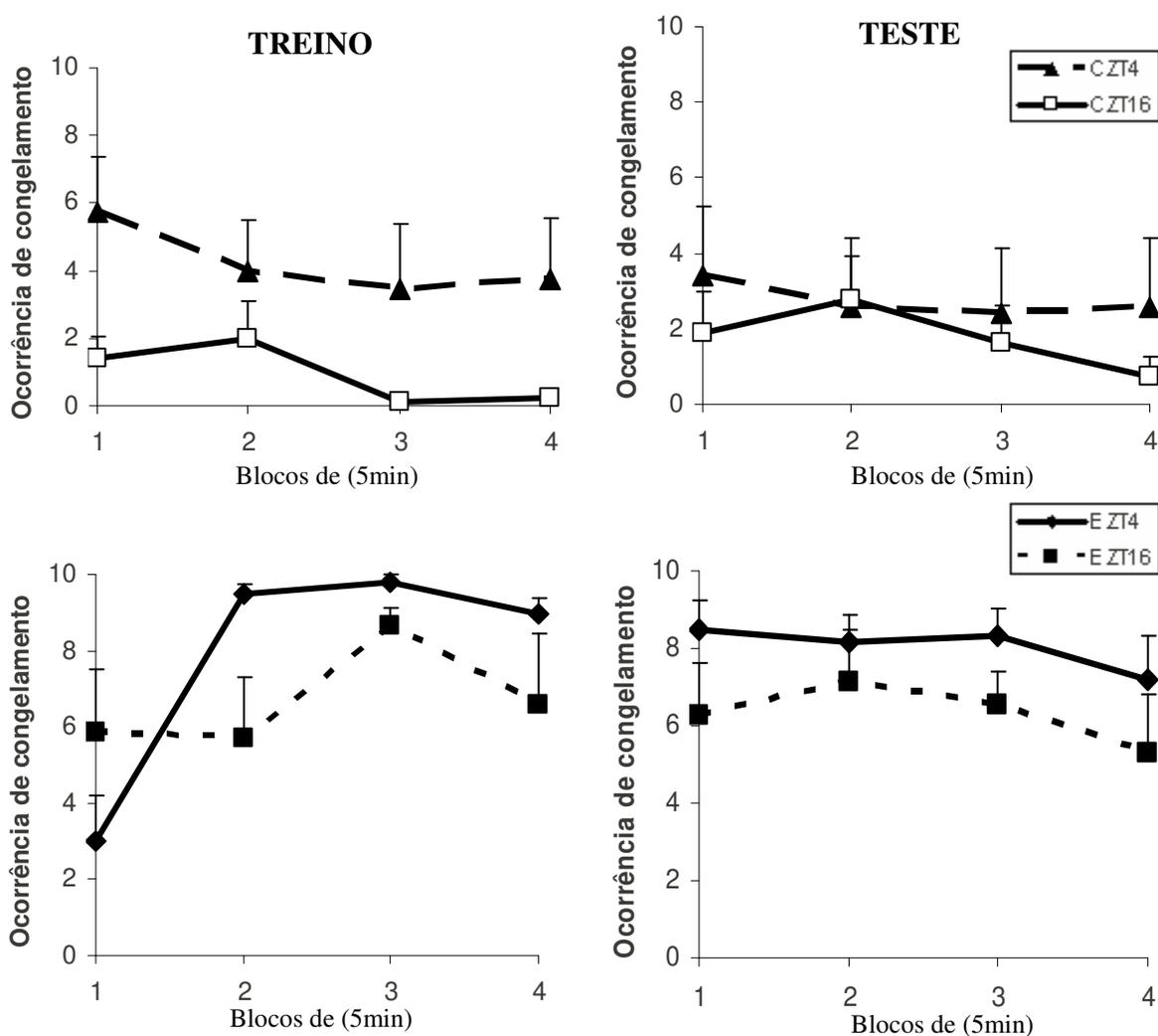


Figura 18 - Ocorrência média e erro padrão do congelamento distribuído em blocos de 300 segundos durante as sessões treino e teste de condicionamento aversivo ao contexto para os grupos Controle-contexto CZT4 e CZT16 e Condicionados EZT4 e EZT16. Cada ponto representa a ocorrência do comportamento em quatro blocos de registros 5min, 10min, 15min e 20min, mais EPM. (ANOVA para medidas repetidas, seguida de teste de Tukey Kramer)

4.3.2 – Análise da distribuição das células nNOS-positivas

A Figura 19 apresentam a comparação no número de células nNOS-positivas marcadas na área total do hipocampo de pombos dos grupos Condicionados EZT4 e EZT16, Controle-Contexto CZT4 e CZT16 e Controle-Manutenção MZT4 e MZT16. Os grupos

condicionados apresentaram um maior número de células nNOS-positivas em comparação aos grupos controle-contexto e controle-manutenção. O teste ANOVA de uma via seguido de múltiplas comparações *post hoc* com o teste de Bonferroni indicou diferença significativa ($F_{5,573} = 14,04$; $p < 0,0001$) na marcação de células nNOS-positivas marcadas na área total do hipocampo de pombos sendo que os grupos EZT4 e EZT16 foram significativamente diferentes de CZT4, CZT16, MZT4 e MZT16.

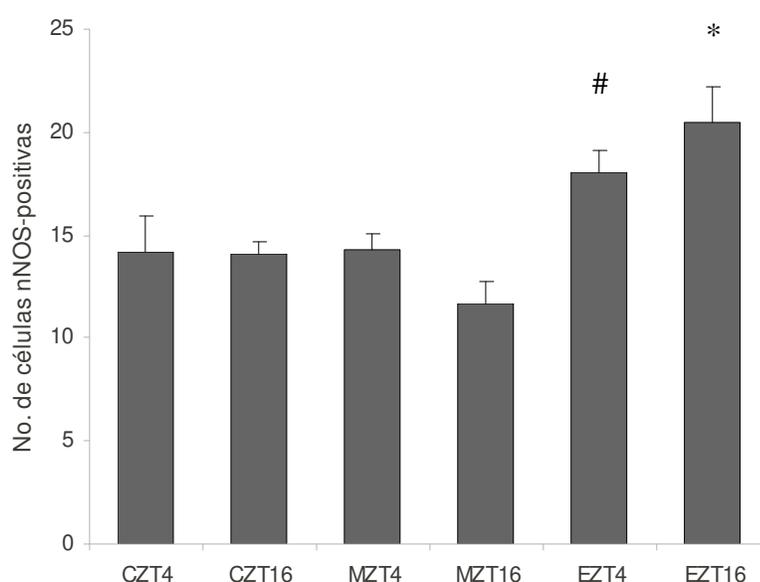


Figura 19 - Média e erro padrão do número de células nNOS-positivas marcadas na área total do hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto. Grupo Condicionado EZT4 e EZT16, Controle Contexto CZT4 e CZT16, Controle Manutenção MZT4 e MZT16. # significa diferença significativa em comparação aos CZT4 e MZT4. * significa diferença comparativa em relação a CZT16 e MZT16 ($p < 0,05$). (ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni).

Na Figura 20 podemos observar a comparação no número de células nNOS-positivas marcadas nas áreas dorsal (HpD) e ventral (HpV) no hipocampo de pombos dos EZT4, EZT16, CZT4, CZT16, MZT4 e MZT16. É possível observar que as áreas HpD apresentam uma marcação maior de células nNOS-positivas em comparação as áreas HpV. O teste ANOVA de duas vias com múltiplas comparações *post hoc* feita com o teste de Newman

Keuls mostrou uma diferença significativa entre os grupos condicionados e os grupos controle-contexto e controle-manutenção ($F_{5,1146} = 17,58$; $p < 0,0000$). Também houve uma diferença significativa para as áreas hipocâmpais sendo que a área HpD teve uma marcação significativamente diferente de HpV ($F_{1,1146} = 10,96$; $p < 0,001$). Observou-se uma interação entre grupo e áreas ($F_{5,1146} = 3,87$; $p < 0,002$), onde a HpD do hipocampo do grupo EZT16 foi significativamente diferente da área HpD dos demais grupos e também apresentou diferença da HpV do próprio grupo EZT16. Além disso, a área HpV de EZT16 também foi significativamente diferente da área HpV do grupo MZT16. No grupo EZT4 além de ser diferente da área HpD de EZT16, também teve suas áreas dorsal e ventral significativamente diferente das áreas HpD e HpV do grupo MZT16, respectivamente.

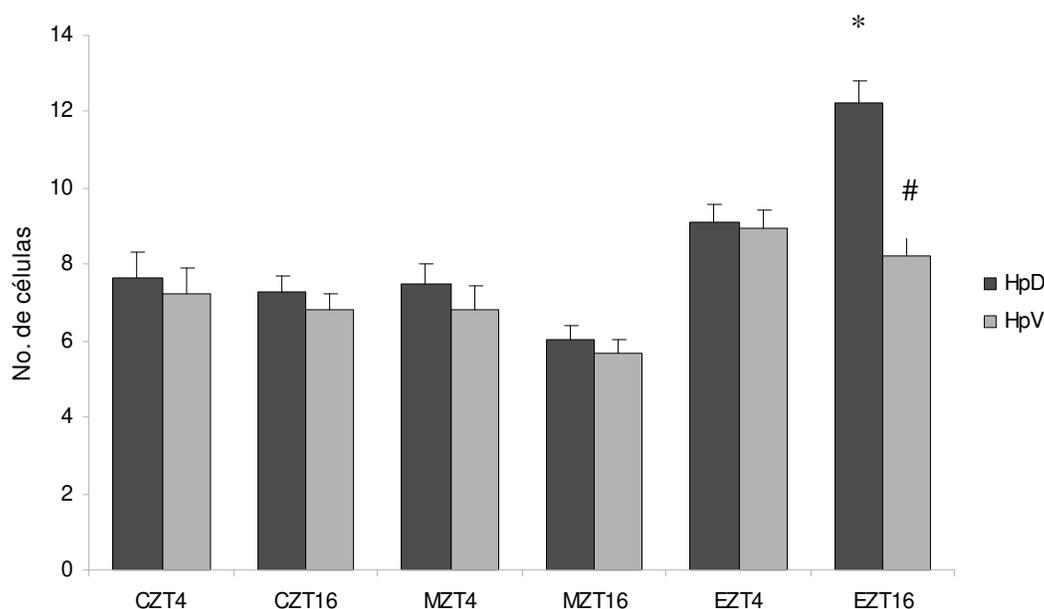


Figura 20 - Média e erro padrão do número de células nNOS-positivas marcadas nas áreas dorsal (HpD) e ventral (HpV) do hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento aversivo ao contexto. Grupo Condicionado EZT4 e EZT16, Controle Contexto CZT4 e CZT16, Controle Manutenção MZT4 e MZT16. *diferença em comparação a HpD de EZT4, CZT16 e MZT6 e HpV de EZT16. # diferença em comparação a HpV de CZT16. (ANOVA de duas vias, seguido de teste de Newman-Keuls).

Na Figura 21 observa-se a comparação do número de células marcadas nas áreas

HpD, HpVL e HpVM para cada um dos grupos. Observa-se um predomínio da marcação na área HpD em relação as áreas HpVM e HpVL. Também é possível visualizar uma maior marcação nos grupos condicionados em comparação aos grupos controles. O teste ANOVA duas vias mostrou uma diferença significativa para áreas ($F_{2,1719} = 280,9$; $p < 0,00001$) e uma interação significativa grupo x área ($F_{10,1719} = 7,31$; $p < 0,00000$). Segundo o teste de Newman-Keuls as áreas HpD dos grupos EZT4, EZT16, CZT4, CZT16, MZT4 e MZT16 foram significativamente diferentes de suas áreas HpVL e HpVM. Também houve uma diferença significativa para grupos ($F_{5,1719} = 21,5$; $p < 0,00001$), após o *post hoc* com o teste de Newman-Keuls observou-se que os grupos EZT4, EZT16 e MZT16 foram diferentes entre si, além de serem diferentes de todos os outros grupos. A área HpD grupos EZT4, EZT16 e MZT16 apresentaram diferenças significativas de todas as outras áreas HpD dos outros grupos e também apresentaram diferença entre si. E a área HpVL do grupo EZT4 foi significativamente diferente das áreas HpVL dos grupos controle-manutenção.

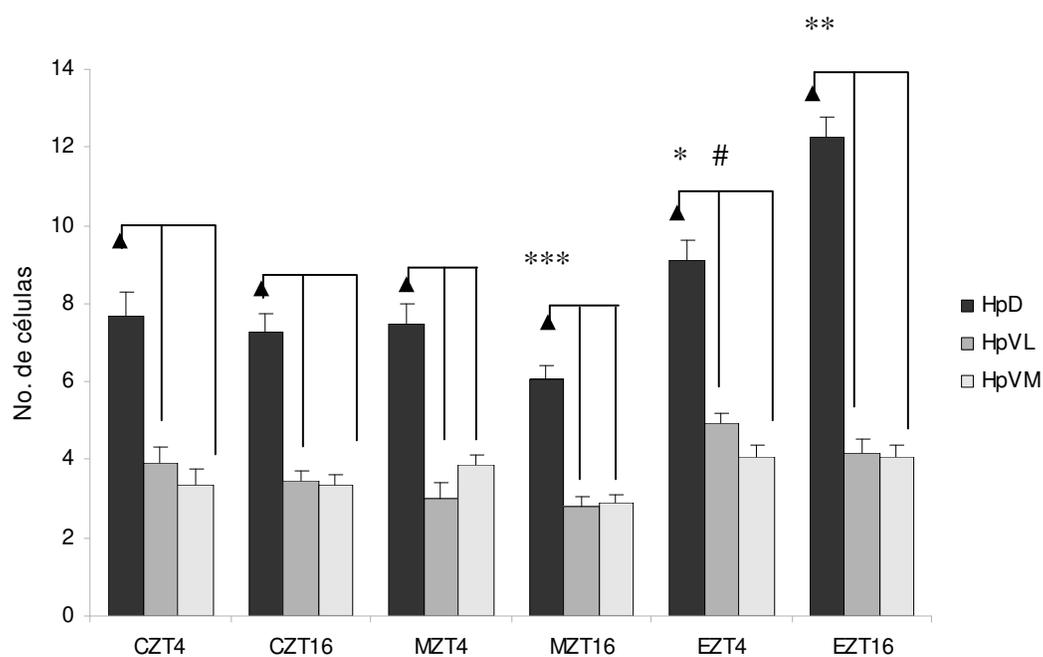


Figura 21 - Média e erro padrão do número de células nNOS-positivas marcadas nas áreas dorsal (HpD), ventrolateral (HpVL) e ventromedial (HpVM) do hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento

aversivo ao contexto. Grupo Condicionado EZT4 e EZT16, Controle Contexto CZT4 e CZT16, Controle Manutenção MZT4 e MZT16. * diferença em comparação as áreas HpD dos grupos EZT16, CZT4, MZT4. # diferença em comparação as áreas HpV de MZT4. ** diferença em comparação a área HpD de EZT4, CZT16, MZT16. *** diferença em comparação a área HpD de EZT16, CZT16, MZT4. ▲ significa diferença em relação a HpVL e HpVM (ANOVA de duas vias, seguido de Teste de Newman-Keuls).

Na Figura 22 são apresentadas imagens digitalizadas de secções frontais do cérebro mostrando diferentes tipos celulares com marcação positiva para nNOS que foram observados no hipocampo de pombos. Tendo como característica a marcação citoplasmática e de membranas, marcando o corpo celular e ramificações dendríticas e axonais.

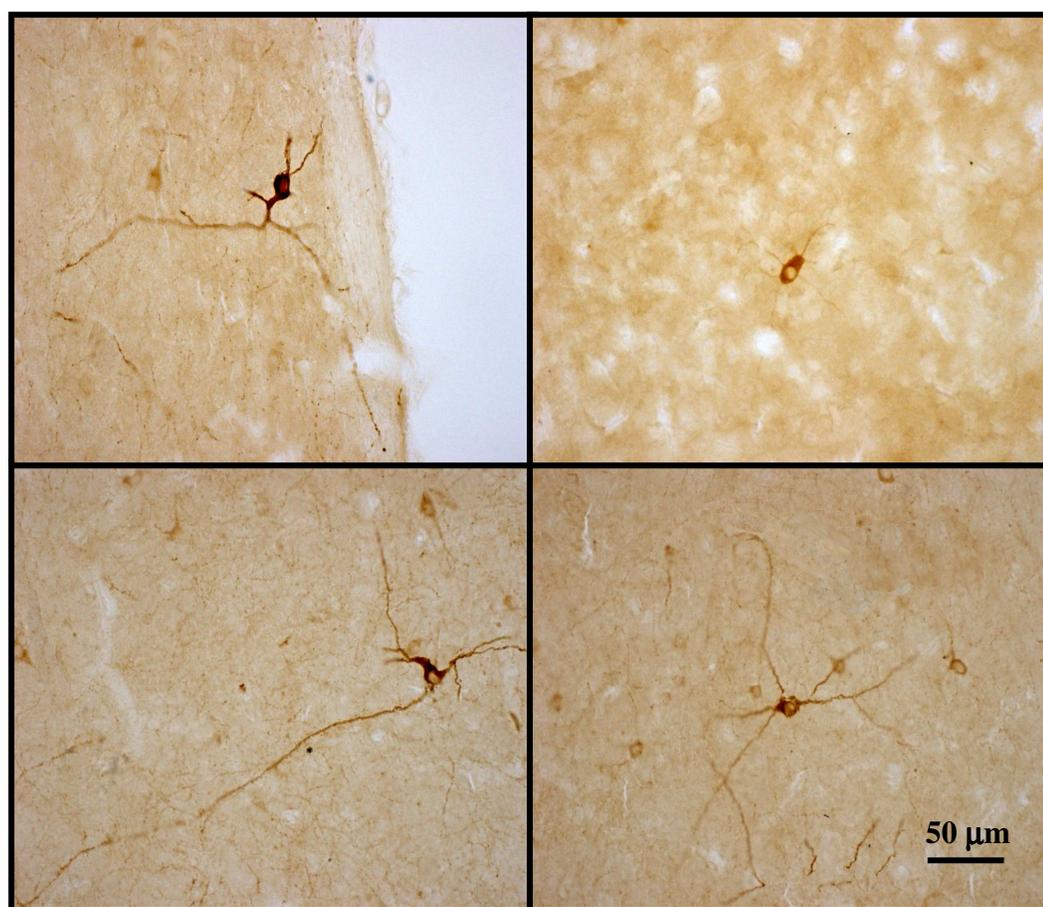


Figura 22 - Imagem digitalizada dos tipos neurais marcados positivamente para nNOS no hipocampo de pombos. Ampliação de 200x. Barra de escala = 50 μ m.

Na Figura 23 está representado esquematicamente o hipocampo de pombos (A)

dividido nas áreas dorsal (HpD) e ventral (HpV) e ilustrada uma secção frontal do hipocampo com imagem digitalizada de marcação de células nNOS-positivas (B).

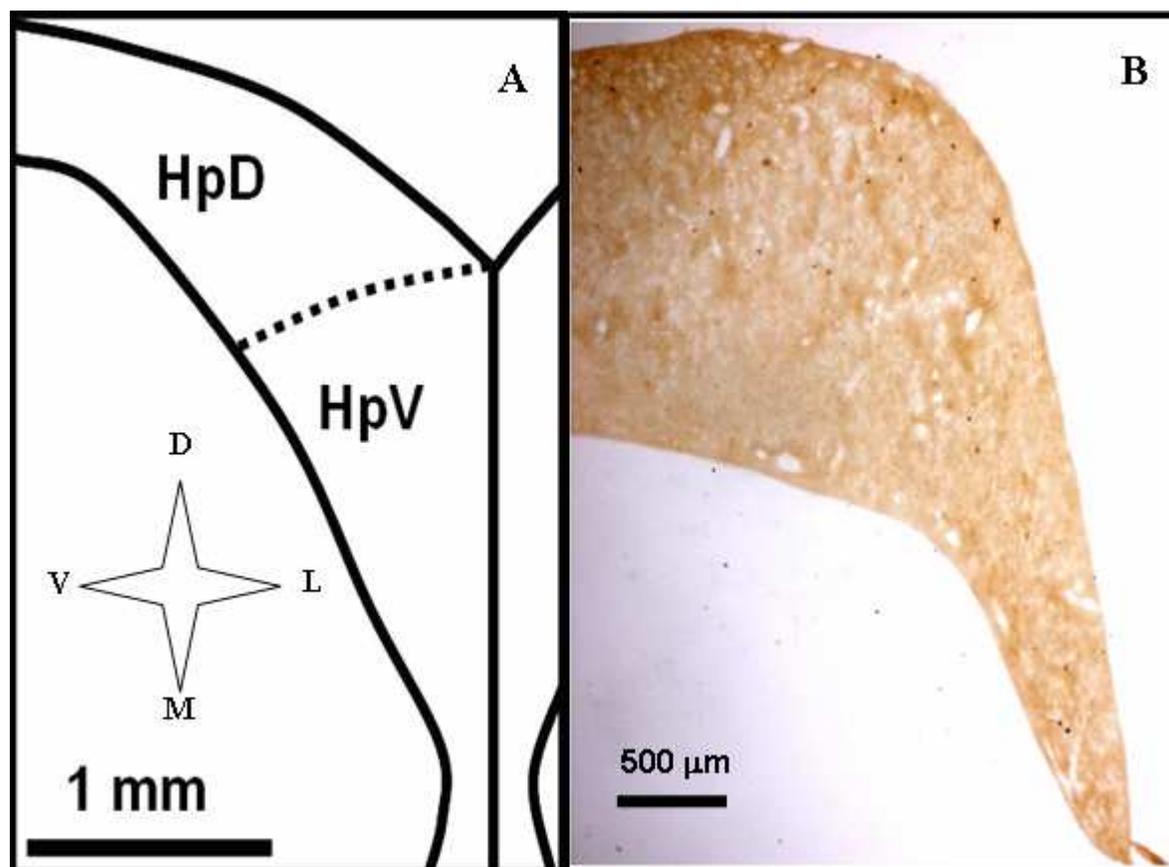


Figura 23 A - representação esquemática de corte coronal do hipocampo de pombos dividido nas áreas dorsal (HpD) e ventral (HpV). Barra de escala = 1 mm. B - Imagem digitalizada de secção frontal do hipocampo de pombos marcado positivamente para nNOS. Ampliação de 50x. Barra de escala = 500 µm.

As Figuras 24 e 25 apresentam imagens digitalizadas de secções frontais, unilaterais, das regiões do hipocampo dos animais dos grupos EZT4 e EZT16, CZT4, CZT16, MZT4 e MZT16, com marcação de células nNOS-positivas nas regiões do Hipocampo Dorsal - HpD (Fig. 22) e do hipocampo Ventral - HpV (Fig. 24).

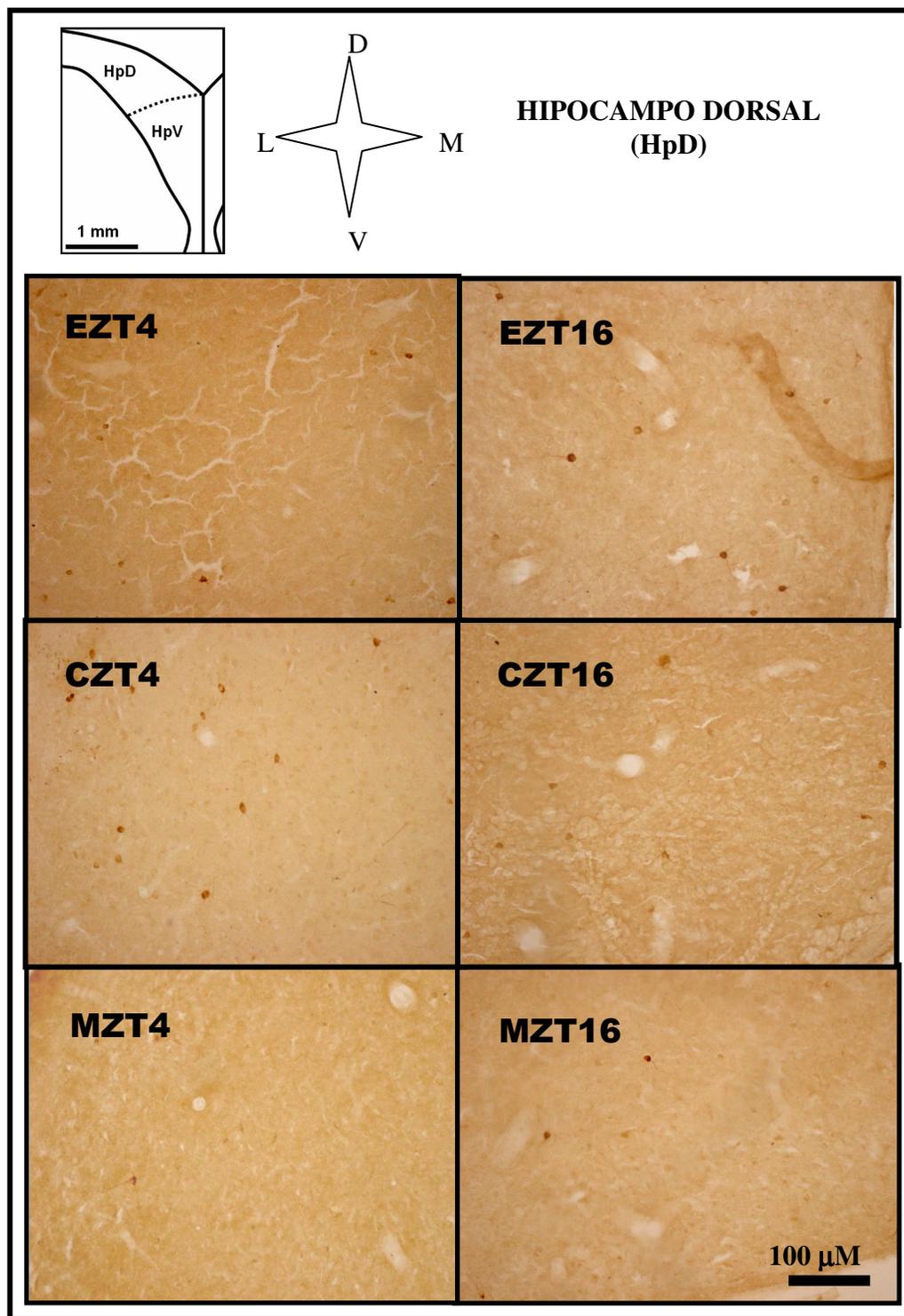


Figura 24 - No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). Barra de escala = 1mm. As imagens digitalizadas são de secções frontais, de uma região do HpD, mostrando o padrão de marcação de células nNOS-positivas para os Grupos Condicionado (EZT4 e EZT16), Grupos Controle-Contexto (CZT4 e CZT16) e Grupos Controle-Manipulação (MZT4 e MZT16). Ampliação 200x. Barra de escala = 100 μm.

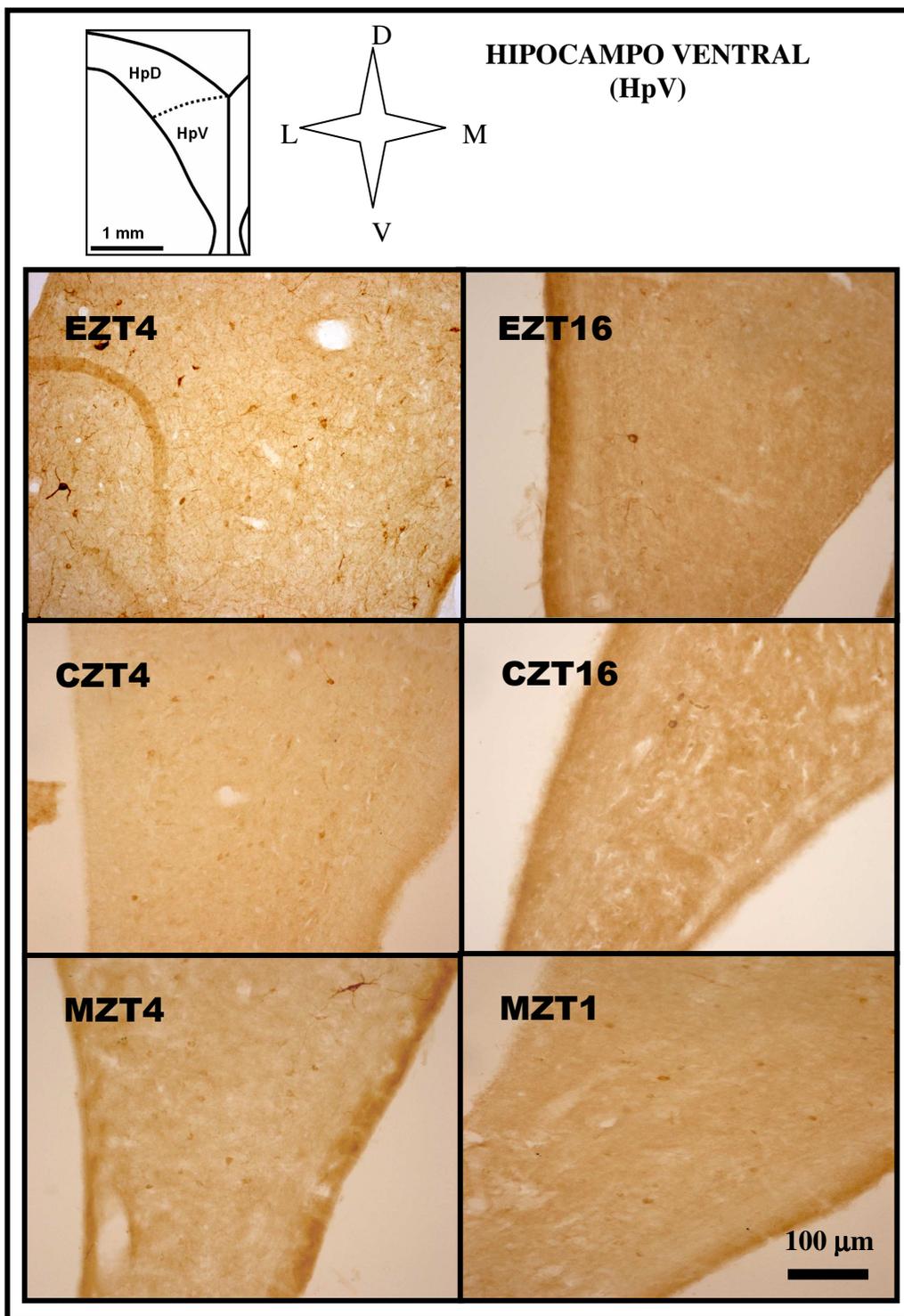


Figura 25 - No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). Barra de escala = 1mm. As imagens digitalizadas são de secções frontais, de uma região do HpV, mostrando o padrão de marcação de células nNOS-positivas para os Grupos Condicionado (EZT4 e EZT16), Grupos Controle-Contexto (CZT4 e CZT16) e Grupos Controle-Manipulação (MZT4 e MZT16). Ampliação 200x. Barra de escala = 100 µm.

4.3 – DISCUSSÃO

Os horários ZT4 e ZT16 foram escolhidos para a realização das sessões de condicionamento contextual aversivo, pois os dados da Etapa I que permitiriam verificar a existência de uma oscilação circadiana da proteína nNOS no seu estado ativo, tiveram nesses horários, respectivamente, a ocorrência da máxima e da mínima atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo de pombos. Os dados comportamentais obtidos na Etapa II indicaram que os pombos dos grupos condicionados não diferiram entre si, indicando que o condicionamento não variou em função do horário. A expressão comportamental de congelamento nos grupos experimentais indica que ambos os grupos, independentemente do horário adquiriram uma memória aversiva ao contexto do treino, indicada pelo aumento da ocorrência de congelamento tanto no treino quanto a manutenção da ocorrência desse comportamento durante o teste em comparação com os 5 minutos iniciais que precederam o condicionamento. O grupo EZT16 não apresentou uma diferença estatística em relação ao seu bloco inicial, mas manteve uma expressão de ocorrência de congelamento aumentada durante o treino e o teste que acompanhou os valores expressos pelo grupo EZT4. Contudo nos grupos controles que foram apenas expostos ao contexto sem estimulação aversiva observou-se uma diferença significativa no primeiro bloco de treino, com uma ocorrência maior de congelamento para o grupo controle da manhã. Esses dados indicariam uma modulação temporal da expressão comportamental de congelamento a uma situação nova. Os grupos controles mostram habituação ao contexto nas duas sessões, indicada pela diminuição da resposta de congelamento no decorrer das sessões. Além disso, os resultados também mostraram que o número de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos variou em função do treinamento ao qual o animal foi submetido e em função do horário, na medida em que os grupos condicionados apresentaram maior número

de células nNOS-positivas que os controles, sendo que os maiores valores foram computados para o grupo condicionado à noite.

Os dados de duração total dos comportamentos indicaram que o condicionamento contextual foi efetivo tanto para o grupo EZT4 quanto para o grupo EZT16, fato demonstrado pelos valores totais da duração do congelamento (Fig. 14) e também pelo número de ocorrência de congelamento (Fig. 17) maiores que os expressados nos grupos controles. De fato, a duração total do congelamento foi maior não apenas que a observada nos grupos controle, mas também em relação aos outros tipos de comportamento exibidos pelos animais experimentais durante as sessões de treino e teste.

No condicionamento aversivo ao contexto há uma associação dos estímulos aversivos (choque) ao ambiente em que estes foram apresentados, adquirindo assim propriedades eliciadoras dos comportamentos defensivos em resposta ao medo condicionado (MAREN *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2006). Os animais dos grupos EZT4 e EZT16 expostos ao pareamento choque-contexto na sessão de treino, não apresentaram diferenças significativas entre si nos diferentes comportamentos, apresentando um predomínio do comportamento de congelamento e, em menor evidência, comportamentos utilizados para avaliação de risco como a exploração cautelosa e a vigilância (REIS *et al.*, 1999; CANOVA, 2008). Observaram-se valores baixos ou nulos relativos à ocorrência de outros comportamentos como exploração, manutenção, locomoção, pré-exploração, movimentos isolados e parado. Segundo Blanchard e Blanchard (1988) ao expor um animal em um novo contexto os primeiros comportamentos defensivos são os de avaliação de risco, como vigilância e exploração; a partir da apresentação do estímulo aversivo esses comportamentos dão lugar a um segundo nível de comportamento defensivo que é a resposta do

congelamento. Pela sua importância como um comportamento defensivo, o congelamento passou a ser utilizado como um índice de medo condicionado em estudos experimentais em diversas espécies, quando os animais são expostos a ambientes que não permitem a fuga em resposta a estímulos aversivos (ANAGNOSTARAS *et al.*, 2001; BAST *et al.*, 2003).

Os grupos controle tiveram uma maior variabilidade de categorias comportamentais exibidas ao longo das sessões de treino e teste, sendo que a duração foi equivalente nos comportamentos de congelamento, exploração, exploração cautelosa, vigilância, manutenção e parado dentro desses grupos. Foi exibida uma maior expressão do comportamento de vigilância e parado no grupo CZT4 em relação aos grupos condicionados, fato ligado a uma avaliação de risco por estar exposto a um novo ambiente e por uma posterior habituação ao longo das sessões, concordando com os dados da literatura sobre habituação (VALENTINUZZI & FERRARI, 1997; SOUZA, 1999).

No presente estudo no bloco inicial da sessão de treino foi detectada uma diferença significativa na ocorrência de congelamento que ocorria entre os grupos CZT16 que foi significativamente diferente de CZT4. Foi observada uma variação dia-noite no comportamento de congelamento dos animais controle, sendo que os animais do grupo CZT4 tiveram uma expressão maior de congelamento que os do grupo CZT16. Tal fato já foi discutido por Valentinuzzi e Ferrari (1997), onde foi constatada uma variação dia-noite no processo de habituação ao som em pombos, onde os animais habituados em horários vespertinos apresentavam uma maior prevalência de comportamentos exploratórios, pré-exploratórios e de manutenção, sugerindo que os processos fisiológicos em interação com o ambiente desses animais estão em estados diferentes e são dependentes da hora do dia.

A partir do primeiro estímulo aversivo apresentado, a prevalência de congelamento foi

observada nos grupos condicionados e se manteve ao longo da sessão de treino e teste. O condicionamento se mostrou efetivo em ambos os grupos condicionados ao longo de toda a sessão de teste, visto que mantiveram o comportamento de congelamento ao longo da sessão nos diferentes blocos, evidenciando a expressão de memória do contexto aversivo. Esses dados indicam que a experiência aversiva associada ao contexto induziu formação e a evocação da memória aversiva.

O fato de que não foi constatada uma variação dia-noite no condicionamento aversivo ao contexto nos horários utilizados surpreende visto que difere de outros estudos. Canova (2009) usou condicionamento com associações contexto-choque em pombos e constatou uma variação dia-noite do comportamento de congelamento apenas no primeiro bloco da sessão de teste ao contexto nos horários correspondentes a ZT2 e ZT14, a qual poderia ser indicativa de variação dia-noite na recuperação da memória de longa-duração. Em camundongos foi observada uma variação dia-noite no condicionamento de medo ao contexto nos horários correspondentes a ZT4 e ZT16, com um déficit da aprendizagem no horário ZT16. Esse horário foi associado à mínima expressão da proteína CREB no hipocampo desses animais (ECKEL-MAHAN *et al.*, 2008). Como já discutido na Etapa I, recentemente foi constatado que a oscilação circadiana da via MAPK/CREB/AMPC é requerida para consolidação da memória no condicionamento de medo em camundongos (ECKEL-MAHAN *et al.*, 2008). A ativação dessa via ocorre por via glutamatérgica (VANHOUTTE *et al.*, 1999), da mesma forma que ocorre com a via de ativação da nNOS. A oscilação circadiana da nNOS parece não estar diretamente envolvida na consolidação da memória, mas a sua ritmicidade basal pode estar intrincada com toda uma ciclicidade de vias glutamatérgicas, das quais há uma dependência para uma efetiva consolidação da memória.

No presente trabalho, poderia se supor que ocorresse um déficit no condicionamento no horário ZT16, visto ser o de mínima expressão da nNOS. Isso poderia fundamentar argumentos favoráveis à importância da nNOS para esse processo de formação de memória aversiva. De fato, essa importância pode ser aventada por que foi observado um aumento da expressão de nNOS no hipocampo de pombos nos animais condicionados ao contexto em ambos os horários em relação aos animais controle-contexto e manutenção. Esse aumento na expressão de nNOS no hipocampo após um condicionamento contextual aversivo corroboram os dados da literatura sobre a importância da nNOS para a aprendizagem e memória (MAREN, 1998; SILVA, 2007; DENADAI, 2008; KELLEY *et al.*, 2009; KELLEY *et al.*, 2010). Além disso, foi observado que a distribuição das células nNOS-positivas foi maior na região dorsal do hipocampo em relação à região ventral. Não foi constatada uma diferença no número de células marcadas entre as áreas ventrolateral e ventromedial. Suarez *et al.* (2006) observaram que a formação hipocampal de galinhas apresenta uma ampla distribuição de células imunorreativas para a nNOS, com predomínio na área dorso-lateral do hipocampo. Além disso, o aumento de células nNOS positivas na área HpD foi relatado ao se treinar pombos em tarefas de aprendizagem de escolha alimentar (SILVA, 2007), demonstrando uma relação entre a aprendizagem e o aumento de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos. Tais dados sugerem a importância funcional de circuitos sinápticos modulados pela nNOS e, conseqüentemente, pelo NO, no hipocampo de pombos. A área HpD no hipocampo de aves pode ser dividido em área dorsal lateral que é considerada compatível ao córtex entorrinal de mamíferos (ATOJI & WILD, 2006), essa área se projeta para a área dorso medial por uma via semelhante a via perfurante e área dorso medial e compatível ao giro denteado de mamíferos (KAHN *et al.*, 2003). Esse circuito forma a entrada sensorial para o hipocampo aves assim com o as áreas compatíveis formam em mamíferos

(KAHN *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos que investigam a participação da nNOS e seu envolvimento com o condicionamento de medo utilizam-se de inibidores da síntese de NO (DENADAI, 2008, KELLEY *et al.*, 2010), seqüestradores de NO ou mesmo animais *knockout* para nNOS (MAREN, 1998; DENADAI, 2008; RESSTEL *et al.*, 2008; KELLEY *et al.*, 2010; KELLY *et al.*, 2011), mostrando que a inibição da nNOS ou de suas vias diretas de sinalização causam prejuízo na aquisição, consolidação e evocação da memória aversiva, demonstrando sua importância na aquisição e consolidação da memória contextual aversiva.

Contudo, o presente trabalho demonstrou que o condicionamento contextual aversivo induziu um aumento de marcação da imunorreatividade para nNOS foi mais significativo no HpD dos animais condicionados no horário ZT16, inclusive maior que do grupo condicionado EZT4. Como o horário de condicionamento de EZT16 é referente ao horário de mínima atividade enzimática da NOS observada na Etapa I esses dados tornam-se interessantes e intrigantes, sugerindo hipóteses relacionadas à participação da nNOS na aprendizagem e na formação da memória aversiva e aos mecanismos reguladores. Ou seja, esse dado poderia indicar que em condições de baixa disponibilidade dessa enzima a formação e a evocação da memória aversiva induziria uma maior expressão de nNOS no hipocampo de pombos. Isso mostraria que essa molécula é requerida além de sua produção basal para nos processos referentes a memória aversiva. Portanto, a questão que se coloca refere-se a por que a evocação da memória aversiva ao contexto induziria maior expressão imunorreativa no horário em que a atividade da nNOS é menor. Porém, o fato de que a maior expressão de células nNOS-positivas não se correlacionou com a expressão de uma memória mais robusta, visto que não houve diferenças significativas entre os grupos EZT4 e EZT16. Nesse

sentido, é interessante uma maior investigação sobre os mecanismos que regulam essa possível ação compensatória que ocorre com a enzima nNOS em situações de baixa disponibilidade.

Esses dados corroboram aqueles relatados por Denadai (2008), a qual estudou pombos condicionados com associações som-choque e testados no contexto aversivo e que receberam injeção intraperitoneal de 7-nitroindazole, inibidor seletivo para nNOS, imediatamente após o treino. Esses animais apresentaram uma maior inibição da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no tecido hipocampal, após a evocação da memória aversiva durante o teste ao contexto. Contudo, a análise de *Western Blotting* do tecido hipocampal indicou uma maior expressão da proteína nNOS em comparação aos seus controles. Esses dados, aparentemente contraditórios, podem sugerir que a redução da atividade da nNOS, causada pela administração do 7-NI, levaria a uma menor biodisponibilidade de NO e, conseqüentemente, a uma alteração nos mecanismos sinápticos mediados por essa molécula. Desse modo, essa condição poderia gerar um *feedback* intracelular que resultaria em um aumento da expressão de nNOS no hipocampo, no sentido de garantir o equilíbrio celular em condições em que a atividade da nNOS e do NO fossem requisitadas. Inclui-se aí as situações de aprendizagem e formação de memória como, no condicionamento aversivo. A evocação da memória aversiva durante o teste ao contexto poderia, assim, induzir esse aumento compensatório da nNOS, na medida em que estaria relacionada com mecanismos de sinalização glutamatérgica e fortalecimento sináptico que garantem um condicionamento aversivo efetivo mesmo no horário referente a mínima atividade enzimática no estado basal do animal. Porém, tais considerações constituem ainda meras suposições.

É interessante notar que Garcia *et al.* (2008) relatam dados que se relacionam positivamente com tais suposições. A ocorrência de um aumento da expressão de nNOS foi observada em tecido vascular de camundongos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Esse dado mostrou-se interessante por que a hipercolesterolemia age no endotélio vascular provocando um aumento na produção de ânions superóxidos, que pode levar à produção de peroxinitrito e, conseqüentemente a uma redução na biodisponibilidade de NO para o tecido vascular.

Portando, seria possível supor que em situações que requisitam a participação da nNOS em processos fisiológicos ou comportamentais em momentos em que a disponibilidade da atividade da NOS é baixa, seja devido à ação de inibidores ou, como no presente estudo, pela regulação temporal da ritmicidade intrínseca ao organismo, poderiam induzir aumento na quantidade da NOS. Isso garantiria que mesmo no horário de mínima atividade enzimática da nNOS haveria um aumento na disponibilidade dessa molécula. Mas, os mecanismos que fazem parte desse suposto efeito compensatório necessitam de maior suporte experimental.

Os dados do presente estudo vêm contribuir com o conhecimento sobre a o padrão temporal circadiano da expressão protéica e da atividade enzimática da proteína nNOS no hipocampo de pombos e também para a análise das relações existentes entre o condicionamento contextual aversivo e os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na memória aversiva de aves. Em especial, mostra as variações dia-noite existentes no comportamento de pombos expostos a um contexto sem estímulo aversivo e o efeito da aprendizagem modulando essa variação dia-noite nos animais exposto ao contexto aversivo.

Novos estudos são necessários para elucidar se a oscilação circadiana de vias

moleculares específicas é requerida para consolidação da memória em aves. Também é necessário se averiguar a que moléculas e vias estão envolvidas tanto na variação circadiana da habituação, quanto na variação circadiana do condicionamento aversivo ao contexto. Mais especificamente com relação a esse estudo é necessário se verificar através de métodos quantitativos, como pelo método de Elisa ou semi-quantitativos, como o *western blotting*, a oscilação circadiana das proteínas em animais exposto ao processo de condicionamento aversivo. Além de verificar o efeito da estampagem temporal no condicionamento contextual aversivo desses animais em relação a oscilação das proteínas, entre elas a nNOS.

6 – CONCLUSÕES

O presente trabalho veio contribuir com outros estudos desenvolvidos no Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento sobre a organização temporal do condicionamento aversivo, acrescentando informações sobre a variação temporal de processos comportamentais e moleculares, visto que:

1. Caracterizou o padrão temporal circadiano da expressão protéica e a atividade enzimática da proteína nNOS, sendo demonstrado uma ritmicidade circadiana robusta com porcentagens rítmicas de 67, 57% e 96, 03%, respectivamente.

2. Indicou uma variação dia-noite na ocorrência de congelamento de animais não exposto a estímulos aversivos e que o condicionamento contextual aversivo é eficaz tanto em sessões matutinas quanto em sessões vespertinas nos horários investigados.

3. Demonstrou que o condicionamento contextual aversivo induz um aumento no número de células nNOS positivas no hipocampo de pombos.

4. O maior aumento de células nNOS-positivas na região dorsal do hipocampo de pombos sugere a importância dessas células nos circuitos sinápticos dessa região.

5. Sugerimos a possibilidade da existência de mecanismos compensatórios para expressão da proteína nNOS, quanto essa é requisitada em situações de baixa disponibilidade.

7 - REFERÊNCIAS

1. ABU-SOUD HM, STUEHR DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *PNAS*. 90:10769–10772, 1993.
2. AGOSTINO PV, PLANO AS, GOLOMBEK DA. Sildenafil accelerates reentrainment of circadian rhythms after advancing light schedules. *PNAS*. 104 (23): 9834-9839, 2007.
3. ALVAREZ RP, BIGGS A, CHEN G, PINE DS, GRILLON G. Contextual fear conditioning in Human: Cortical-Hippocampal and Amygdala contributions. *J. Neurosci.* 28(24): 6211-6219, 2008.
4. ANAGNOSTARAS SG, GALE GD, FASENLOW, MS. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*. 11: 8-17, 2001.
5. ARBONES ML, RIBERA J, AGULLO L, BALTRON MA, CASANOVAS A, RIVEROS-MORENO V, GARCIA A. Characteristics of nitric oxide synthase type I of rat cerebellar astrocytes. *Glia*. 18(3):224-232, 1996.
6. ASCHOFF J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposium. Quant Biol.* 25:11-28, 1960.
7. ATOJI Y, WILD, JM. Anatomy of the avian hippocampal formation. *Rev Neurosci* 17(1-2):3-15, 2006.
8. ATOJI Y, WILD JM, YAMAMOTO Y, SUZUKI, Y. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 447:177-199, 2002.
9. AYERS NA, KAPÁS L, KRUEGER JM. Circadian variation of nitric oxide synthase activity and cytosolic protein levels in rat brain. *Brain Res*. 707: 127-130, 1996.
10. BAADER SL, SCHILLING K. Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. *J Neurosci*. 16(4): 1440-1449, 1996.
11. BARATTI CM, KOPF SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65:197-201, 1996.
12. BARDGETT ME, BOECKMAN R, KROCHMAL D, FERNANDO H, AHRENS R, CSERNANSKY JG. NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. *Brain Res Bull.* 60(1-2):131-142, 2003.

13. BAST T, ZHANG WN, FELDON J. Hippocampus and classical fear conditioning. *Hippocampus*. 11: 828:831, 2001.
14. BAST T, ZHANG WN, FELDON J. 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, 2003.
15. BEAR MF, CONNORS BWE, PARADISO MA. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Artmed Editora, 2a. Edição, 2002.
16. BEKINSCHTEIN P, CAMMAROTA M, IGAZ LM, BEVILAQUA LR, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, v. 53, n. 2, p. 261-277, 2007.
17. BENEDITO-SILVA AA. Cosana: uma versão atualizada do Cosina para microcomputador de 16 bits. *Resumos da III FESBE, Caxambu*. 46, 1988.
18. BINKLEY S, REILLY KB, HRYSHCHYSHYN M. N-Acetyltransferase in the chick retina 1. Circadian rhythms controlled by environmental lighting are similar to those in the pineal gland. *J. Comp. Physiol*. 139: 103:108, 1980.
19. BIANCHIN M, WALZ R, RUSCHEL AC, ZANATTA MS, DA SILVA RC, BUENO E SILVA M, PACZKO N, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol*. 59(2):83-86, 1993.
20. BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol*. 39: 43-48, 1988.
21. BLISS TV, COLLINGRIDRE GL A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361(6407): 31-39, 1993.
22. BONINI JS, DA SILVA WC, BEVILAQUA LRM, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. On the participation on the hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neurosc*. 147: 37-45, 2007.
23. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
24. BRANDSTÄTTER R, ABRAHAM U. Hypothalamic circadian organization in birds I. Anatomy, functional, morphology and terminology of the suprachiasmatic region. *Chronobiol. Inter.*. 20 (4) : 637-655, 2003.
25. BREDT DS, SNYDER SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 8(1): 3-11, 1992.

26. BRITO I, BRITTO LRG, FERRARI EAM. Analysis of zif268 expression in the hippocampus of the pigeon after training in classical sound-shock conditioning. *Behav Neurosci.* 120(2):353-361, 2006.
27. BRÜNING G, FUNK U, MAYER B. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the brain of chicken. *Neuroreport.* 5 (18): 2425-2428, 1994.
28. BURCHULADZE R, ROSE SP. Memory Formation in Day-old Chicks Requires NMDA but not Non-NMDA Glutamate Receptors. *Eur J Neurosci.* 4(6): 533-538, 1992.
29. BUTLER AB, HODOS W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: evolution and adaptation.* Wiley-Liss, NY, USA, 1996.
30. CAIN SW, CHOU T, RALPH MR. Circadian modulation of performance on an aversion-based place learning task in hamsters. *Behav. Brain Res.* 150: 201-205, 2004.
31. CAIN SW, MCDONALD RJ, RALPH MR. Time stamp in conditioning place avoidance can be set to different circadian phases. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89: 591-594, 2008.
32. CALIXTO AV, VANDRESEN N, DE NUCCI G, MORENO H, FARIA MS. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. *Brain Res. Bull.* 55: 37-42, 2001.
33. CAMMAROTA M, BEVILAQUA LRM, VIANNA MRM, MEDINA JH, IZQUIERDO I. The extinction conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. *Res. Bras. Psiq.* 29 (1): 80-85, 2007.
34. CAMPBELL CB, HODOS W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. *Brain Behav. Evol.*, 3: 353-367, 1970.
35. CANOVA F. Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos (C. lívia). Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2009.
36. CARLSON NR. *Physiology of Behavior.* Boston, London, Toronto, Sydney, Tokyo and Singapore: Allyn and Bacon, 409-450 p., 2001.
37. CASSONE VM, MENAKER M. Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? *J. experim. Zoo.* 232 (3): 539 - 549, 1984.
38. CASSONE VM, PAULOSE JK, WHITFIELD-RUCKER MG, PETERS JL. Time's arrow flies like a bird: two paradoxes for avian circadian biology. *Gen Comp Endocrinol.* 163(1-2): 109:116, 2009.
39. CANTWELL EL, CASSONE VM. Chicken suprachiasmatic nuclei: II. Autoradiographic and Immunohistochemical Analysis. *J. Comp. Neuro.* 499:442-457, 2006.

40. COLOMBO M, BROADBEND N. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? *Neurosc. Biobehav. Rev.* 24 (4): 464-484, 2000.
41. CUI Z, WANG H, TAN Y, ZAIA KA, ZHANG S, TSIEN JZ. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial roles of the NMDA receptor preserving in remote memories in the brain. *Neuron*. 41(5): 781-793, 2004.
42. CUNHA IC, JOSÉ RF, PEREIRA LO, PIMENTA JA, OLIVEIRA DE SOUZA IA, REISER R, MORENO H JR, MARINO JN, PASCHOALINI MA, FARIA MS. The role of oxide nitric in the emotional learning of rats in the plus-maze. *Physiol. Behav.* 84: 351-358, 2005.
43. DAAN S. Learning and circadian behavior. *J. Biol. Rhythms*, 15: 296-299, 2000.
44. DAVIS M. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. *Annual Rev. Neurosc.* 15: 353-375, 1992.
45. DAWSON TM, SASAKI M, GONZALEZ-ZULUETA M, DAWSON VL. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res.* 118: 3-11, 1998.
46. DENADAI MA. O efeito da 7-nitroindazole, um inibidor da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS), sobre o condicionamento contextual em pombos. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2008.
47. DOLLER HJ, WEIGHT FF. Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway. *Brain Res.* 237(1):1-13, 1982.
48. DOLLINS AB, LYNCH HJ, WURTMAN RJ, DENG RH, KISCHKA KU, GLEASON RE, LIENBERMAN HR. Effect of pharmacological daytime doses of melatonin on human mood of performance. *Psychopharmacology*, 112: 490-546, 1993.
49. ECKEL-MAHAN KL, STORM DR. Circadian rhythms and memory: not so simple as cogs and gears. *Embo reports.* 10 (6): 584-591, 2009.
50. ECKEL-MAHAN KL, PHAN T, HAN S, WANG H, CHAN GC-K, SCHEINER ZS, STORM DR. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications of memory persistence. *Nature Neuroscience.* 11:1074-1082, 2008.
51. ERICHSEN JT, BINGMAN VP, KREBS JR, The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. *J Comp Neurol.* v. 314, n.3, p. 478-492, 1991.
52. FANSELOW MS, BOLLES RC. Naloxone and shock elicited congelamento in the rat. *J Comp Physiol Psych.* 93: 736- 44, 1979.

53. FENDT M, FANSELOW MS. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Reviews.*, 23, 743-760, 1999.
54. FERRARI EAM, FALEIROS L, CERUTTI SM, OLIVEIRA AM. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. *Behav. Brain Res.* 101, 93-103, 1999.
55. FIGUEREDO LZ, MOREIRA KM, FERREIRA TL, FORNARI RV, OLIVEIRA MG. Interaction between glutamatergic-NMDA and cholinergic-muscarinic systems in classical fear conditioning. *Brain Res Bull.* 77(2-3):71-76, 2008.
56. FORSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *Faseb J.* 12(10): 773-790, 1998.
57. FRANKLAND PW, JOSSELYN SA, ANAGNOSTARAS SG, KOGAN JH, TAKAHASHI E, SILVA AJ. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus.* 14(5):557-69, 2004.
58. GARCIA JAD, DOS SANTOS L, MOURA AL, RICARDO KFS, WANSCHER ACBA, SHISHIDO SM, SPADARI-BRADTFISCH RC, SOUZA HP, KRIEGER MH. S-nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knock-out mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol.* 51:78-85, 2008.
59. GARTHWAITE J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* V. 27, p. 2783-2802, 2008.
60. GARTHWAITE J, BOULTON CL. Nitric oxide signalling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 57:683-706, 1995.
61. GERSTNER JR, YIN JC. Circadian rhythms and memory formation. *Nat Rev Neurosci.* 11(8): 577:588, 2010.
62. GEWIRTZ JC, MCNISH KA, DAVIS M. Is the hippocampus necessary for contextual fear conditioning? *Behav Brain Res.* 110(1-2):83-95, 2000.
63. GOLOMBEK DA, AGOSTINO PV, PLANO SA, FERREYRA GA. Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathways. *Neurochemistry International.* 45: 929:936, 2004.
64. GOULD TJ, LEWIS MC. Coantagonism of glutamate receptors and nicotinic acetylcholinergic receptors disrupts fear conditioning and latent inhibition of fear conditioning. *Learn Mem.* 12(4):389-398, 2005.
65. GUIMARÃES FS, BEIJAMINI V, MOREIRA FA, AGUIAR DC, LUCÇA ACB. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. *Neuroscience and*

Biobehavioral Reviews. 29: 1313-1322, 2005.

66. GWINNER E & BRANDSTÄTTER R. Complex Bird clocks. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 356:1801-1810, 2001.
67. HALL AV, ANTONIOU H, WANG Y, CHEUNG AH, ARBUS AM, OLSON SL, LU WC, KAU CL, MARSDEN PA. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). *J Biol Chem*. 269(52) : 33082 :33090, 1994.
68. HALEY JE, MALEN PL, CHAPMAN PF. Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperatures in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett*. 160: 85–88, 1993.
69. HAYASHI Y, NISHIO M, NAITO Y, YOKOKURA H, NIMURA Y, HIDAKA H, WATANABE Y. Regulation of neuronal nitric oxide synthase by Calmodulin Kinases. *J Bio Chem*. 274(29):20597-20602, 1999.
70. HERRERAS O, SOLIS JM, MATIN DEL RIO R, LERMA J. Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanaesthetized rat. *Brain Res*. 413(1):75-86, 1987.
71. HOLMES MC, FRENCH KL & SECKEL JR. Modulation of serotonin and corticosteroid receptor gene expression in the rat hippocampus with circadian rhythm and stress. *Brain Research Molecular Brain Research*. 28 (2): 186-192, 1995.
72. INOUE ST & KAWAMURA H. Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of comparative physiology*. 146 (2): 153-160, Jun. 1982.
73. IZQUIERDO I & MEDINA JH. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 26(6): 573-589, 1993.
74. JERUSALINSKY D, FERREIRA MB, WALZ R, DA SILVA RC, BIANCHIN M, RUSCHEL AC, ZANATTA MS, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*. 58(1):76-80, 1992.
75. JOLKKONEN J, TUOMISTO L, GREIDANUS TBVW, RIEKKINEN PJ. Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of rats with lesions of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience Lett*. 86(2): 184-188, 1988.
76. KAHN MC, HOUGH II GE, EYCK GRT, BINGMAN VP. Internal connectivity of the homing pigeons (*Columba Livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. *J. Comp. Neurol*, 459:127-141, 2003.
77. KAMERMAN P, MITCHELL D, LABURN H. Circadian variation in the effects of nitric

- oxide synthase inhibitors on body temperature, feeding and activity in rats. *Eur J Physiol.* 443: 609-616, 2002.
78. KAMIN LJ. The retention of an incompletely learned avoidance response. *Journal Comparative Physiology Psychology.* 50 (5): 457-460, 1957.
79. KANDEL ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294: 1030-1038, 2001.
80. KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. In: *Principles of Neural Science.* N.Y.: McGraw-Hill., 2000.
81. KAPÁS L, KRUEGER JM. Intracerebroventricular (i.c.v.) injection of the nitric oxide donors SNAP and SIN-1 induces sleep in rats. *Soc. Neurosci Abstr.* 20: 150, 1994.
82. KAPÁS L, FANG J, KRUEGER JM. Inhibition of nitric oxide synthesis suppresses sleep in rats. *Brain Res.* 664: 189-196, 1994.
83. KARTEN HJ, HODOS W. *A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (Columba livia)* The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1967.
84. KELLEY JB, BALDA MA, ANDERSON KL, ITZHAK Y. Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. *Learn Mem.* 16(6): 371-378, 2009.
85. KELLEY JB, ANDERSON KL, ITZHAK Y. Pharmacological modulators of nitric oxide signaling and contextual fear conditioning in mice. *Psychopharmacology.* 210:65-74, 2010.
86. KELLEY JB, ANDERSON KL, ALTMANN SL, ITZHAK Y. Long-term memory of visually cued fear conditioning: roles of the neuronal nitric oxide synthase gene and cyclic AMP response element-binding protein. *Neuroscience.* 174:91-103, 2011.
87. KIM JJ, FANSELOW MS. Modality specific retrograde amnesia of fear. *Science.* 256: 675-677, 1992.
88. KIRCHNER L, WEITZDOERFER R., HOEGER H, URL A, SCHMIDT P, ENGELMANN M, VILLAR SR, FOUNTOULAKIS M, LUBEC G, LUBEC B. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangement. *Nitric Oxide.* 11:316-330, 2004.
89. KO, C. H-J. The role of the suprachiasmatic nucleus in temporal gating of performance on a reward-based learning and memory task. Tese de Mestrado. Universidade de Toronto, Canadá, 2001.
90. KREBS JR, ERICHSEN JT, BINGMAN VP. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon. *J. Comp. Neurol.*, 314: 467-477, 1991.

91. LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685,1970.
92. LANDEIRA-FERNANDEZ J. Context and Pavlovian conditioning, *Bras. J. Med. Biol. Res.*, v. 29, p. 149-73, 1996.
93. LEE AK, WILSON MA. Memory of sequential experience in the hippocampus during slow wave sleep. *Neuron* 36: 1183–1194, 2002.
94. LE DOUX JE. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol.* 2(2):191-7, 1992.
95. LE DOUX JE. Emotions circuits in the brain N. *An Rev of Neuroscience.* 23, 155-184, 2000.
96. MACIEJAK P, TARACHA E, LEHNER M, SZYNDLER J, BIDZIŃSKI A, SKÓRZEWSKA A, WILSLOWSKA A, ZIENOWICZ M, PLAŻNIK A. Hippocampal mGluR1 and consolidation of contextual fear conditioning. *Brain Res Bull.* 62(1): 39:45, 2003.
97. MARCHAND AR, LUCK D, DISCALA G. Evaluation of an improved automated analysis of congelamento behaviour in rats and its use in trace fear conditioning. *J Neuros Meth.* 126: 145-153, 2003.
98. MAREN S, AHARONOV G, FANSELOW MS. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav. Brain Res.*, 88: 261-274, 1997.
99. MAREN S. Effects os 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. *Brain Res.* 804 (1):155:158, 1998.
100. MARQUES, N. Ritmos Biológicos e Comportamento; *Anais de Etologia* (24) 11:24, 1987.
101. MARQUES N, MENNA-BARRETO L (orgs.). *Cronobiologia: Princípios e Aplicações.* Fiocruz, 1997.
102. MAY CP, HASHER L. Synchrony effects in inhibitory control over thought and action. *Journal Experimental Psychology Hum. Percept Performance*, 24: 36-37, 2002.
103. MAYER ML & ARMSTRONG N. Structure and Function of Glutamate Receptor ions channels. *Annu.Rev.Physiol*, 66: 161-181, 2004.
104. MAYER B, JOHN M, HEINZEL B, WERNER ER, WACHTER H, SCHULTZ G, BÖHME E. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288: 187-191, 1991.

105. MCGAUGH JL, IZQUIERDO I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in pharmacological sciences*. 21 (6):208-210, 2000.
106. MEI B, LI C, DONG S, JIANG CH, WANG H, HU Y. Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Res Bull*. 67(1-2): 1-12, 2005.
107. MENNA-BARRETO L. O tempo na biologia. In: *Cronobiologia: princípios e aplicações*. MARQUES N, MENNA-BARRETO L (orgs.). Fiocruz, 1997.
108. MILNER B, SQUIRE LR, KANDEL ER. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20:445-468, 1998.
109. MISERENDINO MJD, SANANES CB, MELIA KR, DAVIS M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*. 345:716-718, 1990
110. MONAGHAN DT, COTMAN CW. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci*. 5(11):2909-2919, 1985.
111. MONCADA S, HIGGS A, The l-arginine pathway. *N. Engl. J. Med*. 329: 2002–2012, 1993.
112. MONCADA S, HIGGS A, FURCHGOTT R. International Union of Pharmacology nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*. 49(2): 137-142, 1997.
113. MOORE, R.Y.; MARCHAND, E.R.; RILEY, J.N. Suprachiasmatic nucleus afferents in the rat: An HRP retrograde transport study. *Neuroscience*, 5: 232, 1979.
114. MOORE RY, SPEH JC, LEAK RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, 309: 89-98, 2000.
115. NELSON W, TONG YL, LEE JK, HALBERG F. Methods for Cosinor Rhythmometry. *Chronobiologia*, 6: 305-323, 1979.
116. NEUHOFF V, BEHBEHANI AW, QUENTIN CD, BRIEL G. Neurochemical aspects of post-tetanic potentiation of monosynaptic reflexes in the cat spinal cord. III. Analysis of amino acids after long-term potentiation. *Neurobiology*. 5(5):254-61, 1975.
117. OLCESE J. Circadian Signaling in the chick pineal organ. *Chronobiology Internatinal*. 20 (4): 617-636, 2003.
118. OTTONI EB. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods*, 32, 446 – 449, 2000.

REFERÊNCIAS

119. PALUDETTI LA. A origem dos ritmos biológicos e seu papel na evolução e adaptação dos seres vivos. In: *Introdução ao estudo da Cronobiologia*. CIPPOLA-NETO J, MARQUES N, MENNA-BARRETO L (orgs). Ícone. São Paulo, 1988.
120. PANDA S, HOGENESCH JB, KAY SA. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 417: 329-335, 2002.
121. PARNAVELAS JG. The origin and migration of cortical neurones: new vistas. *Trends Neurosci*. 23(3):126-131, 2000.
122. PAXINOS G, WATSON C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press, 1998.
123. PHILLIPS RG, LE DOUX JE. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*. 106(2): 274-285, 1992.
124. PILZ PK, SCHNITZLER HU. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures. *Neurobiol Learn Mem.*; 66(1): 67-79, 1996.
125. PITTENDRIGH, CS. On the mechanism of entrainment of circadian rhythms by light cycles. In *Circadian Clocks*, Amsterdam: North Holland.1965.
126. PITTENDRIGH CS. Temporal organization: reflections of darwinian clock-matcher. *Annu Rev Physiology*, 55: 17-54, 1993.
127. PLANO SA, AGOSTINO PV, GOLOMBEK DA. Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock. *FEBS letters*. 581: 5500-5504, 2007.
128. PRAST H, PHILIPPU A. Nitric oxide as modulator of neural function. *Progress in neurobiology*. 64 (1): 51-68, 2001.
129. QUINN JJ, LOYA F, MA QD, FANSELOW MS. Dorsal hippocampus NMDA receptors differentially mediate trace and contextual fear conditioning. *Hippocampus*. 15(5):665-674, 2005.
130. RABINAK CA, ZIMMERMAN JM, CHANG CH, ORSINI CA. Bidirectional changes in the intrinsic excitability of infralimbic neurons reflect a possible regulatory role in the acquisition and extinction of Pavlovian conditioned fear. *J Neurosci*. 28(29): 7245-7247, 2008.
131. RALPH MR, KO CH, ANTONIADIS EA, SECO P, IRANI F, PRESTA C, MCDONALD RJ. The significance of circadian phase for performance on a reward-based learning task in hamsters. *Behavioural Brain Reseach*. 136: 179-184, 2002.
132. RAMAN CS, LI H, MARTASEK P, SOUTHAN G, MASTERS BSS, POULOS TL. Crystal structure of nitric oxide synthase bound to nitric oxide reveals a novel inactivation

- mechanism. *Biochem.* 40: 13448-13455, 2001.
133. REIS F, SCHENKA AA, MELO LL, FERRARI EAM. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). *Braz J Med Biol Res*, 32: 1127-31, 1999.
 134. REPPERT SM, WEAVER DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418: 935-941, 2002.
 135. RESSEL LBM, CORRÊA FMA, GUIMARÃES FS. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide pathway in medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. 18: 2027-2035, 2008.
 136. RICKARD NS, POOT AC, GIBBS ME, NG KT. Both non-NMDA and NMDA glutamate receptors are necessary for memory consolidation in the day-old chick. *Behav Neural Biol.* 62(1): 33-40, 1994.
 137. ROMERO-CALVO I, OCÓN B, MARTINÉZ-MOYA P, SUARÉZ MD, ZARZUELO A, MARTINÉZ-AUGUSTIN O, MEDINA FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western Blottings. *Anal Biochem*, 401(2):318-320, 2010.
 138. ROSINHA MU, FERRARI EAM, TOLEDO CA. Immunohistochemical distribution of AMPA-type label in the pigeon (*C. livia*) hippocampus. *Neuroscience*. 159(2): 438-450, 2009.
 139. ROTH TL, SWEATT JD. Rhythms of memory. *Nature Neuroscience*. 11(9):993-994, 2008.
 140. RUSAK B, ZUCKER I. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiological Reviews*. 59 (3): 449-526, 1979.
 141. SCHULZ R, TRIGGLE CR. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol Sci*. 15(7): 255-259, 1994.
 142. SILVA MI. Distribuição de células imunorreativas para a síntese neural de óxido nítrico (nNOS) no hipocampo de pombos (*Columbia lívia*) após aprendizagem de escolha alimentar. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 2007.
 143. SIQUEIRA LO, VIEIRA AS, FERRARI EAM. Time-of-Day Variation in the Sensitization of the Acoustic Response in Pigeons. *Biol Rhythm Res*, 2004.
 144. SMITH EE, GROSSMAN M. Multiple systems of category learning. *Neurosci Biobehav Rev*. 32(2): 249-264, 2008.
 145. SPESSERT R, RAPP M. Circadian rhythm in NO synthase I transcript expression and its photoperiod regulation in the rat pineal gland. *Neuroreport*. 12(4): 781-785, 2001.

146. SQUIRE LR, KANDEL ER. *Memória: da mente às moléculas*. Artmed. Porto Alegre, 2003.
147. SOUZA CMZ. Organização temporal de processos de aprendizagem : variação de concentrações plasmáticas de melatonina e corticosterona, atividade geral e habituação a som, em pombos sob condições de claro-escuro e de claro constante; Tese de Mestrado pela Universidade Estadual de Campinas, 1999.
148. STEPHAN FK, KOVACEVIC NS. Multiple retention deficit in passive avoidance in rats is eliminated by supraquiasmatic lesions. *Behavioral Biology*. 22 (4): 456-462. 1978.
149. SUÁREZ J, DÁVILA JC, REAL MA, GUIRADO S, MEDINA L. Calcium-binding proteins, neuronal nitric oxide synthase, and GABA help to distinguish different pallial areas in the developing and adult chicken. I. Hippocampal formation and hyperpallium. *J. Comp. Neurol.*, v. 497, n. 5, p. 751-771, 2006
150. SZABO J, COWAN WM. A stereotaxic atlas of the brain of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Journal of Comparative Neurology*. 222:265–300, 1984.
151. SZABÓ C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull*. 41(3): 131-141, 1996.
152. SZEKELY AD. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. *Behav Brain Res*. v. 98; p. 219-225, 1999.
153. TAKAHASHI JS, MENAKER M. Role of the supraquiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *Journal Neuroci*, 2: 815-828., 1982.
154. TAKAHASHI JS, HAMM H, MENAKER M. Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal gland *in vitro*. *Proc. Natl Aca. Sci.USA*. 77: 2319: 2322, 1980.
155. TUNÇTAN B, WEIGL Y, DOTAN A, PELEG L, ZENGIL H, ASHKENAZI I, ABACIOGLU N. Circadian variation of nitric oxide synthase activity in mouse tissue. *Chronobiology International*. 19 (2):393-404, 2002.
156. TUREK FW. Circadian Rhythms. Recent Progress. *Hor Res*, 49: 43-89, 1994.
157. VALENTINUZZI VS & FERARRI EAM. Habituation to sound during morning and night sessions in pigeons (*Columba lívia*). *Physiology and Behavior*. 62(6): 1203-1209, 1997.
158. VALENTINUZZI VS, KOLKER DE, VITATERNA MH, FERRARI EAM. Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. *An Learn & Beha*. 29 (2): 133-142, 2001.
159. VALENTINUZZI VS, NETO SPD, CARNEIRO BTS, SANTANA KS, ARAÚJO JV,

REFERÊNCIAS

- RALPH MR. Memory for time of training modulates performance on a place conditioning task in marmosets. *Neurobiology of learning and memory*. 86: 604-607, 2008.
160. VANHOUTTE P, BARNIER JV, GUIBERT B, PAGÈS C, BESSON MJ, HIPSKIND RA, CABOCHE J. Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol*. 19(1): 136:146, 1999.
161. ZHOU L, ZHU DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation and clinical implications. *Nitric Oxide*. 20(4): 223:230, 2009.
162. ZOU, L.B.; YAMADA, K.; TANAKA, T.; KAMYANA T.; NABESHIMA, T. Nitric oxide inhibitors impair reference memory formation in a radial maze task in rats. *Neuropharm*. 37 (3): 323-330, 1998.
163. YOSHIMURA T, SUZUKI Y, MAKINO E, SUZUKI T, KUROIWA A, MATSUDA Y, NAMIKAWA T, EBIHARA S. Molecular analysis of avian circadian clock genes. *Molecular Brain Research*. 78: 207-215, 2000.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada Variação circadiana da expressão da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) no hipocampo e o condicionamento contextual aversivo em pombos (*Columba livia*):

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, 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. 1732-1, Instituição: Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

() 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: Aline Vilar da Silva Machado


Orientador: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

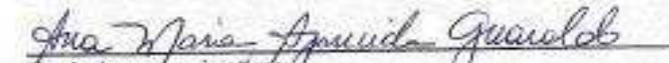
Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(x) Deferido () Indeferido


Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP