

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA OLIVEIRA MELLONI DE FARIA

**PARTICIPAÇÃO DA SINTASE NEURONAL DE ÓXIDO NÍTRICO (nNOS)
NA CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DO
CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AVERSIVO EM POMBOS
(*Columba livia*)**

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

CAMPINAS-SP, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA OLIVEIRA MELLONI DE FARIA

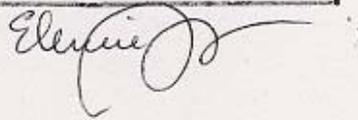
PARTICIPAÇÃO DA SINTASE NEURONAL DE ÓXIDO NÍTRICO (nNOS)

NA CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DO

CONDICIONAMENTO CLÁSSICO AVERSIVO EM POMBOS

(*Columba livia*)

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Larissa Oliveira Melloni
de Faria
e aprovada pela Comissão Julgadora.



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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

CAMPINAS-SP,

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

F225p Faria, Larissa Oliveira Melloni de, 1985-
Participação da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) na consolidação e reconsolidação da memória do condicionamento clássico aversivo em pombos (*Columba livia*) / Larissa Oliveira Melloni de Faria. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Condicionamento clássico. 2. Hipocampo (Cérebro). 3. Óxido nítrico sintase tipo I. 4. 7-nitroindazole. 5. Congelamento. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Participation of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in consolidation and reconsolidation of classical fear conditioning in pigeons (*Columba livia*).

Palavras-chave em Inglês:

Classical conditioning
Hippocampus (Brain)
Nitric oxide synthase type I
7-nitroindazole
Freezing

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari [Orientador]
Liana Lins Melo
Marcelo Nicolás Muscará

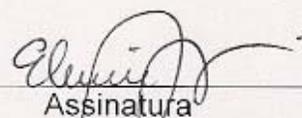
Data da defesa: 28-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 28 de fevereiro de 2013

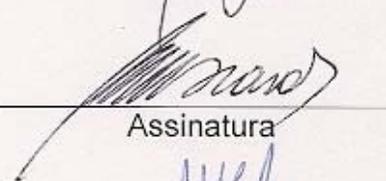
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



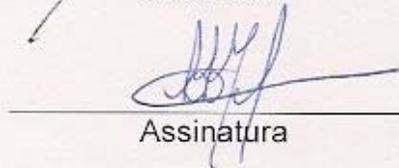
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará



Assinatura

Profa. Dra. Liana Lins Melo



Assinatura

Dra. Simone Aparecida Teixeira

Assinatura

Prof. Dr. Fábio Rogério

Assinatura

SUMÁRIO

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	xiv
<u>INDICE DE FIGURAS</u>	xix
<u>RESUMO</u>	xxvi
<u>ABSTRACT</u>	xxvii
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>1.1. Aprendizagem e Memória</u>	1
<u>1.2. Consolidação e Reconsolidação da Memória</u>	3
<u>1.3. Condicionamento Clássico Aversivo</u>	7
<u>1.4. Caracterização do Hipocampo de Aves</u>	11
<u>1.5. Participação do óxido nítrico em processos de comportamento e memória</u>	15
<u>2. OBJETIVOS</u>	26
<u>2.1. Objetivo geral</u>	26
<u>2.2. Objetivos específicos</u>	26
2.2.1. Experimento 1	26
2.2.2. Experimento 2	27
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	27
<u>3.1. Experimento 1</u>	27
3.1.1. Sujeitos	27
3.1.2. Equipamentos	29
3.1.2. Equipamentos	29
3.1.3. Drogas	29
<u>3.2. Procedimentos</u>	29

3.2.1. <i>Adaptação às condições do biotério</i>	29
3.1.2. Habituação ao contexto do laboratório.....	30
3.1.2. Cirurgia para implante de cânula.....	30
3.1.3. Teste de Angiotensina II.....	31
3.1.3. Infusão intracerebroventricular (i.c.v.).....	31
3.3. <u>Procedimentos comportamentais</u>	31
3.3.1. Treino em condicionamento contexto-choque	32
3.3.2. Teste ao contexto de condicionamento	32
3.3.3. Análise Comportamental	32
3.4. <u>Procedimentos moleculares</u>	35
3.4.1. Atividade enzimática da NOS dependente e independente de Ca ²⁺	35
3.4.2. Análise semi-quantitativa da nNOS	37
3.4.3. Análise Estatística	39
3.5. <u>Experimento 2</u>	39
4. RESULTADOS	40
4.1. <u>Experimento 1</u>	40
4.1.1. Efeitos do 7-NI sobre o comportamento de pombos em situação de condicionamento contextual aversivo.....	40
4.1.2. Análise da atividade enzimática da NOS dependente de Ca ²⁺ e da NOS independente de Ca ²⁺	50
4.1.3. Análise da densitometria óptica da nNOS	52
5. DISCUSSÃO	53
5.1. <u>Experimento 1</u>	53
6. RESULTADOS	61

<u>6.1. Experimento 2</u>	61
6.1.1. Efeitos do 7-NI sobre o comportamento de pombos em situação de condicionamento contextual aversivo.....	61
6.1.2. Análise da atividade enzimática da NOS dependente de Ca ²⁺ e da NOS independente de Ca ²⁺	73
6.1.3. Análise da densitometria óptica da nNOS	74
<u>7. DISCUSSÃO</u>	75
7.1. Experimento 2.....	75
<u>8. DISCUSSÃO GERAL</u>	78
<u>9. CONCLUSÕES</u>	86
<u>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	88
<u>11. ANEXOS</u>	121

LISTA DE ABREVIATURAS

A = anterior

ADP = difosfato de adenosina

AMPA = (-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalol

AMPc = adenosina monofosfato cíclico

ANOVA = Análise de variância

AP = antero-posterior

APS = persulfato de amônia

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro

BH4 = tetrahidrobiopterina

CA = Corno de Amon

Ca²⁺ = íon cálcio

Ca²⁺/CaM = complexo cálcio-calmodulina

cADPR = difosfato de adenosina ribose cíclica

CaM = calmodulina

CAU = exploração cautelosa

CB = calbindina

CCK = colecistocinina

COND = grupo condicionado

CONG = congelamento

CONT = grupo não-condicionado

CREB = elemento responsivo de ligação ao sítio de transcrição de cAMP

CR = calretina

DL = área dorsolateral

DM – área dorsomedial

DMd = área dorsomedial dorsal

DMSO = dimetilsulfóxido

DMv = área dorsomedial ventral

EC = estímulo condicionado

EI = estímulo incondicionado

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA = ácido etilenoglicoltetracético

eNOS = sintase endotelial de óxido nítrico

EPM = erro padrão da média

ESC = escaneamento

EXP = exploração

FAD = flavina adenina dinucleotídeo

FMN = flavina mononucleotídeo

GABA = ácido gamaminobutírico

GC = guanilil ciclase

GLU = glutamato

GLUR = receptor de glutamato

GMPc = monofosfato de guanosina cíclica

GTP = guanosina trifosfato

HpD = hipocampo dorsal

HpV = hipocampo ventral

HpVL = hipocampo ventrolateral

HpVM = hipocampo ventromedial

iNOS = sintase induzível de óxido nítrico

L = lateral

LENK = leucina encefálica

LDL = lipoproteína de baixa densidade

L-NAME = N ω -nitro-L-arginina metil éster

LOC = locomoção

LTP = potenciação de longa duração

MAN = manutenção

MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno

MK-801 = maleato de dizocilpina

MOV = movimentos isolados

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

Na⁺ = íon sódio

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NMDA = N-metila-D-aspartato

nNOS = sintase neuronal de óxido nítrico

NO = óxido nítrico

NOS = sintase de óxido nítrico

NPY = neuropeptídeo Y

PAR = parado

PB = tampão fosfato

PBS = tampão fosfato salina

PKA = proteína cinase A

PKC = proteína cinase C

PKG = proteína cinase G

PMSF = fluoreto de fenilmetanosulfonil

PRE = comportamentos pré-exploratórios

PSD-95 = proteína de densidade pós-sináptica 95

SDS = dodecil sulfato de sódio

SNC = sistema nervoso central

SP = substância P

TXPB = tampão fosfato com triton-X100

V = ventrículo

VEIC = grupo veículo

VC = área ventral central

VIG = vigilância

VIP = polipeptídeo vasoativo intestinal

VL = área ventral lateral

VM = área ventral medial

Zenk = acrônimo das primeiras letras das proteínas Zif-268, EGR-1, NGFI-A e

Krox 24

7-NI = 7-nitroindazol

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de conectividade intrahipocampal obtida através da utilização de traçadores retrógrados e anterógrados no hipocampo de pombos. DL = região Dorso Lateral, a linha tracejada mostra a divisão da área dorsomedial (DM) em porção dorsal (DMd) e ventral (DMv). Setas representam as ligações entre subdivisões. VC = ventral área central; VL = camada ventrolateral; VM = camada ventromedial. Escala de Barra = 1mm. (Modificado de KAHN *et al.* 2003; KARTEN & HODOS, 1967; CANOVA, 2009).....14

Figura 2. Esquema ilustrativo da cascata de ativação da nNOS para a síntese do NO. A liberação do neurotransmissor glutamato que interage com receptores NMDA na membrana pós-sináptica (1), aumentando influxo de Cálcio [Ca^{2+}] (2), 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 ativada a partir do nitrogênio da guanidina, presente na L-arginina, são geradas concentrações equimolares de L-citrulina e de NO (6). O NO agirá no neurônio pré-sináptico, aumentando a produção de cGMP (7), que atua na regulação da neurotransmissão entre outras coisas. A Proteína cinase A (PKA) e PKC, entre outras proteínas regulam a atividade catalítica fosforilando diversos

sítios da nNOS (8). (Modificado de MACHADO, 2010).....18

Figura 3. Esquema ilustrativo dos procedimentos comportamentais do Experimento 1. As sessões de treino consistiram na associação do estímulo condicionado (EC) (contexto) com o estímulo incondicionado (EI) (choque); o 7-NI foi administrado via i.c.v. imediatamente após o treino; 24h após o treino, os grupos foram testados ao contexto sem a apresentação do choque (EI). Após 1,5h do início da sessão de teste, os animais de cada grupo foram sacrificados para realização dos procedimentos moleculares.....35

Figura 4. Esquema ilustrativo dos procedimentos comportamentais do Experimento 2. As sessões de treino consistiram na associação do estímulo condicionado (EC) (contexto) com o estímulo incondicionado (EI) (choque); o teste ocorreu 24h depois na ausência do choque (EI), sendo o 7-NI administrado via i.c.v. imediatamente após; 24h após o teste os grupos foram retestados ao contexto novamente sem a apresentação do choque (EI).....40

Figura 5. Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos 7-nitroindazol, veículo, condicionado não tratado, e contexto não tratado. Categorias comportamentais: CONG = Congelamento, VIG = Vigilância, CAU = Exploração cautelosa, ESC = escanear, EXP = Exploração, PAR = Parado, LOC =

Locomoção, MAN = Manutenção, MOV = Movimentos Isolados. * diferença significativa em relação ao VEIC ($p < 0,001$);. **diferença significativa em relação ao COND ($p < 0,001$); # diferença significativa em relação ao CONT ($p < 0,001$). + diferença significativa em relação ao teste do 7-NI ($p < 0,001$).....43

Figura 6. Valores médios (+EPM) dos comportamentos de exploração, vigilância, locomoção, congelamento, movimento isolado, parado e manutenção, registrados em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (blocos 1 a 5), durante o final da sessão de treino (blocos 16 a 20), e durante a sessão de teste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. A linha vertical pontilhada indica a separação entre o início e o final da sessão de treino. ANOVA: # diferença significativa em relação aos demais blocos ($p < 0,001$); § diferença significativa em relação a 7-NI ($p < 0,001$).....48

Figura 7. Valores médios (+EPM) do comportamento de congelamento registrado em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino, e cinco blocos de 60 segundos durante o final da sessão de treino, cinco blocos de 60 segundos durante a sessão de teste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. ANOVA: * $p < 0,001$, quando comparado com os demais grupos. ** $p < 0,001$, quando comparado com o teste dos demais grupos. + $p < 0,001$, quando comparado com os demais blocos. # $p < 0,001$, quando comparado com a sessão de treino do 7-NI.....50

Figura 8. Média e Erro padrão das porcentagens da análise da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} (A) e da NOS independente de Ca^{2+} (B) em amostras de homogenato de hipocampo. Atenção para a diferença da escala em A e B; § diferença significativa em relação ao NAÏVE e CONT; ($p < 0,05$). # diferença significativa entre os demais grupos($p < 0,05$); * diferença significativa em relação ao VEIC ($p < 0,05$).....51

Figura 9. A. Médias e erro padrão das porcentagens das análises densitométricas das bandas imunorreativas para nNOS em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas. Os dados foram calculados em referência aos valores do grupo NAÏVE. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA de uma via). B. Bandas imunorreativas representativas para nNOS. C. Bandas imunorreativas representativas para nNOS quantidade total da proteína alfa-tubulina.....52

Figura 10. Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais durante as sessões de treino, teste e reteste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos 7-nitroindazol, veículo, condicionado não tratado, e contexto não tratado. Categorias comportamentais: CONG = Congelamento, VIG = Vigilância, CAU = Exploração cautelosa, ESC = escanear, EXP = Exploração, PAR = Parado, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção, MOV = Movimentos Isolados. * diferença significativa em relação ao 7-NI ($p < 0,05$); # diferença significativa em relação aos

demais grupos ($p < 0,05$); + diferença significativa em relação ao demais grupos exceto o 7-NI ($p < 0,05$).....63

Figura 11. Porcentagem média e erro padrão da média da duração do comportamento de congelamento durante a sessão de treino (A) e de teste e reteste (B) de condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos 7-nitroindazol (7-NI), veículo (VEIC), condicionado não tratado (COND), e contexto não tratado (CONT). * diferença significativa em relação ao reteste do VEIC e COND ($p < 0,05$); # diferença significativa em relação ao teste do VEIC, COND e dele mesmo ($p < 0,05$).....65

Figura 12. Porcentagem média e erro padrão da média da duração total dos comportamentos defensivos durante as sessões de treino, teste e reteste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos 7-nitroindazol (7-NI), veículo (VEIC), condicionado não tratado (COND), e contexto não tratado (CONT). + diferença significativa em relação ao treino dos grupos VEIC, 7-NI, COND e CONT ($p < 0,05$); # diferença significativa em relação ao teste dos grupos VEIC, 7-NI, COND e CONT ($p < 0,05$); * diferença significativa em relação ao reteste dos grupos VEIC, COND e CONT ($p < 0,05$).....67

Figura 13. Valores médios (+EPM) dos comportamentos defensivos registrados em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (A; blocos 1 a 5), durante o final da sessão de treino (blocos 16 a 20), e durante a sessão de

teste e reteste ao contexto (B) para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. A linha vertical pontilhada indica a separação entre o início e o final da sessão de treino; A: ANOVA indicou diferenças significativas entre grupo ($p < 0,001$). B: diferença significativa entre grupos e sessão de teste e reteste ($p < 0,001$). * diferença significativa em relação aos demais grupos (7-NI, VEIC e COND); + diferença significativa do reteste dos demais grupos (7-NI, COND e CONT); § diferença significativa em relação ao teste do 7-NI.....69

Figura 14. Valores médios (+EPM) do comportamento de congelamento registrados em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (A; blocos 1 a 5), durante o final da sessão de treino (blocos 16 a 20), e durante a sessão de teste e reteste ao contexto (B) para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. A linha vertical pontilhada indica a separação entre o início e o final da sessão de treino. A: diferença significativa entre grupos e momento do treino ($p < 0,001$). B: diferença significativa entre grupos ($p < 0,001$) e marginalmente significativa entre a sessão de teste e reteste ($p = 0,06$); sessão de reteste do 7-NI significativamente diferente do VEIC e COND ($p < 0,05$). * diferença significativa em relação aos demais grupos (7-NI, VEIC e COND); # diferença significativa em relação aos demais grupos (VEIC, COND e CONT); + diferença significativa do reteste dos demais grupos (VEIC, COND e CONT) e dele mesmo; § diferença significativa em relação ao teste do 7-NI.....72

Figura 15. Média e Erro padrão das porcentagens de L-citrulina produzida por pmol/min/mg através da reação da atividade catalítica da NOS dependente de Ca^{2+} (A) e da NOS independente de Ca^{2+} (B) em amostras de homogenato de hipocampo (ANOVA: $p > 0,05$). Atenção para a diferença da escala em A e B.....73

Figura 16. A. Médias e erro padrão das porcentagens das análises densitométricas das bandas imunorreativas para nNOS em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas. Os dados foram calculados em referência aos valores de NAÏVE. B. Bandas imunorreativas representativas para nNOS. C. proteínas totais detectadas pela alfa-tubulina; ANOVA ($p > 0,05$).....74

RESUMO

FARIA, L.O.M. **Participação da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) na consolidação e reconsolidação da memória do condicionamento clássico aversivo em pombos (*Columba livia*). 2013.**

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor não convencional o qual tem papel importante em processos neurobiológicos de comportamento e de memória. Sua síntese é mediada por três isoformas de sintase do óxido nítrico (NOS): a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). Este trabalho investigou os efeitos da administração do 7-nitroindazol (7-NI), inibidor preferencial da nNOS, na consolidação e reconsolidação da memória do condicionamento clássico aversivo. Pombos adultos foram atribuídos a 5 grupos: Foram usados 5 grupos: grupo 7-nitroindazole (7-NI) (100nmol/0.5µl; DMSO (20%), NaOH (50mM) e Tween-80 (16%) diluído em PBS; i.c.v.), grupo veículo (VEIC) (0,5µl; DMSO (20%), NaOH (50mM) e Tween-80 (16%) diluído em PBS, i.c.v.), grupo condicionado/não tratado (COND), grupo contexto/não-tratado (CONT) e grupo não tratado/não condicionado (NÄIVE). Sete dias após implante de microcânula intracerebroventricular (i.c.v.), ocorreu o condicionamento com três associações contexto-choque numa sessão de 20 min. O teste e o re-teste consistiram na re-exposição ao contexto do condicionamento por 5 min. O intervalo entre sessões foi de 24h. A administração de 7-NI ou do veículo ocorreu imediatamente após o treino (Experimento 1) ou após o re-teste (Experimento 2). A atividade enzimática da NOS dependente e independente de Ca^{2+} e da expressão protéica da nNOS foram realizadas no tecido hipocampal. No Experimento 1, a ocorrência de congelamento no teste do 7-NI foi menor do que no treino ($p < 0.01$) e no teste do COND e VEIC ($p < 0.001$). A atividade da NOS dependente de Ca^{++} no 7-NI foi menor do que no COND e VEIC ($p < 0,01$), mas não diferiu do CONT e do NÄIVE. A expressão protéica de nNOS não diferiu entre os grupos ($p < 0,05$). No Experimento 2, houve diminuição dos comportamentos defensivos, incluindo o congelamento, no re-teste do 7-NI comparado com VEIC e COND ($p < 0.05$), mas os grupos não diferiram quanto à atividade de NOS dependente de Ca^{2+} ou à expressão protéica da nNOS. Conclui-se que o 7-NI interferiu na consolidação e a reconsolidação da memória, indicando a ativação da via de sinalização do óxido nítrico no hipocampo em processos da memória de medo condicionado ao contexto em pombos.

Palavras-chave: condicionamento clássico, hipocampo, sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS), 7-nitroindazol (7-NI), congelamento.

ABSTRACT

FARIA, L. O. M. **Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) on the consolidation and reconsolidation of aversive classical conditioning memory in pigeons (*Columba livia*). 2013.**

Nitric oxide (NO) is an unconventional neurotransmitter which plays an important role in neurobiological processes of behavior and memory. Its synthesis is mediated by three isoforms of nitric oxide synthase (NOS): the neuronal (nNOS), the endothelial (eNOS) and the inducible (iNOS). This study investigated the effects of the administration of 7-nitroindazole (7-NI), a preferential nNOS inhibitor, in the consolidation and reconsolidation of aversive classical conditioning memory. Adult male pigeons were assigned to 5 groups: 7-nitroindazole, 7-NI (100nmol/0.5µl; DMSO (20%), NaOH (50 mM) and Tween-80 (16%) diluted in PBS; i.c.v.) Vehicle group; VEH (0.5 µ / L; DMSO (20%), NaOH (50 mM) and Tween-80 (16%) diluted in PBS; i.c.v.), conditioning/non-treated group (COND), context/non-treated group (CONT) and non-conditioning/non-treated group (NÄIVE). Seven days after implantation of intracerebral ventricular (i.c.v.) microcannula the conditioning occurred with three context-shock associations in a session of 20 min. During the testing and retesting sessions pigeons were reexposed to the conditioning context for 5 min. The between sessions interval was 24h. Administration of 7-NI or vehicle occurred immediately after training (Experiment 1) or after testing (Experiment 2). The enzymatic activity of Ca²⁺ dependent and independent NOS and protein expression of nNOS in the hippocampus tissue were carried out following the behavioral test or retest. In Experiment 1, the occurrence of freezing in the testing session of 7-NI group was lower than in the training (p <0.01) and the testing sessions of COND and VEH groups (p <0.001). The activity of Ca²⁺ dependent NOS in the 7-NI group was lower than in COND and VEH groups (p <0.01) but did not differ from CONT and NÄIVE groups. The nNOS protein expression in the hippocampus did not differ among the different groups (p<0.05). In Experiment 2, there was a decrease of defensive behaviors, which include freezing, in the retest of the 7-NI compared with VEH and COND groups (p <0.05), but the groups did not differ in the activity of Ca²⁺ dependent NOS or the protein expression of nNOS. We conclude that 7-NI interfered on the consolidation and reconsolidation of memory, indicating activation of the nitric oxide signaling pathway in the hippocampus and in memory processes of conditioned fear context in pigeons.

Key words: classical conditioning, hippocampus, neuronal nitric oxide synthase (nNOS), 7-nitroindazole, freezing behavior.

"A vida continua significando o que significou:
continua sendo o que era.
O cordão de união não se quebrou.
Por que eu estaria fora de teus pensamentos,
Apenas porque estou fora de tua vista?"

Autor Desconhecido

Em memória dos queridos: Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo
e
Prof. Dr. Francesco Langone

"Se cada dia cai, dentro de cada noite,
há um poço
onde a claridade está presa.
Há que sentar-se na beira
do poço da sombra
e pescar luz caída
com paciência."

Pablo Neruda

Dedico esta dissertação a meus pais, que, durante todos os momentos da minha vida, estiveram ao meu lado ajudando-me a "pescar luz caída com paciência".

AGRADECIMENTOS

- ✓ Aos meus pais, Marcos Melloni de Faria e Maria Elisa Oliveira Melloni de Faria, os responsáveis pela minha existência, pela minha sobrevivência e por tudo o que sei sobre a vida. Sem eles não conseguiria idealizar e concluir este trabalho. Eles são o melhor que há em mim.
- ✓ À minhas irmãs, Elisa Helena Oliveira Leite e Marcella Oliveira Melloni de Faria, por serem pessoas tão essenciais na minha vida, me incentivarem e estarem sempre ao meu lado, mesmo nem sempre estando por perto. Vocês seriam minhas irmãs mesmo se pudesse escolher.
- ✓ Aos meus sobrinhos, Pedro e Lucca, as inspirações para os meus sorrisos diários. Amo vocês!
- ✓ Aos amigos que fiz em Campinas, pessoas maravilhosas que conheci durante os anos de mestrado. Em especial aos amigos e moradores da República Moita: Mateus (Fedo), Filipe (Fifo), Vitor, Amilcar, Heitor (Minero) e Hugo por compartilhar momentos de descontração e por me confortar nos dias difíceis. Infelizmente não conseguirei citar todos os agregados da rep, mas graças ao Marcio (Shao-Lin) e a Monique Ottmann conheci essa turma incrível. Enfim, só bons amigos que estiveram em meu caminho nesses anos de mestrado. Obrigada por tudo.
- ✓ Em especial, aos meus queridos amigos de Arceburgo-MG, Karen de Faria Muzarra e Edgard Ferraresi Araujo, que me agregaram a Galera do Mal, que de 'mal' só tem o nome, pois são pessoas com os maiores corações que já conheci em minha vida. Não sei como agradecer-los, sem vocês e nossos encontros aos fins de semana regados à boas conversas e rock 'n' roll, meus dias de trabalho seriam mais difíceis. Obrigada por existirem.

Agradeço nessa turma, em especial, ao Diego Bevilacqua por me ajudar a converter os arquivos para a versão final da dissertação (sim, precisei de ajuda para isso!).

- ✓ Às minhas amigas e colegas de casa, atuais e antigas moradoras: Raffaella, Camila, Giovanna, Luciana, Ariel, Priscila, Juliana e Michele, que me receberam tão bem e dividiram comigo, além da casa, longas conversas, meus bons e maus momentos! Obrigada pela paciência e pela amizade durante todas as etapas deste trabalho.
- ✓ Aos atletas da Equipe Labex-GGBS-Unicamp de atletismo, em especial aos treinadores Carlos Eduardo Silva e Lucas Tessuti, por fazerem da corrida um refúgio e uma aliada em minha busca por bem-estar e auto-conhecimento.
- ✓ À secretária do programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Andréia Aparecida Vigilato, pela sua simpatia e disponibilidade em ajudar em relação a todas as questões burocráticas. A heroína dos pós-graduandos!
- ✓ Aos meus colegas de laboratório: Rodolfo Souza, Rúbia Mendes, Andressa Pelaquim, Aline Vilar, Jéssica Natuline Ianof, Grazielle Fraga e Maria Luíza Sperandéo, pela amizade, pela convivência amigável durante este período e pelas discussões sobre a ciência e sobre a vida. Em especial ao Fernando Canova, por ter me ensinado, com muita paciência e disposição, todos procedimentos e análises comportamentais que utilizei em meu trabalho, por ouvir minhas reclamações diárias, pela companhia nos almoços no bandejão, pelos cafés no meio da tarde, enfim, por ser amigo e divertido.

- ✓ Aos amigos de departamento: Felipe de Faria, Anderson Ferreira, Luis Manzo, Eduardo Socca, Ana de Almeida, Luiz Alberto Ramos, Aline Arouca, Larissa Yuri, por me fazerem rir diariamente e até mesmo me refugiarem em seus respectivos laboratórios após dias cansativos de trabalho.
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia: Alexandre Rezende, Carlos Vinicius de Assis, César Sartori, Elayne Vieira Dias, Gustavo Facchini, Janice Nascimento, Karina Furuzawa, Raffaella Silvestre Ignarro (também minha colega de casa e amiga pra vida toda!). Em especial ao André Schwambach Vieira, por ter me ajudado nos cálculos da dose da droga utilizada nos experimentos, por ser uma "enciclopédia humana de Neurofisiologia", em toda sua simplicidade e disposição em ajudar e ser amigo.
- ✓ Aos colegas do Laboratório de Pâncreas Endócrino: Tiago Batista, Priscila Muniz e Rosane Ribeiro, os quais foram muito simpáticos e prestativos em me ajudar a diluir a droga utilizada nos experimentos.
- ✓ Ao técnico do laboratório Washington Luis Gomes por ter me ensinado a técnica cirúrgica utilizada neste trabalho, por ser solícito em tudo que precisei, por cuidar dos animais no biotério e por ter me feito dar boas risadas ao longo deste tempo.
- ✓ Ao Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará que cedeu gentilmente o Laboratório de Farmacologia e Bioquímica dos Radicais Livre e Inflamação do Departamento de Farmacologia do ICB-USP para que as análises moleculares deste estudo pudessem ser realizadas. Em especial, à Profa. Dra. Simone Aparecida Teixeira, por sua simpatia, disposição, e paciência em ensinar-me as técnicas referentes à atividade enzimática

da NOS e o método Western Blot. Certamente sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Pessoas apaixonadas e dedicadas pela ciência. Foi um prazer conhecê-los.

- ✓ À minha orientadora Profa. Dra. Elenice Ap. de Moraes Ferrari pela oportunidade de ingressar no programa de pós-graduação, pela confiança e extrema dedicação e incentivo para a realização deste trabalho. Pelas longas conversas científicas e sobre a vida. Por preocupar-se com o bem-estar de seus alunos. Por ser uma amiga, companheira, divertida, por ser mais que uma orientadora e pesquisadora exemplar - uma mãe. Sinto-me privilegiada por ter trabalhado e convivido com essa mulher, que mesmo em momentos difíceis, se mostrou firme, sem perder a ternura jamais. Um exemplo de pessoa que carregarei comigo para a vida.

- ✓ Este trabalho foi financiado pela FAPESP, processo: 2009/13213-7, referente à concessão da bolsa de Mestrado.
- ✓ Agradecemos à FAPESP pelo apoio recebido, o qual foi fundamental para a nossa formação.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aprendizagem e Memória

A aprendizagem é o processo pelo qual os diversos organismos adquirem conhecimento sobre o mundo. Essa capacidade é extraordinária, pois é por meio dela que é possível modificar o comportamento em função das experiências com os eventos do ambiente e com as respostas emitidas pelo próprio organismo (KANDEL, 2001).

Nos estudos sobre aprendizagem salienta-se dois tipos principais de experiências que ocorrem por procedimentos não-associativos e associativos, fundamentando a consideração de duas classes de aprendizagem: não-associativa e associativa. Ocorre aprendizagem não-associativa quando o animal é exposto a um só tipo de estímulo que se repete regularmente ou que tem duração prolongada, sem que se estabeleçam relações funcionais entre estímulos ou entre estímulo e comportamento. Isso acontece na habituação, caracterizada pelo decréscimo progressivo da resposta a estímulos inócuos repetidos ou contínuos, e na sensibilização, processo em que a exposição à um estímulo aversivo prévio resulta no fortalecimento da resposta a um estímulo inócuo que ocorre num momento posterior, sem associação com o primeiro. Na aprendizagem associativa, há o estabelecimento de uma relação de associação ou pareamento entre estímulos e comportamentos. Isso ocorre no condicionamento clássico, com relações de associação ou contingências entre dois estímulos (por exemplo, som e choque, cheiro e alimento) e no condicionamento operante, com estabelecimento de contingências entre estímulos

anteriores, comportamento e o estímulo consequente (por exemplo, som, resposta de pressão à barra, alimento) (FERRARI et al., 1999; KANDEL, 2001).

As experiências não-associativas e associativas vivenciadas induzem alterações celulares e moleculares no sistema nervoso central (SNC) que se correlacionam com a formação da memória. A memória é caracterizada como o processo de manutenção do conhecimento adquirido ao longo do tempo, cuja duração depende de mecanismos celulares e moleculares específicos.

A memória pode ser classificada de acordo tanto com seu período de armazenamento - memória de curto prazo e de longo prazo, quanto de acordo com seu conteúdo - memória explícita e implícita (MARKOWITSCH, 1997; CARLSON, 2001; KANDEL, 2001). A memória de curto prazo se refere ao armazenamento de pequena quantidade de informações por período de tempo limitado a segundos e poucos minutos até 3 horas, sendo independente da transcrição de mRNA e de síntese protéica. Já a memória de longo prazo refere-se ao armazenamento de grande quantidade de informações por um período de tempo prolongado que pode variar em horas, dias e até anos (IZQUIERDO *et al.*, 2000; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; BONINI *et al.*, 2007). A memória de longo prazo pode ser explícita ou declarativa quando inclui o conhecimento cuja evocação requer um esforço consciente, com conteúdo sobre fatos ou eventos auto-biográficos e sobre as relações entre esses fatos e eventos. Também, a memória de longo prazo pode ser implícita ou procedimental quando está relacionada a informações que, independentemente da evocação consciente, induzem comportamentos que dependem de treino repetido, como ocorre em condicionamentos reflexos e na aquisição de habilidades motoras (SQUIRE & KANDEL, 2003).

1.2. Consolidação e reconsolidação da memória

O processo de memória é descrito como envolvendo diferentes fases: aquisição ou codificação, consolidação, recuperação, reconsolidação, persistência e extinção das informações adquiridas, sendo cada fase caracterizada por eventos neurais específicos (IZQUIERDO *et al.*, 2000; DUNNING & DURING, 2003; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007). É bem reconhecido que a consolidação da memória envolve uma cascata de eventos moleculares e celulares relativamente breves e que alteram a eficácia sináptica, bem como uma interação prolongada nos níveis de sistemas que abrangem o hipocampo e o córtex cerebral (MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2004).

Nas primeiras horas após o treino, a experiência estímulos ambientais desencadeia as primeiras mudanças nos circuitos neuronais (aquisição e codificação) iniciando-se a memória de curto-prazo. A seguir, pode ocorrer a consolidação que é caracterizada pela reorganização gradual das informações recém-armazenadas como memória de curto-prazo, e que são ainda vulneráveis à desorganização, tornando-as mais estáveis para o armazenamento a longo-prazo (SQUIRE & ALVAREZ, 1995; MCGAUGH, 2000). Esta fase requer a síntese de novas proteínas e a expressão de genes que garantirão modificações estruturais de longa duração nas sinapses e garantir que as novas memórias sejam fortalecidas e mantidas ao longo do tempo (DAVIS & SQUIRE; NADER, 2003; IZQUIERDO, 2006). Portanto, pode-se considerar que a consolidação inicial ocorre por meio de uma reorganização de memórias pré-existentes (MCKENZIE & EICHENBAUM, 2011). A ocorrência de uma fase tardia da consolidação da memória de longo-prazo, que dura por dias ou semanas, torna o

armazenamento desta permanente e persistente (SQUIRE & ALVAREZ, 1995; MCGAUGH, 2000; NADER, 2003; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, foi evidenciado que quando a memória de longo-prazo é evocada são induzidas alterações celulares que geram um estado de instabilidade transiente da memória original, havendo então a necessidade de transcrição gênica *de novo* e nova síntese protéica para a sua re-estabilização (STREKALOVA *et al.*, 2003; CESTARI *et al.*, 2006; TRONSON *et al.*, 2006; INOUE *et al.*, 2009; GORMAN & ROOSE, 2011). Ou seja, a lembrança (recuperação) da experiência vivenciada anteriormente seria influenciada pelos eventos em curso no momento da recuperação, gerando alterações na memória já consolidada, com novas informações incorporadas ao contexto de treinamento, a memória original torna-se vulnerável, resultando em um novo aprendizado (EICHENBAUM, 2006). Esta nova fase é denominada reconsolidação, na qual a memória recentemente consolidada e que é evocada passa por nova consolidação, tornando-se uma memória de longa duração mais fortalecida e que é menos susceptível à desorganização (DUDAI & EISENBERG, 2004; TRONSON & TAYLOR, 2007; NADER & HARDT, 2009)

Tanto a consolidação como a reconsolidação podem ser suprimidas por meio de um evento que interfira com a formação ou com a reativação do traço de memória, tornando-o susceptível a modificação. Diversos meios já foram utilizados a fim de bloquear o processo de reconsolidação, como lesões em determinadas áreas cerebrais (como o hipocampo, por exemplo), administração de fármacos que inibem a síntese de proteínas envolvidas nesse processo, além de modelos animais geneticamente modificados para a expressão de determinados genes (SARA, 2000;

MORRIS *et al.*, 2006; LEE, 2009; DUDAI & EISENBERG, 2004). Assim, a utilização de intervenções farmacológicas tem sido usada por que permite análises dos mecanismos celulares e moleculares da aprendizagem e memória que subsidiam a expressão de determinados comportamentos. A administração de um agente farmacológico antes e imediatamente após uma tarefa interfere na aquisição e consolidação da memória, respectivamente (IZQUIERDO, 1989). Quando a intervenção ou tratamento são administrados antes, ou imediatamente após o teste, os agentes interferem na evocação e na reconsolidação da memória (TRONSON & TAYLOR, 2007).

Os dados oriundos de estudos que utilizam estas abordagens fundamentam a consideração de que a reconsolidação envolve uma atualização de memórias pré-existentes, que pode ocorrer por meio de dois mecanismos: a desestabilização de traços de memória existentes e a modificação do conteúdo da memória original para adição de novas informações relacionadas (LEE & EVERITT, 2008). Sendo assim, a reconsolidação da memória pode ser considerada como um processo pelo qual memórias inicialmente consolidadas são integradas e modificadas com um novo aprendizado, ocorrendo uma reorganização do esquema de memória já formado e consolidado (LEE, 2010; MCKENZIE & EICHENBAUM, 2011; FIORENZA *et al.*, 2012). Dudai e Eisenberg (2004) sugerem ainda a ocorrência de sobreposição dessas, considerando que a reconsolidação é a manifestação de um traço persistente ou até mesmo um interminável processo de consolidação.

Embora a reconsolidação de uma memória reativada e a consolidação de um aprendizado inicial possuam características distintas, como a ativação de diferentes

áreas e circuitos no cérebro, bem como diferentes relações temporais, ambos os processos compartilham mecanismos e vias moleculares similares, os quais medeiam a plasticidade sináptica a longo-prazo (ALBERINI, 2005). A síntese de novo de mRNA é requerida tanto para o processo de consolidação quanto para o de reconsolidação da memória de medo (DUVARCI *et al.*, 2008). Além disso, ambas as fases são sensíveis às mesmas manipulações experimentais e tratamentos farmacológicos, tais como inibidores de síntese protéica e de expressão gênica (ALBERINI, 2005).

A persistência é uma das principais características da memória de longa-duração. A consolidação e a persistência da memória envolvem mecanismos moleculares cuja ocorrência parece se repetir em ciclos. Eckel-Mahan *et al.* (2008) demonstraram que a persistência da memória de longo prazo pode ser dependente da reativação da via de sinalização intracelular envolvendo AMPc/MAPK/CREB no hipocampo. Essa consideração relaciona-se com evidências de que repetidos ciclos de síntese do receptor de glutamato do tipo NMDA seriam requeridos para consolidação da memória e sua manutenção (CUI *et al.*, 2004).

Na fase de extinção, ocorre um enfraquecimento da memória que não seria caracterizado como o esquecimento da memória original, mas sim como a incorporação de um novo aprendizado devido à quebra de relações ambientais já experienciadas e memorizadas antes. Portanto, na extinção haveria a inibição da recuperação de memórias previamente consolidadas, por que nova memória foi formada. Esse processo relaciona-se com procedimentos muito utilizados no tratamento de memórias de medo, tais como as decorrentes de desordens como o

estresse pós-traumático (RESCORLA, 2001; QUIRK *et al.*, 2010). O desaparecimento das memórias ainda não consolidadas, como as que duram apenas alguns minutos ou horas, pode ser considerado um processo de extinção de curto-prazo (CAMMAROTA *et al.*, 2005; IZQUIERDO *et al.*, 2008), porém, ainda não é claro se faz parte do mesmo fenômeno, visto que as memórias de curto-prazo podem simplesmente desaparecer, porque não são dependentes de síntese protéica (QUEVEDO, 1999; IGAZ *et al.*, 2002).

1.3. Condicionamento Clássico Aversivo

Uma situação muito utilizada para o estudo experimental dos processos de memória é o condicionamento clássico, também denominado Pavloviano ou respondente, o qual se refere a uma classe de aprendizagem que envolve relações de contingência e controle de estímulos, nas quais um estímulo sinaliza a apresentação de outro (RESCORLA, 1969).

No condicionamento clássico, ocorre a apresentação de um estímulo neutro (som ou luz) seguida de um estímulo incondicionado (EI) aversivo (choque elétrico). O EI é também associado ao ambiente onde ocorre o condicionamento, denominado como contexto de treinamento (ANAGNOSTARAS *et al.*, 2001; MAREN, 2001). A partir destas associações estabelece-se uma relação de contingência e o estímulo neutro (som, luz ou contexto) passa a ser um estímulo condicionado (EC), que elicia a resposta condicionada, denominada de medo ou medo condicionado (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996; MAREN *et al.*, 1997). Esta denominação fundamenta-se no fato de que o medo é identificado em situações nas quais existe um perigo iminente ou

mesmo um perigo potencial (LEDOUX, 1994; LEDOUX, 2012; SHUHAMA *et al.*, 2007). Portanto, após pareamentos som-choque, os estímulos contextuais ou do som (EC) passam a induzir a ocorrência de comportamentos defensivos, parte do repertório de defesa que contribuem para a auto-preservação do organismo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; FENDT E FANSELOW, 1999; MAREN, 2001; SHUHAMA *et al.*, 2007). Tais comportamentos foram identificados e classificados por meio de análises experimentais, consistindo em exploração cautelosa do ambiente por meio da avaliação de risco, imobilidade completa ou congelamento (*freezing*), fuga orientada ou ataque, e submissão (BLANCHARD *et al.*, 1988; SHUHAMA *et al.*, 2007). Geralmente essas respostas são acompanhadas de reações neurovegetativas tais como aumento da pressão sanguínea, frequência cardíaca e respiratória, analgesia e alterações hormonais (FENDT & FANSELOW, 1999). No caso do condicionamento contextual aversivo, o animal que é treinado em uma determinada caixa experimental, uma vez que é colocado novamente na mesma caixa evocará imediatamente essas respostas defensivas, mesmo quando não há a apresentação do choque. (ALVAREZ *et al.*, 2008). Estas respostas incluem a exploração cautelosa/avaliação de risco e a imobilidade tensa ou congelamento (*freezing*) (BLANCHARD *et al.*, 1988; SHUHAMA *et al.*, 2007). Destas, o congelamento tem sido a resposta mais utilizada para avaliar o medo condicionado a um estímulo discreto ou ao contexto (SCHAFE *et al.*, 2001; LEDOUX, 2012).

A ocorrência do medo condicionado foi observada em diversas espécies de animais incluindo moscas, moluscos, peixes, pombos, ratos, ratos, coelhos, gatos, cães, macacos, e humanos (LEDOUX, 1994). Em humanos, foram identificadas

estratégias de defesa semelhantes, relacionadas a desordens tais como fobias, ansiedade social ou generalizada, estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo (SHUHAMA *et al.*, 2007).

Entre as estruturas neurais que participam dos processos de aprendizagem e memória do medo condicionado, estão a amígdala e o hipocampo. A amígdala é o componente central do circuito neural do medo, sendo mais responsável pela memória emocional aversiva sinalizada ou discriminativa; o hipocampo, por sua vez, foi identificado como uma estrutura mais envolvida com processos de memória contextual aversiva, sendo fundamental para a estabilização da representação sensorial e cognitiva do contexto (IZQUIERDO & MEDINA, 1993; MAREN *et al.*, 1997; MAREN, 2000; PHILIPS & LEDOUX, 1992; MEI *et al.*, 2005). Uma das funções do hipocampo seria montar uma representação contextual associada ao estímulo incondicionado, permitindo consolidar e estabilizar uma memória de uma representação integrada do contexto aversivo (AGNOSTARAS *et al.*, 2001; BAST *et al.*, 2001) Também há evidências de que o hipocampo participa dos processos de condicionamento clássico aversivo a estímulos discretos (BAST & FELDON, 2003; RICHMOND *et al.*, 1999). A memória permanece hipocampo-dependente poucos dias após o treino, sendo progressivamente incorporada a outras áreas corticais (TSE *et al.*, 2007; BONTEMPI *et al.*, 1999).

Os processos de consolidação e reconsolidação da memória são freqüentemente estudados por meio do condicionamento clássico pavloviano. O bloqueio da consolidação não apenas prejudica a consolidação da memória adquirida, mas também interfere nas mudanças sinápticas dos circuitos neurais pré-

estabelecidos, resultando numa série de alterações do esquema cortical. A utilização do paradigma de condicionamento contextual aversivo permitiu estudar mecanismos primários no hipocampo pelos quais as memórias de medo são fortalecidas (LEE & EVERITT, 2008).

A participação essencial do hipocampo na aquisição e consolidação da memória de medo contextual em ratos foi demonstrada pelo trabalho pioneiro de Kim e Fanselow (1992), a partir do qual foram realizados diversos estudos com roedores a fim de analisar o papel do hipocampo na memória contextual aversiva através de lesões excitotóxicas e eletrolíticas do hipocampo. Os autores utilizaram o pareamento som e choque elétrico, e lesões no hipocampo 1, 7, 14, ou 28 dias após o treino. Os animais com lesão 1 dia pós-treino tiveram menor ocorrência de resposta de congelamento ou imobilidade tensa quando re-expostos ao ambiente em que receberam o choque (contexto). Quando testados em outro contexto com reapresentação do som, todos os animais dos diferentes grupos apresentaram congelamento.

Muitos estudos indicam que a apresentação repetida do estímulo condicionado (EC) sem qualquer reforço, resulta em extinção da memória original, a qual consiste no declínio da intensidade ou frequência do comportamento aprendido; assim, sugere-se que ocorre uma nova associação (EC - ausência de EI), que suprime a resposta original caracterizando o processo de extinção da memória (MYERS & DAVIS, 2002; CAMMAROTA et al., 2004).

Em situações experimentais que analisam a reconsolidação da memória, para que o processo de extinção não ocorra deve-se utilizar testes de evocação da

memória com menor duração ou um protocolo de treinamento mais intenso (TRONSON & TAYLOR, 2007), pois a ocorrência de reconsolidação depende da intensidade e idade do traço de memória (BEVILAQUA *et al.*, 2008, ROBINSON & FRANKLIN, 2010). Suzuki *et al.* (2004) verificaram que no condicionamento contextual aversivo em camundongos, uma memória antiga e robusta adquirida num treino com maior número de choques é susceptível a desorganização apenas após um teste de reativação com maior duração, enquanto que memórias recentes e fracas são susceptíveis a desorganização após um teste de reativação com menor duração.

Em pombos Reis *et al.* (1999) observaram menor porcentagem de ocorrência de congelamento ao contexto nos animais que receberam lesões hipocampais 24 horas após o treino. Brito *et al.* (2006) e Sperandéo (2005) submeteram pombos ao condicionamento clássico som-choque e analisaram a expressão de Zenk no hipocampo após o treino e após o teste ao contexto. Canova (2009) investigou as variações dia-noite na aquisição do condicionamento clássico aversivo ao som e ao contexto, e verificou variações comportamentais e na marcação de núcleos Zenk-positivos no hipocampo no horário matutino em comparação ao vespertino.

1.4. Caracterização do Hipocampo de Aves

Em mamíferos, a Formação Hipocampal é uma estrutura do lobo temporal que inclui o hipocampo propriamente dito (corno de Ammon), o giro denteado, o subículo, e o córtex entorrinal (Machado, 2004). O hipocampo pode ser dividido em quatro áreas: as camadas CA1 e CA3 que se localizam na região superior e inferior, respectivamente, a camada CA2, que constitui uma pequena zona de transição entre

CA1 e CA3, e a camada CA4, que fica na zona de transição entre o hipocampo e o giro denteado (BEAR *et al.*, 2002). As estruturas constituintes do sistema hipocampal estão interligadas por um circuito excitatório tri-sináptico e unidirecional, que inclui a via perforante, a via das fibras musgosas e a via eferente das fibras colaterais de Schaffer (KANDEL *et al.*, 2000).

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

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

Kahn *et al.* (2003) investigaram a organização anatômica das subdivisões do hipocampo de pombos com traçadores retrógrados e anterógrados, e sugeriram a existência de um circuito tri-sináptico no hipocampo de pombos, comparável ao

existente em mamíferos (Figura 1). A entrada sensorial se localiza na área dorsolateral, como ocorre no córtex entorrinal. Da área dorsolateral seguem projeções para área dorsomedial, como ocorre as projeções pela via perfurante do córtex entorrinal para o giro denteado. Da área dorsomedial seguem projeções para as áreas ventromedial e ventrolateral, como ocorrido 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 as projeções da região CA3 para as CA1 ipsilateral e contralateral. Em mamíferos a área CA1 se projeta para o *subiculum*, em pombos a área ventrolateral de projeção para área dorsomedial. O *subiculum* e a área dorsomedial se projetam para fora da formação hipocampal em mamíferos e aves (ATOJI *et al.*, 2002; KAHN *et al.*, 2003). SZÉKELY (1999) identificou projeções eferentes para outras regiões, tais como as do hipocampo dorsolateral de onde se projetam fibras para os núcleos basorostrais, arcopálio, septo lateral e regiões meso-diencefálicas.

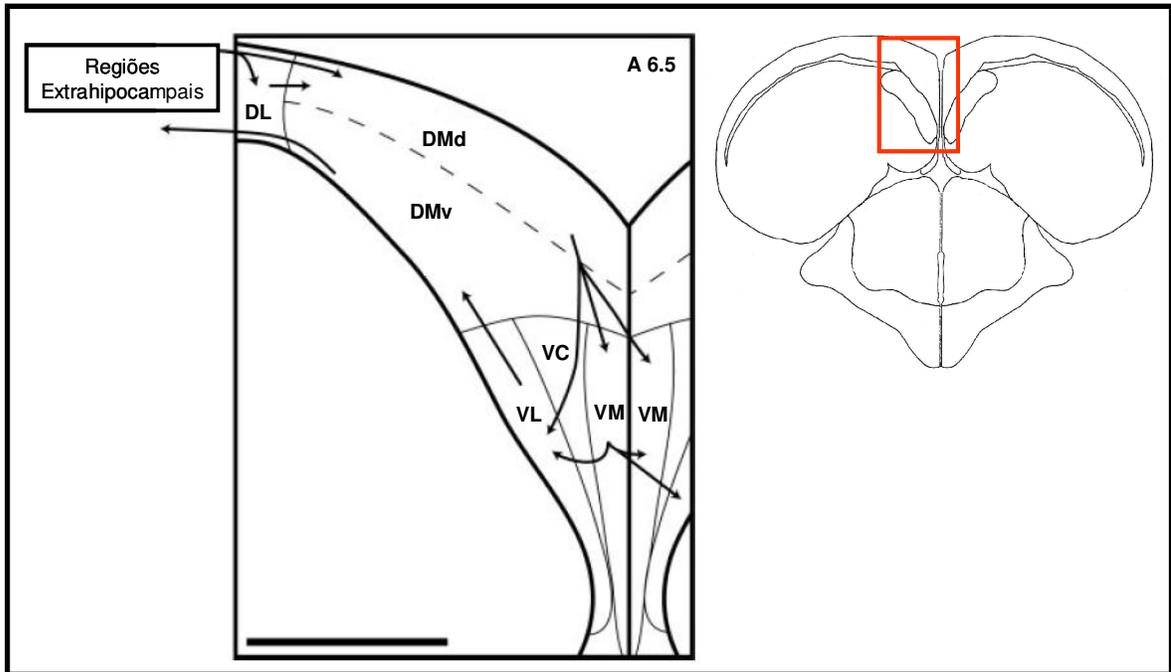


Figura 1. Esquema de conectividade intrahipocampal obtida através da utilização de traçadores retrógrados e anterógrados no hipocampo de pombos. DL = região Dorso Lateral, a linha tracejada mostra a divisão da área dorsomedial (DM) em porção dorsal (DMd) e ventral (DMv). Setas representam as ligações entre subdivisões. VC = ventral área central; VL = camada ventrolateral; VM = camada ventromedial. Escala de Barra = 1mm. (Modificado de KAHN *et al.* 2003; KARTEN & HODOS, 1967; CANOVA, 2009).

Os estudos neuroquímicos do hipocampo de aves indicam que são encontrados diversos tipos de neurotransmissores e neuropeptídeos também presentes em mamíferos. Krebs *et al.* (1991) descreveram uma região com terminais de fibras mediais aferentes, na qual se encontram-se fibras imunoreativas para substância P (SP), colecistoquinina (CCK), leucina encefalina (LENK), polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e neuropeptídeo Y (NPY); há também a presença de fibras colinérgicas, catecolaminérgicas, serotoninérgicas e glutamatérgicas.

Brüning *et al.* (1994) por meio da técnica de imunohistoquímica, verificaram a distribuição da sintase neuronal de óxido nítrico, que medeia a síntese de óxido nítrico em diversas regiões cerebrais, principalmente na região ventral do *hiperstriatum*, o qual está envolvido com processos de aprendizado e memória, como a esquia inibitória. O óxido nítrico também encontra-se em abundância no hipocampo de aves, o que foi demonstrado pelo trabalho de Suárez *et al.* (2006). Estes autores analisaram a distribuição da imunomarcagem de GABA, calbindina (CB), calretinina (CR) e sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) na formação hipocampal e no *hiperpalium* durante o desenvolvimento e fase adulta de galinhas. Rosinha *et al.* (2009) descreveram a distribuição de células com marcação imunohistoquímica das várias subunidades de receptores de glutamato do tipo AMPA (GluR1, GluR2/3 e GluR4) no hipocampo de pombos.

1.5. Participação do óxido nítrico em processos de comportamento e memória

O NO é considerado um neurotransmissor atípico, pois não se encontra armazenado em vesículas sinápticas e nem é liberado por exocitose (VINCENT, 1995; ALDERTON *et al.*, 2001; DUNNING & DURING, 2003), sendo, portanto, um gás produzido a partir do aminoácido L-arginina e de uma família de enzimas chamadas sintase do óxido nítrico (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) (MONCADA & HIGGS, 1993), agindo como um neurotransmissor retrógrado na LTP hipocampal (GARTHWAITE, 1991, 2008; HALEY *et al.*, 1993; GARTHWAITE & BOULTON, 1995) 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 GTP para GMP cíclico (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 ADP ribose cíclico (cADPR) (GARTHWAITE & BOULTON, 1995; ALDERTON *et al.*, 2001).

Com a ação retrógrada do óxido nítrico no neurônio pré-sináptico e conseqüente síntese e aumento de GMPc, o resultado é o estabelecimento da fase inicial (1 a 3 horas) da LTP (potenciação a longo-prazo), que é caracterizada pelo aumento estável e duradouro na eficiência da transmissão sináptica (BON & GARTHWAITE, 2003; GARTHWAITE, 2008). O NO também garante a fase tardia da LTP (BREDT & SNYDER, 1992; LU *et al.*, 1999), quando ocorrem síntese de novas proteínas e ativação de vias de sinalização intracelular a partir do complexo Ca^{2+} /calmodulina, com a ativação do AMPc, a fosforilação das cinases de proteína PKA e MAPKs, resultando em aumento da atividade das proteínas CREBs no núcleo e conseqüente síntese de BDNF (BREDT & SNYDER, 1992; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; LU *et al.*, 1999; KANDEL, 2000).

Como a síntese de NO é mediada pela NOS, a maior parte do conhecimento sobre as funções do NO decorre de investigações sobre a atividade da NOS (WANG & MARSDEN, 1995; SUSSWEIN *et al.*, 2004). 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 no endotélio vascular (MAYER *et al.*, 1991) 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+} (DAWSON & SNYDER, 1994; ALDERTON, 2001; PRAST & PHILIPPU, 2001; GUIX *et al.*, 2005).

A enzima nNOS é associada à membrana plasmática por uma proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95) e quando o receptor NMDA para Glu é ativado e há o influxo e aumento de Ca^{2+} intracelular, o complexo cálcio-calmodulina interage com a nNOS, induzindo sua translocação da membrana para o citoplasma, onde ocorre a síntese de NO (Figura 2) (DAWSON *et al.*, 1998).

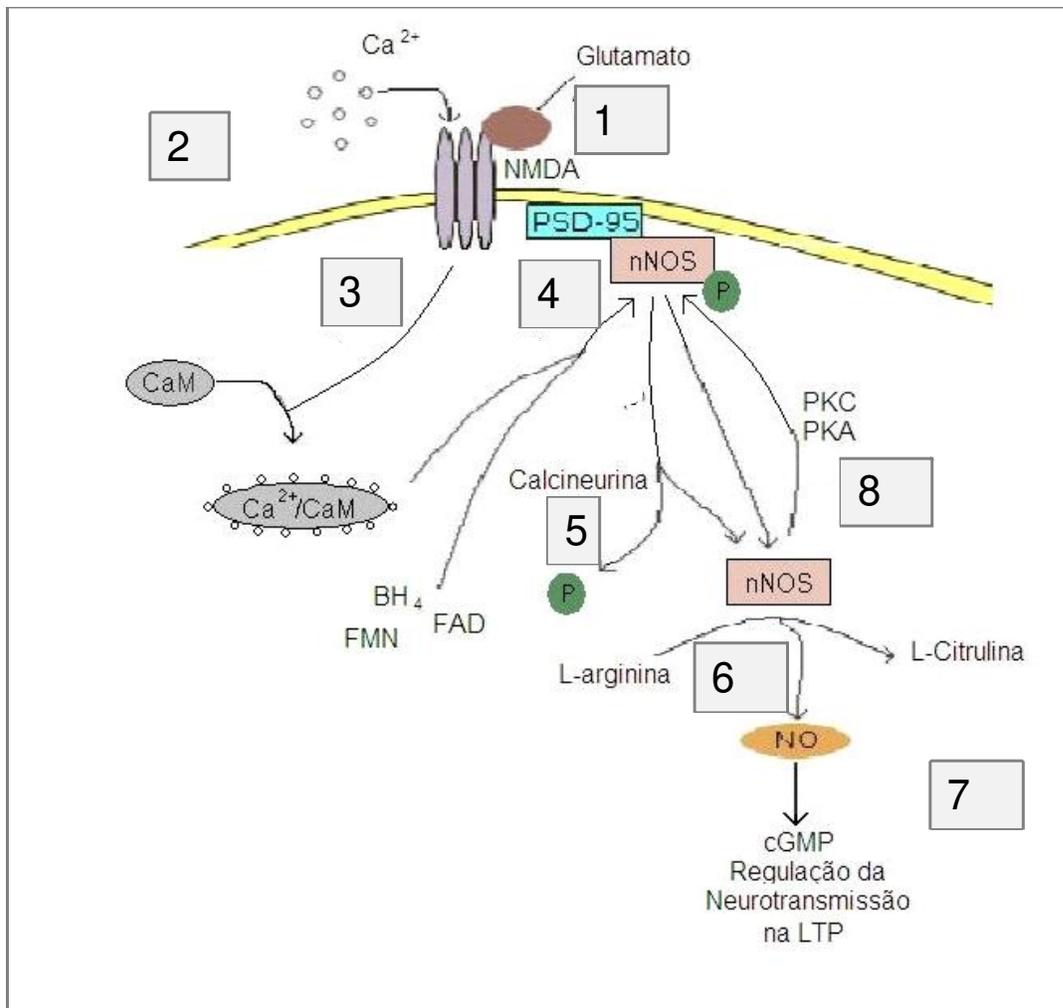


Figura 2. Esquema ilustrativo da cascata de ativação da nNOS para a síntese do NO. A liberação do neurotransmissor glutamato que interage com receptores NMDA na membrana pós-sináptica (1), aumentando influxo de Cálcio [Ca^{2+}] (2), interage com a proteína CaM (3). O complexo Ca^{2+}/CaM se liga no seu 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) (4), o que implica na desfosforilação da nNOS pela Calcineurina (5). Sob a ação catalítica da nNOS ativada a partir do nitrogênio da guanidina, presente na L-arginina, são geradas concentrações equimolares de L-citrulina e de NO (6). O NO agirá no neurônio pré-sináptico, aumentando a produção de cGMP (7), que atua na regulação da neurotransmissão entre outras coisas. A Proteína cinase A (PKA) e PKC, entre outras proteínas regulam a atividade catalítica fosforilando diversos sítios da nNOS (8). (Modificado de MACHADO, 2010).

A nNOS é uma enzima que tem em seu domínio N-terminal um sítio heme catalisador e um co-fator, tetrahydrobiopterina, enquanto o domínio C-terminal que contém FMN, FAD e NADPH e sítios de ligação que servem como doador 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 Ca^{2+} /CaM, e se relacionando diretamente com os receptores NMDA (HAYASHI *et al.*, 1999; BAADER & SCHILLING, 1996; GUIMARÃES *et al.*, 2005).

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).

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 há 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.

Diversos estudos sobre a participação do NO nos processos de aprendizagem e memória investigam os efeitos de inibidores da NOS, os quais impedem a síntese de NO, e dessa forma, prejudicam a formação da memória em diversas tarefas em diferentes espécies (SUSSWEIN *et al.*, 2004; RICKARD & GIBBS, 2003). Dentre os inibidores seletivos para a nNOS mais utilizados, encontra-se o 7-nitroindazol (7-NI), uma molécula que se liga ao grupo prostético heme da enzima, competindo com a ligação da L-arginina e de BH₄, interrompendo, assim, a transferência de elétrons e a síntese do NO (MOORE & HANDY, 1997). Dentre os agentes indazoles, o 7-NI apresenta seletividade 10 vezes maior para a nNOS, sendo sua atividade eficaz *in vitro* e principalmente *in vivo*. Além disso, este agente não afeta a pressão arterial, sendo capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica por difusão passiva e distribuir-se rapidamente pelo SNC (BUSH & POLLACK, 2001). Apesar disso, existem restrições quanto à classificação como inibidor seletivo visto que em testes com a enzima nNOS isolada não foi verificada seletividade do 7-NI (ALDERTON *et al.*, 2001).

Hölscher (1994) verificou que a administração em pintainhos de 40 mg/kg de 7-NI via intraperitoneal (i.p.) antes do treino de esquivas inibitórias resultou em déficit de memória no teste. Em 1996, Hölscher *et al.* mostraram que a injeção i.p. de 30mg/kg de 7-NI pré-treino, em ratos, prejudicou a aprendizagem espacial no labirinto aquático e também no labirinto radial de 8 braços. Maren (1998) relatou que a administração de 7-NI na concentração de 30 mg/kg não afeta especificamente a aquisição da memória contextual no condicionamento de medo, e sim a atividade locomotora. Akar *et al.* (2007) submeteram ratos ao labirinto em cruz elevado e verificaram que a

administração de 20 ou 50 mg/kg de 7-NI, i.p., antes do treino, aumentou a latência de entrada no braço fechado, no testes 24 hs após o treino.

Rickard & Gibbs (2003) investigaram a atividade da nNOS em ambos os hemisférios cerebrais na consolidação da memória de esquiva inibitória em pintainhos. Baratti *et al.* (2008) observaram a ocorrência de atividade do óxido nítrico no hipocampo de camundongos na persistência da memória de esquiva inibitória até 30 dias depois do treino, sugerindo que o NO participa no processo de reconsolidação, mas, dentro de um intervalo de tempo limitado. A participação do NO em outras estruturas como o córtex pré-frontal ventro-medial (RESSEL *et al.*, 2008) e a substância cinzenta periaquedutal (CARVALHO-NETTO *et al.*, 2009) contribui para a expressão de comportamentos defensivos a longo-prazo em roedores. Schafe *et al.* 2005 verificaram que a sinalização por NO na amígdala lateral é essencial para a formação e consolidação da memória de medo sinalizado.

Camundongos *knockout* para o gene nNOS apresentam prejuízo no desempenho cognitivo (KIRCHNER *et al.*, 2004). Kelley *et al.* (2009) submetem camundongos *knock out* (KO) para nNOS, ao condicionamento contextual aversivo e verificaram redução de congelamento quando testados 1 hora, 24 horas e principalmente 7 dias após o treino, demonstrando déficit na memória a curto e a longo-prazo. Itzhak (2008) também verificou que camundongos *knock out* para o gene nNOS apresentaram déficit na persistência da memória de preferência condicionada de lugar.

Em nosso laboratório, Fornel *et al.* (2006) relataram facilitação da habituação da resposta exploratória a estimulação acústica em pombos quando a sessão de treino foi precedida por administração sistêmica de 7-NI (25 mg/kg). Denadai (2008) analisou os efeitos da administração de 7-NI sobre o condicionamento contextual aversivo em pombos e verificou que a administração intraperitoneal do inibidor na concentração de 25 mg/kg imediatamente após o treino de condicionamento clássico aversivo, resultou em redução da expressão da resposta de congelamento ao contexto quando os animais eram testados após 24 horas, com diminuição da atividade da nNOS no hipocampo dos animais que receberam a droga.

Apesar da importância funcional atribuída ao Glu e ao seu papel na ativação da nNOS e conseqüente síntese do NO, poucos estudos se preocuparam em caracterizar a distribuição e as funções do NO e da NOS em aves. Silva (2007) por meio do método de imunohistoquímica, verificou a distribuição de células nNOS-positivas no hipocampo de pombos treinados em situação de aprendizagem espacial de escolha alimentar, e relatou que o hipocampo dorsal, comparado ao hipocampo ventral, de animais treinados por 5 dias tem maior número de células nNOS-positivas marcadas do que animais treinados por apenas 1 dia.

A fim de verificar a participação do óxido nítrico no processo de reconsolidação da memória, Baratti *et al.* (2008) submeteram camundongos ao treino de esQUIVA inibitória de uma sessão, na qual os animais recebiam choque elétrico nas patas. Após 48 horas desde o treino, os animais eram submetidos ao primeiro teste de retenção (T1), e, recebiam o tratamento com L-NAME administrado via i.p.; em seguida, eram realizados testes subseqüentes (T2, T3, T4, T5 e T6). Verificou-se que após T1 houve

redução da latência de retenção até T6, o que indica um déficit na reativação da memória. Além disso, os animais que tiveram o tratamento até 30 minutos após T1 apresentaram prejuízo na retenção quando este ocorreu em 7, 15, ou 30 dias depois do treino, mas não após 45 dias, o que sugere que o óxido nítrico participa no processo de reconsolidação, mas, dentro de um intervalo de tempo limitado. Com estes resultados é possível inferir que o óxido nítrico participa de processos que envolvem a reativação da memória a longo-prazo (reconsolidação), os quais diferem da extinção da memória original.

Przybylski & Sara (1997) verificaram que a infusão de MK-801 (antagonista não competitivo do receptor NMDA) prejudica a reconsolidação da memória em ratos submetidos à tarefa de labirinto radial de oito braços. Mais recentemente, Itzhak (2008) investigou o papel do receptor NMDA e da nNOS na reconsolidação da memória de preferência de lugar condicionado induzida por cocaína. Para isto submeteram camundongos selvagens e *knockout* (KO) positivo e negativo para o gene nNOS à administração de cocaína, sendo em seguida, submetidos ao treinamento. Após 24 horas ocorreu o primeiro teste de retenção, sendo que imediatamente após este os animais receberam injeção i.p. de MK-801. Os testes subsequentes ocorreram em intervalos de uma semana. Foi mensurado o tempo passado em cada compartimento e a atividade locomotora. Verificou-se que os animais que receberam MK-801 apresentaram déficit na expressão e no reestabelecimento da memória de preferência de lugar condicionado. No mesmo estudo, foi observado que os animais do grupo KO positivo para nNOS injetados com 25 mg/kg de 7-NI via i.p. após o primeiro teste de retenção, apresentaram prejuízo na expressão e reestabelecimento

da preferência de lugar, caracterizando um déficit na reconsolidação da memória. Esses estudos sugerem que a via de sinalização celular por glutamato e óxido nítrico exerce papel fundamental na reconsolidação da memória em diferentes tipos de aprendizado.

Alguns estudos utilizando inibidores não seletivos da NOS a fim de investigar a participação do NO nos processos de memória mostraram resultados contraditórios em relação a seus efeitos sobre a memória devido à ampla variação dos efeitos decorrentes do bloqueio das diferentes isoformas da enzima.

Os trabalhos que investigaram a participação do NO em processos de memória, por meio de inibidores não seletivos da NOS, mostraram alguns resultados contraditórios que podem ser devidos à ampla variação dos efeitos decorrentes do bloqueio das diferentes isoformas da enzima. Além disso, a grande maioria dos estudos utiliza a administração sistêmica, sendo que os efeitos de infusões locais ainda não foram suficientemente explorados. Deste modo, não é possível saber a participação específica da sinalização mediada por óxido nítrico em estruturas cerebrais específicas, como o hipocampo, no processo de consolidação e reconsolidação de determinados tipos de memória. Dessa forma, o uso de inibidores seletivos permite análises celulares e moleculares mais específicas sobre a atividade do NO em determinados tipos de aprendizado (RICKARD & GIBBS, 2003). A infusão intracraniana de inibidores da nNOS ainda não foi suficientemente explorada, sendo capaz de prevenir a ocorrência de efeitos inespecíficos resultantes da administração sistêmica.

Muitas pesquisas foram realizadas sobre os efeitos dos inibidores da NOS sobre a memória e o desempenho em diferentes tipos de tarefas de aprendizagem utilizando diversas espécies de animais, tais como moluscos, ratos, camundongos e aves (CHEN et al., 1997; DAWSON et al., 1991; GIBBS et al., 1987; RICKARD et al., 2003; SUSSWEIN et al., 2004), bem como no papel fundamental do NO como neurotransmissor que atua no processo de plasticidade no hipocampo, amígdala e cerebelo (SUSSWEIN et al., 2004; RICKARD & GIBBS, 2003). Entretanto, ainda não há estudos totalmente esclarecedores sobre o papel da NOS no processos de aprendizagem e memória (FRISCH et al., 2000; DERE et al., 2001). No trabalho de Maren (1998) foi observado aumento na ocorrência de congelamento em ratos que receberam injeção i.p. de 7-NI antes do teste quando comparados com ratos que receberam a mesma injeção antes do treino. Em sua discussão ele afirma que 7-NI administrado i.p. antes do teste não afetaria a aquisição da memória contextual em situação de condicionamento de medo e que os valores de congelamento aumentados poderiam estar relacionados a um déficit na atividade locomotora provocado pela droga. No trabalho de Denadai (2008), no qual a administração da droga foi feita após o treino, impedindo os efeitos na atividade locomotora, pode-se verificar que a expressão do congelamento frente ao contexto aversivo foi prejudicada. Assim, é possível inferir que a atividade da enzima nNOS é funcionalmente importante para os processos de aprendizagem e memória, pois a ausência da ocorrência do congelamento apresentado pelo G7-NI, indica que houve prejuízos na consolidação da memória contextual aversiva.

No caso do condicionamento clássico aversivo, há ativação de redes neuronais complexas, incluindo a atuação de diferentes sistemas e estruturas que processam e integram as informações em diferentes níveis do SNC e organizam as respostas condicionadas e incondicionadas. Há evidências de que a infusão de drogas restrita à determinadas áreas cerebrais, apresenta vantagens em relação à administração sistêmica. No caso do uso de inibidores da NOS, a administração local previne a ocorrência de efeitos inespecíficos resultantes da administração periférica (RICKARD & GIBBS *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a participação da nNOS na consolidação e reconsolidação da memória de condicionamento clássico aversivo em pombos. Para isso foi administrado um inibidor da nNOS, 7-nitroindazol, imediatamente após o treino, durante a fase inicial do processo de consolidação (Experimento 1); e imediatamente após o teste de reativação da memória contextual, durante a fase inicial de reconsolidação (Experimento 2).

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Experimento 1

1. Investigar os efeitos da administração i.c.v. do 7-nitroindazol imediatamente depois do treino de condicionamento contextual aversivo sobre a consolidação da memória de medo condicionado;

2. Analisar diferentes tipos de comportamentos exibidos durante o treino e durante o teste de re-exposição ao contexto do condicionamento;

3. Avaliar a atividade da NOS dependente e independente de Ca^{2+} no tecido do hipocampo após o teste da memória contextual;

4. Avaliar a expressão protéica da nNOS no hipocampo após o teste da memória contextual.

2.2.2. Experimento 2

1. Analisar os efeitos da administração i.c.v. do 7-nitroindazol depois do teste ao contexto aversivo sobre a reconsolidação da memória de medo condicionado;

2. Analisar diferentes tipos de comportamentos exibidos durante o treino, o teste e reteste de ao contexto do condicionamento;

3. Avaliar a atividade da NOS dependente e independente de Ca^{2+} no hipocampo após o reteste ao contexto do condicionamento;

4. avaliar a expressão protéica da nNOS no hipocampo após o reteste ao contexto do condicionamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Experimento 1

3.1.1. Sujeitos: Foram utilizados 40 pombos, adultos, derivação não controlada da espécie *Columba livia*, adquiridos de um mesmo fornecedor comercial. Após a chegada ao biotério, foram mantidos em quarentena, recebendo banho e tratamento anti-parasitas internos e externos. Durante esse período, os animais sofreram manipulações de caráter dessensibilizatório, profilático e terapêutico. Em seguida,

foram alojados em gaiolas-viveiro individuais, identificados numericamente e catalogados e tiveram água e comida *ad libitum* (mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração especial para aves, areia e farinha de ostra). 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 °C). Nestas condições foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12h. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação com Animais (CEEA) da UNICAMP (protocolo 2051-1) e realizados em acordo com as suas prescrições. Foram constituídos os seguintes grupos:

1. Grupo treino-7-nitroindazol (7-NI; n=8): administração de 7-NI via i.c.v. imediatamente após o treino;
2. Grupo treino - veículo (VEIC; n=8): administração i.c.v. do veículo (tampão fosfato salino (PBS) contendo 20% de Dimetilsulfóxido (DMSO), 50 mM NaOH e 16% Tween-80) imediatamente após o treino;
3. Grupo treino- não tratado (COND; n=8): expostos a pareamentos dos estímulos som e choque, mas não receberam tratamento;
4. Grupo contexto - não tratado (CONT; n=8): exposição à caixa experimental, sem apresentação de estímulos e nenhum tratamento.
5. Grupo não condicionado - não tratado - grupo manipulação (NÄIVE; n=8): durante 6 dias os animais foram retirados das gaiolas-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério. Este grupo foi utilizado apenas para as análises da

atividade da NOS dependente e independente de Ca^{2+} e a expressão protéica da nNOS no hipocampo.

3.1.2. Equipamentos: As sessões experimentais de condicionamento choque-contexto e teste ao contexto foram realizadas numa câmara de observação (30 x 30 x 40 cm), com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. A iluminação da caixa foi feita com lâmpadas vermelhas de 20W, localizadas numa parede lateral. Os eletrodos de aço inoxidável (0,5 mm; 0.020") foram implantados no dia anterior a cirurgia extereotáxica, ao redor dos ossos púbicos dos animais, após a aplicação local de lidocaína. Os choques foram aplicados através dos eletrodos a partir de uma fonte (Foringer, USA), controlados por marcadores de tempo eletromecânicos. Todas as sessões foram gravadas digitalmente com o auxílio do software (WinVDR pro versão 3.7.0). Os animais do grupo NÄIVE não tiveram implante de eletrodos.

3.1.3. Drogas: O 7-NI (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em 0,5 µl de tampão fosfato salino (PBS) contendo 20% de Dimetilsulfóxido (DMSO), 50mM NaOH e 16% de Tween-80 (100 nmol / 0.5µl). (MORATO *et al.*, 2004). A solução foi preparada no dia do experimento e administrada nos animais via intracerebroventricular (i.c.v.).

3. 2. Procedimentos

3.2.1. Adaptação às condições do biotério: os animais foram submetidos às condições do biotério por um período mínimo de 15 dias antes do início dos procedimentos experimentais.

3.2.2. Habituação ao contexto do laboratório: Foram realizadas sessões diárias de 30 min, em uma câmara experimental diferente daquela do treino, durante quatro dias no mesmo horário previsto para os testes comportamentais. Nesses dias, os animais do grupo NÄIVE foram apenas retirados das gaiolas-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e colocados na gaiola-viveiro. Esse procedimento visou diminuir a interferência de reações de estresse relacionadas com a manipulação dos pombos pela experimentadora.

3.2.3. Cirurgia para implante de cânula: Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina Agener 10%, Agener União, 20 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer, 10 mg/kg) via intramuscular. Após a anestesia, as penas do dorso da cabeça foram removidas. Antes dos animais serem colocados no aparelho estereotáxico, foi estabelecido o ponto zero antero-posterior (AP) do aparelho, e a seguir fixou-se o animal pela linha interaural, e após assepsia cutânea com peróxido de hidrogênio a 3% foi realizada uma incisão na pele (linha sagital) para exposição da calota craniana e visualização da sutura sagital. A trepanação foi feita nas coordenadas A: 9 mm (medida antero-posterior) e L: 1mm (medida lateral), de acordo com atlas de Karten e Hodos (1967). Uma cânula-guia de aço inoxidável 26G (*gauge*), medindo 10 mm de comprimento foi implantada através do orifício (V: 3 mm em relação à calota craniana), e fixada com resina acrílica auto-polimerizável (L.D. Caulk, Milford, DE, USA). Um fio de aço medindo 10 mm de comprimento, e espessura igual ao diâmetro interno da cânula foi introduzido na cânula-guia e fixado à calota craniana, para obliteração da mesma e impedir comunicação do sistema ventricular com o meio externo. Ao final, os animais

retornaram para suas gaiolas-viveiro, lá permanecendo por um período de seis dias para recuperação.

3.2.4. Teste da angiotensina II: Na manhã do sexto dia, para verificar o correto posicionamento da cânula guia, a comida foi removida das gaiolas e 2µl de angiotensina II (10µg/ml em tampão fosfato salino - PBS) foram infundidos através da mesma utilizando-se uma agulha de infusão (32G) de 11mm. Após os animais serem recolocados nas gaiolas-viveiro, o consumo de água foi monitorado, visto que a angiotensina II é um potente indutor da sede (Brun *et al.*, 2001; Carvalheira *et al.*, 2005). Desta forma, os pombos que consumiram água continuamente por mais de 1 minuto foram utilizados nas demais etapas dos experimentos.

3.2.5. Infusão intracerebroventricular (i.c.v.): No sétimo dia após a cirurgia, os animais selecionados no teste com angiotensina II foram distribuídos, aleatoriamente, para administração de 7-NI (7-NI) ou de veículo (VEIC). A administração foi realizada imediatamente após o treino em condicionamento choque-contexto (Experimento 1) ou imediatamente após o teste ao contexto (Experimento 2), através de uma seringa de 10 µl (Hamilton, Reno, NV, USA) acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha gengival 30G fixada em sua extremidade. A seringa Hamilton é adaptada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) regulada para injeção de 0,25 µl/min. Para infusão, a agulha 30G foi inserida na cânula-guia, passando 0,5 mm além do seu comprimento, e permanece posicionada por 5 min para evitar um possível refluxo da solução infundida.

3. 3. Procedimentos comportamentais

3.3.1. Treino em condicionamento contexto-choque: os animais 7-NI, VEIC e COND foram colocados na caixa experimental onde receberam a apresentação de um choque (5 mA, 35 ms) no 5º, 10º e 15º minuto. A sessão de treino teve 20 min de duração. Imediatamente após a sessão, os animais 7-NI e VEIC receberam a administração i.c.v. da droga ou do veículo, respectivamente. Os animais do grupo COND não receberam tratamento com 7-NI nem veículo. Os animais do grupo CONT foram colocados na caixa experimental, onde permaneceram por 20 min, mas não receberam estímulos; o objetivo foi a habituação dos comportamentos relacionados com a novidade do ambiente experimental durante o treino.

3.3.2. Teste ao contexto de condicionamento: os animais 7-NI, VEIC, COND e CONT foram colocados no contexto de condicionamento numa sessão de 5 min de duração, realizada 24 horas após o treino. Após o teste, os animais foram reconduzidos às suas gaiolas-viveiro.

Os comportamentos dos pombos nas sessões de treino e teste foram gravados com sistema digital para posterior transcrição e registros dos dados comportamentais.

Um esquema ilustrativo dos procedimentos comportamentais do Experimento 1 pode ser visto na Figura 3.

3.3.3. Análise Comportamental: As gravações das sessões experimentais de todos os grupos foram transcritas com a utilização do software Etholog 2.2.5 (Otoni, 1999). O registro foi contínuo, para a análise de duração e também da amostragem de tempo a cada 30 segundos. A descrição dos comportamentos será baseada na

descrição contida no catálogo de comportamentos de pombos (REIS *et al.*, 1999), conforme se segue:

1. Comportamentos defensivos:

1.1. 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.

1.2. 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.

1.3. 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.

1.4. Escanear (ESC): deslocamento lateral da cabeça no plano horizontal, com rotação lenta da cabeça, percorrendo ponto a ponto um ângulo de 180° em torno do eixo vertical. Postura ereta ou agachada.

2. Comportamentos exploratórios e atividade geral:

2.1. Exploração (EXP): movimentos relacionados à orientação para investigação de partes ou do ambiente como um todo. Compreende estender o pescoço com movimentos sequenciais, rápidos e repetidos de rotação, inclinação e balanço da cabeça. Postura em pé ou agachada.

2.2. Parado (PAR): ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte desse; 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 $< 60^\circ$.

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

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

2.5. 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.

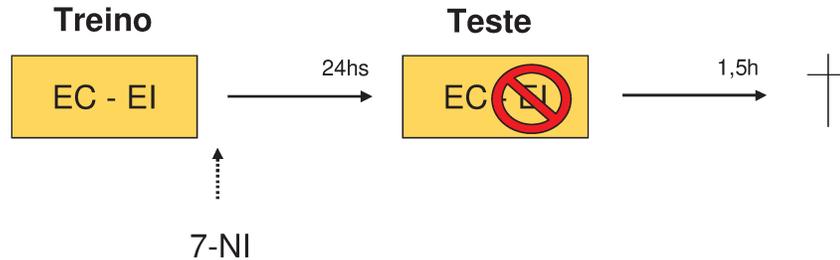


Figura 3. Esquema ilustrativo dos procedimentos comportamentais do Experimento 1. As sessões de treino consistiram na associação do estímulo condicionado (EC) (contexto) com o estímulo incondicionado (EI) (choque); o 7-NI foi administrado via i.c.v. imediatamente após o treino; 24h após o treino, os grupos foram testados ao contexto sem a apresentação do choque (EI). Após 1,5h do início da sessão de teste, os animais de cada grupo foram sacrificados para realização dos procedimentos moleculares.

3. 4. Procedimentos moleculares

3.4.1. Atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} e da NOS independente de Ca^{2+}

Após uma 1,5 h do início da sessão de teste, os animais de cada grupo (n=6) passaram por decapitação por guilhotina, sendo os cérebros removidos, os hipocampus dissecados, e o tecido estocado em freezer (-70° C). Amostras de hipocampo dos grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT e NÄIVE 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- 3 H]L-arginina

mono hidrocloreto em um volume final de 100 µl 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 vials 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 “branco” (onde o homogenato de tecido 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 vials 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) e na 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.

3.4.2. Análise protéica da nNOS por Western Blotting

Após as análises da atividade enzimática da NOS, as mesmas amostras foram utilizadas para a análise da quantidade de proteína nNOS no hipocampo. A análise da expressão protéica da nNOS foi realizada em homogenatos de hipocampo de todos os grupos. Cento e trinta microlitros das amostras de hipocampo (concentração de proteínas totais = 20 mg/ml) foram diluídas com 30 μ l de tampão de Laemmli (0,0625 M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e fervidas durante 10 min.

Após rápida centrifugação a 10.000 *g* (30 seg), as proteínas das amostras (50 μ g/lane) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) contendo 0.1% de lauril sulfato de sódio (SDS - PAGE; Laemmli, 1970). A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0,1%) ajustado para pH 8,3. A separação eletroforética das proteínas foi realizada à intensidade de corrente constante (25 mA), durante aproximadamente 2 horas, resultando em valores de voltagem variando entre 100 a 180V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma amperagem constante de 150 mA (voltagem ~50V) durante 2 horas. A composição do tampão

empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1%) e etanol (18%). Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com corante Commassie blue (solução à 0,1% de Commassie brilliant blue em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25 % de etanol), e as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau (solução à 2% de corante Ponceau em solução aquosa contendo 30% de ácido tricloro acético e 30% de ácido sulfosalicílico). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,2% de caseína diluída em tampão TBS-t pH 7,4 (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0,2% de Tween-20) sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas overnight a 18°C com anticorpo policlonal anti nNOS (coelho, 1:2000, diluído em tampão TBS-t, BD Transduction, EUA). Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (HRP, feito em cabra e diluído 1:3000 em TBS-t), durante 2 horas. Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência em filme de Raio-X mediante um kit de revelação (Super Signal West pico, Thermo Scientific, EUA). Após a revelação das bandas para nNOS, as membranas foram lavadas duas vezes por 10 min em TBS-t e em seguida, incubadas 10 min, em temperatura ambiente com 10 ml de solução “stripping” pH 2,2 para a retirada do anticorpo nNOS e posterior incubação com o

controle interno (anti- α -tubulina) . A solução “stripping” é constituída de 1,5% de glicina, 0,1% de SDS e 1% de Tween-20. A seguir, as membranas foram lavadas novamente duas vezes em TBS-t e submetidas a novo bloqueio e finalmente ao anticorpo anti α -tubulina (1:2000, Santa Cruz, EUA) conforme descrito anteriormente para nNOS. O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa: 7 a 205 kDa, Bio Rad., EUA). A intensidade das bandas (como medida do grau de expressão da proteína) foi determinada por análise densitométrica mediante o uso de software Chemilmager (Alpha Innoteck., EUA). Os resultados de densitometria para nNOS foram normalizados pela densitometria do controle interno (α -tubulina) e expressos como porcentagem de variação em relação ao grupo NAÏVE.

3.4.3. Análise Estatística

A análise estatística dos dados comportamentais foi realizada utilizando o teste ANOVA, tendo grupo, sessão e blocos de intervalos de registro como fatores. Os dados de densidade óptica das bandas imunorreativas obtidos por Western Blotting foram analisados tendo grupo como fator. As análises de múltiplas comparações *post hoc* foram realizadas com os testes Tukey-Kramer ou Newman-Keuls quando apropriado. Para todas as análises estatísticas foi considerado o valor de $p \leq 0,05$.

3.5. Experimento 2

Todos os procedimentos experimentais, bem como materiais e métodos foram idênticos aos utilizados no Experimento 1. Contudo, no Experimento 2, 24 horas após

a sessão de teste, foi realizado o reteste ao contexto de condicionamento, o qual consistiu na recolocação do animal no contexto no qual foi treinado, na ausência do choque, sendo que administração i.c.v. do inibidor 7-nitroindazol foi realizada imediatamente após o teste ao contexto (Figura 4).

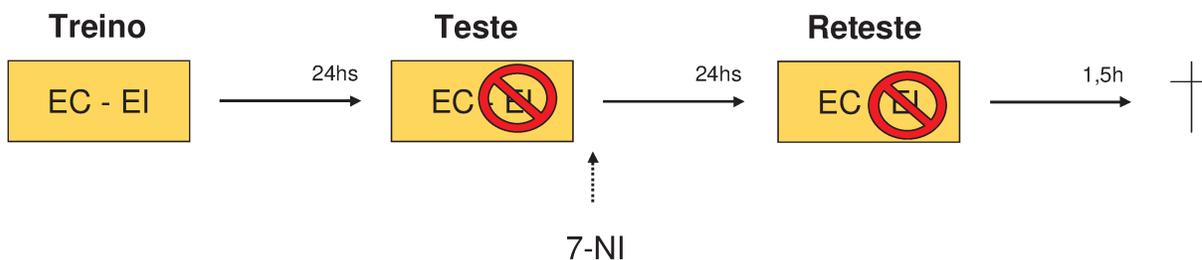


Figura 4. Esquema ilustrativo dos procedimentos comportamentais do Experimento 2. As sessões de treino consistiram na associação do estímulo condicionado (EC) (contexto) com o estímulo incondicionado (EI) (choque); o teste ocorreu 24h depois na ausência do choque (EI), sendo o 7-NI administrado via i.c.v. imediatamente após; 24h após o teste os grupos foram retestados ao contexto novamente sem a apresentação do choque (EI). Após 1,5h do início da sessão de teste, os animais de cada grupo foram sacrificados para realização dos procedimentos moleculares.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1

4.1.1. Efeitos do 7-NI sobre o comportamento de pombos em situação de condicionamento contextual aversivo

A Figura 5 mostra a duração percentual média dos comportamentos analisados durante a sessão do treino e de teste ao contexto. Cada barra corresponde à

porcentagem média calculada considerando como 100% o valor do total geral de comportamentos registrados na sessão, para todas as categorias.

Na sessão de treino, os grupos 7-NI, VEIC e COND apresentaram um padrão semelhante de comportamentos com ocorrência de diferentes categorias de comportamento, porém com uma elevada porcentagem de congelamento, exploração cautelosa e vigilância, enquanto que o grupo CONT apresentou uma porcentagem elevada de exploração e de parado. Durante a sessão de teste ao contexto, observa-se um claro efeito do tratamento com o 7-nitroindazol sobre a expressão do congelamento, evidenciado por baixos valores no grupo 7-NI, em comparação com os grupos VEIC e COND.

A análise com ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas entre os grupos para a duração percentual média dos comportamentos de congelamento ($F_{3,23} = 13,32$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,23} = 5,07$; $p < 0,05$), exploração cautelosa ($F_{3,23} = 9,56$; $p < 0,001$), escaneamento ($F_{1,3} = 4,70$; $p < 0,05$), exploração ($F_{3,23} = 5,05$; $p < 0,001$), parado ($F_{3,23} = 6,75$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{3,23} = 4,09$; $p < 0,001$), manutenção ($F_{3,23} = 5,40$; $p < 0,001$). Houve diferença significativa entre as sessões de treino e teste apenas para as categorias de locomoção ($F_{1,3} = 41,81$; $p < 0,001$) e houve interação entre grupos e sessão para os comportamentos de locomoção ($p < 0,05$), vigilância ($p < 0,001$), exploração cautelosa ($p < 0,001$) e congelamento ($p < 0,001$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente dos demais grupos na categoria de congelamento. A sessão de treino do 7-NI e foi significativamente

diferente da sessão de teste do grupo 7-NI ($p < 0,05$) e também das sessões de teste dos grupos VEIC E COND ($p < 0,05$). O grupo CONT diferiu significativamente do grupo 7-NI nas categorias de manutenção, parado e vigilância ($p < 0,05$), do grupo COND nas categorias de exploração, parado, congelamento e exploração cautelosa ($p < 0,05$) e do grupo VEIC nas categorias de exploração, locomoção, manutenção, parado, congelamento e exploração cautelosa ($p < 0,05$).

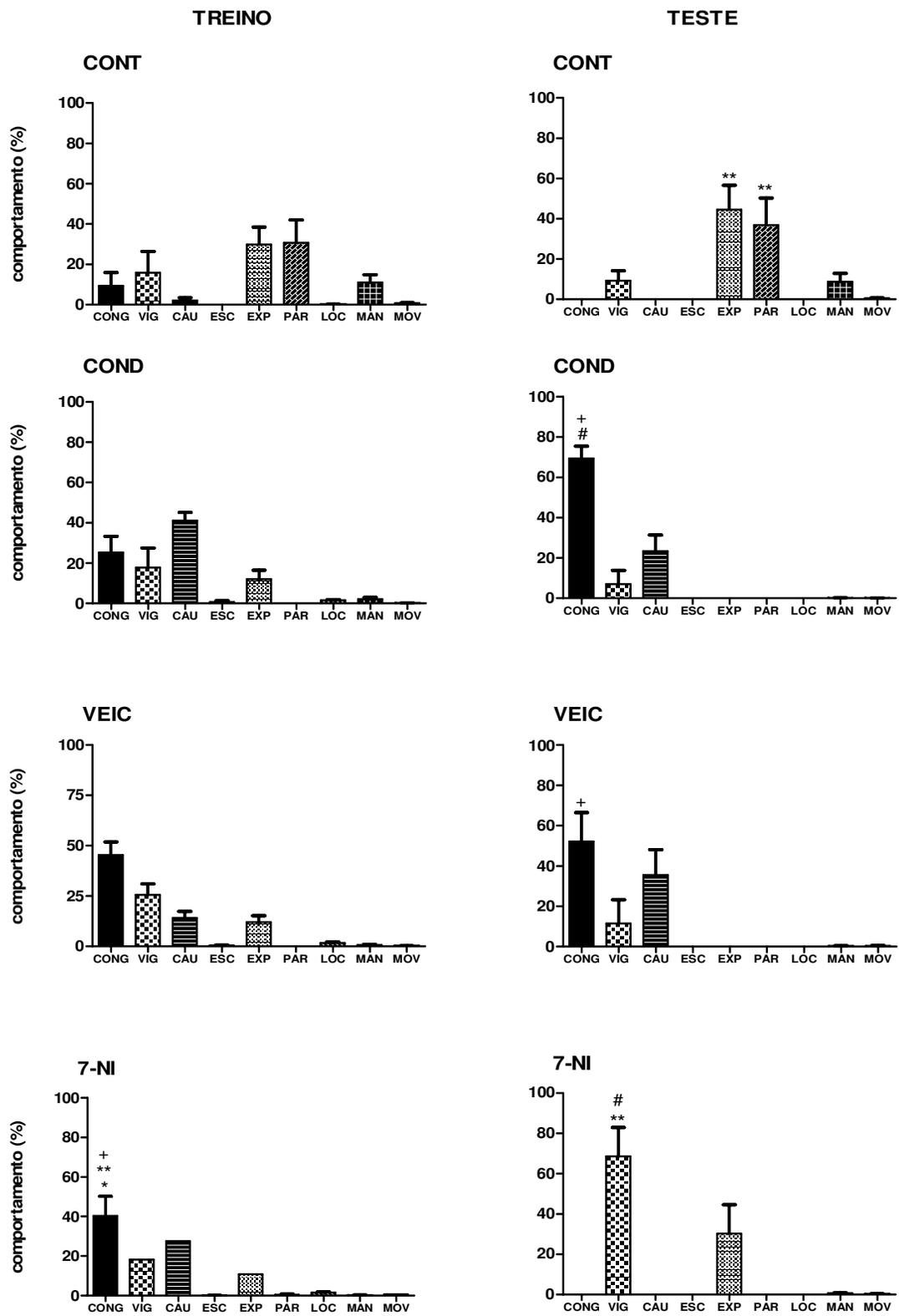


Figura 5. Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais durante as sessões de treino e teste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do gupos 7-nitroindazol, veículo, condicionado não tratado, e contexto não tratado. Categorias comportamentais: CONG = Congelamento, VIG = Vigilância, CAU = Exploração cautelosa, ESC = escanear, EXP = Exploração, PAR = Parado, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção, MOV = Movimentos Isolados. * diferença significativa em relação ao VEIC ($p < 0,001$); **diferença significativa em relação ao COND ($p < 0,001$); # diferença significativa em relação ao CONT ($p < 0,001$). + diferença significativa em relação ao teste do 7-NI ($p < 0,001$).

A Figura 6 apresenta os dados médios da ocorrência dos comportamentos de exploração, vigilância, movimento isolado, locomoção, manutenção, parado e congelamento registrados em cinco intervalos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (antes da apresentação do choque), durante o final da sessão de treino (após a apresentação do último choque), e durante os 5 minutos da sessão de teste ao contexto para os grupos CONT, COND, VEIC e 7-NI.

Observa-se que os três grupos que foram condicionados, COND, VEIC e 7-NI apresentaram aumento de congelamento e diminuição da vigilância e exploração nos últimos 5 blocos da sessão de treino quando comparados com os 5 blocos iniciais deles mesmo e do grupo CONT. Na sessão de teste, os grupos COND e VEIC apresentaram ocorrência elevada de congelamento, enquanto que os grupos 7-NI e CONT não apresentaram ocorrência deste comportamento; o grupo CONT apresentou maior ocorrência de exploração e parado, e o grupo 7-NI de vigilância e exploração.

Na categoria de congelamento a análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,23} = 4,57$; $p < 0,05$), entre os blocos ($F_{9,23} = 11,82$; $p < 0,001$), e interação grupo-blocos ($F_{3,27} = 3,36$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste

Tukey-Kramer indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente dos demais grupos, VEIC, COND e CONT ($p < 0,05$). Houve diferença significativa na sessão de treino e teste do grupo 7-NI ($p < 0,05$). No treino, o grupo 7-NI diferiu significativamente do grupo CONT e do teste dele mesmo. No teste, o grupo 7-NI diferiu significativamente do teste dos demais grupos VEIC, COND e CONT e do treino dele mesmo. ($p < 0,05$). O vigésimo bloco (último bloco do teste) do grupo 7-NI diferiu significativamente de todos os seus outros blocos, e do último bloco dos grupos VEIC E COND. A ocorrência de congelamento no grupo 7-NI diferiu significativamente dos grupos COND e VEIC no décimo quinto, décimo sexto, décimo sétimo, décimo oitavo e vigésimo blocos.

Na categoria de exploração a análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre os blocos ($F_{9,23} = 3,91$; $p < 0,001$). Não foram observadas diferenças significativas entre grupos e sessão ($p < 0,05$).

Na categoria de vigilância, foi observado diferença significativa entre os blocos ($F_{9,23} = 3,91$; $p < 0,001$), e interação grupo x bloco ($F_{3,27} = 2,90$; $p < 0,001$), mas não entre os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o vigésimo (último bloco do teste) bloco do 7-NI diferiu significativamente dos demais blocos deste, e do último bloco dos grupos VEIC e COND. O décimo-sétimo, o décimo-oitavo e décimo-nono blocos do grupo 7-NI foram significativamente diferentes do primeiro, segundo, terceiro, quarto, quinto e vigésimo blocos dele mesmo. O décimo sexto bloco (primeiro do teste) do grupo 7-NI diferiu significativamente do segundo, terceiro, quarto, quinto

blocos do treino e do último (vigésimo) bloco do seu teste ($p < 0,05$). Os segundo, terceiro, quarto e quinto blocos do 7-NI diferiram do CONT, e o quinto bloco do grupo 7-NI diferiu do quinto bloco do grupo COND.

Na categoria de locomoção a análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,23} = 6,21$; $p < 0,05$), entre os blocos ($F_{9,23} = 3,61$; $p < 0,001$), interação grupo x blocos ($F_{3,9,27} = 2,69$; $p < 0,001$), interação grupo x sessão ($F_{3,3,1} = 16,96$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente dos demais grupos VEIC, COND e CONT ($p < 0,05$). O vigésimo (último bloco do teste) bloco do grupo 7-NI diferiu significativamente do seu quinto bloco (último do treino) e dos demais grupos, enquanto que o quinto bloco do grupo 7-NI diferiu significativamente do quinto bloco e dos últimos cinco blocos do grupo CONT. O quinto bloco do grupo 7-NI diferiu significativamente dos quatro primeiros blocos e dos cinco últimos blocos do seu treino. No teste, o grupo 7-NI diferiu significativamente dos testes dos demais grupos e do treino dele mesmo.

Na categoria de manutenção, foi observada uma interação grupo x blocos ($F_{3,12} = 1,88$; $p < 0,05$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que os primeiros cinco blocos do grupo 7-NI diferiram significativamente do último bloco do CONT.

Na categoria parado, houve diferença significativa entre o grupo 7-NI e o grupo CONT ($F_{3,23} = ,37$; $p < 0,05$) mas não entre o grupo 7-NI e os grupos VEIC e COND ($p > 0,05$), sendo que os demais grupos diferiram do CONT $p < 0,05$.

Na categoria de movimento isolado, foi observada diferença significativa entre grupos ($F_{3,23} = 3,56$; $p < 0,05$) e diferença marginalmente significativa entre blocos ($F_{4,23} = 2,46$; $p = 0,050513$). As análises *post hoc* com o teste Tukey-Kramer indicaram que o grupo CONT diferiu significativamente do grupo VEIC ($p < 0,05$).

Figura 6. Valores médios (+EPM) dos comportamentos de exploração, vigilância, locomoção, congelamento, movimento isolado, parado e manutenção, registrados em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (blocos 1 a 5), durante o final da sessão de treino (blocos 16 a 20), e durante a sessão de teste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. A linha vertical pontilhada indica a separação entre o início e o final da sessão de treino. ANOVA: # diferença significativa em relação aos demais blocos ($p < 0,001$); § diferença significativa em relação a 7-NI ($p < 0,001$).

A Figura 7 apresenta os dados médios da ocorrência do comportamento de congelamento em função dos blocos de cinco intervalos de 60 segundos durante o início da sessão de treino, durante o final da sessão de treino, e durante a sessão de teste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT.

Na sessão de treino, observa-se aumento da ocorrência de congelamento no final do treino para os grupos 7-NI, VEIC, COND, sendo que o CONT não apresentou o comportamento de congelamento. Na sessão de teste, o grupo 7-NI não apresentou congelamento, e houve aumento nos grupos VEIC e COND.

A análise estatística com ANOVA indicou diferenças significativas entre grupos ($F_{3,23} = 11,87$; $p < 0,001$), sessão ($F_{2,23} = 21,58$; $p < 0,0001$), interação grupo x sessão ($F_{2,6} = 10,93$; $p < 0,0001$).

As análises *post hoc* indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente dos grupos VEIC, COND e CONT ($p < 0,05$). A ocorrência do congelamento no treino inicial foi diferente daquela do treino final e do teste ($p < 0,05$). O teste do grupo 7-NI foi diferente do treino final do grupo VEIC, COND e dele mesmo ($p < 0,05$), bem como do teste dos grupos VEIC e COND ($p < 0,05$), mas não do grupo CONT ($p > 0,05$).

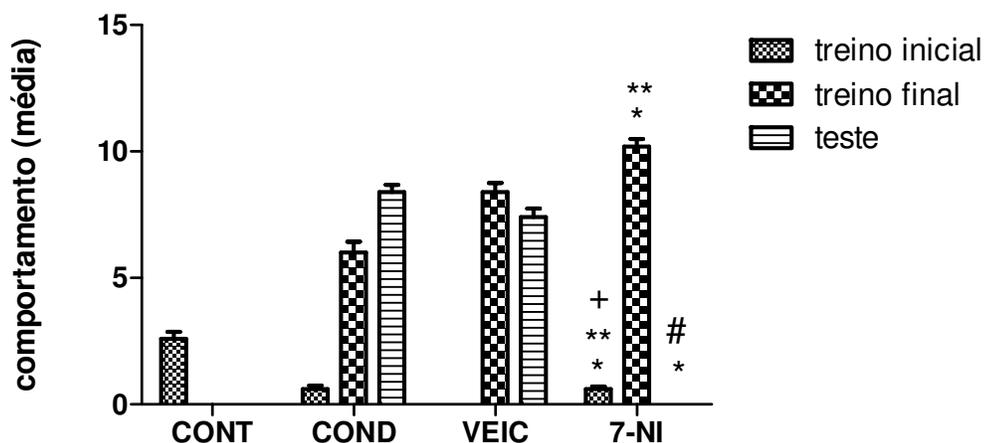


Figura 7. Valores médios (+EPM) do comportamento de congelamento registrado em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino, e cinco blocos de 60 segundos durante o final da sessão de treino, cinco blocos de 60 segundos durante a sessão de teste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. ANOVA: * $p < 0,001$, quando comparado com os demais grupos. ** $p < 0,001$, quando comparado com o teste dos demais grupos. + $p < 0,001$, quando comparado com os demais blocos. # $p < 0,001$, quando comparado com a sessão de treino do 7-NI.

4.1.2. Análise da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} e da NOS independente de Ca^{2+}

A Figura 8 mostra dados da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} (Figura 8A) e da NOS independente de Ca^{2+} no hipocampo (Figura 8B) de pombos dos grupos NÄIVE, CONT, COND, VEIC e 7-NI. A atividade da NOS foi medida por meio da quantidade de L-citrulina produzida por minuto na reação entre a NOS e a L-arginina e por micrograma da proteína para todos os grupos.

Na atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} , os animais do grupo condicionado COND apresentaram aumento em relação aos grupos não

condicionados NAÏVE e CONT, mas não do grupo 7-NI, sugerindo um efeito positivo do condicionamento sobre a atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} .

Na atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} , a análise estatística com o teste ANOVA de uma via mostrou diferença entre os grupos ($F_{4,37} = 14,10$; $p < 0,0001$). As análises com múltiplas comparações com o teste Newman-Keuls indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente do grupo VEIC ($p < 0,05$). Os grupos CONT e NAÏVE foram significativamente diferentes dos grupos COND e VEIC ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas na análise da atividade enzimática da NOS independente de Ca^{2+} ($p > 0,05$).

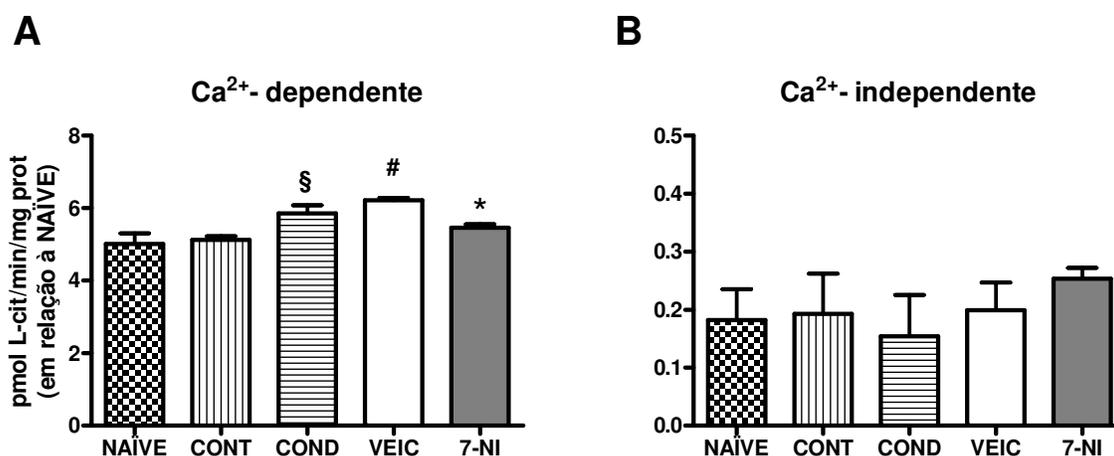


Figura 8. Média e Erro padrão das porcentagens da análise da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} (A) e da NOS independente de Ca^{2+} (B) em amostras de homogenato de hipocampo. Atenção para a diferença da escala em A e B; § diferença significativa em relação ao NAÏVE e CONT; ($p < 0,05$). # diferença significativa entre os demais grupos($p < 0,05$); * diferença significativa em relação ao VEIC ($p < 0,05$). Atenção para a diferença da escala em A e B.

4.1.3. Análise da densitometria óptica da nNOS

Na Figura 9 observam-se valores da densitometria óptica (Figura 9A) das bandas imunorreativas à proteína nNOS (Figura 9B) normalizadas pela quantidade total de proteínas determinada pela quantidade total da proteína alfa-tubulina (Figura 9C) no hipocampo de pombos dos grupos 7-NI, VEIC, COND, CONT, NÄIVE. A análise estatística com o teste ANOVA de uma via não indicou diferenças significativas entre os grupos ($F_{4,29} = 0,80$; $p = 0,53$).

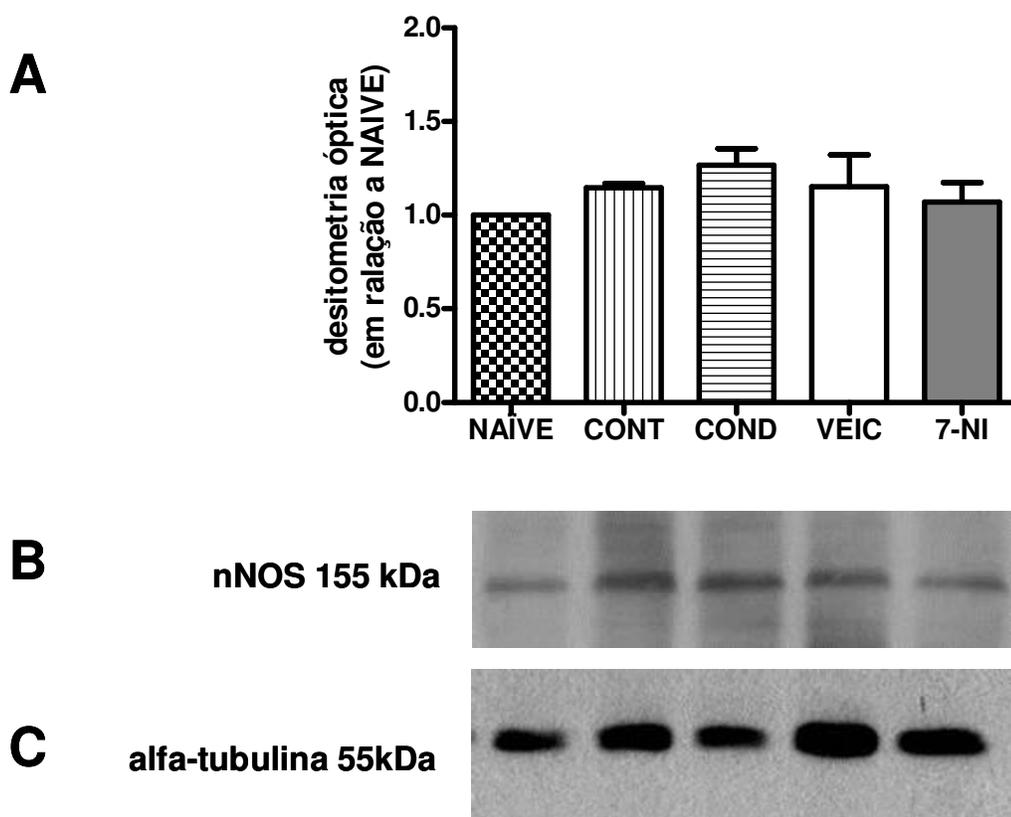


Figura 9. A. Médias e erro padrão das porcentagens das análises densitométricas das bandas imunorreativas para nNOS em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas. Os dados foram calculados em referência aos valores do grupo

NAÏVE. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA de uma via). **B. Bandas imunorreativas representativas para nNOS.** **C. Bandas imunorreativas representativas para nNOS quantidade total da proteína alfa-tubulina.**

5. DISCUSSÃO

5.1. Experimento 1

A maioria dos estudos que investigam a participação da nNOS nos processos de medo condicionado utiliza inibidores da síntese de NO, seqüestradores de NO ou mesmo animais *knockout* para nNOS (BARATTI et al., 2009; DENADAI, 2008; RESSTEL et al., 2008; KELLEY et al., 2009; KELLEY 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. Os dados do presente estudo indicam que a administração i.c.v. de 7-NI imediatamente após o treino provocou uma redução na ocorrência do comportamento de congelamento em pombos submetidos ao treinamento de condicionamento clássico aversivo durante a sessão de teste ao contexto. Esses dados corroboram o estudo de Denadai (2008), que demonstrou uma diminuição na reação de congelamento em pombos que receberam a administração de 7-nitroindazol (25 mg/kg; i.p.) imediatamente após a sessão de treino de condicionamento clássico aversivo. No condicionamento aversivo ao contexto, há uma associação entre os estímulos aversivos (choque) e o ambiente onde estes foram apresentados, adquirindo assim, propriedades eliciadoras dos comportamentos defensivos em resposta ao medo condicionado (LANDEIRA, 1996; REIS et al., 1999). Isso foi observado com os animais dos grupos VEIC e COND que, quando

recolocados no contexto da apresentação do choque, exibiram uma elevada ocorrência do comportamento de congelamento. Contudo, os animais do 7-NI expressaram significativamente menos comportamentos de congelamento quando comparados com aqueles que receberam veículo ou não tiveram tratamento algum. Isso pode ser interpretado como um déficit na memória contextual aversiva, resultante do tratamento com o inibidor 7-NI logo após o treino. Uma vez que o teste ao contexto constitui um teste de recuperação/evocação das informações aversivas consolidadas (ABEL *et al.*, 2001), essa observação permite inferir que para os grupos VEIC e COND houve consolidação da memória de que o contexto é potencialmente perigoso, ao contrário do grupo 7-NI que não expressou congelamento quando reexposto ao contexto. Portanto, isto pode indicar que houve um prejuízo na consolidação da memória contextual aversiva e que a enzima nNOS, que teve sua atividade inibida pela administração i.c.v. de 7-NI imediatamente após o treino, deve participar da consolidação da memória contextual aversiva em pombos.

Os animais do grupo COND e VEIC quando recolocados no contexto onde ocorreram as apresentações de choque, exibiram um padrão comportamental diferente do CONT, o que permite inferir que houve consolidação da memória das associações contexto-choque. Os animais dos grupos COND e VEIC reagiram ao contexto com respostas características de situações de defesa ou, mais especificamente, de congelamento, de exploração cautelosa e vigilância, fato que pode ser interpretado como evidência de que o contexto teria algum valor aversivo (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; LEDOUX, 1994; SANDERS *et al.*, 2003). Os animais do grupo CONT apresentaram maior ocorrência de comportamentos

exploratórios em relação ao COND. Esses dados corroboram os dados de Anagnostaras *et al.* (1999) e Maren & Holt (2000) e de outros estudos com roedores (BERNABEU *et al.*, 1997, ANAGNOSTARAS *et al.*, 1999) e com pombos (REIS *et al.*, 1999), os quais sugerem que as apresentações de choque resultam na expressão de comportamentos defensivos no contexto condicionado, enquanto que, animais que são expostos a contextos neutros, apresentam aumento de comportamento exploratórios, resultado da novidade do ambiente. Segundo Blanchard & Blanchard (1988), ao expor um animal em um novo contexto, os primeiros comportamentos defensivos são os de avaliação de risco, como vigilância, a qual consiste em uma exploração tensa. Com a administração do 7-NI, os animais tratados com este inibidor apresentaram aumento da vigilância e exploração em relação aos grupos controles. Estes comportamentos são resultantes da exposição a um novo ambiente e, conseqüentemente, mostram uma posterior habituação ao longo das sessões, concordando com os dados da literatura sobre habituação (VALENTINUZZI & FERRARI, 1997; SOUZA, 1999). Estes dados, portanto, sugerem que houve um prejuízo da memória nos animais do grupo 7-NI, resultante da administração i.c.v. de 7-NI imediatamente após o treino.

Na análise da ocorrência dos comportamentos registrados em blocos, observou-se que houve redução da ocorrência de congelamento. Na sessão de treino, observa-se aumento da ocorrência de congelamento no final da sessão para 7-NI, VEIC, COND e na sessão de teste para os grupos VEIC e COND. Esses dados demonstram, primeiramente, que a exposição repetida ao estímulo aversivo resultou num aumento do congelamento que pode ser indicativo de que os pombos aprenderam que o contexto experimental tornou-se ameaçador e perigoso. Os grupos

VEIC e COND exibiram congelamento durante toda a sessão de teste ao contexto, diferenciando-se do grupo 7-NI, o qual apresentou ocorrência de congelamento significativamente menor tanto em relação a sua sessão de treino como também em relação ao teste dos grupos VEIC e COND. Esses dados evidenciam que, embora durante o treino o grupo 7-NI tenha mostrado condicionamento ao contexto, a administração i.c.v. de 7-NI imediatamente após o treino interferiu na consolidação da memória contextual aversiva.

A partir do início do treinamento ou fase de aquisição, o cérebro do animal passa por uma seqüência de alterações intracelulares, bioquímicas e genéticas, que alteram a funcionalidade de circuitos neuronais. Nas 6h que se seguem ao treinamento inicial ocorrem mudanças bioquímicas essenciais em circuitos hipocampais. Nesta fase, o uso de inibidores de síntese protéica ou de outros agentes farmacológicos que interfiram em processos sinápticos pode prejudicar a consolidação da memória de longa duração (IZQUIERDO, 2006). No presente trabalho, pode-se considerar que a consolidação da memória foi prejudicada, uma vez que a administração do 7-nitroindazol ao grupo 7-NI foi feita imediatamente após a sessão de treino, tempo que coincide com esse período inicial de consolidação. Assim, os animais do grupo 7-NI não expressaram resposta condicionada de congelamento ao contexto aversivo, provavelmente por que a memória contextual aversiva não foi consolidada. Por outro lado, o grupo CONT apresentou uma maior variabilidade de categorias comportamentais exibidas ao longo das sessões de treino e teste, com diminuição dos comportamento de congelamento e exploração, durante e entre as sessões de treino e teste, bem como aumento da postura de parado. Esses dados

podem ser considerados indicativos de que houve um processo de habituação ao contexto experimental.

Uma das vias intracelulares que são ativadas na formação de memória é a da NOS. A maioria dos trabalhos que indicam o envolvimento da nNOS em processos de aprendizagem e memória utilizam a administração sistêmica de 7-nitroindazol (HOLSHER, 1994; AKAR, *et. al.*, 2007; MAREN 1998; RICKARD & GIBBS, 2003). Porém, Ota *et al.* (2010) demonstraram que a infusão bilateral de 7-NI (1µg/0,5µl) pré-treino na amígdala lateral prejudicou o aprendizado de condicionamento clássico aversivo. Com os dados obtidos pelo presente trabalho, onde a administração da droga foi feita após o treino, e por via i.c.v, pode-se verificar que a expressão do congelamento frente ao contexto aversivo foi prejudicada. A infusão intracraniana de agentes farmacológicos ainda não foi suficientemente explorada, sendo capaz de prevenir a ocorrência de efeitos inespecíficos resultantes da administração sistêmica.

No condicionamento clássico aversivo, há ativação de sistemas e estruturas neurais que processam e integram as informações em diferentes níveis do SNC e organizam as respostas condicionadas e incondicionadas. Entre esses encontra-se o hipocampo, que participa de modo essencial nessa rede de circuitos neuronais pois está fundamentalmente envolvido nos processos de memória contextual aversiva, bem como na consolidação e reconsolidação desta (DEBIEC, 2002).

Com a administração i.c.v. de 7-NI no presente estudo, foram obtidos dados comportamentais que mostraram prejuízo da recuperação da memória durante a re-exposição ao contexto de treinamento, confirmando, portanto, o papel da nNOS no processo de consolidação da memória contextual aversiva e sugerindo que o

armazenamento da memória depende de processos mediados pelo óxido nítrico no hipocampo de pombos.

Em relação à atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo, os animais dos grupos COND e VEIC apresentaram aumento em relação aos animais dos grupos 7-NI, NÄIVE e CONT. Isto indica que o processo de condicionamento teve um efeito positivo sobre a atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo, porém, este efeito foi bloqueado pelo tratamento com o 7-nitroindazol. Além disso, o grupo 7-NI apresentou atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} que não diferiu dos grupos controles NÄIVE e CONT, demonstrando a eficácia da administração i.c.v deste e sua capacidade de inibir a ativação da atividade enzimática da NOS. Esses dados sugerem que o treinamento em condicionamento contextual aversivo induziu maior ativação da via de sinalização do óxido nítrico e, conseqüentemente, constituem uma evidência da participação da NOS no processo de aprendizagem e formação da memória de medo contextual. Na análise da atividade da NOS independente de Ca^{2+} , não foi observada diferença significativa entre os grupos. Este resultado é esperado devido a iNOS ser expressa em situações patológicas, em resposta a estímulos inflamatórios.

Como os grupos treinados em condicionamento contextual aversivo e que não foram tratados com 7-NI apresentaram maior atividade da NOS dependente de Ca^{2+} , seria possível supor que encontraríamos também diferenças na quantidade de NOS no hipocampo de animais de diferentes grupos. Mais especificamente, considerando a importância atribuída à nNOS em processos de formação de memória, poderíamos supor que o treinamento também induziria maior expressão protéica da nNOS. Uma

possibilidade de averiguação dessa hipótese seria analisar o tecido hipocampal por meio da técnica de *Western blotting*. Assim, para analisar a expressão protéica da nNOS no hipocampo dos animais dos diferentes grupos, o presente trabalho utilizou a técnica de *Western blotting* seguida de análise de densitometria óptica das bandas imunorreativas, no tecido hipocampal (Figura 9). Os dados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT nos valores relativos de densitometria óptica da nNOS hipocampal, calculados em relação ao grupo NÄIVE. Ou seja, a experiência de condicionamento aversivo e a evocação da memória aversiva na exposição ao contexto condicionado, não induziu aumento significativo na expressão protéica da nNOS hipocampal, embora esses grupos tenham apresentado aumento da expressão da proteína nNOS em relação ao grupo NÄIVE. Assim, embora tenham sido encontradas diferenças significativas entre grupos quanto à atividade da NOS dependente de Ca^{2+} , a quantidade de nNOS no hipocampo não diferiu entre os grupos. Isso poderia ser relacionado com o fato de que a atividade da NOS dependente de Ca^{2+} refere-se à atividade de duas isoformas, a nNOS e a eNOS. Portanto, isso nos leva a considerar que a eNOS também teria sido ativada nessa situação.

Com relação ao grupo NÄIVE, podemos considerar que apesar destes animais apenas terem sido retirados do biotério e pesados, a estimulação resultante deste processo de manipulação pode ser indutora de estresse e característica de resposta à novidade do ambiente, seguida por um processo de habituação (LEUSSIS & BOLIVAR, 2006; RANKIN et al., 2009), bem como ter provocado ativações de vias de transmissão no hipocampo que utilizam a nNOS para a sinalização, como já

observado por Echeverry e colaboradores (2004). Um ponto a ser considerado é o de que administração da 7-NI foi i.c.v., e, assim, temos que considerar que outras regiões cerebrais podem ter sido afetadas pelo tratamento. Dentre essas regiões provavelmente teríamos a amígdala, a principal estrutura responsável pela evocação das reações de medo (SCHAFE et al., 2001).

Esses resultados poderiam ser discutidos em relação a dois pontos adicionais. Primeiro, o processo de ativação enzimática pode ser mais rápido e envolver mecanismos intracelulares menos complexos que puderam ser detectados na janela temporal utilizada, ou seja, nas horas iniciais da fase de formação de memória. Segundo, a expressão proteica da nNOS requer mecanismos intracelulares complexos de transcrição gênica e síntese proteica que necessitam de um tempo maior para poderem ser detectados (IZQUIERDO, 2006).

O conjunto de resultados aqui apresentados acrescenta dados para a análise da integração dos processos comportamentais no condicionamento contextual de medo e dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à memória aversiva em pombos. Dessa forma, este estudo mostrou que a administração do 7-NI interferiu na consolidação da memória contextual aversiva, resultando numa menor expressão do comportamento de congelamento nos animais tratados com 7-NI durante o teste de evocação da memória aversiva em pombos. Ao mesmo tempo, os hipocampus dos animais tratados com 7-NI apresentaram menor atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} quando comparados com os animais condicionados e não tratados com 7-nitroindazol, sugerindo uma relação entre a atividade da NOS e a recuperação da memória contextual aversiva. Assim, os dados desse experimento

contribuem para o conhecimento do papel da NOS, em particular da NOS hipocampal, na formação, consolidação e evocação da memória contextual aversiva.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento 2

6.1.1. Efeitos do 7-NI sobre o comportamento de pombos em situação de condicionamento contextual aversivo

A Figura 10 mostra a duração percentual dos comportamentos analisados durante a sessão do treino, teste e reteste ao contexto. Cada barra corresponde à porcentagem da duração média calculada, considerando-se como 100% o valor do total geral de comportamentos registrados na sessão, para todas as categorias.

O grupo 7-NI não apresentou ocorrência de congelamento na sessão de reteste em relação aos demais grupos VEIC e COND, bem como o grupo não condicionado e não-tratado CONT, sugerindo que o 7-nitroindazol prejudicou a reconsolidação da memória de medo. O grupo 7-NI apresentou menor ocorrência do comportamento de exploração cautelosa no reteste em relação aos animais dos demais grupos VEIC e COND, porém apresentou maior ocorrência de vigilância em relação ao grupo CONT. Os grupos 7-NI e CONT apresentaram aumento do comportamento de exploração no reteste em relação aos grupos VEIC e COND. Os animais do grupo CONT apresentaram maior ocorrência do comportamento parado em relação aos demais grupos, sugerindo o efeito positivo do condicionamento.

A análise com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para ocorrência dos comportamentos de exploração ($F_{3,22} = 9,88$; $p <$

0,001), locomoção ($F_{3,22} = 4,20$; $p < 0,05$), parado ($F_{3,22} = 13,87$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{3,22} = 5,46$; $p < 0,05$), exploração cautelosa ($F_{3,22} = 48,66$; $p < 0,001$) e congelamento ($F_{3,23} = 14,68$; $p < 0,001$). Houve diferença significativa entre as sessões de treino, teste e reteste para as categorias de exploração ($F_{1,2} = 24,46$; $p < 0,001$), locomoção ($F_{1,2} = 53,47$; $p < 0,001$), parado ($F_{1,2} = 17,31$; $p < 0,001$), vigilância ($F_{1,2} = 7,41$; $p < 0,05$), exploração cautelosa ($F_{1,2} = 45,21$; $p < 0,001$) e congelamento ($F_{1,2} = 66,06$; $p < 0,001$). Houve interação entre grupos e sessão para os comportamentos de exploração ($p < 0,05$), locomoção ($p < 0,05$), parado ($p < 0,001$), exploração cautelosa ($p < 0,001$) e congelamento ($p < 0,001$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que na categoria de congelamento, vigilância, exploração e parado, o grupo 7-NI diferiu significativamente apenas do grupo CONT, enquanto que na categoria de exploração cautelosa o grupo 7-NI apresentou diferença significativa em relação aos grupos VEIC e COND ($p < 0,05$). O grupo CONT se diferenciou significativamente dos demais grupos nos comportamentos de congelamento, exploração cautelosa, parado e exploração ($p < 0,05$). Na categoria de congelamento, a sessão de treino do 7-NI foi significativamente diferente da sessão de treino apenas do CONT ($p < 0,05$), porém foi diferente do teste e reteste dos grupos VEIC e COND e do teste e reteste dele mesmo ($p < 0,05$).

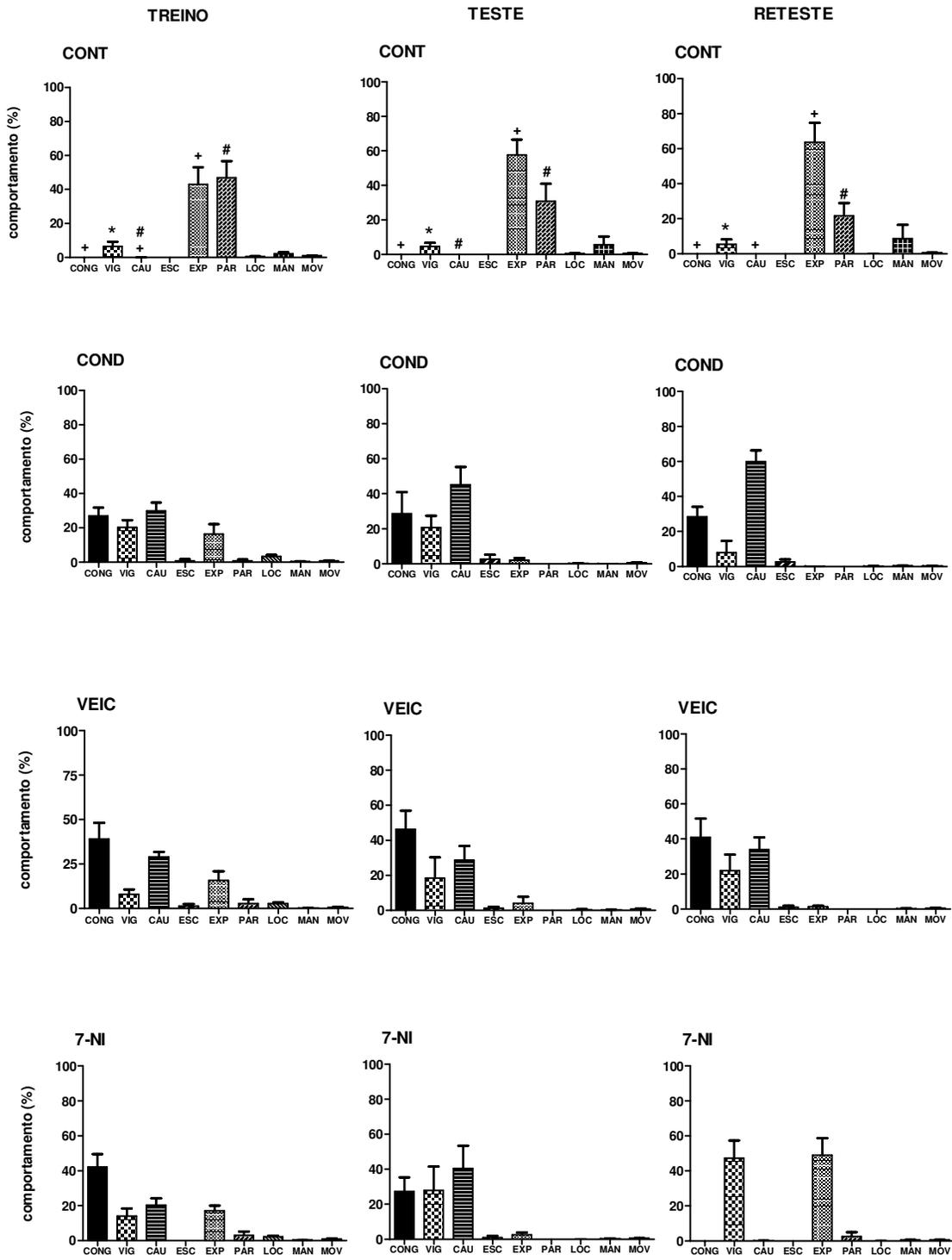


Figura 10. Porcentagem média e erro padrão da média da duração total das categorias comportamentais durante as sessões de treino, teste e reteste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do gupos 7-nitroindazol, veículo, condicionado não tratado, e contexto não tratado. Categorias comportamentais: CONG = Congelamento, VIG = Vigilância, CAU = Exploração cautelosa, ESC = escanear, EXP = Exploração, PAR = Parado, LOC = Locomoção, MAN = Manutenção, MOV = Movimentos Isolados. * diferença significativa em relação ao 7-NI ($p < 0,05$); # diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$); + diferença significativa em relação aos demais grupos exceto o 7-NI ($p < 0,05$).

A Figura 11 mostra a porcentagem da frequência do comportamento de congelamento analisado durante as sessões de treino (11A) e nas sessões de teste e reteste (11B) de condicionamento aversivo ao contexto. Cada barra corresponde à porcentagem média de congelamento calculada considerando-se como 100% o total dos comportamentos registrados em cada sessão.

Vinte e quatro horas após a administração do inibidor 7-nitroindazol, o grupo 7-NI apresentou redução da ocorrência de congelamento na sessão de reteste em relação aos demais grupos VEIC e COND, e em relação a sessão de teste dele mesmo.

No treino (Figura 11A), a análise estatística foi feita com o teste ANOVA de uma via, com o grupo como fator. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para ocorrência de congelamento ($F_{3,23} = 12,68$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que na categoria de congelamento, o grupo CONT diferiu significativamente dos demais; o grupo 7-NI diferiu significativamente apenas do grupo CONT ($p < 0,05$).

Em relação às comparações entre a sessão de teste ao contexto e a sessão de reteste ao contexto (Figura 11B), a análise com o teste ANOVA de medidas repetidas

para o comportamento de congelamento indicou diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,23} = 12,22$; $p < 0,001$) e valores marginalmente significativos para a diferença entre sessões ($F_{1,2} = 3,80$; $p = 0,06$); e para a interação entre grupos e sessão ($F_{1,2} = 2,65$ $p = 0,07$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que a sessão de reteste do 7-NI diferiu significativamente do seu teste, do teste do reteste dos grupos VEIC e COND ($p < 0,05$).

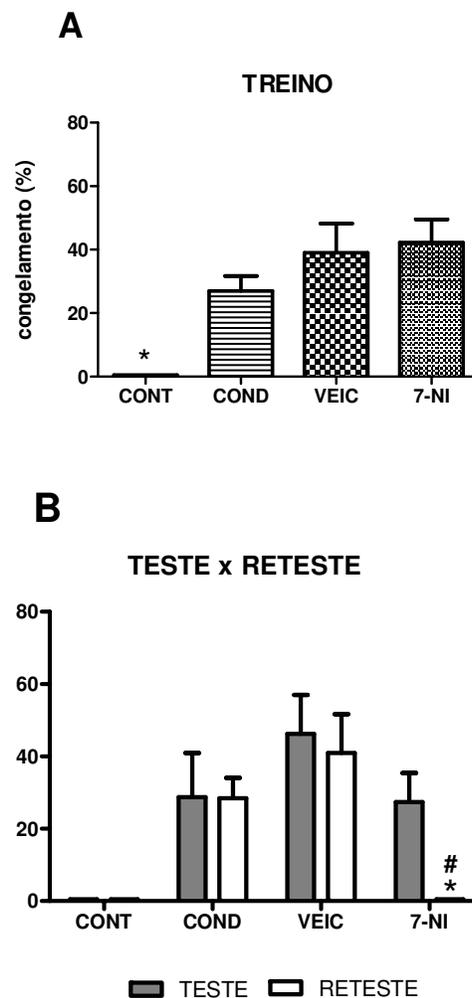


Figura 11. Porcentagem média e erro padrão da média da duração do comportamento de congelamento durante a sessão de treino (A) e de teste e reteste (B) de condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos 7-nitroindazol (7-NI), veículo (VEIC), condicionado não tratado (COND), e contexto não tratado (CONT). * diferença significativa em relação ao reteste do VEIC e COND ($p < 0,05$); # diferença significativa em relação ao teste do VEIC, COND e dele mesmo ($p < 0,05$).

A Figura 12 mostra a porcentagem da frequência total dos comportamentos defensivos, considerados pela somatória dos comportamentos de vigilância, exploração cautelosa e congelamento, analisados durante a sessão do treino, teste e reteste ao contexto. A porcentagem média foi calculada considerando como 100% o valor do total geral de comportamentos registrados na sessão, para todas as categorias.

Vinte e quatro horas após a administração do inibidor 7-nitroindazol, o grupo 7-NI apresentou redução dos comportamentos defensivos na sessão de reteste em relação ao treino e teste dos demais grupos e dele mesmo, bem como no reteste dos grupos VEIC, COND e CONT, sugerindo prejuízo da reconsolidação da memória contextual aversiva com o tratamento com o 7-nitroindazol.

A análise estatística com ANOVA de duas vias indicou diferenças significativas entre os grupos para ocorrência dos comportamentos defensivos ($F_{3,22} = 150,56$; $p < 0,001$). Houve diferença significativa entre as sessões de treino, teste e reteste ($F_{1,2} = 3,41$; $p < 0,05$) e interação entre grupos e sessão ($F_{3,6} = 10,77$; $p < 0,001$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente do VEIC, COND e CONT. Em relação às sessões, o teste do grupo 7-NI diferiu significativamente do

reteste dele mesmo, e também das sessões de treino, teste e reteste do CONT. Em relação ao reteste do 7-NI, houve diferença significativa em relação ao treino, teste e reteste do VEIC e do CONT, bem como do treino e teste do COND e dele mesmo ($p < 0,05$). A sessão de treino do 7-NI foi estatisticamente diferente apenas do reteste do 7-NI, e das sessões de treino, teste e reteste do CONT ($p < 0,05$).

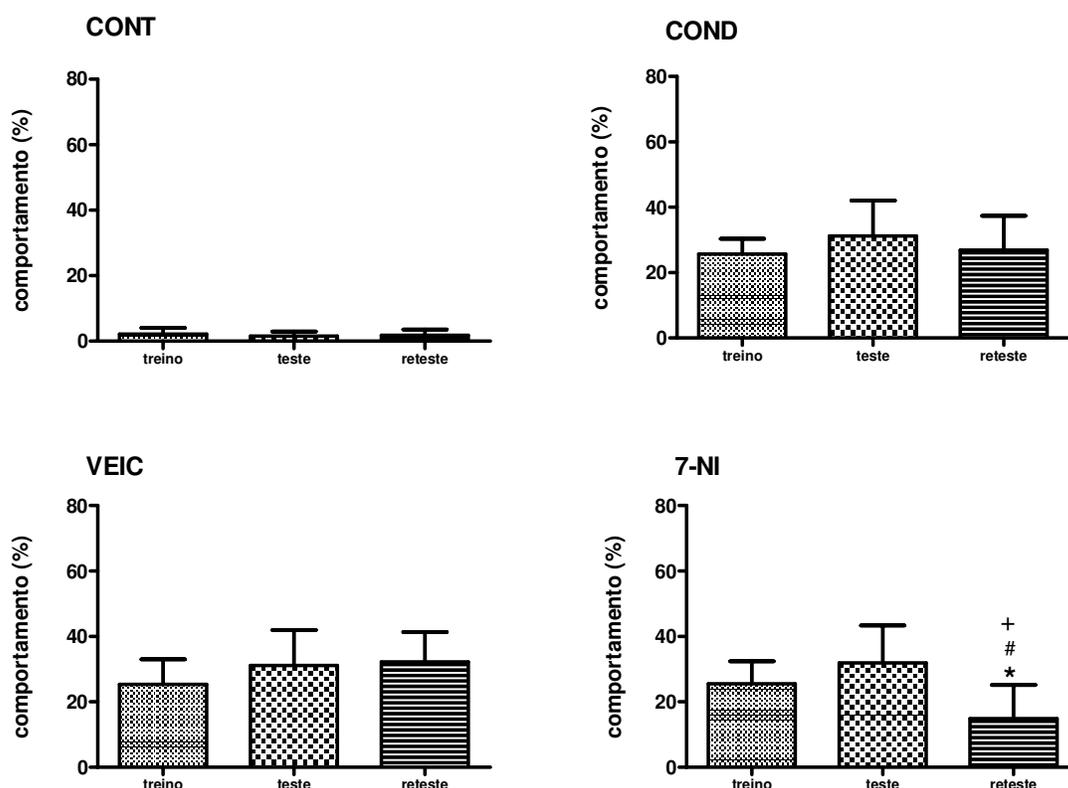


Figura 12. Porcentagem média e erro padrão da média da duração total dos comportamentos defensivos durante as sessões de treino, teste e reteste do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do gupos 7-nitroindazol (7-NI), veículo (VEIC), condicionado não tratado (COND), e contexto não tratado (CONT). + diferença significativa em relação ao treino dos grupos VEIC, 7-NI, COND e CONT ($p < 0,05$); # diferença significativa em relação ao teste dos grupos VEIC, 7-NI, COND e CONT ($p < 0,05$); * diferença significativa em relação ao reteste dos grupos VEIC, COND e CONT ($p < 0,05$).

A Figura 13 mostra os dados médios da ocorrência dos comportamentos defensivos, considerados pela somatória dos comportamentos de vigilância, exploração cautelosa e congelamento, analisados durante a sessão do treino (13A), teste e reteste (13B) ao contexto, em função dos blocos de cinco intervalos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (treino inicial), durante o final da sessão de treino (treino final), durante as sessões de teste e reteste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT.

O grupo 7-NI apresentou diminuição da ocorrência de comportamentos defensivos na sessão de reteste em relação aos demais grupos e em relação ao teste dele mesmo, sugerindo prejuízo da reconsolidação da memória contextual aversiva com o tratamento com o 7-nitroindazol.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de treino, comparando o treino inicial e o treino final, indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,22} = 21,37$; $p < 0,001$), entre o treino inicial e final ($F_{3,1} = 25,37$; $p < 0,001$) e interação entre grupos e o momento do treino ($F_{3,9} = 7,15$; $p < 0,05$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que o grupo CONT diferiu significativamente dos demais grupos ($p < 0,05$). No treino inicial não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), porém no treino final o grupo CONT diferiu significativamente dos grupos treinado (7-NI, VEIC e COND; $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos 7-NI, VEIC e COND seja no treino inicial ou final ($p > 0,05$).

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas comparando-se o teste e o reteste, indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,22} = 107,69$; $p < 0,0001$), entre o teste e reteste ($F_{3,1} = 8,77$; $p < 0,05$) e interação entre grupos e sessões ($F_{3,9} = 12,83$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que o reteste do grupo 7-NI foi estatisticamente diferente do teste e reteste dos demais grupos ($p < 0,05$), bem como do teste dele mesmo ($p < 0,05$).

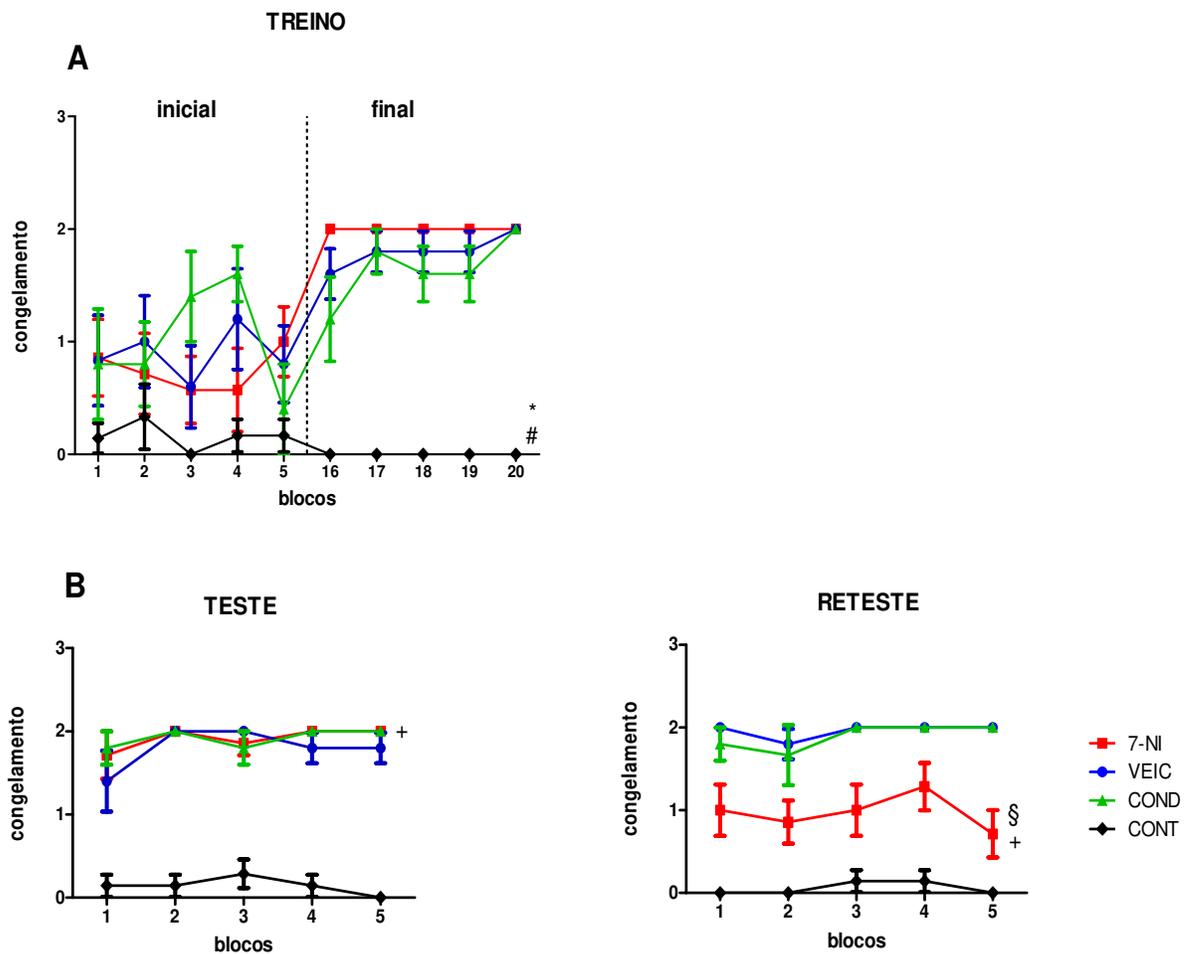


Figura 13. Valores médios (+EPM) dos comportamentos defensivos registrados em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (A; blocos 1 a 5), durante o final da sessão de treino (blocos 16 a 20), e durante a sessão de teste e reteste ao contexto (B) para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. A linha vertical pontilhada indica a separação entre o início e o final da sessão de treino; A: ANOVA indicou diferenças significativas entre grupo ($p < 0,001$). B: diferença significativa entre grupos e sessão de teste e reteste ($p < 0,001$). * diferença significativa em relação aos demais grupos (7-NI, VEIC e COND); + diferença significativa do reteste dos demais grupos (7-NI, COND e CONT); § diferença significativa em relação ao teste do 7-NI.

A Figura 14 mostra os dados médios da ocorrência do comportamento de congelamento, analisado durante a sessão do treino (14A), teste e reteste (14B) ao contexto, em função dos blocos de cinco intervalos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (treino inicial), durante o final da sessão de treino (treino final), durante as sessões de teste e reteste ao contexto para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT.

O grupo 7-NI apresentou redução da ocorrência de congelamento em relação ao teste dos demais grupos e dele mesmo, sugerindo prejuízo da reconsolidação da memória contextual aversiva com o tratamento com o 7-nitroindazol.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de treino, comparando o treino inicial e o treino final, indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,22} = 8,31$; $p < 0,001$), entre o treino inicial e final ($F_{3,1} = 44,78$; $p < 0,001$), entre os blocos ($F_{4,22} = 7,44$; $p < 0,001$), interação entre grupos x momento do treino ($F_{3,9} = 7,18$; $p < 0,01$), bem como interação entre grupos x blocos ($F_{4,12} = 2,33$; $p <$

0,05) e interação entre momento do treino e blocos ($F_{4,12} = 3,14$; $p < 0,05$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que o grupo CONT diferiu significativamente dos grupos 7-NI e VEIC ($p < 0,05$). No treino inicial, o grupo CONT diferiu significativamente do treino final dos demais grupos ($p < 0,05$). No treino final, houve diferença estatística entre o 7-NI e o COND e CONT, bem como do treino inicial do grupo VEIC, CONT e dele mesmo ($p > 0,05$).

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas comparando-se o teste e o reteste, indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,22} = 13,53$; $p < 0,001$), diferença marginalmente significativa entre o teste e reteste ($F_{3,1} = 3,85$; $p = 0,006$), diferença significativa entre blocos ($F_{3,4} = 5,83$; $p < 0,001$), e interação entre grupos e sessões e blocos ($F_{12,22} = 2,41$; $p < 0,01$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Newman-Keuls indicaram que o grupo 7-NI diferiu significativamente do grupo VEIC ($p < 0,05$). Na sessão de reteste, o 7-NI foi significativamente diferente da sessão de teste e reteste dos grupos VEIC e COND ($p < 0,05$).

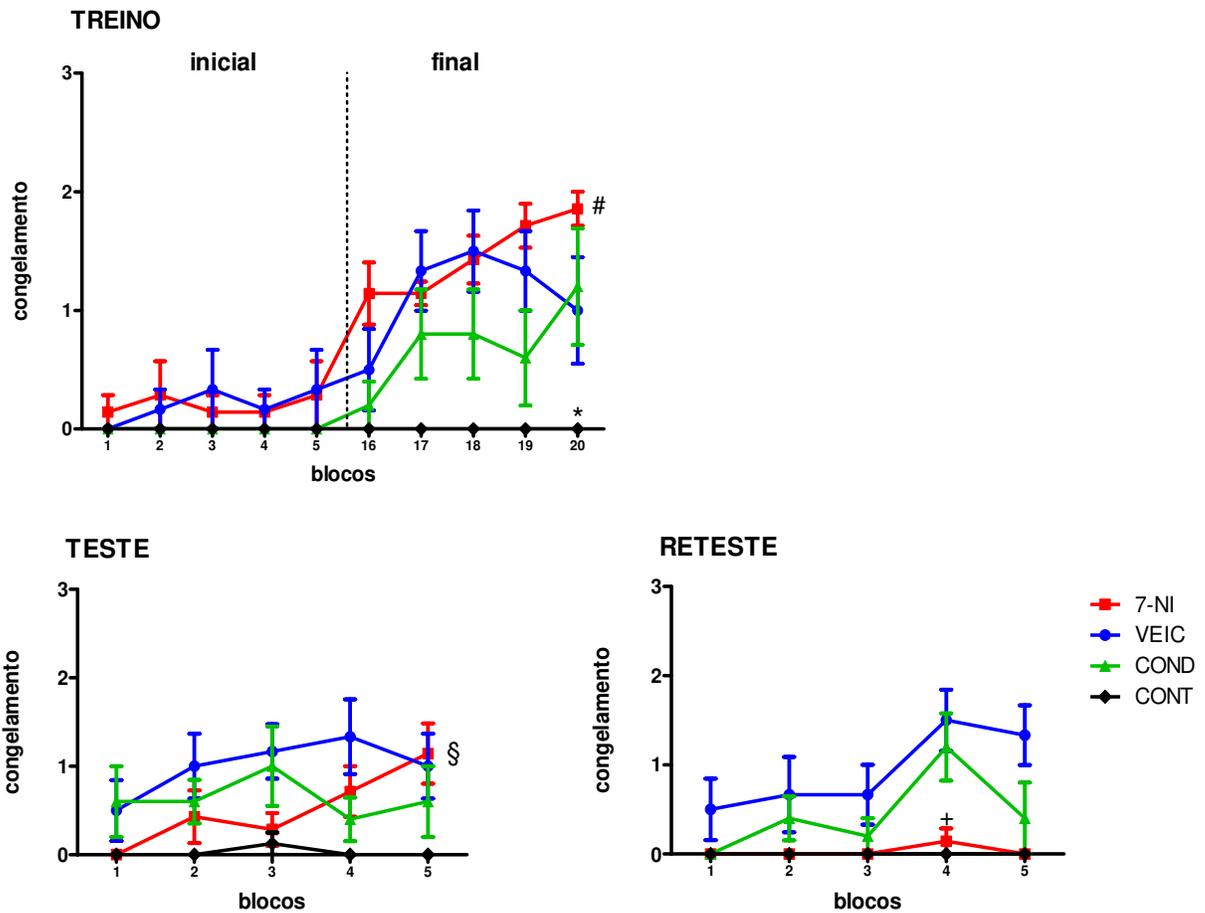


Figura 14. Valores médios (+EPM) do comportamento de congelamento registrados em cinco blocos de 60 segundos durante o início da sessão de treino (A; blocos 1 a 5), durante o final da sessão de treino (blocos 16 a 20), e durante a sessão de teste e reteste ao contexto (B) para os grupos 7-NI, VEIC, COND e CONT. A linha vertical pontilhada indica a separação entre o início e o final da sessão de treino. A: diferença significativa entre grupos e momento do treino ($p < 0,001$). B: diferença significativa entre grupos ($p < 0,001$) e marginalmente significativa entre a sessão de teste e reteste ($p = 0,06$); sessão de reteste do 7-NI significativamente diferente do VEIC e COND ($p < 0,05$). * diferença significativa em relação aos demais grupos (7-NI, VEIC e COND); # diferença significativa em relação aos demais grupos (VEIC, COND e CONT); + diferença significativa do reteste dos demais grupos (VEIC, COND e CONT) e dele mesmo; § diferença significativa em relação ao teste do 7-NI.

6.1.3. Análise da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} e da NOS independente de Ca^{2+}

A Figura 15 mostra dados da atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} (Figura 15A) e da NOS independente de Ca^{2+} (Figura 15B) no hipocampo, a qual foi medida por meio da quantidade de L-citrulina produzida na reação entre a NOS e a L-arginina por minuto e por micrograma da proteína para todos os grupos após a sessão de reteste. Os dados são expressos como razão entre o valor médio de cada grupo e o valor médio do grupo GM. A análise estatística com o teste ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

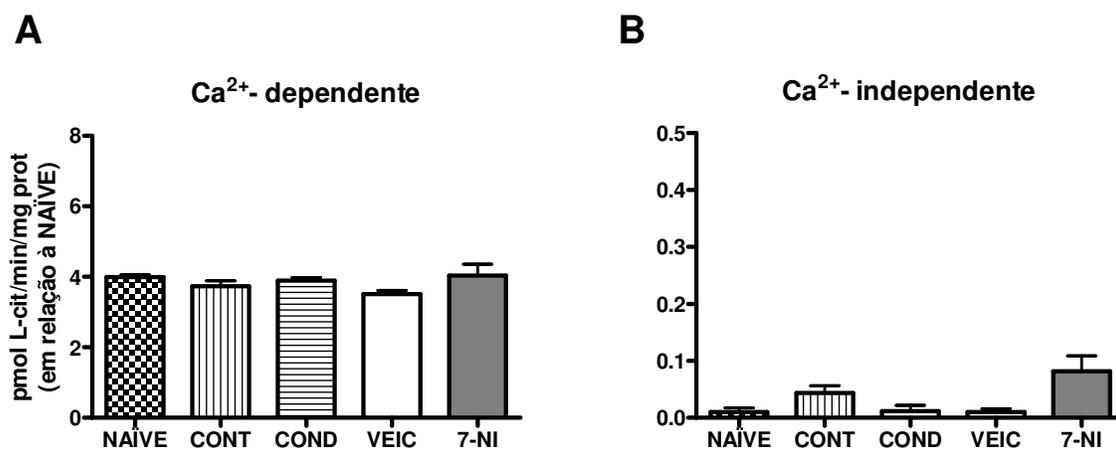


Figura 15. Média e Erro padrão das porcentagens de L-citrulina produzida por pmol/min/mg através da reação da atividade catalítica da NOS dependente de Ca^{2+} (A) e da NOS independente de Ca^{2+} (B) em amostras de homogenato de hipocampo (ANOVA: $p > 0,05$). Atenção para a diferença da escala em A e B.

6.1.4. Análise da densitometria óptica da nNOS

Na Figura 16A observam-se valores da densitometria óptica das bandas imunorreativas a proteína nNOS (Figura 16B) normalizadas pela quantidade total de proteínas determinada pela alfa-tubulina (Figura 16C) no hipocampo de pombos, para os grupos NAÏVE, CONT, COND, VEIC, 7-NI. A análise estatística com o teste ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os diferentes grupos ($p > 0,05$).

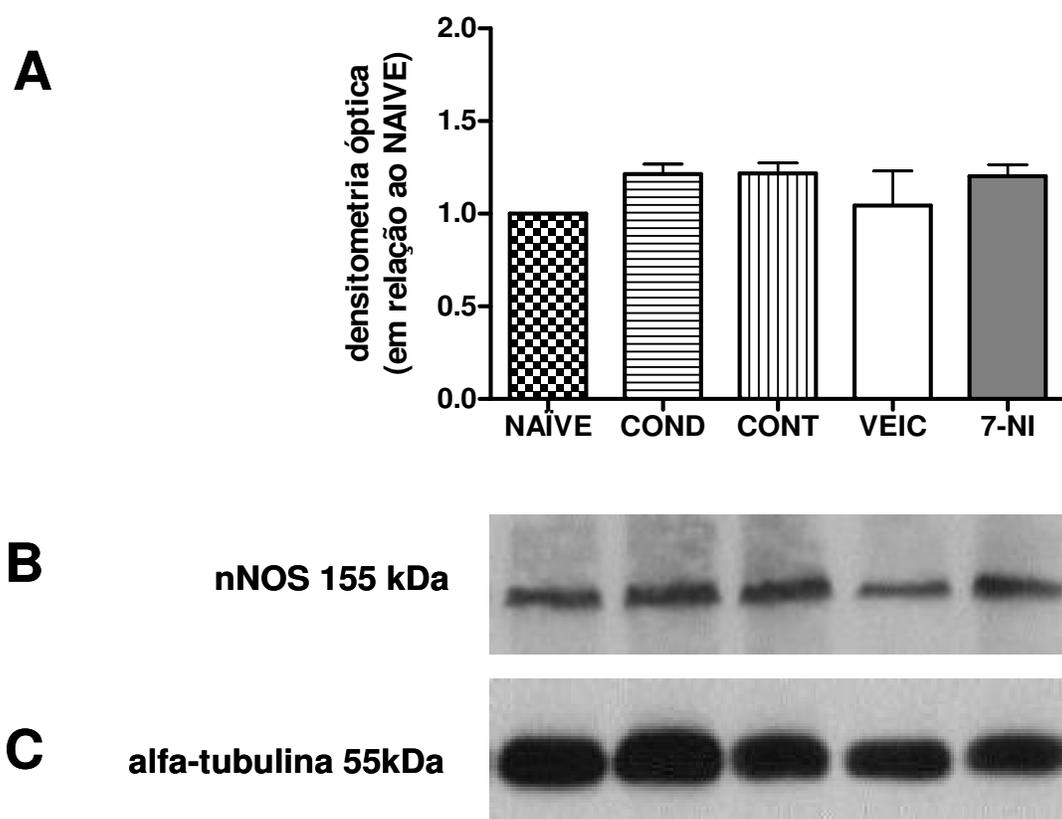


Figura 16. A. Médias e erro padrão das porcentagens das análises densitométricas das bandas imunorreativas para nNOS em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas. Os dados foram calculados em referência aos valores de NAÏVE. B. Bandas imunorreativas representativas para nNOS. C. proteínas totais detectadas pela alfa-tubulina; ANOVA ($p > 0,05$).

7. DISCUSSÃO

7.1. Experimento 2

Os comportamentos defensivos abrangem uma série de comportamentos anti-predatórios que garantem a sobrevivência do animal em meio a estímulos nocivos, sendo eles o ataque e a fuga, quando possível (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Em laboratório, é possível estudar as respostas de defesa por meio da observação de comportamentos como vigilância, avaliação de risco ou exploração cautelosa e congelamento (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). No presente estudo os grupos VEIC e COND apresentaram aumento tanto na duração média como na frequência de comportamentos defensivos nas sessões de teste e reteste, demonstrando o efeito positivo do treino em condicionamento contextual aversivo sobre a memória de medo. O grupo que recebeu administração i.c.v. de 7-NI apresentou redução da duração e frequência de comportamentos defensivos na sessão de reteste ao contexto em relação aos grupos VEIC e COND. Na sessão de teste, o grupo 7-NI apresentou o mesmo padrão de comportamentos defensivos que os demais grupos, porém na sessão de reteste teve baixa ocorrência de comportamentos defensivos, assemelhando-se ao grupo CONT. Isto sugere que o inibidor 7-nitroindazol foi eficaz em interferir no processo de reconsolidação da memória, uma vez que esta droga foi administrada imediatamente após a sessão de teste ao contexto. Estes dados corroboram com o estudo feito por Baratti e colaboradores (2009), que ao submeterem camundongos à administração i.p. de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, observaram redução da resposta de esQUIVA inibitória quando esses animais foram

retestados ao contexto, o que sugeriu prejuízo no processo de reconsolidação e a participação da via do óxido nítrico neste processo.

Quando o comportamento de congelamento foi analisado separadamente, foi observado que a duração média do comportamento de congelamento do grupo 7-NI na sessão de reteste apresentou-se diminuída quando comparada às sessões de teste e reteste dos grupos VEIC e COND, e quando comparado a ele mesmo na sessão de teste. Esses dados reforçam a evidência da interferência do inibidor 7-NI, bem como a participação da nNOS e da via de sinalização do óxido nítrico neste processo de reconsolidação da memória contextual de medo.

Contudo, a análise da atividade enzimática da NOS no hipocampo dos animais dos diferentes grupos, indicou que não houve diferenças significativas entre os grupos. Este resultado poderia ser indicativo de que a situação de re-exposição ao contexto induziria uma reconsolidação da memória contextual aversiva, que seria independente da administração pós-teste de 7-NI e da experiência (condicionamento ou habituação) vivenciada. Ou seja, a memória do contexto aversivo já teria sido formada no intervalo de 24h entre o treino e o teste, de modo que a interferência do 7-NI seria menor quando administrado após o teste (Experimento 2) do que quando administrado após o treino (Experimento 1). Durante o reteste, ocorreria a evocação da memória e a possível reconsolidação que dependeriam de traço de memória já consolidado entre o treino e o teste, com conseqüente indução de atividade da via de sinalização da sintase de óxido nítrico nos grupos treinados. Contudo, deve ser considerado que a inibição da nNOS após o teste teria interferido com a memória contextual já consolidada, visto que os animais do grupo 7-NI expressaram menores valores de

congelamento no re-teste, em comparação com os grupos VEIC e COND. Nossos dados corroboram com os resultados obtidos por RAPANELLI e colaboradores (2010), que analisaram a atividade enzimática da NOS durante condicionamento operante em ratos. Contudo, o nosso estudo é o primeiro a apresentar dados acerca da atividade enzimática da NOS em pombos submetidos a condicionamento clássico aversivo.

De acordo com os dados referentes à densitometria óptica das bandas imunorreativas à proteína nNOS, também não houve diferenças estatísticas entre os diferentes grupos. A observação de que o grupo 7-NI expressou no hipocampo quantidades de nNOS que foram equivalentes às daquelas dos grupos VEIC, COND e CONT, embora tenha apresentado menor ocorrência de congelamento no re-teste, evidencia que a inibição da atividade da nNOS prejudicou a memória durante o re-teste, porém a quantidade de proteína nNOS não variou significativamente em função da memória ser mais robusta ou mais fraca. Uma outra possibilidade seria de que após a inibição da atividade enzimática em animais tratados com 7-NI, ocorreria expressão da nNOS no tecido hipocampal que independeria da indução pela ativação dos circuitos da memória ou da integridade da evocação da memória e que estaria relacionada com o equilíbrio homeostático celular. Dado semelhante foi relatado por Denadai (2008). Esses dados também concordam com Garcia e colaboradores (2008), os quais demonstraram um aumento na expressão da nNOS em camundongos selvagens e em camundongos *knock out* para receptores LDL alimentados com uma dieta rica em colesterol, quando comparados com animais alimentados com dieta padrão. A hipercolesterolemia age no endotélio e provoca a redução da biodisponibilidade do NO para esse tecido. Assim, associando esses resultados com

os dados do presente trabalho, é possível inferir que, ocorrendo déficit na produção e ou na função da NOS, poderiam ocorrer a ativação de mecanismos intracelulares compensatórios que garantiriam a homeostase celular.

8. DISCUSSÃO GERAL

Os dados dos experimentos realizados neste estudo mostraram que o tratamento i.c.v. com 7-NI resultou em prejuízos da memória de medo ao contexto, os quais estariam relacionadas com o fato de que a inibição da NOS pelo 7-NI resultaram em déficit no funcionamento de vias bioquímicas intracelulares que teriam prejudicado o fortalecimento sináptico nos circuitos hipocampais. Assim, ocorreu um prejuízo na tanto na consolidação quanto na reconsolidação da memória contextual aversiva.

Os nossos dados indicaram que no Experimento 1, no qual o 7-NI foi infundido via i.c.v. após o treino, houve um prejuízo na consolidação da memória expresso pela diminuição do congelamento ao contexto durante o teste. No Experimento 2, no qual a infusão via i.c.v. de 7-NI foi feita após o teste, observou-se que a expressão de congelamento durante o teste foi estatisticamente equivalente nos três grupos treinados, 7-NI, VEIC e COND evidenciando o efeito semelhante do condicionamento. Já no reteste os três grupos treinados se diferenciaram, evidenciando um prejuízo da reconsolidação no grupo 7-NI. Quando se analisa os dados de atividade da NOS dependente de Ca^{2+} verificamos que no Experimento 1 houve uma variação entre os grupos, sugestiva de que o treinamento induziu alteração na atividade da NOS dependente de Ca^{2+} . Contudo, no Experimento 2, em que a atividade foi analisada

após o reteste, não foram observadas diferenças significativas em função do treinamento.

Frente a esses resultados, uma primeira interpretação poderia ser a de que a atividade da NOS é requerida na fase inicial da consolidação da memória. O processo de consolidação da memória requer a ativação de transcrição gênica e tradução de proteínas, mecanismos que são dependentes da ativação de cascatas de sinalização intracelular. Um fator crítico na formação da memória de longa duração é a transcrição gênica induzida pela fosforilação da CREB, fator que está diretamente relacionado à transcrição gênica subjacente à consolidação. Pode-se considerar que essas cascatas sejam iniciadas quando processos sinápticos mediados por glutamato induzem um aumento do Ca^{2+} intracelular, resultando, além da ativação de outras vias, na síntese do NO que vai atuar retrogradamente e manter a ativação sináptica. Como essa ativação da síntese do NO é um evento precoce, um novo processo de consolidação ou reconsolidação dependeria de síntese de outras proteínas, regulada por eventos intermediários entre a ativação inicial de transcrição e expressão de genes efetores. Ou seja, a partir da atividade sináptica inicial que é induzida pelo treino ocorreriam mecanismos que garantem a atividade genômica e síntese protéica que resultariam na ativação de fatores de transcrição que regulariam nova síntese protéica subjacente à reconsolidação. Contudo, como no presente estudo a inibição da nNOS pela infusão do 7-nitroindazol pós-treino e pós-teste resultou em menor expressão comportamental de congelamento, evidenciando prejuízo da consolidação e reconsolidação da memória, respectivamente, deve-se supor que o NO tem função nesses processos.

Novos experimentos são necessários para melhor esclarecer tais questões, principalmente em quais regiões ocorre ativação da função da NOS e síntese do NO.

Assim, a formação de memória de longa duração a partir de experiências de aprendizagem associativa depende de transcrição gênica e síntese protéica induzidas pelo processo de condicionamento (MAYFORD & KANDEL, 1999). A resposta genômica resultante da aprendizagem altera mecanismos sinápticos em circuitos neurais que participam de processamento de associação entre estímulos, particularmente em neurônios que teriam um papel-chave para a expressão de respostas condicionadas. Estudos relatados na literatura indicam que a nNOS e o NO tem efeitos modulatórios em diferentes tipos de aprendizagem e memória, incluindo esquiva inibitória e aprendizagem espacial (HOLSHER, 1994; HOLSHER *et al.*, 1996). A administração local ou i.c.v. de um inibidor da nNOS induziu prejuízos na memória espacial de reconhecimento de objeto e esquiva inibitória em ratos (BLOKLAND *et al.*, 1998; AKAR *et al.*, 2007). O uso de inibidores não-seletivos da NOS também prejudicou a memória em situação de esquiva inibitória com uma única tentativa em pintainhos e de alternância espontânea em ratos (KIRCHNER *et al.*, 2004; WEITZDOERFER *et al.*, 2004). Bernabeu e colaboradores (1997) relataram que a infusão hipocampal de inibidor de guanilato-ciclase imediatamente após o treino de esquiva inibitória em ratos prejudicou a memória, enquanto que a administração pré-treino de um análogo de GMPc facilitou a memorização da esquiva inibitória. De fato, o NO atua como mensageiro retrógrado com efeitos pré e pós sinápticos, promovendo a produção de GMPc e em sinalização intracelular na via do AMPc (GARTHWAITE, 1991; MICHEVA *et al.* 2001). A aplicação de inibidores seletivos para a nNOS

provoca também a eliminação ou redução da LTP (BÖHME et al., 1991; O'DELL et al. 1991; DOYLE et al., 1996).

A ativação da via NO-GMPc e do fator de transcrição da CREB foi descrita durante a LTP em camundongos, sugerindo que processos dependentes de NO são importantes para a formação de memória de longa duração de eventos associativos. O NO contribuiria para a fase tardia da LTP por meio da estimulação da PKG, que é dependente da ativação de guanilato-ciclase e GMPc, agindo em paralelo com a PKA dependente de AMPc para aumentar a fosforilação do fator de transcrição CREB (LU et al., 1999). Experimentos em abelhas também mostraram o papel dessa via na ativação prolongada da PKA, a qual é necessária para a memória de longa duração (MÜLLER, 2000). Contudo, esses resultados ainda não foram suficientes para garantir uma compreensão precisa do papel da NOS e do NO em circuitos que controlam comportamentos aprendidos em animais vertebrados intactos. Do mesmo modo, estudos envolvendo aprendizagem e memória em pintainhos, camundongos e ratos, como também com o molusco *Lymnaea*, mostraram a relação entre o NO e a formação de memória de longa duração (HÖLSCHER & ROSE, 1993; BARATTI & KOPF, 1996; RICKARD et al., 1998; SAMAMA & BOEHM, 1999).

Nesse contexto de investigações sobre as relações entre a NOS e o NO e a formação de memória, outro aspecto que mereceu análise em muitos estudos refere-se à janela temporal em que a atividade da NOS induzida pelo treino é necessária para garantir a formação da memória de longa duração. Experimentos em camundongos mostraram que a injeção de L-NAME até 3h após o treino (BARATTI & KOPF, 1996) resultou em déficit de memória. Bernabeu e colaboradores (1995)

relataram que houve um aumento de cerca de 45% da atividade da NOS no hipocampo; quando a NOS foi inibida imediatamente após o treino, ocorreu prejuízo na formação da memória.

É possível supor que a contribuição do NO para a formação da memória estaria fundamentada em processos bioquímicos que ocorrem num período mínimo de 5h, cuja interrupção neste período poderia impedir que esse processo atingisse o limiar necessário para o fortalecimento do traço de memória e, assim, a formação da memória de longa duração seria bloqueada. Uma explicação alternativa seria a de que a supressão farmacológica da via NO-GMPc causaria efeitos fisiológicos que atuariam indiretamente para desorganizar o processo de formação da memória (KEMENES et al., 2002).

Os estudos citados acima apresentaram, assim, evidência de que, tanto em invertebrados como em vertebrados, a ativação da NOS desempenha um papel crítico logo após o treino, indicando que os mecanismos subjacentes à fase inicial de formação de memória mantêm-se conservados em diferentes espécies animais. Como a síntese do óxido nítrico no encéfalo depende principalmente da atividade da nNOS, pode-se considerar que isso também se aplica ao papel da NOS na formação da memória. O nosso estudo acrescenta novos dados na medida em que relata processos comportamentais e celulares que foram afetados pelo condicionamento clássico aversivo, como também pela inibição da nNOS imediatamente após o treino ou teste, por infusão i.cv. de 7-NI em pombos. No seu conjunto, este estudo sugere que a NOS desempenha importante função nos processos de aprendizagem e

memória em pombos. Porém, ainda não se sabe exatamente quais são os mecanismos envolvidos.

A importância do hipocampo no condicionamento contextual aversivo (KIM e FANSELOW, 1992; MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997; ZHANG, BAST e FELDON, 2001), relaciona-se com o fato de esta ser uma região onde ocorrem os processos de plasticidade sináptica, como a LTP, que são fundamentais para a consolidação efetiva da memória. Esses processos estão diretamente relacionados à importância dos mecanismos sinápticos mediados por glutamato nos circuitos hipocampais, tanto em roedores quanto em aves (ROSINHA *et al.*, 2009). Tais considerações fundamentaram as análises hipocampais da atividade da NOS e da expressão da nNOS conduzidas no presente estudo.

Porém, é importante salientar dois pontos importantes. Primeiro, os efeitos da administração i.c.v. do 7-NI caracterizam uma ação geral em diferentes estruturas e regiões encefálicas. Segundo, o condicionamento clássico aversivo envolve a ativação de vias neuronais complexas, incluindo a atuação de diferentes sistemas e estruturas neuronais que processam e integram as informações em diferentes níveis do SNC, organizando as respostas condicionadas e incondicionadas. O hipocampo e a amígdala são indicados como estruturas que participam de modo essencial nessa rede de circuitos neuronais (TEYLER & DISCENNA, 1985; PHILLIPS & LEDOUX, 1992; IZQUIERDO & MEDINA, 1993; FANSELOW & KIM, 1994; MAREN *et al.*, 1997; HOLT & MAREN, 1999; MAREN & HOLT, 2000; HALL *et al.*, 2001; PANG e LU, 2004; SMITH e MIZUMORI, 2006). Em conjunto, esses dois pontos indicam que a análise da variação da atividade enzimática da NOS e da expressão da proteína nNOS em outras

regiões cerebrais, após evocação e reativação da memória do condicionamento de medo, poderia acrescentar dados interessantes a essa investigação.

É importante considerar que a atividade da NOS e também a síntese da proteína nNOS estão diretamente relacionadas com processos sinápticos mediados por glutamato. Assim, pode-se considerar que a distribuição de células que sintetizam nNOS estaria relacionada com a distribuição de sinapses glutamatérgicas nos circuitos hipocampais. Rosinha e colaboradores (2009) relataram intensa marcação de células GluR1 e GluR2/R3- positivas na área dorsomedial do hipocampo de pombos, o que pode também sugerir a atuação de células que têm a atividade da nNOS. De modo relacionado, Silva (2007) relatou aumento de células nNOS positivas no hipocampo dorsal dos animais treinados por cinco dias em aprendizagem de escolha alimentar, quando comparados com os animais treinados por apenas 1 dia. Machado (2010) também relatou que, após o teste de condicionamento de medo ao contexto em pombos, ocorreu maior marcação de células nNOS-positiva no hipocampo dorsal.

As evidências de que os circuitos glutamatérgicos e nitrérgicos no hipocampo são regionalizados, poderia explicar, pelo menos parcialmente, a ausência de diferenças significativas na análise da atividade bioquímica, uma vez que as análises conduzidas nesse estudo utilizaram todo o tecido hipocampal.

Finalmente, embora o 7-NI seja considerado um inibidor preferencial da nNOS, ele também tem uma ação inibitória sobre a atividade da eNOS *in vitro*. Contudo, o fato de que o 7-NI não tem efeito sobre a pressão arterial *in vivo*, apoiaria a especificidade da inibição dessa droga sobre a nNOS (RICKARD *et al.*, 2003). Alderton e colaboradores (2001) argumentam que é necessário ter cautela ao relatar

esta seletividade do 7-NI para a nNOS. Neste sentido, poderia se supor que a análise da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} evidenciaria a ativação da nNOS e da eNOS, indicando a participação das duas isoformas da NOS durante a evocação e reativação da memória aversiva. De qualquer modo, pode-se considerar que o 7-NI causou inibição da NOS e interferiu com processos de memória, confirmando informações já relatadas por outros trabalhos (SOUTHAN, *et al.*, 1996; KALISCH, *et al.*, 1996; BUSH & POLLACK, 2001; RICKARD & GIBBS, 2003).

O presente trabalho insere-se numa seqüência de estudos desenvolvidos em nosso laboratório sobre o papel da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) no condicionamento clássico aversivo em pombos (*Columba Livia*), acrescentando informações que contribuem para a análise das bases comportamentais e moleculares dos processos de aprendizagem e memória de eventos aversivos. Assim, este estudo corrobora investigações realizadas com outras espécies de animais e demonstra que o hipocampo de pombos, tal como o hipocampo de mamíferos, tem circuitos que participam dos processos de memória contextual aversiva, com envolvimento da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} e conseqüente síntese do óxido nítrico. Deste modo, demonstra-se que o pombo constitui um bom modelo experimental para investigação da aprendizagem e memória.

7. CONCLUSÕES

1. O condicionamento contextual aversivo ocorreu em pombos que foram expostos a uma associação entre o contexto e um estímulo aversivo incondicionado (choque) e foi demonstrado pela exibição de comportamentos de medo, quando recolocados no contexto da apresentação do choque

2. A consolidação da memória do condicionamento contextual aversivo foi prejudicada pela infusão i.c.v. de 7-NI imediatamente após o treino (Experimento 1), como indicado pela ausência de comportamentos de medo condicionado quando os pombos foram recolocados no contexto do condicionamento.

3. A reconsolidação da memória do condicionamento contextual aversivo também foi prejudicada pela infusão i.c.v. de 7-NI imediatamente após o teste (Experimento 2), visto que os pombos do grupo 7-NI apresentaram diminuição do comportamento de medo condicionado no reteste, mas não no teste, em comparação com os grupos de animais condicionados e não tratados.

4. As evidências comportamentais fundamentam a consideração de que a isoforma neuronal da NOS (nNOS), que atua na síntese de NO, está envolvida na memória contextual de medo, visto que o tratamento com 7-NI prejudicou a consolidação (Experimento 1) e a reconsolidação (Experimento 2) da memória aversiva ao contexto.

5. O aumento da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} durante o teste ao contexto, indicou a participação da NOS na evocação da memória contextual aversiva e de circuitos hipocâmpais que dependem da atividade da NOS dependente de Ca^{2+} .

O tratamento com 7-NI após o treino prejudicou a consolidação e a evocação da memória contextual aversiva, levando a uma menor atividade enzimática da NOS dependente de Ca^{2+} .

6. Pode-se considerar que as diferenças significativas na atividade da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo, mas não na expressão protéica da nNOS no hipocampo, estariam relacionadas ao fato de que tanto a isoforma nNOS quanto a eNOS participariam da evocação da memória contextual aversiva.

7. O tratamento com 7-NI após o teste prejudicou a reconsolidação da memória contextual aversiva, como indicado pelos dados comportamentais. A ausência de alterações significativas na atividade da NOS dependente de Ca^{2+} no hipocampo, após a reativação da memória contextual no reteste, pode ser indicativa de que a memória já teria sido consolidada antes do teste e, assim, a sua reativação durante o reteste recrutaria outros circuitos além dos hipocampais.

8. O hipocampo de pombos, tal como o hipocampo de mamíferos, tem circuitos que participam dos processos de memória contextual aversiva, cuja função envolve a atividade da NOS dependente de Ca^{2+} e da consequente síntese do óxido nítrico. Assim, o presente estudo demonstra que o pombo constitui um bom modelo animal para a investigação do papel da NOS e do óxido nítrico na aprendizagem e memória.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABU-SOUD, H.M.; STUEHR, D.J. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *PNAS*. v. 90, p.10769-72, 1993.
2. AKAR, U.Y.; ULAK, G.; TANYERI, P.; ERDEN, F.; UTKAN, T.; GACAR, N. 7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. *Pharmacol, Biochem and Behav*. v. 87, p. 434 -43, 2007.
3. ALBERINI, C.M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci*. v. 28, n. 1, p. 51-6, 2005.
4. ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. v. 1, n. 357, p. 593-615, 2001.
5. ANAGNOSTARAS, S.G.; GALE, G.D.; FANSELOW, M.S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*. v.11, n. 1, p. 8-17, 2001.

6. ANAGNOSTARAS, S.G.; MAREN, S.; FANSELOW, M.S. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. **J Neurosci**. v. 19, n. 3, p. 1106-14, 1999.
7. ALVAREZ, R.P.; BIGGS, A.; CHEN, G.; PINE, D.S.; GRILLON, C. Contextual fear conditioning in humans: Cortical-hippocampal and amygdala contributions. **Journal of Neuroscience**. v. 28, p. 6211-19, 2008.
8. ATOJI, Y.; WILD, J. Anatomy of the avian hippocampal formation. **Rev Neurosci**. v. 17, n.1-2, p. 3-15, 2006.
9. ATOJI, Y.; SAITO, S.; WILD, J.M. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). **J Comp Neurol**. v. 447, n. 2, p. 177-99, 2002.
10. BAADER, S.L.; SCHILLING, K. Glutamate receptors mediate dynamic regulation of nitric oxide synthase expression in cerebellar granule cells. **J Neurosci**. v. 16, n. 4, p. 1440-49, 1996.
11. BARATTI, C.M.; BOCCIA, M.M.; BLAKE, M.G.; ACOSTA, G.B. Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. **Neurobiol Learn Mem**. v. 89, n. 4, p. 426-40, 2008.

12. BARATTI, C.; BOCCIA, M.; BLAKE, M. Pharmacological effects and behavioral interventions on memory consolidation and reconsolidation. ***Braz J Med Biol Res.*** v. 42, n. 2: p. 148-54, 2009.
13. BARATTI, C.M.; KOPF, S.R. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. ***Neurobiol Learn Mem.*** v. 65, n. 3, p. 197-201, 1996.
14. BAST, T.; FELDON, J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. ***Prog Neurobiol.*** v. 70, n. 4, p. 319-15, 2003.
15. BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON, J. Hippocampus and classical fear conditioning. ***Hippocampus.*** v. 11, n. 6, p. 828-31, 2001.
16. - BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.E.; PARADISO, M.A. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso.** 2ª. Edição, Porto Alegre: Artmed Editora, 2002.
17. BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L.M.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. ***Neuron.*** v. 53, n. 2, p. 261-77, 2007..

18. BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist**. v. 14, n. 2, p. 147-56, 2008.

19. BERNABEU, R. et al. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 94, n. 13, p. 7041-7046, 1997.

20. BERNABEU, R.; DE STEIN, M. L.; FIN, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA J.H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**. v. 6, n. 11, p. 1498-1500, 1995.

21. BEVILAQUA, L.; MEDINA, J.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Reconsolidation and the fate of consolidated memories. **Neurotox Res**. v. 14, n. 4, p. 353-58, 2008.

22. BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol**. v. 39, p. 43-68, 1988.

23. BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD D. C. Bringing natural behaviors into the laboratory: a tribute to Paul MacLean. **Physiol Behav**. v. 79, n.3, p. 515-24, 2003.

24. BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**. v. 361, n. 6407, p. 31-9, 1993.
25. BÖHME, G.A.; BON, C.; STUTZMANN, J.M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. **Eur. J. Pharmacol.** v. 199, p. 379-81, 1991.
26. BONTEMPI, B.; LAURENT-DEMIR, C.; DESTRADE, C.; JAFFARD, R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. **Nature**. v. 400, n. 6745, p. 671-75, 1999.
27. BON, C.L.; GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **J Neurosci**. v. 23, n. 5, p. 1941-8, 2003.
28. BONINI, J.S.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation on the hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**. v. 147, p. 37-45, 2007.
29. BREDET, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**. v. 8; n. 1; p. 3-11, 1992.

30. BRITO, I.; BRITTO, L.R.; FERRARI, E.A. Classical tone-shock conditioning induces Zenk expression in the pigeon (*Columba livia*) hippocampus. ***Behav Neurosci.*** v. 120, n. 2, p. 353-61, 2006.
31. BRUN, S.R.; DA LUZ, V.; FERNANDEZ, M.; PASCHOALINI, M.A.; MARINONETO, J. Atypical angiotensin receptor may mediate water intake induced by central injections of angiotensin II and of serotonin in pigeons. ***Regul Pept.*** v. 98, n. 3, p. 127-35, 2001.
32. BUSH, M. A.; POLLACK, G.M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 7-nitroindazole, a selective nitric oxide synthase inhibitor, in the rat hippocampus. ***Pharm Res.*** v. 18, n. 11, p. 1607-12, 2001.
33. BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J.; HONIG, W.; DE VENT, J.; State dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. ***Neuroreport.*** V. 9, n. 18, p 4205-08, 1998.
34. BRÜNING, G.; FUNK, U.; MAYER, B. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the brain of chicken. ***Neuroreport.*** v. 5, n. 18, p. 2425-28, 1994.
35. CAMPBELL, C. B.; HODOS, W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. ***Brain Behav Evol.*** v.3, p. 353-367, 1970.

36. - CARLSON, N.R. **Fisiologia do comportamento**. 7ª edição. São Paulo: Manole, 2002.
37. CARVALHO-NETO, E.F.; GOMES, K.S.; AMARAL, V.C.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Role of glutamate NMDA receptors and nitric oxide located within the periaqueductal gray on defensive behaviors in mice confronted by predator. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 204, n. 4, p. 617-25, 2009.
38. CARVALHEIRA, J.B. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. **Obes Res**. v. 13, n. 1, p. 48-57, 2005.
39. CAMMAROTA, M.; BARROS, D.; VIANNA, M.; BEVILAQUA, L.; COITINHO, A., SZAPIRO, G. L.; MEDINA J. H.; IZQUIERDO, I. The transition from memory retrieval to extinction. **An Acad Bras Cienc**. p. 76, n. 3, p. 573-82, 2004.
40. CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R.; ROSSATO, J. I.; RAMIREZ, M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. **Neurobiol Learn Mem**. v. 84, n. 1, p. 25-32, 2005.
41. - CANOVA, F. Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos (*C. livia*).

(Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, Fisiologia) - UNICAMP - São Paulo, 2009.

42. CESTARI, V.; COSTANZI, M.; CASTELLANO, C.; ROSSI-ARNAUD, C. A role for ERK2 in reconsolidation of fear memories in mice. **Neurobiol Learn Mem.** v. 86, n. 2, p. 133-43, 2006.

43. CHEN, D.; HURST, W.J.; DING, J.M.; FAIMAN, L.E.; MAYER, B.; GILLETE, M.U. Localization and characterization of nitric oxide synthase in the rat suprachiasmatic nucleus: evidence for a nitrenergic plexus in the biological clock. **J. Neurochem.** v. 68, n. 2, p. 855-61, 1997.

44. CUI, Z; WANG, H.; TAN, Y.; ZAIA, K.A.; ZHANG, S.; TSIEN, J.Z. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial roles of the NMDA receptor preserving in remote memories in the brain. **Neuron.** v. 41, n. 5, p. 781-93, 2004.

45. DAVIS, H. P.; SQUIRE, L. R. Protein synthesis and memory: a review. **Psychol Bull.** v. 96, n. 3, p. 518-559, 1984.

46. DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M.; LONDON, E.D.; BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 88, n. 14, p. 6368-71, 1991.

47. DAWSON, T.M.; SASAKI, M.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; DAWSON V.L. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. ***Prog Brain Res.*** v. 118, p. 3-11, 1998.
48. DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. ***J Neurosci.***, v. 14, n. 9, p. 5147-59, 1994.
49. DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. ***Neuron.***, v. 36, n. 3, p. 527-38, 2002.
50. - DENADAI, M.A. Efeitos do 7-nitroindazole, um inibidor da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS), sobre o condicionamento contextual em pombos (*Columba livia*). (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, Fisiologia) -UNICAMP - São Paulo, 2008.
51. DERE, E.; FRISCH, C.; DE SOUZA SILVA, M.A.; GÖDECKE A.; SCHRADER J.; HUSTON, J.P. Unaltered radial maze performance and brain acetylcholine of the endothelial nitric oxide synthase knockout mouse. ***Neuroscience.*** **2001**;107(4):561-70.
52. DOYLE, C.; HÖLSCHER, C.; ROWAN, M.J.; ANWYL, R. The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitro-indazole blocks both long-term potentiation and

depotentialiation of field EPSPs in rat hippocampal CA1 in vivo. **J Neurosci.** v. 16, p. 418-24, 1996.

53. DUDAI, Y.; EISENBERG, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron.** v. 44, n. 1, p. 93-100, 2004.

54. DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol.** v. 55, p. 51-86, 2004.

55. DUVARCI, S.; NADER, K.; LEDOUX, J. E. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. **Learn Mem.** v. 15, n. 10, p. 747-755, 2008.

56. DUNNING, J.; DURING, M. J. Molecular mechanisms of learning and memory. **Expert Rev Mol Med.** v. 5, n. 25, p. 1-11, 2003.

57. ECKEL-MAHAN, K.L.; PHAN, T.; HAN, S.; WANG, H.; CHAN, G.C.K.; SCHEINER, Z.S.; STORM, D.R. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications of memory persistence. **Nature Neurosci.** v. 11, p. 1074-82, 2008.

58. ECHEVERRY, M.B.; GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E.A. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. **Neuroscience**. v. 125, n. 4, p. 981-993, 2004.
59. EICHENBAUM, H. The secret life of memories. **Neuron**. v. 50, n. 3, p. 350-352, 2006.
60. FANSELOW, M.S.; KIM, J.J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of a NMDA receptor agonist D-L-2 amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behav Neurosci**. v. 108, p. 210-212, 1994.
61. FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res**. v. 110, n. 1-2, p. 73-81, 2000.
62. FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 23, n. 5, p. 743-60, 1999.
63. FERRARI, E.A.; FALEIROS, L.; CERUTTI, S.M.; OLIVEIRA, A.M. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. **Behav Brain Res**. v. 101, p. 93-103, 1999.

64. FIORENZA, N.G.; ROSA, J.; IZQUIERDO, I.; MYSKIW, J.C. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. ***Behav Brain Res.*** v. 232, n. 1, p. 210-216, 2012.
65. - FORNEL, A.C.G.; TEIXEIRA, S.A.; DENADAI, M.A.; MUSCARÁ, M.; FERRARI, E. A. Inibição da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) por 7-nitroindazole e a habituação a som em pombos (*C. livia*). Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento, Depto. de Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP e Depto. de Farmacologia, ICB, USP. ***FeSBE.*** 2006.
66. FRISCH, C.; DERE, E.; SILVA, M.A.; GODECKE, A.; SCHRADER, J.; & HUSTON, J.P. Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum. ***Journal of Neuroscience.*** v. 20, p. 6694-700, 2000.
67. GORMAN, J.M.; ROOSE, S.P. The neurobiology of fear memory reconsolidation and psychoanalytic theory. ***J Am Psychoanal Assoc.***, v. 59, n. 6, p. 1201-1220, 2011.
68. GARCIA J.A.; DOS SANTOS L.; MOURA A.L.; RICARDO K.F.; WANSCHER A.C.; SHISHIDO S.M.; SPADARI-BRATFISCH R.C.; DE SOUZA H.P.; KRIEGER M.H. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in

hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by anti-inflammatory action. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 51, n. 1, p. 78-85, 2008.

69. GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends in Neurosci.** v. 14; n. 2; p. 60-67, 1991.

70. GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annu Rev Physiol.** v. 57, p. 683-706, 1995.

71. GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci.** v. 27, n. 11, p. 2783-802, 2008.

72. GIBBS, M.E.; RICHDALÉ, A.L.; NG, K.T. Effect of excess intracranial amino acids on memory: a behavioural survey. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 11, n. 3, p. 331-9, 1987.

73. GORMAN, J.M.; ROOSE, S.P. The neurobiology of fear memory reconsolidation and psychoanalytic theory. **J Am Psychoanal Assoc.** v. 59, n. 6, p. 1201-1220, 2011.

74. GUIMARÃES, F.S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; LUCCA, A.C.B. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v. 29, p. 1313-22, 2005.

75. GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol.* v. 76, n. 2, p. 126-52, 2005.
76. HALEY, J.E.; MALEN, P.L.; CHAPMAN, P.F. 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.* v. 160, p. 85-8, 1993.
77. HALL, J.; THOMAS, K.L.; EVERITT, B.J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci.* v. 21, n.6, p. 2186-93, 2001.
78. 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.* v. 274, n. 29, p. 20597-602, 1999.
79. HÖLSCHER, C. 7-Nitroindazole, a neuron-specific nitric oxide synthase inhibitor, produces amnesia in the chick. *Learn Mem.* v. 1, n. 4, p. 213-6, 1994.

80. HÖLSCHER, C.; McGLINCHEY L.; ANWYL, R.; ROWAN M.J. 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. ***Learn Mem.*** v. 2, n. 6, p. 267-78, 1996.
81. HÖLSCHER, C.; ROSE, S.P. Inhibiting synthesis of the putative retrograde messenger nitric oxide results in amnesia in a passive avoidance task in the chick. ***Brain Res.*** v. 619, n.1-2, p. 189-194, 1993.
82. HOLT, W.; MAREN, S. Muscimolin activation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. ***J. Neurosci.*** v. 19, n. 20, p. 9054-9062, 1999.
83. HUANG, E.P. Synaptic plasticity: A role for nitric oxide in LTP. ***Curr Biol.*** v. 7, n. 3, p. 141-3, 1997.
84. IGAZ, L.M.; VIANNA, M.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. ***J Neurosci.*** v. 22, n. 15, p. 6781-89, 2002.
85. IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** v. 94, n.13, p. 7041-7046, 1997.

86. INOUE, N.; NAKAO, H.; MIGISHIMA, R.; HINO, T.; MATSUI, M.; HAYASHI, F.; NAKAO, K.; MANABE, T.; AIBA, A.; INOKUCHI, K. Requirement of the immediate early gene ves1-1S/homer-1a for fear memory formation. ***Mol Brain***. v. 5, n. 3, p. 7, 2009.
87. ITZHAK, Y. Role of the NMDA receptor and nitric oxide in memory reconsolidation of cocaine-induced conditioned place preference in mice. ***Ann N Y Acad Sci***. v. 1139, p. 350-7, 2008.
88. - IZQUIERDO, I. Memórias. ***Estudos Avançados***. v. 3, n. 6, p. 89-112, 1989.
89. IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. ***Braz J Med Biol Res***. v. 26, p. 573-89, 1993.
90. IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; ARDENGHI, P.G.; PEREIRA, P.; RODRIGUES, C.; CHOI, H.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. ***Behav Brain Res***. v. 111, n. 1-2, p. 93-8, 2000.

91. IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* v. 29; n. 9; p. 496-505, 2006.
92. IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol.* v. 51, n. 2, p. 171-202, 1989.
93. IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MELLO, P.; BENETTI, F.; COSTA, J.C.; MEDINA, J.H.; The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *An Acad Bras Cienc.* v. 80, n. 1, p. 115-127, 2008.
94. JOHNSON, D.M.; BAKER, J.D.; AZORLOSA, J.L. Acquisition, extinction, and reinstatement of Pavlovian fear conditioning: the roles of the NMDA receptor and nitric oxide. *Brain Res.*, v. 857; p. 66-70, 2000.
95. KAHN, M.C.; HOUGH, G.E.; TEN EYCH, G.R.; BINGMAN, V.P. Internal connectivity of the homing pigeons (*Columba Livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. *J. Comp.Neurol.* v. 459, p. 127-141, 2003.

96. KALISCH, B.E.; CONNOP, B.P.; JHAMANDAS, K.; BENINGER, R.J.; BOEGMAN, R.J. Differential action of 7-nitroindazole on rat nitric oxide synthase. **Neurosci. Letters**. v. 219; p. 75-78, 1996.
97. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, D.M. **Principles of Neural Science**. N.Y.: McGraw Hill, 2000.
98. KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**. v. 294, n. 5544, p. 1030-8, 2001.
99. KARTEN, H.J.; HODOS, W. **A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*)**. The Johns Hophins Press, Baltimore, Maryland, 1967.
100. KELLEY, J.B.; BALDA, M.A.; ANDERSON, K.L.; ITZHAK, Y. Impairments in fear conditioning in mice lacking the nNOS gene. **Learn Mem**. v. 16, n. 6, p. 371-8, 2009.
101. KELLEY, J.B.; ANDERSON, K.L.; ALTMANN, S.L.; 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**. v. 174, p. 91-103, 2011.

102. KEMENES, I.; KEMENES, G.; ANDREW, R.J.; BENJAMIN, P.R.; O'SHEA, M. Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. **J Neurosci.** v. 22, n. 4, p. 1414-1425, 2002.
103. KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science.**, v. 256, n. 5057, p. 675-7, 1992.
104. KIRCHNER, L., WEITZDOERFER, R., HOEGER, H.; URL A., SCHMIDT, P.; ENGELMANN, M.; VILLAR, S.R.; FOUNTOULAKIS, M.; LUBEC, G.; LUBEC, B. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. **Nitric Oxide.** v. 11; n. 4; p. 316-30, 2004.
105. KREBS, J.R.; ERICHSEN, J.T.; BINGMAN, V.P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). **J Comp Neurol.** v. 314, n. 3, p. 467-77, 1991.
106. LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian conditioning. **Braz J Med Biol Res.** v. 29, n. 2, p. 149-73, 1996.

107. LEHMANN, H.; LACANILAO, S.; SUTHERLAND, R.J. Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. ***Eur J Neurosci***. v. 25, n. 5, p. 1278-86, 2007.
108. LEDOUX, J.E. Emotion, memory and the brain. ***Sci Am***. v. 270, n. 6, p. 50-7, 1994.
109. LEDOUX J. Rethinking the emotional brain. ***Neuron***. v. 73, n. 4, p. 653-76, 2012.
110. LEE, J.; EVERITT, B. Reactivation-dependent amnesia in Pavlovian approach and instrumental transfer. ***Learn Mem***. v. 15, n. 8, p. 597-602, 2008.
111. LEE, J.L. Reconsolidation: maintaining memory relevance. ***Trends Neurosci***. v. 32, n. 8, p. 413-20, 2009.
112. LEE, J.L. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. ***Front Behav Neurosci***. v.11, n. 4, p. 168, 2010.
113. LEE, S.H. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. ***Science***. v. 319, n. 5867, p. 1253-56, 2008.

114. LEUSSIS, M.P.; BOLÍVAR, V.J. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 30, n. 7, p. 1045-64, 2006.

115. LU, Y.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric Oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. **J Neurosci.** v. 1, n. 23, p.10250-61,1999.

116.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional.** 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

117. - MACHADO, A.V.S. Variação circadiana do condicionamento clássico aversivo e da expressão da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) no hipocampo de pombos (*Columba livia*). (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, Fisiologia) - UNICAMP - São Paulo, 2010.

118. MARKOWITSCH, H. The functional neuroanatomy of episodic memory retrieval. **Trends Neurosci.** v. 20, n. 12, p. 557-58, 1997.

119. MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M.S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behav Brain Res.** v. 88, n. 2, p. 261-74, 1997.

120. MAREN S. Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. *Brain Res.* v 804, p. 155-158, 1998.
121. MAREN, S.; HOLT, W. The hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res.* v. 110, p. 97-108, 2000.
122. MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci.* v. 24, p. 897-931, 2001.
123. MAYER, B.; JOHN, M.; HEINZEL, B.; WERNER, E.R.; WACHTER, H.; SCHULTZ, G.; BÖHME, E. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* v. 288, p. 187-91, 1991.
124. MAYFORD, M.; KANDEL, E.R. Genetic approaches to memory storage. *Trends Genet.* v.15, n. 11, p. 463-470, 1999.
125. McGAUGH, J.L. Memory - a century of consolidation. *Science.* v. 287, n. 5451, p. 248-51, 2000.
126. MCKENZIE, S; EICHENBAUM, H. Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? *Neuron.* v. 28, n. 71, p. 224-33, 2011.

127. MORRIS, R.G.; INGLIS, J.; AINGE, J.A.; OLVERMAN, H.J.; TULLOCH, J. DUDAI, Y.; KELLY, P.A. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*. v. 50, n. 3, p. 479-89, 2006.
128. MYERS, K.; DAVIS, M. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*. 36(4): 567-584, 2002.
129. MEI, B.; LI, C.; DONG, S.; JIANG, C.H.; WANG, H.; HU, Y. Distinct gene expression profiles in hippocampus and amygdala after fear conditioning. *Brain Res Bull*. v. 67, n. 1-2, p. 1-12, 2005.
130. MICHEVA, K.D.; HOLZ, R.W.; SMITH, S.J. Regulation of presynaptic phosphatidylinositol 4,5-biphosphate by neuronal activity. *J Cell Biol*. v. 154, n. 2, p. 355-68, 2001.
131. MOORE, P.K.; HANDY, R.L.C. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase - is no NOS really good NOS for the nervous system? *TIPS*. v. 18, p. 204-211, 1997.
132. MONCADA, S; HIGGS, A. The l-arginine pathway. *N. Engl. J. Med*. v. 329, p. 2002-12, 1993.

133. MONCADA, S; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev.* v. 49, n. 2, p. 137-142, 1997.
134. MORATO, G.S; ORTIGA, R.M; FERREIRA, V.M.M. Involvement of nitric oxide-dependent pathways of dorsolateral periaqueductal gray in the effects of ethanol in rats submitted to the elevated plus-maze test. *Behav Brain Res.* v. 153, n. 2, p. 341-9, 2004.
135. MÜLLER, U. Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron.* v. 27, p. 159-168, 2000.
136. NADER, K. Memory traces unbound. *TRENDS Neurosci.* v. 26, n. 2, p. 65-72, 2003.
137. NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci.* v. 10, n. 3, p. 224-34, 2009.
138. O'DELL, T.J.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R.; ARANCIO, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a

possible retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 88, p. 11285–11289, 1991.

139. OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods*. v. 32, p. 446-449, 2000.

140. PANG, P.T.; LU, B. Regulation of late-phases LTP and long-term memory in normal and ageing hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res. Rev.* v.3, n. 4, p. 407-430, 2004.

141. PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*. v. 106, n. 2, p. 274-85, 1992.

142. PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.*, v. 64, n. 1, p. 51-68, 2001.

143. PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res*, v. 84, n. 1-2, p. 241-6, 1997.

144. QUEVEDO, J. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learn Mem*. v. 6, n. 6, p. 600-607, 1999.

145. QUIRK, G. J. Erasing fear memories with extinction training. **J Neurosci.** v. 30, n. 45, p. 14993-97, 2010.

146. RANKIN, C.H.; ABRAMS, T.; BARRY, R.J.; BHATNAGAR, S.; CLAYTON, D.F.; COLOMBO, J.; COPPOLA, G.; GEYER, M.A.; GLANZMAN, D.L.; MARSLAND, S.; McSWEENEY, F.K.; WILSON, D.A.; WU, C.F.; THOMPSON, R.F. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. **Neurobiol Learn Mem.** v. 92, n. 2, p. 135-138, 2009.

147. RAPANELLI, M.; FRICK, L.R.; ZANUTTO, B.S.J. Modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthases during learning of an operant conditioning task. **Neurobiol Learn Mem.** v. 113, n. 3, p. 725-34, 2009.

148. REIS, F.; SCHENKA, A.A.; MELLO, L.L.; FERRARI, E.A. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). **Braz J Med Biol Res.** v. 32, n. 9, p. 1127-31, 1999.

149. RESCORLA, R.A. Conditioned inhibition of fear resulting from negative CS-US contingencies. **J Comp and phys Psychol.** v. 67, p. 504-509, 1969.

150. RESCORLA, R.A. Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. **J Exp Psychol Anim Behav Process.**, v. 27, n. 2, p. 115-124, 2001.
151. RESSTEL, L.B.; CORRÊA, F.M.; GUIMARÃES, F.S. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex.** v. 18, n. 9, p. 2027-35, 2008.
152. RICHMOND, M.A.; YEE, B.K.; POUZET, B.; VEENMAN, L.; RAWLINS, J.N.; FELDON, J.; BANNERMAN, D.M. Dissociating context and space within the hippocampus: Effects of complete, dorsal, and ventral excitotoxic hippocampal lesions on conditioned freezing and spatial learning. **Behavioral Neuroscience.** v. 113, n. 6, p. 1189-1203, 1999.
153. RICKARD, N.S.; NG, K.T.; GIBBS, M.E. Further support for nitric oxide-dependent memory processing in the day-old chick. **Neurobiol Learn Mem.** v. 69, n. 1, p. 79-86, 1998.
154. RICKARD, N.S.; GIBBS, M.E. Hemispheric dissociation of the involvement of NOS isoforms in memory for discriminated avoidance in the chick. **Learn Mem.** v. 10, n. 5, p. 314-8, 2003.

155. RICKARD, N.S.; GIBBS, M.E. Effects of nitric oxide inhibition on avoidance learning in the chick are lateralized and localized. *Neurobiol Learn Mem.* v. 79, n. 3, p. 252-56, 2003.
156. ROBINSON, M.J.; FRANKLIN, K.B. Reconsolidation of a morphine place preference: impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam. *Behav Brain Res.* v. 213, p. 201-07, 2010.
157. ROSINHA, M.U.; FERRARI, E.A.; TOLEDO, C.A. Immunohistochemical distribution of
158. AMPA-type label in the pigeon (*C. livia*) hippocampus. *Neuroscience.* v. 159, n. 2, p. 438-50, 2009.
159. SAMAMA, B.; BOEHM, N. Inhibition of nitric oxide synthase impairs early olfactory associative learning in newborn rats. *Neurobiol Learn Mem.* v. 71, n. 2, p. 219-31, 1999.
160. SANDERS, M.J.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M.S. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur. J. Pharmacol.* v.463, p. 217-223, 2003.
161. SARA, S.J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* v. 7, n. 2, p. 73-84, 2000.

162. - SILVA, M.I. Distribuição de células imunorreativas para a sintase neuronal do óxido
163. nítrico (nNOS) no hipocampo de pombos (*Columba livia*) após aprendizagem de
164. escolha alimentar. (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas - São Paulo, 2007.
165. SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. ***Biochem Pharmacol.*** v. 51; p. 383-94, 1996.
166. SCHAFE, G.E.; NADER, K.; BLAIR, H.T.; LEDOUX, J.E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. ***Trends Neurosci.*** v. 24, n. 9, p. 540-6, 2001.
167. SCHAFE, G.E.; BAUER, E.P.; ROSIS, S.; FARB, C.R.; RODRIGUES, S.M.; LEDOUX J.E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning requires nitric oxide signaling in the lateral amygdala. ***Eur J Neurosci.*** v. 22, p. 201-11, 2005.
168. SHUHAMA, R.; DEL-BEM, C.M.; LOUREIRO, S.R.; GRAEFF, F.G. Animal defense strategies and anxiety disorders. ***An Acad Bras Cienc.*** v. 79, n. 1, p. 97-109; 2007.

169. SMITH D. M.; MIZUMORI S. J. Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus*, v. 16, n. 9, p. 716-729, 2006.
170. SOUZA C.M.Z. 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.
171. SPERANDÉO, M.L.A.S.; BRITO, I.; SIQUEIRA, L.O.; BRITTO, L.R.G.; FERRARI, E. A. Evocação da memória contextual aversiva em pombos: efeitos do bloqueio pré-treino do receptor NMDA com o antagonista MK-801 na ativação do produto do proto-oncogene zenk no hipocampo. In: XX Reunião Anual da FeSBE, 2005, Águas de Lindóia, SP.
172. - SQUIRE, L.R.; ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol.*, v. 5, n. 2, p. 169-77, 1995.
173. - SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória. Da mente às moléculas.** São Paulo: Artmed, 2003.
174. SZÉKELY, A.D. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. *Behav Brain Res.*, v. 98, n. 2, p. 219-25, 1999.

175. SUÁREZ, J.; DÁVILA, J.C.; REAL, M.A.; 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. 10; p. 751-71, 2006.
176. SUSSWEIN, A.J.; KATZOFF, A.; MILLER, N.; HURWITZ, I. Nitric Oxide and memory. **The Neuroci**. v. 10, p. 153-62, 2004.
177. SUSUKI, A.; JOSSELYN, S.A.; FRANKLAND, P.W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci**. v. 24, n. 20, p. 4787-95, 2004.
178. STREKALOVA, T.; ZÖRNER, B.; ZACHER, C.; SADOVSKA, G.; HERDEGEN, T.; GASS, P. Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. **Genes Brain Behav**. v. 2, n. 1, p. 3-10, 2003.
179. SZABÓ C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. **Brain Res Bull**. 41(3): 131-41, 1996.
180. TEYLER, T. J.; DISCENNA, P. The role of hippocampus in memory: a hypothesis. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 9, n. 3, p. 377-89, 1985.

181. TRONSON, N. C.; WISEMAN S. L.; OLAUSSON P; TAYLOR J. R. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. **Nat Neurosci.** v. 9, n. 2, p. 167-69, 2006.
182. TRONSON, N.C.; TAYLOR, J.R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci.** v. 8, n. 4, p. 262-75, 2007.
183. TSE, D.; LANGSTON, R.F.; KAKEYAMA, M.; BETHUS, I.; SPOONER, P.A.; WOOD, E.R.; WITTER, M.P.; MORRIS, R.G. Schemas and memory consolidation. **Science.** v. 316, n. 5821, p. 76-82, 2007
184. VALENTINUZZI, V.S.; FERARRI, E.A. Habituation to sound during morning and night sessions in pigeons (*Columba lívia*). **Physiology and Behavior.** v. 62, n. 6, p. 1203-09, 1997.
185. VINCENT, S.R. **Nitric oxide in the nervous system.** San Diego: Academic Press, 1995.
186. WANG, Y; MARSDEN, P.A. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. **Adv Pharmacol.** v. 34, p. 71-90, 1995.

187. WEITZDOERFER, R.; HOEGER, H.; ENGIDAWORK, E; ENGELMANN, M.; SINGEWALD, N.; LUBEC, G.; LUBEC, B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. **Nitric Oxide**. v. 10, n. 3, p. 130-40, 2004.

188. ZHANG, W.N.; BAST, T.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. **Behav Brain Res**. v. 126, n. 1-2, p. 159-174, 2001.

11. ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada Participação da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) na consolidação e reconsolidação da memória do condicionamento clássico 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. 2051-1, Instituição: Instituto de Biologia - UNICAMP.

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

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

Larissa Oliveira Melloni de Faria

Aluno: (nome completo)

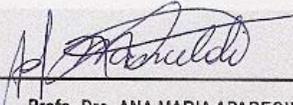
Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Orientador: (nome completo)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



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

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura