

MARIA LUIZA ANTUNES SPERANDÉO

**MEMÓRIA DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO:
ALTERAÇÕES POR INIBIÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA OU
POR BLOQUEIO DE RECEPTORES DE GLUTAMATO DO TIPO
NMDA NO HIPOCAMPO**

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIA LUIZA ANTUNES SPERANDÉO

**MEMÓRIA DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO:
ALTERAÇÕES POR INIBIÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA OU
POR BLOQUEIO DE RECEPTORES DE GLUTAMATO DO TIPO
NMDA NO HIPOCAMPO**

Este exemplar corresponde à redação final
da TESE defendida pela candidata

Maria Luiza Antunes Sperandéo

e aprovada pela Comissão Examinadora.

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

Orientadora: Prof^ª Dr^a Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

CAMPINAS
2013

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

Sp36m Sperandéo, Maria Luiza Antunes, 1949-
Memória do medo condicionado ao contexto : alterações por inibição da síntese proteica ou por bloqueio de receptores de glutamato do tipo NMDA no hipocampo / Maria Luiza Antunes Sperandéo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Condicionamento clássico. 2. Memória. 3. Inibidores da síntese de proteínas. 4. Maleato de dizocilpina. 5. Hipocampo. 6. Pombo. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Memory of contextual fear conditioning : Impairments by protein synthesis inhibition or blockade of NMDA glutamatergic receptor in the hippocampus

Palavras-chave em inglês:

Conditioning, classical

Memory

Protein synthesis inhibitors

Dizocilpine maleate

Hippocampus

Pigeon

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari [Orientador]

Gilberto Fernando Xavier

Suzete Maria Cerutti

Luiz Roberto Georgetti de Britto

César Renato Sartori

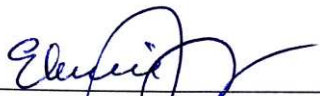
Data de defesa: 28-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 28 de Agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Elenice Aparecida de Moraes Ferrari
(Orientadora)


Assinatura

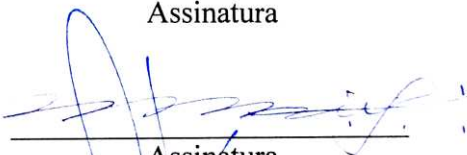
Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier


Assinatura

Prof^a Dr^a Suzete Maria Cerutti


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Roberto Georgetti de Britto


Assinatura

Prof. Dr. César Renato Sartori


Assinatura

Prof^a Dr^a Dora Maria Grassi-Kassisse

Assinatura

Prof^a Dr^a Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

Prof^a Dr^a Catarina Raposo Dias Carneiro

Assinatura

ABSTRACT

SPERANDÉO, M. L. A. Memory of contextual fear conditioning: Impairments by protein synthesis inhibition or blockade of NMDA glutamatergic receptor in the hippocampus. 2013. 118 p.

The study of classical aversive conditioning has contributed to the characterization of different phases in memory formation (acquisition, consolidation, reconsolidation, extinction and persistence) and the underlying mechanisms of neuronal plasticity. Among these, the activation of NMDA glutamate receptors, gene transcription and protein synthesis are pointed as essentials. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and immediate expression gene (IEG) *zenk* are activated in the hippocampus of mammals during reconsolidation and extinction. This study investigated the effects of protein synthesis inhibition and blockade of NMDA receptors in the hippocampus of pigeons on reconsolidation and extinction of contextual fear memory. In Experiment 1, pigeons were conditioned, tested in the context (reactivation), received intra-hippocampus infusion of saline (SAL-PR), anisomycin (ANI-PR) or MK-801 (MK-PR) after the test (post-reactivation, PR), and had a retest two days later (Rt 2d). Experiment 2, had a retest 9 days after intra-hippocampus infusion (Rt 9d) for three PR groups, and other three groups that were not tested 24h after training served as control for reactivation (no reactivation-NR). Three tone-shock pairings were presented during training (20 min). Pigeons were exposed to the context during 5 min in the test and Rt 2d sessions and during 30 min in Rt 9d. In both experiments, the occurrence of freezing (FRZ) was high in training and testing sessions for all the groups, but ANI-PR and MK-PR pigeons showed a significant decrease in FRZ during the Rt 2d ($p < 0.05$). The NR groups exhibited high occurrence of FRZ both in the Rt 2d and in the beginning of Rt 9d ($p > 0.05$). MK-PR pigeons had no spontaneous recovery of FRZ, suggesting irreversible impairment caused by MK-801 in contextual fear memory. The groups, SAL-PR, SAL-NR, ANI-PR, ANI-NR and MK-NR showed a gradual decrease in FRZ during the Rt 9d session, evidencing extinction. Western Blotting analysis indicated that the content of mature BDNF in the hippocampus of SAL-PR group after Rt 9d session was higher than that seen for the other groups ($p < 0.05$), but no between-group differences for *Zenk* were observed ($p > 0.05$). This suggests the involvement of hippocampal BDNF in reconsolidation and extinction of contextual fear memory in pigeons. The present data show that inhibition of protein synthesis and blockade of NMDA receptors in the hippocampus of pigeons, after the testing session to context, impaired reconsolidation of contextual fear conditioning memory and affected the process of extinction. Furthermore, the impairments were dependent on the reactivation of fear memory during the test.

Keywords: contextual fear memory, protein synthesis inhibition, MK-801, hippocampus, pigeons.

RESUMO

SPERANDÉO, M. L. A. Memória do medo condicionado ao contexto: alterações por inibição da síntese proteica ou por bloqueio de receptores de glutamato do tipo NMDA no hipocampo. 2013. 118p.

O estudo do condicionamento clássico aversivo contribuiu para caracterizar as fases da formação da memória (aquisição, consolidação, reconsolidação, persistência e extinção) e os mecanismos de plasticidade neuronal subjacentes. Entre estes, a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA, de transcrição gênica e síntese proteica parecem fundamentais. O fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) e o gene de expressão imediata (IEG) *zenk* são ativados no hipocampo de mamíferos durante a reconsolidação e a extinção. Este estudo investigou os efeitos da inibição da síntese proteica e do bloqueio dos receptores NMDA no hipocampo de pombos na reconsolidação e extinção da memória de medo contextual. No Experimento 1, pombos foram condicionados, testados ao contexto (reativação), submetidos à infusão intra-hipocampo de salina (SAL-PR), de anisomicina (ANI-PR) ou de MK-801 (MK-PR) após o teste (pós-reativação; PR), e retestados 2 dias depois (Rt 2d). No Experimento 2, três grupos tiveram um segundo reteste, 9 dias após a infusão (Rt 9d), enquanto que outros três grupos não passaram pelo teste (sem reativação- SR). O treino (20 min) teve três pareamentos som-choque. No teste e no Rt 2d houve exposição ao contexto do condicionamento por 5 min e no reteste Rt 9d, por 30 min. Nos dois experimentos, todos os grupos apresentaram alta ocorrência de congelamento (CONG) nas sessões de treino e de teste, mas no Rt 2d os grupos ANI-PR e MK-PR mostraram uma redução significativa de CONG ($p < 0,05$). Os grupos SR exibiram alta ocorrência de CONG tanto no Rt 2d, quanto no início do Rt 9d ($p > 0,05$). No Rt 9d o grupo MK-PR não teve recuperação espontânea de CONG, sugerindo prejuízo irreversível provocado pelo MK-801 na memória de medo contextual. Os grupos, SAL-PR, SAL-SR, ANI-PR, ANI-SR e MK-SR mostraram diminuição gradual de CONG durante a sessão de Rt 9d, evidenciando a extinção. Análises com Western blotting após o Rt 9d indicaram que o conteúdo de BDNF-maduro no hipocampo dos pombos SAL-PR foi significativamente maior em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$), mas não foram observadas diferenças entre os grupos para o *Zenk* ($p > 0,05$). Isso sugere a participação do BDNF hipocampal na reconsolidação e na extinção da memória de medo contextual em pombos. Assim, a inibição da síntese proteica e o bloqueio dos receptores NMDA no hipocampo de pombos, após o teste ao contexto, prejudicaram a reconsolidação da memória de medo condicionado ao contexto. Além disso, os prejuízos observados foram dependentes da reativação da memória durante o teste.

Palavras-chave: memória de medo ao contexto, inibição de síntese de proteína, MK-801, hipocampo, pombos.

SUMÁRIO

ABSTRACT.....	vi
RESUMO.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aprendizagem e Memória.....	2
1.2 Tipos e fases da memória.....	3
1.3 Condicionamento Clássico Aversivo.....	9
1.4 Importância funcional da transmissão glutamatérgica no hipocampo para a memória e plasticidade neuronal.....	12
1.5 Efeitos bloqueadores de síntese de proteínas da anisomicina na memória hipocampo-dependente.....	16
1.6 As relações entre o hipocampo, os genes de expressão imediata (GEIs) e a memória.....	18
1.7 Caracterização do Hipocampo de Aves.....	30
1.8 Justificativa do trabalho.....	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
2.2.1 Experimento 1.....	36
2.2.2 Experimento 2.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Experimento 1.....	38
3.1.1 Sujeitos.....	38
3.2 Procedimentos.....	39
3.2.1 Drogas e reagentes.....	39
3.2.2 Adaptação às condições do biotério.....	39
3.2.3 Adaptação às condições do laboratório.....	39
3.2.4 Implante cirúrgico das cânulas-guia e colocação dos eletrodos públicos.....	40
3.2.5 Infusão da droga.....	41
3.3 Procedimentos comportamentais.....	41
3.3.1 Câmara experimental.....	41
3.3.2 Treino em condicionamento som-choque.....	42
3.3.3 Teste ao Contexto de Condicionamento.....	42
3.3.4 Reteste.....	42
3.4 Análise dos dados comportamentais.....	43
3.5 Procedimentos moleculares.....	46
3.5.1 Análise proteica de ZENK e BDNF por Western Blotting.....	46
3.6 Análise Estatística.....	48
3.7 Experimento 2.....	48
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Experimento 1.....	52
4.1.1 Análise da densitometria óptica de BDNF e ZENK.....	58
4.2 Experimento 2.....	62
4.2.2 Análise da densitometria óptica de BDNF e ZENK.....	74
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

IN MEMORIAN

Agradeço aos queridos professores

Prof. Dr. Francesco Langone

Prof. Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo

pelo apoio, respeito e generosidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à vida, à energia que rege os seres vivos, à força geradora do Universo. À vontade Superior, à Paz que o Superior nos proporciona para continuar a luta, a superar os obstáculos, a vencer as batalhas, a persistir mesmo quando tudo parece não ter solução. Acima de tudo dedico ao Ser Humano que habita em cada um de nós.

Dedico especialmente à querida Prof^a Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, que me colocou numa “missão impossível”, mas hoje se tornando “quase possível”.

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO

À querida Prof^a. Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari pela incrível força, energia, garra e, principalmente, pela dedicação com que me orientou no dia-a-dia, mesmo nos momentos em que as forças Universais estavam desfavoráveis. Sei que é o polo central, a força motriz da minha própria energia para a realização deste trabalho.

Ao querido amigo e colega Rodolfo Souza de Faria, que me ensinou os procedimentos experimentais e me manteve sempre sob sua "tutela", me instigando, ajudando (em sentido *lato sensu*), sempre de forma amável e respeitosa.

À querida amiga Rúbia pelo seu carinho, amizade e companheirismo.

Ao colega Fernando Canova, que mesmo no seu silêncio, muito falou aos meus ouvidos.

À cara Prof^a. Dra. Suzete Maria Cerutti e ao colega Renan Barretta Gaiardoque que tão gentilmente abriram as portas do laboratório da UNIFESP-CAMPUS DIADEMA para a realização dos procedimentos moleculares.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti Britto, que amavelmente sempre manteve seu laboratório na USP-SP disponível para realização de experimentos.

À Andréia Aparecida Vigilato dos Santos, secretária do programa de pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, pela sua amizade e disponibilidade em ajudar em todas as questões burocráticas.

A todos os funcionários da UNICAMP, que participaram de alguma forma para a realização deste trabalho e, especialmente ao Washington Luis Gomes, pela sua atenção e amizade.

A todos os colegas da UNICAMP, que me ajudaram no dia-a-dia laboral e laboratorial, a resolver as situações emergentes.

À Janice A. Assis Rodrigues, que com amor e carinho muito me ajudou em todos os momentos dessa caminhada.

À Eliana Vilela, fiel amiga, que sempre teve palavras de amizade e de estímulo para continuar em meus propósitos.

Ao Marco Antonio, pela sua presença incentivadora, sua atuação nos momentos de emergência dos experimentos e seu conhecimento na área de exatas.

Ao meu querido filho Alexandre S. Fenerich, amigo carinhoso, com palavras amenas, suaves, incentivo e bondade.

À minha querida filha Taynah S. Gouvea, por ter que superar a ausência da mãe, com paciência, ternura e muitas vezes, com energia de anjo me tocou fundo.

A minha querida irmã e colega de profissão Rita de Cássia Antunes Sperandéo, que com dedicação, me substituiu no trabalho para que eu pudesse cumprir as agendas dos experimentos exigidos pelo projeto do doutorado.

Aos meus alunos, que compreenderam minha ausência com respeito e carinho na fase final dessa jornada.

Agradecimento especial aos pombos, lindas criaturas divinas.

Agradeço ao Ser Superior, o qual permitiu que tudo isso acontecesse na minha vida.

O presente trabalho teve suporte financeiro oriundo de auxílio da FAPESP, do CNPq e do FAEP-UNICAMP.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo do mecanismo de ativação do gene zenk.....	21
Figura 2. Representação esquemática das isoformas precursoras e clivagem do BDNF neuronal.....	23
Figura 3. Representação esquemática da clivagem enzimática do BDNF.....	25
Figura 4. Representação esquemática da ligação do mBDNF e do BDNF-trun aos seus receptores.....	26
Figura 5. Representação esquemática da liberação e ação de BDNF em ambos os compartimentos pré e pós-sinápticos.....	27
Figura 6. Esquema de conectividade intrahipocampal obtida através da utilização de traçadores retrógrados e anterógrados no hipocampo de pombos.....	32
Figura 7. Câmara de adaptação	40
Figura 8. Câmara experimental.....	42
Figura 9. Esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais do Experimento 1.....	43
Figura 10. Fotografia de pombos durante a sessão de treino (CONG).....	44
Figura 11. Fotografia de pombos durante a sessão de treino (PAR).....	45
Figura 12. Esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais dos grupos com e sem reativação do Experimento 2.....	50
Figura 13. (A) Representação esquemática da localização aproximada das cânulas-guia (setas vermelhas) nos Hp; (B) Corte frontal de um cérebro congelado de pombo no nível do Hp (A-P, 6.75).....	52
Figura 14. Porcentagem média (+EPM) da duração total durante as sessões de treino, teste e Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto, para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. (A) CD; (B) CONG.....	54
Figura 15. Porcentagem média (+EPM) da duração total durante as sessões de treino, teste e Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto, para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. (A) EXP; (B) PAR e (C) AG.....	56
Figura 16. (A) Valores médios (+EPM) do comportamento de CONG registrado em blocos de intervalos de 2,5 min nas sessões de treino, (B) teste e (C) Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto.....	58
Figuras 17. Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para as isoformas da proteína BDNF em amostras de homogenato de hipocampo normaliza-	

das com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina.....	59
Figuras 18. Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para a proteína ZENK em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina	61
Figura 19. Porcentagem média (+EPM) da duração total dos CD (A) e CONG (B), durante as sessões de treino, teste, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR.....	63
Figura 20. Porcentagem média (+EPM) da duração total dos comportamentos de EXP, PAR e AG durante as sessões de treino, teste, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR.....	65
Figura 21. (A) Valores médios (+EPM) de CONG registrado nas sessões de treino, (B) teste e (C) Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto.....	67
Figura 22. (A) Valores médios (+EPM) de CONG registrados nos 5 minutos iniciais da sessão do Rt 9d e (B) sessão completa do Rt 9d para os animais dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR do condicionamento aversivo ao contexto.....	69
Figura 23. Porcentagem média (+EPM) da duração total dos CD e CONG durante as sessões de treino, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR.....	70
Figura 24. Porcentagem média (+EPM) da duração total dos comportamentos de EXP, PAR e AG durante as sessões de treino, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR.....	71
Figura 25. (A) Valores médios (+EPM) de CONG registrado nas sessões de treino, (B) Rt 2d, (C) cinco minutos iniciais da sessão de Rt 9d e (D) sessão completa de Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR.....	73
Figuras 26. Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para as isoformas da proteína BDNF em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina.....	75
Figuras 27. Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para a proteína ZENK em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina	77

LISTA DE ABREVIATURAS

α -tubulina= alfa-tubulina

μ g= micrograma

μ l= microlitro

All= anexina tetramérica

AMPA= alfa-amino-3-hidroxi-5-metilixazole-4-ácido propiônico

AMPc = adenosina monofosfato cíclico

ANI= grupo anisomicina

ANOVA= Teste Estatístico para Análise de Variância

APV= ácido-amino-5-fosfonoaléxico

BDNF = fator neurotrófico derivado do cérebro

BDNF-trun= BDNF truncado

Ca^{2+} =Ion Cálcio

CaMKIV= cinase cálcio calmodulina 4

CaMKK= cinase cinase cálcio calmodulina

CAU = exploração cautelosa

CG= guanilil ciclase

CONG = congelamento

CREB1= proteína 1 de ligação ao elemento responsivo ao AMPc

D-AP5= *ácido 2-amino-5-fosfono pentanóico*

dB= Decibel

DL = área dorsolateral

DM – área dorsomedial

DMd = área dorsomedial dorsal

DMv = área dorsomedial ventral

DNA= ácido desoxirribonucleico

DTT= Ditionitrito

EC= estímulo condicionada

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EI= estímulo incondicionado

EPM= erro padrão da média

ERK= cinase regulada por sinal extracelular

EXP = exploração

g= grama

GEIs= genes de expressão imediata

GLU = glutamato

GMPc = monofosfato de guanosina cíclica

Grb2= proteína 2 de ligação ao receptor do fator de crescimento

GTP = guanosina trifosfato

H= Hora

Hz= Hertz

IKK α = Inibidor do fator nuclear kappa B- cinase subunidade alfa

IP3= inositoltrifosfato

LOC = locomoção

LTP = potenciação de longo prazo

M= Molar

mA= Miliampere

MAN = manutenção

MAPK = proteína cinase ativada por mitógeno

mBDNF = BDNF maduro

Mg²⁺ = íon magnésio

min = Minuto

MK= grupo MK-801

MK-801 = maleato de dizocilpina

mM= milimolar

MOV= movimentos isolados

mRNA= ácido ribonucleico mensageiro

MS= milisegundos

NaCL= Cloreto de Sódio

NMDA= N-metil-D-aspartato

NO= óxido nítrico

NT= neurotrofina

PAR= parado

PKA= proteína cinase A
PKC= proteína cinase C
PLC- γ = fosfolipase C- γ
Pós= espinhas pós-sinápticas
PRE= comportamentos pré-exploratórios
Pré= terminal pré-sináptico
proBDNF= BDNF precursor
Raf= cinase proteína treonina/serina proto-oncogênica
Ras= proteína G proto-oncogênica de sarcoma de rato
Rt 2d= reteste dois dias
Rt 9d= reteste 9 dias
s= segundo
Sal= grupo salina
SH-2= domínio 2 homólogo ao sarcoma
SHC= SH-2 contendo proteína
SNC= sistema nervosa central
SOS= fator de aumento de nucleotídeo
tPA= proteína ativadora do plasminogênio tecidual
TR= treino
TrkB= receptor de tirosina cinase
TST= teste
V GLU= vesículas de glutamato
VIG= vigilância
VNDG= vesícula de núcleo denso e grande
W= Watts
Zenk= acrônimo das primeiras letras das proteínas Zif/268, EGR-1, NGFI-A e Krox 24
zenk ou *zif/268*= gene de expressão imediata

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aprendizagem e Memória

Indivíduos de todas as espécies possuem a habilidade de reagir adequadamente frente às situações do ambiente em que vivem e às ameaças a sua sobrevivência. Esta habilidade pode ser incondicionada, mas geralmente pode estar relacionado à aprendizagem, processo pelo qual se adquire conhecimento sobre o mundo, e as capacidades de prever eventos futuros, programar e modificar os próprios comportamentos. Assim, essa habilidade desenvolve-se em função das experiências com os eventos do ambiente e das consequências de respostas emitidas pelo próprio organismo (CATANIA, 1999; KANDEL, 2001).

Os estudos sobre aprendizagem destacam dois tipos principais de experiências: as que envolvem procedimentos não associativos e as que envolvem procedimentos associativos, caracterizando as aprendizagens não associativa e associativa, respectivamente. Na aprendizagem não associativa o organismo é exposto a um único tipo de estímulo, o qual é repetido regularmente, ou tem uma duração prolongada sem o estabelecimento de relações funcionais programadas entre estímulos ou entre estímulo e comportamento. Como exemplo de aprendizagem não associativa tem-se a habituação, que é caracterizada pelo decréscimo progressivo da resposta a estímulos inócuos repetitivos ou que tenham longa duração, ou a sensibilização, quando um organismo exposto a um estímulo aversivo prévio responde com fortalecimento da resposta a um estímulo inócuo, que ocorre num momento posterior, sem associação com o primeiro. Na aprendizagem associativa, são estabelecidas relações funcionais ou de contingências a partir da associação ou pareamento entre estímulos ou entre estímulos e resposta. No condicionamento clássico a partir da associação repetida entre dois estímulos (por exemplo, som e choque), um estímulo previamente inócuo adquire funções de controle de respostas que eram eliciadas apenas pelo estímulo incondicionado. No condicionamento operante ocorre o estabelecimento de contingências de reforçamento entre estímulo (por exemplo, alimento) e a resposta (por exemplo, a pressão de uma barra), a partir da associação entre resposta e sua

consequência (PAVLOV, 1927; SKINNER, 1938; SKINNER, 1953; KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 2000).

As experiências vivenciadas pelo organismo, que envolvem tanto aprendizagem não associativa quanto não associativa, induzem alterações celulares no sistema nervoso central (SNC), que se correlacionam com a formação da memória, ou seja, as informações oriundas dessas experiências são armazenadas e podem ser lembradas/evocadas.

1.2. Tipos e fases da memória

A memória pode ser caracterizada como o processo de manutenção ao longo do tempo do conhecimento e, conseqüentemente, das mudanças comportamentais adquiridas. A duração da memória depende de mecanismos celulares e moleculares específicos (MARKOWITSCH, 1997; CARLSON, 2001; KANDEL, 2001). Assim, considera-se que a memória constitui uma das mais importantes formas de plasticidade do SNC (KANDEL, 2001).

Além de variar quanto a sua duração, a memória pode variar também quanto ao tipo de informação ou conteúdo que é retido e evocado, como por exemplo, referentes a fatos e seu valor emocional, datas, procedimentos, relações entre eventos, mapas espaciais, entre outros. Dessa forma, a memória pode ser classificada de acordo tanto com seu período de armazenamento - memória de curta duração e de longa duração, quanto de acordo com seu conteúdo - memória explícita ou declarativa e implícita ou de procedimento (KANDEL *et al.*, 2001; CARLSON, 2002; PANG & LU, 2004). De um modo geral, considera-se que a memória de curta duração se refere ao armazenamento de poucas informações por um período de tempo limitado a segundos, poucos minutos ou até cerca de 3 horas, sendo um processo neural que independe da transcrição de RNA mensageiro e de síntese proteica. Já a memória de longa duração refere-se ao armazenamento de uma quantidade ilimitada 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 longa duração pode ser explícita ou declarativa, implícita ou não declarativa (ou de procedimento). A

primeira, memória explícita ou declarativa, inclui o conhecimento cuja evocação requer um esforço consciente, com conteúdo sobre fatos ou eventos autobiográficos e sobre as relações entre esses fatos e eventos que podem ser explicitados ou declarados por meio da linguagem. Como animais que não fazem uso da linguagem também têm memória declarativa. Carlson (2002) propõe o termo memória relacional para se referir a esse processo. A segunda, memória implícita ou não declarativa, inclui conhecimentos adquiridos por meio de experiências repetitivas envolvidas na habituação e sensibilização, hábitos e habilidades motoras, condicionamento clássico e alguns casos de condicionamento operante (KANDEL *et al.*, 2002; SQUIRE & KANDEL, 2003).

O processo de formação da memória é descrito como envolvendo diferentes fases que são: aquisição e ou codificação, consolidação, armazenamento, recuperação e extinção (IZQUIERDO *et al.*, 2000; NADER, 2003; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; KIRTLEY & THOMAS, 2010). A aprendizagem (aquisição) depende de processos sensoriais que garantem a detecção dos eventos/estímulos ambientais e a codificação se refere aos processos pelos quais as informações recebidas por meio desses estímulos são transformadas em códigos neurais e processadas no SNC. A informação codificada deve ser associada de forma significativa e sistemática com os conhecimentos já estabelecidos na memória, de tal forma a permitir que seja integrada com o que já é conhecido. A seguir, essa informação pode passar pela consolidação, processo que se caracteriza pela reorganização gradual das informações recém - armazenadas como memória de curta duração, de forma a torná-las mais estáveis para o armazenamento de longa duração e posterior evocação. Pode-se considerar que a consolidação seja o processo de transformação de memórias de curta duração em memórias de longa duração, ou seja, pelo qual as memórias transientes tornam-se persistentes e resistentes à desorganização. Para que a memória seja consolidada e armazenada por longa duração é necessário que haja a expressão de genes e a síntese de novas proteínas. Ocorrerão, então, mudanças estruturais e funcionais de longa duração nas sinapses garantindo que as novas memórias sejam mantidas ao longo do tempo (NADER, 2003; IZQUIERDO, 2006; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

Muitos estudos comportamentais em diferentes espécies animais investigaram a formação da memória de longa duração no condicionamento clássico aversivo. Estes estudos confirmaram sua dependência de síntese proteica, cuja regulação se inicia durante o treino e continua durante horas após o treino (SCHAFE & LEDOUX, 2000; PEDREIRA & MALDONADO, 2003; LEE, EVERITT & THOMAS, 2004; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; LONERGAN *et al.*, 2010). Atualmente se considera que a fase da consolidação da memória de longa duração envolva a indução de repetidos ciclos de síntese proteica que se repetem dentro de uma janela temporal de aproximadamente 12 horas (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; FARIA *et al.*, 2013).

O armazenamento se refere aos mecanismos pelos quais a memória consolidada é transferida aos locais onde será retida e de onde poderá ser recuperada. A fase tardia da consolidação da memória de longa duração, que dura por dias ou semanas, torna permanente e persistente o armazenamento desta memória (SQUIRE & ALVAREZ, 1995; MCGAUGH, 2000; NADER, 2003; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007). O hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal são considerados estruturas-chave envolvidas no armazenamento da memória (LEDOUX *et al.*, 1990).

A recuperação ou evocação envolve processos que permitem acessar e usar as informações armazenadas em diferentes regiões neurais, o que ocorre por meio de interações entre estruturas que compõem um circuito neural. Este, por sua vez, compreende o conjunto de entradas e saídas neurais, e de sistemas de armazenamento que garantem a organização de respostas de adaptação ao meio ambiente (LEWIS, 1979; NADER *et al.*, 2000; SANDERS, WILTGEN & FANSELOW, 2003). Quando expostos a condições estimuladoras adequadas, esses circuitos são ativados permitindo a lembrança ou evocação das informações armazenadas.

A lembrança ou recuperação de uma experiência leva a uma atualização de memórias pré-existentes, por meio do processo de reconsolidação. Esse processo envolve dois mecanismos: a desestabilização dos traços de memória já existentes, e a modificação do conteúdo da memória original pela adição de novas informações relacionadas (MISANIN, MILLER & LEWIS, 1968; DUDAI & EISENBERG, 2004; EICHENBAUM, 2006; LEE, 2010). Assim, considera-se que o processo de

reconsolidação da memória consiste de duas fases, a desestabilização da memória original dependente da reativação, seguida pela fase de reestabilização, a qual requer nova transcrição gênica e nova síntese de proteínas (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004; LEE, MILTON, & EVERITT, 2006; TRONSON *et al.*, 2007; LEE & EVERITT, 2008). Então, na reconsolidação, a memória consolidada e evocada passa por nova consolidação, fortalecendo-se e tornando-se menos susceptível à desorganização (TRONSON & TAYLOR, 2007; NADER & HARDT, 2009). Nesse processo pode ocorrer a sobreposição da memória inicialmente consolidada com um novo aprendizado, reorganizando aquelas memórias já formadas e consolidadas. Desse modo, a reconsolidação resultaria na manifestação de um traço de memória persistente ou até mesmo num interminável processo de consolidação (DUDAI & EISENBERG, 2004).

A consolidação e a reconsolidação da memória podem ser prejudicadas por eventos que interfiram com a aquisição ou com a reativação do traço da memória, sejam por lesões em determinadas áreas cerebrais, como na amígdala (BLANCHARD & BLANCHARD, 1972; KIM & DAVIS, 1993) ou no hipocampo (PHILLIPS & LEDOUX, 1992; MAREN *et al.*, 1997); por administração de fármacos inibidores de síntese proteica envolvida nesses processos (NADER & LEDOUX, 1999; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; EINARSSON & NADER, 2012; KISHIOKA *et al.*, 2013), ou pela modificação da expressão de determinados genes (ABELIOVICH *et al.*, 1993; SARA, 2000; DUDAI & EISENBERG, 2004; LIU *et al.*, 2004). Assim, uma propriedade da memória de longa duração, tanto na consolidação, como na reconsolidação é a sua sensibilidade aos inibidores de síntese de proteínas e de expressão gênica, uma vez que ambas são dependentes de nova síntese de proteínas e de nova transcrição gênica (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; DUVARCI *et al.*, 2008). Intervenções farmacológicas têm sido usadas em estudos de memória, pois permitem análises dos mecanismos celulares e moleculares que medeiam a memória e que subsidiam a expressão de determinados comportamentos. Quando a intervenção ou tratamento são administrados antes, ou imediatamente após o teste, os agentes interferem na reconsolidação da memória (TRONSON & TAYLOR, 2007; EINARSSON & NADER, 2012; KISHIOKA *et al.*, 2013). As fases de consolidação e de reconsolidação apresentam relações temporais

diferentes, como também ativação de distintas áreas e circuitos cerebrais; contudo, compartilham de mecanismos e vias moleculares similares, que medeiam a plasticidade sináptica de longa-duração (ALBERINI, 2005).

Os processos de memória estão associados com a regulação da expressão de muitas proteínas. Uma molécula que tem sido demonstrada como necessária para a formação de memória em diferentes tarefas de aprendizado é o fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), a qual é largamente expressa em cérebro de mamíferos adultos (TYLER *et al.*, 2002; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; LONERGAN *et al.*, 2010). Esta molécula é extensivamente considerada como implicada na plasticidade sináptica e no processamento de memória. Esta proteína parece ser essencial para o desenvolvimento da fase tardia da potenciação de longa duração (L-LTP) dependente de síntese proteica (KANG *et al.*, 1997; POO, 2001; TYLER *et al.*, 2002; PANG *et al.*, 2004). A L-LTP é uma forma de plasticidade sináptica que medeia a memória de longa duração. O BDNF tem sido relacionado com a formação sináptica e com o crescimento de espinhas dendríticas no hipocampo (TYLER *et al.*, 2002), mecanismos envolvidos no armazenamento de memória.

A persistência é uma característica fundamental da memória de longa duração, e se refere a sua duração por períodos de dias, meses, anos ou mesmo por toda a vida. Então, para as memórias persistirem após a aquisição o traço de memória deve ser mantido de forma robusta, e para isso são necessários mecanismos moleculares cuja ocorrência parece se repetir em ciclos. (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; ECKEL-MAHAN *et al.*, 2008). Essa consideração relaciona-se com evidências de que repetidos ciclos de síntese do receptor de glutamato do tipo NMDA seriam requeridos para consolidação da memória e sua persistência (CUI *et al.*, 2004). A persistência da memória está relacionada com a capacidade de reativar ou reconstruir uma representação original ou similar pelos mesmos processos moleculares que medeiam a recuperação da memória (DUDAI, 2002).

É importante considerar que, além da reconsolidação, a recuperação da memória pode levar ao processo de extinção. A reconsolidação atua para estabilizar, enquanto que a extinção leva ao enfraquecimento da memória original e aquisição de nova

memória (SUZUKI *et al.*, 2004). O teste experimental para se analisar a reconsolidação da memória deve ter curta duração para evitar o processo de extinção da memória recentemente consolidada. Além disso, pode também ser utilizado um protocolo de treinamento mais intenso, pois a ocorrência da reconsolidação depende da intensidade e da duração do traço de memória (TRONSON & TAYLOR, 2007; BEVILAQUA *et al.*, 2008, ROBINSON & FRANKLIN, 2010). Suzuki *et al.*, (2004) mostraram, em camundongos condicionados ao contexto aversivo, que um treino com maior número de choques resulta numa memória robusta que só é desorganizada após um teste de reativação com longa duração, enquanto que após um treino com menor número de choques, as memórias recentes e fracas são susceptíveis à desorganização após reativação com menor duração.

A extinção se refere a um processo de quebra da contingência do reforçamento original entre os eventos, levando a um enfraquecimento da resposta originalmente reforçada (SKINNER, 1953). No caso da extinção da memória, a reexposição aos estímulos condicionados na ausência do estímulo incondicionado ou a não apresentação de reforçamento após a resposta, resulta no enfraquecimento das relações previamente estabelecidas e também à formação de uma nova memória; ou seja, o organismo aprende que a relação anterior deixou de existir, mudando o valor funcional do estímulo ou da resposta. Esta nova memória suprimiria a ativação dos traços iniciais. Todavia, como não ocorre a modificação direta da memória existente (que caracterizaria o esquecimento da memória original) (IZQUIERDO *et al.*, 1992; IZQUIERDO *et al.*, 2000), pode ocorrer recuperação espontânea em situações futuras. A recuperação espontânea é o processo através do qual uma resposta condicionada pode reaparecer após um intervalo de tempo sem condicionamento (PAVLOV, 1927; DUVARCI & NADER, 2004).

Então, considerando-se que na extinção ocorra a formação de nova memória, deduz-se que esta fase poderia também necessitar da cascata molecular que é ativada durante a consolidação (SUZUKI *et al.*, 2004; BECKINSCHTEIN *et al.*, 2007; TRONSON *et al.*, 2007). Pedreira & Maldonado (2003) fizeram estudos usando caranguejos e mostraram que a duração do evento pode ser um determinante

importante de subsequente processamento da memória: as reativações breves levam à reconsolidação, enquanto que as recordações de eventos durante períodos longos, em que as contingências originais são rompidas, resultam em extinção.

1.3. Condicionamento Clássico Aversivo

A aprendizagem e a modificação de comportamentos respondentes (ou reflexos) envolvem contingências estímulo-estímulo, no qual os sujeitos aprendem sobre a relação entre dois estímulos ou entre um estímulo e um comportamento (RESCORLA, 1969). A essência do condicionamento clássico é o pareamento de dois estímulos, condição que o caracteriza como aprendizagem associativa. O processo comportamental resultante é denominado de condicionamento clássico (CATANIA, 1999) e foi descrito pelo fisiologista russo Ivan Pavlov no início do século XX (PAVLOV, 1927; CATANIA, 1994). O aprendizado associativo de medo é estudado em laboratório por meio de um procedimento referido como condicionamento clássico aversivo, ou, condicionamento Pavloviano do medo (SANDERS, WILTGEN & FANSELOW, 2003).

No condicionamento clássico aversivo, um estímulo inicialmente considerado sem função para uma determinada resposta de medo (como um som) é pareado com um estímulo aversivo incondicionado (EI) (como um choque), estabelecendo relações de contingência entre os estímulos que resultam em propriedades aversivas do estímulo inicialmente inócuo, agora referido como estímulo condicionado (EC), que passa a controlar respostas de medo condicionado (RC) (RESCORLA, 1969; LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996). Nessas situações o ambiente onde ocorre o condicionamento EC-EI, ou seja, o contexto de treinamento, também se associa ao EI e adquire propriedades aversivas condicionadas (REIS *et al.*, 1999; MAREN & HOLT, 2000). Assim, o EC e também o contexto adquirem controle sobre as respostas que eram eliciadas pelo EI. A reexposição do organismo ao contexto aversivo condicionado, na ausência do EC e do EI, resulta na manifestação de respostas condicionadas, denominadas de medo ou medo condicionado. Esta denominação fundamenta-se no

fato de que o contexto aversivo condicionado é uma situação em que o organismo exhibe respostas de defesa ou de medo por constituir um ambiente ameaçador, que sinaliza um perigo iminente ou mesmo um perigo potencial (LEDOUX, 1994; SHUHAMA *et al.*, 2007; LEDOUX, 2012).

Portanto, os estímulos contextuais aversivos (EC) passam a induzir a ocorrência de comportamentos defensivos, parte do repertório de defesa que contribuem para a autopreservação do organismo (FENDT & FANSELOW, 1999; MAREN, 2001; BLANCHARD & BLANCHARD, 2003; SHUHAMA *et al.*, 2007). Tais comportamentos foram identificados e classificados por meio de análises experimentais, e incluem respostas de exploração cautelosa do ambiente por meio da avaliação de risco, imobilidade completa ou congelamento (*freezing*), fuga orientada ou ataque em situação de perigo próximo, e submissão (SHUHAMA *et al.*, 2007). Às respostas comportamentais ocorrem respostas neurovegetativas como aumento dos batimentos cardíacos, alterações gastrointestinais, da pressão sanguínea e respiratória, analgesia e alterações hormonais (LEDOUX, 1992; FENDT & FANSELOW, 1999; SCHAFE *et al.*, 2001). O estudo da ocorrência do medo condicionado foi realizado em diversas espécies animais (ratos, camundongos, gatos, cães, coelhos, caranguejos, moscas) inclusive em humanos (LEDOUX, 1994). Em humanos, foram identificadas estratégias de defesa semelhantes, relacionadas a desordens como fobias, ansiedade social ou generalizada, estresse pós-traumático e transtorno obsessivo compulsivo (NAKAMURA *et al.*, 2006; SHUHAMA *et al.*, 2007). Em roedores, a resposta de congelamento tem sido utilizada como a principal variável dependente em estudos que investigam aprendizagem e a memória do medo condicionado utilizando o condicionamento clássico aversivo (FENDT & FANSELOW, 1999; NADER, SHAFE & LEDOUX, 2000; HALL, THOMAS & EVERITT, 2001). Além do congelamento inclui também a resposta de exploração cautelosa do ambiente/avaliação de risco (RESCORLA, 1988; SHUHAMA *et al.*, 2007). Em pombos, a resposta de congelamento defensivo caracterizada pela imobilidade tensa ocorre quando se observa pelo menos cinco dos seguintes critérios: flexão total ou parcial das pernas (agachado ou encolhido); separação ampla entre os pés (base de apoio alargada); cauda e asas desalinhas; região ventral ou peitoral do corpo em contato com o piso ou com uma das paredes da

câmara experimental; pescoço com extensão restrita ou encolhido; olhos totalmente abertos (midríase); cabeça imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente; respiração acelerada e, ausência de outros comportamentos observáveis (REIS *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2006).

Dentre as estruturas que participam dos processos de memória do medo condicionado estão a amígdala e o hipocampo. A amígdala foi enfatizada inicialmente pelos trabalhos de LeDoux (1990) e a partir daí foi considerada como um componente central do circuito neural do medo condicionado, um lugar de plasticidade responsável pela memória emocional aversiva sinalizada ou discriminativa (LEDOUX *et al.*, 1990; PHILLIPS & LEDOUX, 1994; MAREN, AHARONOV & FANSELOW, 1997). De fato, o bloqueio da atividade na amígdala impede o condicionamento de medo para diferentes tipos de EC (MISERENDINO *et al.*, 1990).

A participação essencial do hipocampo na aquisição e na consolidação da memória de medo contextual foi demonstrada por Kim & Fanselow (1992). Ratos, que sofreram lesão hipocampal um dia após o condicionamento som-choque, tiveram prejuízo na memória de medo condicionado ao contexto, expressando menor congelamento durante o teste ao contexto do que durante o teste ao som. Posteriormente, o hipocampo foi identificado como uma estrutura fundamental para a consolidação da representação sensorial e cognitiva do contexto (KIM & FANSELOW, 1992; PHILIPS & LEDOUX, 1992; IZQUIERDO & MEDINA, 1993; MAREN *et al.*, 1997; MAREN, 2000; 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 (ANAGNOSTARAS *et al.*, 2001; ZHANG, BAST & FELDON, 2001). Contudo, também há evidências de que tanto o hipocampo dorsal quanto o hipocampo ventral participam dos processos de condicionamento clássico aversivo a estímulos discretos (RICHMOND *et al.*, 1999; BAST, ZHANG & FELDON, 2003). A memória permanece hipocampo-dependente poucos dias após o treino, sendo progressivamente transferida para áreas do neocortex (KIM & FANSELOW, 1992; BONTEMPI *et al.*, 1999; TSE *et al.*, 2007).

A utilização do paradigma de condicionamento contextual aversivo permitiu estudar mecanismos, pelos quais as memórias de medo são fortalecidas durante os processos de consolidação e reconsolidação da memória, particularmente mecanismos que ocorrem em circuitos do hipocampo. Interferências ou bloqueio da atividade sináptica no hipocampo afetam negativamente não apenas a consolidação a reconsolidação da memória adquirida, mas também interfere nas mudanças sinápticas dos circuitos neurais que envolvem outras estruturas (IZQUIERDO & MEDINA, 1993; PHILLIPS & LEDOUX, 1994; MAREN AHARONOV & FANSELOW, 1997; PANG & LU, 2004; LEE & EVERITT, 2008).

1.4. Importância funcional da transmissão glutamatérgica no hipocampo para a memória e plasticidade neuronal

Muitos estudos focalizaram os efeitos de alterações funcionais em vias neuroquímicas no hipocampo e abrangeram a análise de diferentes neurotransmissores (serotonina, acetilcolina e GABA) que atuam nos circuitos hipocampais (STIEDL *et al.*, 2000; GALÉ, ANAGNOSTARAS & FANSELOW, 2001; WALLENSTEIN & VAGO, 2001; BURGHARDT & BAUER, 2013; CHUGANI, KUMAR & MUZIK, 2013). Observa-se na literatura sobre a neuroquímica hipocampal, que os circuitos glutamatérgicos foram alvos de um elevado número de investigações (BUTELMAN, 1988; VENERO & SANDI, 1997; ZHANG, BAST & FELDON, 2001, KIRTLEY & THOMAS, 2010; LEE & HYND, 2013).

O glutamato é classificado como um neurotransmissor Tipo I, porque é um aminoácido simples, como também é o principal neurotransmissor com atividade excitatória do SNC de mamíferos e de aves (KREBS, ERICHSEN & BINGMAN, 1991; RIEDE *et al.*, 2003). A importância da ação de sinapses glutamatérgicas como sendo o sítio de desencadeamento do processo de potenciação sináptica de longa duração cresceu a partir da descoberta de Bliss & Lomo (1973) de que um estímulo breve, mas de alta frequência, em qualquer um dos três principais circuitos que envolvem sinapses

do hipocampo aumenta a amplitude do potencial excitatório pós-sináptico no neurônio alvo.

Os receptores sinápticos para o glutamato são classificados em duas categorias diferentes de acordo com a sua funcionalidade: ionotrópicos ou metabotrópicos. Sumariamente, os receptores ionotrópicos são os do tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metilazole-4-ácido propiônico), cainato e NMDA (N-metil- D-aspartato) que funcionam como canais iônicos permeáveis aos íons sódio, potássio e cálcio (HUME *et al.*, 1991). Os receptores metabotrópicos interagem com a proteína G determinando cascatas de segundos mensageiros, dentre as quais vias bioquímicas da enzima fosfolipase C (MADDEN, 2002; VAIDYAA *et al.*, 2012). Na transmissão sináptica de baixa frequência o glutamato é liberado do terminal pré-sináptico e atua nos receptores do tipo AMPA. Um estímulo de alta frequência que despolariza a membrana do neurônio pós-sináptico pela ação dos canais AMPA libera o íon Mg^{2+} que bloqueia os canais NMDA. Isto permite o influxo de Ca^{2+} por esses canais para o interior do neurônio pós-sináptico. O aumento da concentração desse íon no neurônio pós-sináptico dispara as cinases dependentes de Ca^{2+} (cinase cálcio calmodulina e proteína cinase C) e a tirosina cinase Fyn que juntas induzem a LTP. A cinase cálcio calmodulina fosforila os canais não NMDA, aumentando a sensibilidade desses canais ao glutamato, e ativa enzimas sintases do óxido nítrico (NO) que disparam a síntese do NO que age como um neuromediador retrógrado que contribui para a LTP hipocampal (GARTHWAITE, 1991, HALEY *et al.*, 1993; GARTHWAITE & BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008) uma vez que se difunde pelo citosol e atravessa facilmente as membranas lipídicas e atua no neurônio pré-sináptico. Nesta célula, o NO ativa a guanilil ciclase (CG) com subsequente conversão da guanosina trifosfato (GTP) para monofosfato de guanosina cíclica (GMPc), que atua nas vias de sinalização intracelular aumentando a liberação do glutamato e conseqüentemente, a resposta pós-sináptica (SZABÓ, 1996). 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, 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 da proteína cinase A (PKA) e da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Isso resulta na ativação da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) que se transloca para o núcleo ativando proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB1), genes de expressão imediata (GEIs) como o zenk, e síntese de BDNF (BREDT & SNYDER, 1992; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; LU *et al.*, 1999; KANDEL, 2000).

Assim, os receptores de glutamato têm ação essencial nesses mecanismos que levam à síntese proteica e à estabilização dos processos de memória fosforilando a proteína CREB1 (KELLY *et al.*, 2003; LEE, 2004).

As evidências indicam uma importante participação dos circuitos glutamatérgicos hipocampus nos processos de memória de medo ao contexto (ZHANG, BAST & FELDON, 2001; SANDERS, WILTGEN & FANSELOW, 2003; POWER *et al.*, 2006). Como a LTP no hipocampo foi referida como tendo um papel preponderante nos fenômenos de plasticidade sináptica, cognição e memória, resulta que intervenções que alterem a funcionalidade desses receptores NMDA afetariam esses processos (BAKER & AZORLOSA, 1996; GOULD, MCCARTHY & KEITH, 2002; BAST, ZHANG & FELDON, 2003). De fato, a ativação dos receptores NMDA está diretamente envolvida nos mecanismos primários que medeiam a formação de memória (MORRIS *et al.*, 1986; IZQUIERDO *et al.*, 1992).

A ativação dos receptores NMDA é bloqueada pelo MK-801 (5R,10S-(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo [a,d] ciclohepteno-5,10-imino maleato), descrito como um antagonista não competitivo do receptor NMDA. O antagonista não competitivo impede a ação do agonista, ou seja, quando se liga a outro sítio específico do receptor impede a ação do agonista (GILMAN *et al.*, 1993). O MK-801 se liga a um sítio específico dentro do poro do canal aberto, que é distinto do sítio de ligação do Mg^{2+} e, portanto, não precisa competir com ele para se ligar ao canal e nem com o glutamato para se ligar ao receptor (BAKER & AZORLOSA, 1996; ZHANG, BAST & FELDON, 2001). Os

antagonistas não competitivos de receptores NMDA, como o MK-801, mostraram eficiência no bloqueio da plasticidade neural (STAUBLIN *et al.*, 1989; WHISHAW & AUER, 1989) e prejudicaram o desempenho em testes de aprendizagem, principalmente no que diz respeito à fase de aquisição (BUTELMAN, 1988; STAUBLI *et al.*, 1989; WHISHAW & AUER, 1989).

Muitos estudos usaram o MK-801 como droga de intervenção no sistema de transmissão glutamatérgico, seja por administração sistêmica ou por infusões intracerebrais (XU & DAVIS, 1992; ZHANG, BAST & FELDON, 2001; GOULD, MCCARTHY & KEITH, 2002; BAST, ZHANG & FELDON, 2003). A administração intraperitoneal (i.p.) de MK-801 em ratos, imediatamente antes de serem testados, prejudicou o desempenho em tarefas de aprendizado espacial no labirinto radial de oito braços (BUTELMAN, 1988; PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997), no labirinto radial e no labirinto aquático de Morris (Pitkänen *et al.*, 1995), as quais são dependentes do hipocampo. Lee *et al.*, (2006) usaram D-cicloserina (DCS), um agonista parcial de receptor NMDA, administrado via i.p. e por infusão intra- amígdala e o inibidor não competitivo, MK-801, após o treino, para investigar em ratos o papel da transmissão glutamatérgica na reconsolidação do medo condicionado, o MK-801 prejudicou a reconsolidação da memória de medo condicionado.

Além disso, Jafari-Sabet (2006) mostrou que a infusão intrahipocampal de MK-801 prejudicou a retenção da memória em ratos treinados em tarefa de esquila inibitória. Sanders & Fanselow (2003) mostraram que a infusão de ácido-amino-5-fosfonoaléxico (APV), um antagonista de receptor NMDA, no hipocampo de ratos prejudicou aquisição e consolidação de memória de medo contextual. Schenberg & Oliveira (2008) mostraram que a infusão de ácido 2-amino-5-fosfono pentanóico (D-AP5), um antagonista de receptor NMDA, antes ou imediatamente após o treino em condicionamento de medo, no hipocampo dorsal de ratos prejudicou a aquisição e consolidação de memória de medo ao contexto. Lee & Hynds (2013) fizeram infusão no hipocampo dorsal de ratos de D-AP5, 15 minutos antes do condicionamento de medo ao contexto, o que resultou em prejuízo na aquisição da memória de medo ao contexto.

Por outro lado, os efeitos do MK-801 também foram analisados em aves, por infusão sistêmica ou intracerebral (FREEMAN & ROSE, 1995; PARSONS & ROGERS, 1997; VENERO & SANDI, 1997; SPERANDÉO, 2005; HAMASU *et al.*, 2010). Esses estudos evidenciam que a ação do MK-801, como um antagonista do receptor NMDA, interfere no aprendizado associativo, tal como no condicionamento clássico aversivo utilizado no presente trabalho.

1.5. Efeitos bloqueadores de síntese de proteínas da anisomicina na memória hipocampo-dependente

Os processos de consolidação e de reconsolidação de memória requerem a expressão de genes e de nova síntese de proteínas (DAVIS & SQUIRE, 1984; MCGaugh, 2000). Previamente se pensou que consolidação ocorresse somente uma vez, porém há crescentes evidências de que a consolidação da memória seja um processo dinâmico que reforça ou altera a memória, ou seja, que a memória passe por processos de reconsolidação (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997; NADER *et al.*, 2000; SARA, 2000; PEDREIRA *et al.*, 2002). Assim, muitos trabalhos foram realizados utilizando inibidores de síntese de proteína antes ou imediatamente após a recuperação da memória de medo com subsequente prejuízo desta memória sugerindo que a evocação dispara uma onda de síntese proteica requerida para a reconsolidação (NADER, *et al.*, 2000; DEBIEC *et al.*, 2002; KIDA *et al.*, 2002).

Anisomicina (Z-p-methoxyphenylmethyl-3-acetoxy-4-hydroxypyrrolidine) é um antibiótico isolado de culturas de vários *Streptomyces* que tem uma potente e reversível ação inibidora de síntese de proteínas em levedura e em células de mamíferos (BUTLER, 1966; GROLLMAN, 1967). Grollman (1967) verificou que a anisomicina (ANI) atua de forma rápida e reversível, a qual produz 95% de inibição de síntese proteica de forma inespecífica. ANI atua na reação de transferência subsequente para a formação de aminoacil transferase do ácido ribonucleico, (inibindo a diasil transferase no ribossomo), atuando, portanto na tradução, ou na síntese da proteína, mas não tem

ação sobre a transcrição do RNA mensageiro. A ANI é largamente usada em estudos de memória com a finalidade de bloquear a síntese de proteínas requerida para a consolidação, reconsolidação ou até mesmo para a persistência ou extinção da memória.

Suzuki *et al.*, (2004) fizeram uma série de experimentos em camundongos que foram treinados em uma câmara experimental com um choque. O teste ao contexto ocorreu 24 h depois do treino e ANI foi administrada sistemicamente 30 min depois do teste que teve duração de 0, 1, 3 ou 30 min. Houve menor ocorrência de congelamento no teste com duração de 3 min e prejuízo na reconsolidação. Quando o teste teve a duração de 30 min houve extinção (decréscimo de ocorrência de congelamento) tanto para os animais tratados com ANI quanto para os animais do grupo salina, mas apenas quando os animais do grupo ANI não apresentaram extinção numa segunda sessão realizada 24h depois, indicando que a estabilidade de longa duração da extinção requer síntese de proteína. Assim, a extinção e a reconsolidação apresentam diferentes vias bioquímicas.

Power *et al.*, (2006) treinaram ratos em tarefa de esquiva inibitória e realizaram testes 6 h (teste 1), 2 d (teste 2) e 6 d (teste 3) após o treino. No teste 1 os ratos foram removidos do compartimento de apresentação do choque imediatamente após entrar ou retidos no contexto de choque por 200 segundos. A infusão intrahipocampal de ANI foi administrada imediatamente após o teste. Após o teste 1, a infusão prejudicou o desempenho da esquiva inibitória no teste 2 em animais que tiveram uma reexposição de curta duração; os animais expostos ao contexto por um período de tempo mais longo (200 segundos) apresentaram extinção. Os ratos com prejuízo na reconsolidação induzido por ANI no teste 2 demonstraram recuperação espontânea no teste 3. Os ratos que tiveram extinção no teste 2 mostraram mais extinção no teste 3. Os resultados indicaram que a administração de ANI após o teste de evocação prejudicou o desempenho de retenção da memória somente nos animais que apresentaram extinção.

Frankland *et al.*, (2006) condicionaram camundongos ao medo contextual e fizeram infusão intrahipocampal e intracórtex cingulado anterior de ANI, após o teste de 2,5 min, realizado 24 h ou 36 dias após o treino. A infusão intrahipocampal prejudicou a memória de medo contextual reativada 24 h após o treino, mas não após 36 dias. A infusão intracórtex cingulado anterior não teve efeito. Outro grupo de animais foi treinado e, antes do teste (10 ou 15 min) realizado 24 h ou 36 dias após o treino recebeu a administração sistêmica de ANI. Ocorreu o bloqueio da expressão de memória no teste mais longo realizado 36 dias após o treino. Os dados sugerem que a memória de medo contextual de longa duração torna-se mais estável e que pode apresentar uma distribuição em circuitos corticais ou hipocampo-corticais.

Bekinschtein *et al.*, (2007) demonstraram a existência de um período tardio de síntese proteica, cerca de 12h após o treino que é crítico para a persistência da memória. A infusão de ANI intrahipocampal, ou de oligonucleotídeos anti-sense de BDNF no hipocampo, 12h após o treino, prejudicou a persistência de memórias dependentes do hipocampo em tarefas de esquiva inibitória e de condicionamento de medo contextual. O BDNF transforma o traço de memória de longa duração de maneira permanente, portanto, é uma proteína essencial para o armazenamento da memória de longa duração.

1.6. As relações entre o hipocampo, os genes de expressão imediata (GEIs), e a memória

Os genes de expressão ou ativação imediata (GEIs) são uma classe de genes que são ativados rápida e transitoriamente em resposta à atividade neuronal, pois não requerem novas sínteses de proteínas. Os GEIs poderiam constituir uma resposta genômica precocemente requerida para o disparo dos mecanismos subjacentes às modificações persistentes das células (MORGAN *et al.*, 1987). Isso explicaria a sua ativação rápida e transitória, como também sua resistência a inibidores de síntese proteica. Esses GEIs, que seriam as vias de terceiros mensageiros - dentre eles o

zenk, e seu produto o fator de transcrição ZENK, ativa genes de expressão tardia, responsáveis pela expressão de proteínas formadoras de receptores, proteínas estruturais e sinapsinas causando alterações no fenótipo sináptico, ou seja, a plasticidade sináptica, formando o traço de memória (RICHARDSON *et al.*, 1991; LANAHAN e WORLEY, 1998; WALTON *et al.*, 1999; WALLENSTEIN, VAGO & WALBERER, 2001; BRITO, 2002; LEE & HYND, 2013).

Os GEIs descritos como regulatórios codificam proteínas que podem aumentar ou diminuir à montante (na direção 5' na molécula do DNA) a expressão do gene, e os descritos como efetores codificam proteínas que têm um papel funcional mais diretamente relacionado com a sinapse (DAVIS, BOZON & LAROCHE, 2003). Lanahan & Worley (1998) estimaram que aproximadamente 30-40 genes são GEIs neuronais e desses, 10 a 15 são genes regulatórios tais como o *c-fos* e *zif/268* ou *zenk*, enquanto os demais são genes efetores tais como *arg3.1*, *Homer* e *Bdnf* (DAVIS, BOZON & LAROCHE, 2003). Quando traduzidas no citoplasma, estas proteínas podem translocar-se para o núcleo e regular a transcrição de genes alvo.

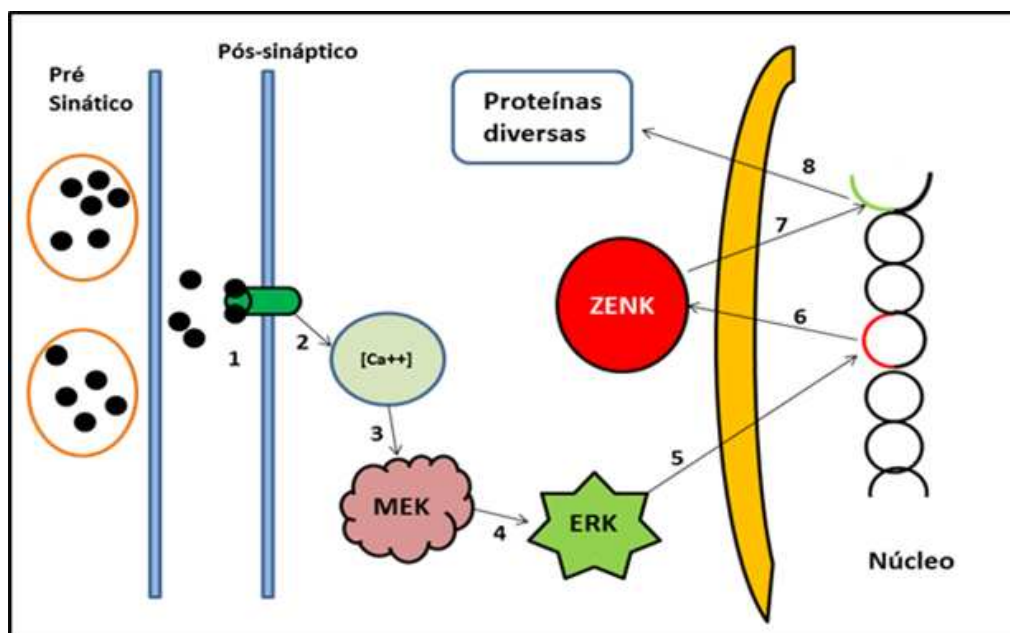
O *zenk*, também conhecido como *zif/268*, *Krox-24*, *NGFI-A*, *egr1* e *TIS 8*, que codifica a proteína ZENK, foi um dos GEIs inicialmente clonado e encontrado no cérebro (COLE *et al.*, 1989). Ele tem uma alta expressão cerebral, portanto é uma importante ferramenta utilizada para mapeamento da atividade funcional do cérebro (COLE *et al.*, 1989; WORLEY & CHRISTY, *et al.*, 1991). Os seus genes alvos ainda não foram identificados, embora já se conheça a sequência específica de DNA: 5' - GC[G / T]GGGC - 3' (CHRISTY & NATHANS, 1989) com alta afinidade onde se liga ativando a expressão gênica. Clayton (2000) postulou uma hipótese para o papel dos GEIs na consolidação de memória, comparando o funcionamento da ativação dos GEIs a um potencial de ação fisiológico, embora em um tempo e curso muito mais lentos. A ativação dos GEIs poderia ser considerada como um potencial de ação genômico, que funcionaria para integrar múltiplos estímulos aplicados em neurônios individuais dentro do circuito.

Estudos utilizando procedimentos que resultavam em deficiência do gene *zenk* em roedores confirmaram um papel fundamental para este gene em tarefas de memória dependentes do hipocampo (JONES *et al.*, 2001) como também em tarefa de

reconsolidação de memórias (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004; LONERGAN, 2010; LEE & HYND, 2013).

O início do mecanismo de ativação do gene *zenk* ocorre por estímulo nas sinapses, estímulo este, que é transmitido via neurônio pré-sináptico. Esta estimulação resulta na liberação de neurotransmissor, particularmente glutamato, e ativação de receptores pós-sinápticos, que controlam o influxo de cálcio e ativam vias de sinalização intracelular. O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e de segundos mensageiros como, AMPc, GMPc, causa a ativação da proteína Cinase Regulada por Sinal Extracelular Ativada por Mitógeno (MEK); molécula de 393 aminoácidos com 43.5 kD, que participa de vários processos celulares incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. Essa ativação de MEK resulta na ativação de outra proteína, cinase regulada por sinal extracelular (ERK), que ativada se transloca para o núcleo celular. Essas enzimas catalisam a fosforilação de fatores de transcrição, tais como o gene *zenk*, que se liga com alta afinidade à RNA polimerase II, o que leva à tradução de proteínas como a proteína ZENK. Esta proteína, por também ser um fator de transcrição, tem a capacidade de ligar-se em sítios específicos no DNA e assim iniciar os processos de transcrição e tradução para outras proteínas (Figura 1).

Figura 1 - Esquema ilustrativo do mecanismo de ativação do gene zenk



A ativação do neurônio pré-sináptico, resultante do processamento de estímulo, induz a liberação de neurotransmissor que ativa os receptores da membrana pós-sináptica (1), causando uma alteração na concentração de Cálcio $[Ca^{++}]$ (2), o que por sua vez ativa a proteína MEK (Cinase Regulada por Sinal Extracelular Ativada por Mitógeno) (3). Isso resulta na ativação de outra proteína, ERK (Cinase regulada por sinal extracelular) (4) que, então, se transloca para o núcleo celular (5), causando a transcrição do RNA mensageiro que poderá resultar na tradução da proteína ZENK (6). Por sua vez, ZENK atua como fator de transcrição, translocando-se para o núcleo, onde se ligará a sítios específicos do DNA (7) resultando assim na transcrição em RNA mensageiro que será traduzido em inúmeras proteínas (8). Adaptado de Canova, 2009.

As proteínas codificadas pelo gene de expressão imediata *zenk* têm a capacidade de regulação de genes distintos, como das sinapsinas, as proteínas constituintes mais abundantes nas sinapses. Estudos em camundongos *knockout* para o gene da sinapsina sugerem que as vesículas sinápticas podem ser desestabilizadas na ausência dessa proteína (THIEL, 1995). Além disso, demonstrou-se que o gene *zenk* é necessário para a formação de novas memórias (RIBEIRO, 2003; LEE *et al.*, 2004, LEE & HYND, 2013). Zenk foi considerado também um fator para regular a expressão da sinaptobrevina II, proteína presente na membrana das vesículas sinápticas (PATTERSON *et al.*, 1996). No encéfalo, Zenk tem uma expressão basal mantida por

atividade sináptica, neurohormonal ou neurotrófica (WORLEY *et al.*, 1991; HERDEGEN & LEAH, 1998; BECKMANN & WILCE, 1997).

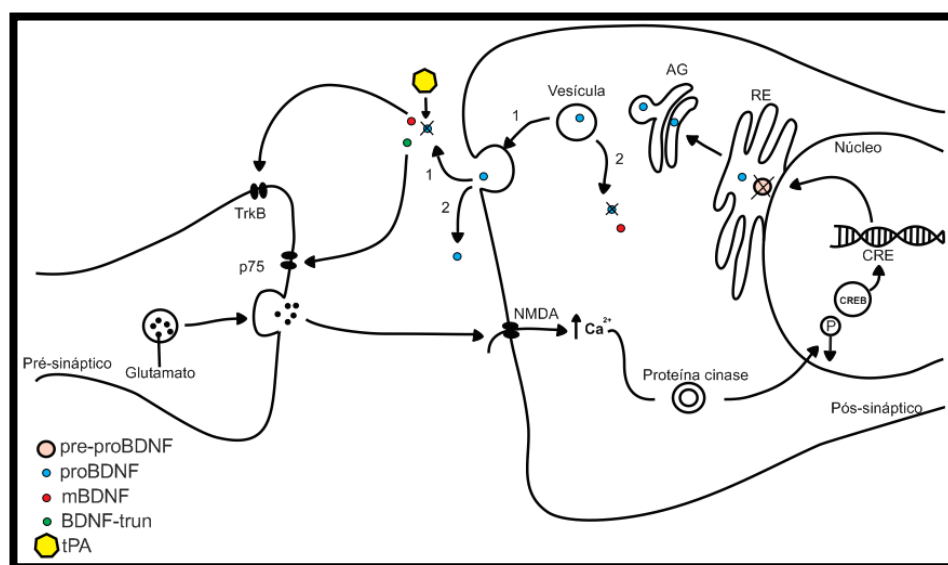
No presente estudo, os pombos foram submetidos ao condicionamento Pavloviano do medo. Este condicionamento é um processo comportamental complexo que envolve a ativação neuronal, com ação integrada de diferentes áreas cerebrais, na qual ocorre a expressão de GEI regulatório como o *zenk* e também efetor como o *Bdnf* (LEE & EVERITT, 2004; BEKINSCHTEIN, *et al.*, 2007; LEE & HYND, 2013). BDNF faz parte da família das neurotrofinas que são fatores de crescimento que promovem a sobrevivência, diferenciação como também morte celular. Os membros da família das neurotrofinas são o NGF (fator de crescimento neural), BDNF (fator neurotrófico derivado de cérebro), NT3 (Neurotrofina 3) e NT4/5 (Neurotrofinas 4 e 5), os quais se ligam por alta afinidade à cinase relacionada à tropomiosina, a família de receptores tirosina cinase (Trk). O NGF se liga ao Trk-A, o BDNF e NT4/5 ao TrkB e NT3 preferencialmente ao Trk-C (PATAPOUTIAN & REICHARDT, 2001).

O BDNF é sintetizado como isoforma precursora (pre-proBDNF), cuja ação biológica é regulada por clivagem proteolítica. Após a clivagem da isoforma pre-proBDNF tem-se a isoforma madura (mBDNF) que se liga ao receptor TrkB para promover a sobrevivência celular (LEE *et al.*, 2001) e a isoforma truncada (BDNF-trun) que se liga ao receptor p75 e tem efeitos pro-apoptóticos de anti-plasticidade neuronal (LU *et al.*, 2005).

O aumento dos níveis de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico ativa inúmeras cascatas de eventos bioquímicos, inclusive a via da proteína MEK, ativando a proteína CREB1 ocorrendo transcrição gênica de BDNF, que no retículo endoplasmático é sintetizado como isoforma precursora pre-proBDNF, a qual é clivada em proBDNF. No aparelho de Golgi o proBDNF é empacotado e por exocitose passa para o citoplasma. Por ação enzimática as vesículas de proBDNF são então clivadas na isoforma madura (mBDNF). Além disso, vesículas de proBDNF deixam o meio celular e no meio extracelular são clivadas em duas isoformas, mBDNF e BDNF-trun. A isoforma mBDNF no meio extracelular se liga então ao receptor TrkB no neurônio pré-sináptico aumentando a

liberação de glutamato no terminal pré-sináptico e BDNF-trun também pode se ligar ao receptor p75 (SEIDAH *et al.*, 1999) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática das isoformas precursoras e clivagem do BDNF neuronal

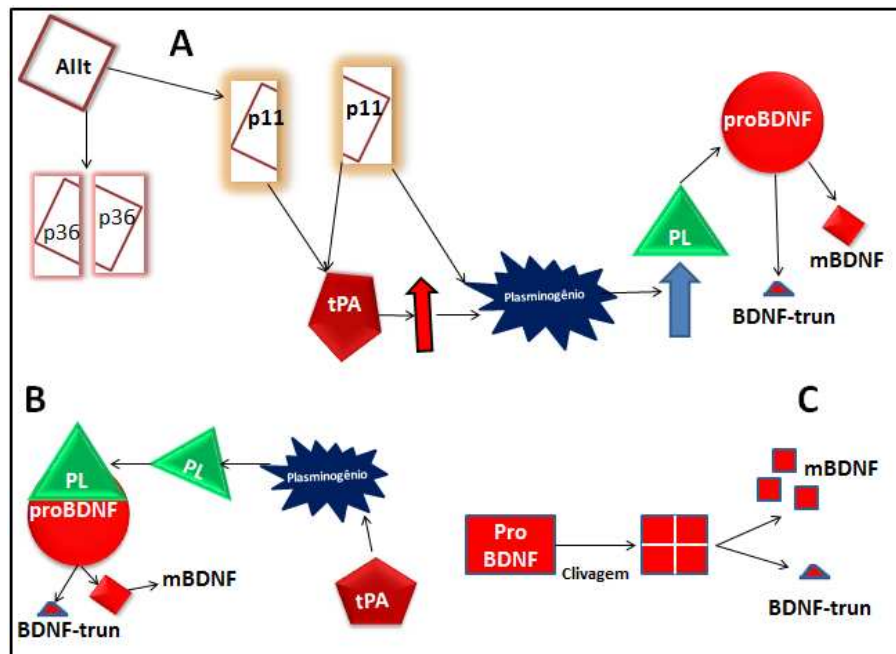


No neurônio pós-sináptico, o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular ativa inúmeras cascatas de eventos bioquímicos, ocorrendo a transcrição gênica de BDNF. No retículo endoplasmático é então sintetizado como isoforma precursora, pre-proBDNF e clivada em proBDNF. Intracelularmente as vesículas de proBDNF são clivadas na isoforma madura (mBDNF). No meio extracelular proBDNF é clivado em duas isoformas, mBDNF e a isoforma truncada BDNF-trun. A isoforma mBDNF no meio extracelular se liga então ao receptor TrkB no neurônio pré-sináptico aumentando a liberação de glutamato do terminal pré-sináptico e está relacionado com plasticidade neuronal, enquanto que a isoforma BDNF-trun pode se ligar ao receptor p75 e está relacionado com anti-plasticidade. Adaptado de Faria, 2013.

A isoforma precursora do BDNF é a isoforma proBDNF com 32 kDa. Extracelularmente esta é clivada por enzima proteolítica que gera 2 isoformas: a isoforma madura do BDNF (o mBDNF, com 14kDa) e a isoforma truncada (BDNF-trun com 28

kDa) (MOWLA *et al.*, 2001). O mBDNF tem preferência a se ligar ao receptor de tirosina cinase B (TrkB), que dispara uma cascata de sinalização intracelular, promovendo a sobrevivência celular e a plasticidade neural. A clivagem extracelular do proBDNF é catalizada pela enzima protease plasmina que é expressa como uma pró-enzima inativa (zimogênio) chamada plasminogênio (presente na fenda sináptica). A ativação do plasminogênio (forma inativa) envolve outra protease, a ativadora do plasminogênio tecidual (tPA) (secretada de terminais axonais para o espaço extra-celular) enzima que cataliza a conversão de plasminogênio a plasmina (forma ativa) esta, por sua vez, cliva o proBDNF gerando mBDNF e BDNF-trun (PANG & LU, 2004). A anexina tetramérica (AII_t) faz parte de uma família de proteínas que se liga a fosfolipídios acídicos na presença de Ca^{2+} e pode desempenhar um papel em eventos de tráfico de membrana, tais como a exocitose, a endocitose e a adesão célula-célula. Esta proteína interage na superfície extracelular com ambos, plasminogênio e tPA aumentando a ativação da enzima plasmina (KIM e HAJJAR, 2002). A AII_t é um complexo heterotetramérico que é composto por 2 subunidades p36 também referida como anexina II e, 2 subunidades p11 chamada S100A10, um membro da família de proteínas S100 que é encontrada no citosol, ou na superfície interna da membrana plasmática. Está também presente na superfície extracelular onde se liga ao tPA (SVENNINGSSON & GREENGARD, 2007). Isso mostra que a subunidade p11 é crítica para a interação molecular do AII_t com o plasminogênio e aumenta a ativação de plasminogênio mediado por tPA (KASSAM *et al.*, 1998) (Figura 3).

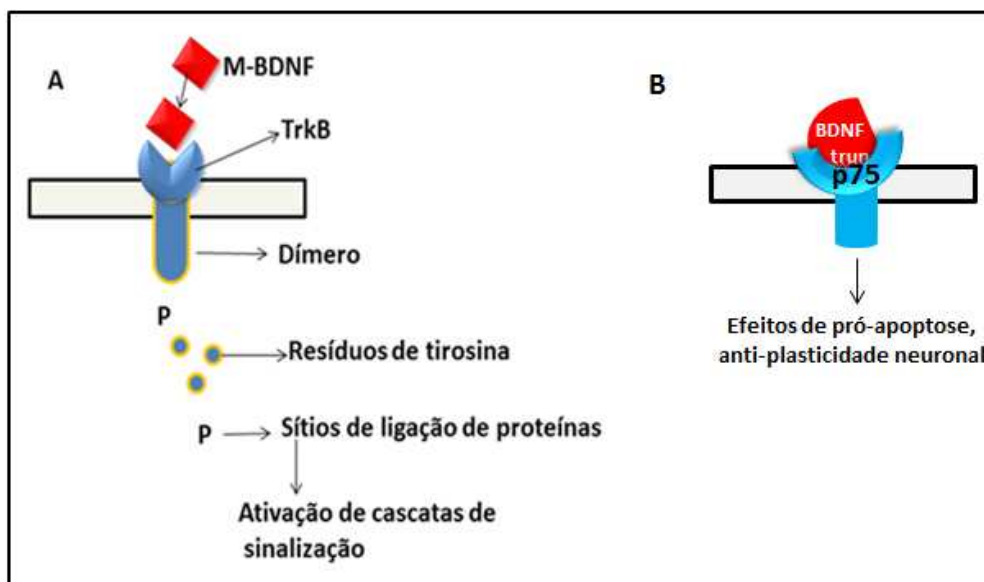
Figura 3 - Representação esquemática da clivagem enzimática do BDNF



(A) Anexina II (Allt) é composta por 2 subunidades p36 e duas p11, e esta última interage com tPA e plasminogênio aumentando a ativação de plasmina, que cliva o proBDNF. (B) A clivagem extra-celular do proBDNF é catalizada pela protease plasmina (PL). Esta é expressa na forma inativa (plasminogênio). O plasminogênio é ativado pela tPA (ativador de tecido plasminogênico) como também o converte em plasmina. Esta então, cliva o proBDNF gerando o mBDNF. (C) ProBDNF (32 kDa), isoforma precursora do BDNF, que é clivada por enzima proteolítica em mBDNF (14 kDa) ou em uma isoforma truncada (BDNF-trun com 28 kDa) (Adaptado de LU, PANG & WOO, 2005).

Quando o mBDNF se liga ao receptor induz a sua dimerização e este, ativa o domínio da cinase por meio de autofosforilação em resíduos de tirosina. A fosforilação da tirosina do receptor provê muitos sítios de interação para proteínas levando a ativação de outras enzimas que participam da plasticidade neuronal (HUANG & REICHARDT, 2001) (Figura 4).

Figura 4 - Representação esquemática da ligação do mBDNF e do BDNF-trun aos seus receptores

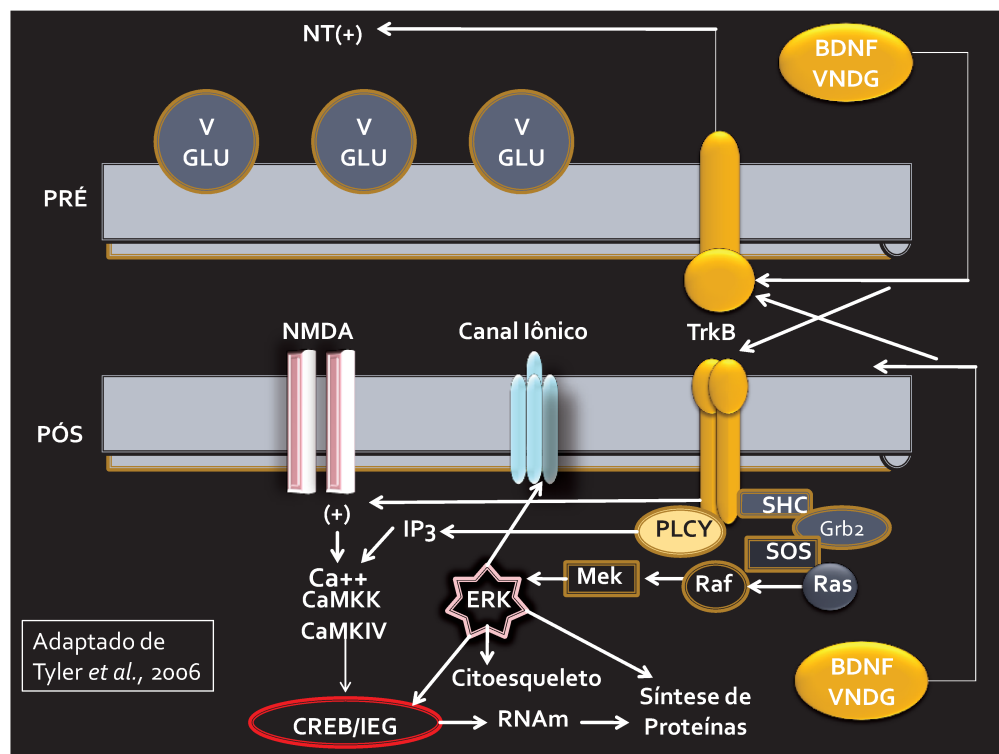


(A) mBDNF se liga ao receptor TrkB formando um dímero que ativa o domínio da cinase por autofosforilação em resíduos de tirosina. A fosforilação da tirosina do receptor provê muitos sítios de ligação para proteínas que ativam distintas cascatas de sinalização a montante de plasticidade neural. (B) O BDNF-trun pode se ligar ao receptor de neurotrofina p75 disparando efeitos pro-apoptóticos e de anti-plasticidade neuronal.

A propagação dessas cascatas leva a ativação de distintas vias de sinalização intracelulares. Algumas das proteínas ativadas pela autofosforilação dos receptores TrkB são a fosfolipase C- γ (PLC- γ ; OBERMEIER *et al.*, 1994; STEPHENS *et al.*, 1994), domínio 2 homólogo ao sarcoma (SH2-B), SH-2 contendo proteína (Shc) e rAPS, (OBERMEIER *et al.*, 1994) a cinase fosfatidil inositol 3 (KAPLAN & STEPHENS, 1994) e a tirosina cinase Fyn (IWASAKI *et al.*, 1998). As proteínas ativadas também levam à ativação da proteína G proto-oncogênica de sarcoma de rato (Ras) dependente de ativação da MAP e ERK cinases (KAPLAN & STEPHENS, 1994; SWEATT, 2001). A PLC- γ ativada hidroliza fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato para produzir inositoltrifosfato (IP3), que dispara a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos, e diacilglicerol (DAG), que ativa a proteína cinase C (PKC; Kaplan & Stephens, 1994). O sinal intracelular de Ca^{2+} ativa muitas formas de cinases cálcio-calmodulina dependentes de cálcio (CaMK; FINKBEINER *et al.*, 1997). Por meio dessas cascatas sinalizadas, mBDNF tem sido evidenciado com função para induzir fosforilação e ativação da proteína CREB que

dispara transcrição gênica, da via de CaMC regulada por cálcio e da MAP (FINKBEINER *et al.*, 1997). A relação entre a sinalização intracelular de mBDNF/TrkB, plasticidade sináptica e aprendizado dependente de hipocampo é fortalecida pelas observações de que moléculas similares apresentam papéis fundamentais nesses processos (DUMAN, *et al.*, 2000; TYLER *et al.*, 2002; CALABRESE *et al.*, 2009) (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática da liberação e ação de BDNF em ambos os compartimentos pré e pós-sinápticos



O BDNF aumenta a liberação de glutamato do terminal pré-sináptico após ligação com o receptor TrkB, como também fosforila algumas subunidades de receptor NMDA pós- sinápticas. Após a sua ligação ao receptor TrkB a sinalização de cascata converge para a via da MAP cinase ativando ERK. A ERK fosforilada ativa muitos alvos como CREB, GEIs, elementos do citoesqueleto, síntese de proteínas, e/ou canais iônicos. A via da MAP está envolvida em aprendizagem e memória. (VNDG) vesícula de núcleo denso e grande; (BDNF) fator neurotrófico derivado de cérebro; (V GLU) vesículas de glutamato; (NT) neurotrofina; (Pre) terminal presináptico; (Pós) espinhas pos-sinápticas; (NMDA) N-metil-D-aspartato; (TrkB) receptor de tirosina cinase B; (IP3) inositoltrifosfato; (CaMKK) cinase cinase cálcio calmodulina; (CaMKIV) cinase cálcio calmodulina 4; (CREB) proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc; (GEIs) gene de expressão imediata; (ERK) cinase regulada por sinal extra celular; (MAPC) proteína cinase ativada por mitógeno; (PLC-y) fosfolipase C-y; (RNAm) RNA mensageiro; (Raf) cinase proteína treonina/serina proto-oncogênica; (Ras) proteína G proto-oncogênica de sarcoma de rato; (Grb2) proteína 2 de ligação ao receptor do fator de crescimento; (SH-2) domínio 2 homólogo ao sarcoma; (SHC) SH-2 contendo proteína; (SOS) fator de aumento de nucleotídeo.

Alguns trabalhos demonstram que o BDNF endógeno é requerido para a indução de algumas formas de LTP no hipocampo de animais adultos. A indução por estimulação de alta frequência da LTP em cortes da região CA1 do hipocampo foi atenuada em camundongos sem o gene de BDNF, mas resgatada com a sua suplementação (PATTERSON *et al.*, 1996) por aplicação exógena ou por infecção com um *adenovirus* expressando BDNF (KORTE *et al.*, 1995; FIGUROV *et al.*, 1996). A fase tardia da LTP não foi induzida por estimulação tetânica em cortes hipocampais de camundongos sem o gene de BDNF ou em cortes nos quais a sinalização de TrkB foi interrompida (KORTE *et al.*, 1998). Esses trabalhos sugerem que BDNF e sua alta afinidade com os receptores TrkB são requeridos para a indução de algumas formas de LTP hipocampal e podem ser necessários para a conversão da fase precoce em fase tardia da LTP, ou seja, LTP é dependente de síntese de novas proteínas.

Kang & Shuman (1995) mostraram que a ação do BDNF aumenta a transmissão sináptica em cortes hipocampais. Os níveis de RNA mensageiro de BDNF foram aumentados em ratos que viviam em um ambiente enriquecido (FALKENBERG *et al.*, 1992; MA *et al.*, 1998; ICKES *et al.*, 2000). O hipocampo é uma estrutura que tem os mais altos níveis de RNA mensageiro de BDNF entre todas as regiões do cérebro (HOFER *et al.*, 1990). BDNF apresenta efeitos fisiológicos no hipocampo por ação pré, pós e perissinápticas (POO, 2001). A sinalização bidirecional do BDNF nas sinapses é uma evidência fisiológica de que esta neurotrofina aumenta a transmissão sináptica por ação pré e pós-sináptica (KOHARA *et al.*, 2001). A fosforilação dos resíduos de tirosina de subunidades do receptor NMDA aumenta a função deste receptor (WANG & SALTER, 1994). A ativação de receptor TrkB rapidamente fosforila as subunidades NR1 e NR2 do receptor NMDA (SUEN *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 1998). A secreção pós-sináptica de BDNF é criticamente dependente de influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico via receptores de glutamato ou canais de cálcio voltagem dependentes (HARTMANN *et al.*, 2001; LEVER *et al.*, 2001). A ação do BDNF facilita o influxo de Ca^{2+} pelos canais NMDA nas espículas dendríticas e a ativação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no aprendizado e memória (JARVIS *et al.*, 1997; LEVINE *et al.*, 1998). Como já visto anteriormente, a ativação de receptor NMDA é um componente necessário para a

indução de LTP (ARONIADOU & TEYLER, 1991) e formação de memória, como também exerce um papel fundamental no aumento da expressão de RNA mensageiro de BDNF no hipocampo. Esses resultados sugerem que a expressão do gene *Bdnf* está associada com os processos de aprendizagem e memória (TYLER *et al.*, 2002; LEE & HYND, 2013).

MA *et al.*, (1998) mostraram em ratos condicionados à esQUIVA INIBITÓRIA que o BDNF foi requerido para os processos de consolidação da memória. Os resultados do estudo de Lee, Everitt & Thomas (2004) mostraram em ratos infundidos com anti-sense de *zif/268* (*zenk*) ou de BDNF, 90 min antes do condicionamento do medo contextual, que a reconsolidação da memória é dependente de *zif/268* (*zenk*) enquanto que a consolidação depende de BDNF hipocampal. Esta dissociação no papel de BDNF e ZENK não está muito clara nas distintas fases de memória dependente de hipocampo.

BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007, demonstraram em ratos, condicionados à esQUIVA INIBITÓRIA, que 12 horas após a aquisição da memória houve um aumento de BDNF no hipocampo, crítico para a persistência e não para a formação da memória de longa duração. O BDNF endógeno foi neutralizado pela infusão de anticorpo contra BDNF no hipocampo dorsal 15 min antes do treino. A retenção de memória de longa duração foi bloqueada quando retestada 2 ou 7 dias após o treino. A neutralização realizada 12 h após a aquisição causou amnésia 7 dias após o treino, prejudicando então a persistência da memória. Os resultados indicaram que a consolidação da memória e sua persistência requerem os mesmos mecanismos moleculares com ciclos recorrentes de eventos dentro de uma estreita janela temporal. Neste mesmo estudo também foi analisada a expressão de *Zif268*, a qual aumentou 24 h após o treino em esQUIVA INIBITÓRIA. A expressão desse gene é modulada e induzida por BDNF (ALDER *et al.*, 2003; GLORIOSO *et al.*, 2006). A mudança dos níveis de *Zif268* foi completamente bloqueada por infusão de anisomicina 12 h após o treino, indicando que a síntese de proteína ao redor de 12 h após o treino é requerida para a indução tardia de *Zif268*. Sua expressão também foi prejudicada pela infusão de anticorpo contra BDNF 12 h após o treino, mostrando que a indução de *Zif268* depende de BDNF. Os resultados revelam que, os eventos disparados por BDNF no hipocampo, os quais são necessários para o

armazenamento e persistência da memória de longa duração envolve pelo menos em parte a indução do Zif268, que por sua vez, pode interagir com elementos regulatórios e com uma variedade de genes efetores.

LEE & HYNDZ (2013) evidenciaram em ratos infundidos com anisomicina ou D-AP5, um antagonista de receptor NMDA, no hipocampo que tanto a consolidação quanto a reconsolidação são dependentes da ativação de receptores NMDA no hipocampo, mas há uma dupla dissociação entre o inibidor de MEK e o inibidor de IKK α (Inibidor do fator nuclear kappa B- cinase subunidade alfa). A via funcional de BDNF-ERK1 e receptor NMDA foi requerida para a reconsolidação e a via Zif268-IKK α e receptor NMDA para a consolidação. A consolidação e reconsolidação da memória no hipocampo envolvem vias comuns na superfície celular, com mecanismos glutamatérgicos, mas requerem dissociação de vias nas cascatas de cinase a montante.

Quanto ao mecanismo de atuação na modulação da plasticidade sináptica hipocampal, há trabalhos que indicam que o BDNF atua de uma maneira retrógrada aumentando a liberação de transmissor da célula pré-sináptica, talvez por meio de fosforilação de proteínas de vesícula sináptica e elevação citosólica dos níveis de cálcio (POO, 2001). Kovalchuk e colaboradores (2002) mostraram um efeito pós-sináptico da sinalização BDNF-TrkB: a aplicação de BDNF em células granulares do giro denteado do hipocampo deu origem a aumento transiente de cálcio nas espinhas e dendritos pós-sinápticos que pode então induzir LTP, mesmo quando pareada com fraca estimulação sináptica. Rose (2000) analisou os efeitos do BDNF, na consolidação da memória em pintainhos de um dia treinados em tarefa de esquiva inibitória, e concluiu que o envolvimento de BDNF é específico e requerido para a forma mais tardia de consolidação da memória em tal modelo de estudo.

1.7. Caracterização do Hipocampo de Aves

A Formação Hipocampal, em mamíferos é uma estrutura localizada no lobo temporal que inclui o hipocampo propriamente dito (corno de Ammon), o giro denteado,

o subículo, e o córtex entorrinal (MACHADO, 2004). O termo hipocampo é comumente utilizado para descrever as duas regiões interligadas: o giro denteado e o hipocampo propriamente dito (Corno de Amon). Ambos possuem uma organização interna trilaminada, composta por dois tipos de células principais: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do Corno de Amon, sendo estas divididas nos setores de CA1, CA2 e CA3. Essas regiões mantêm um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas. A principal aferência para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal. As fibras que saem do córtex entorrinal (CE) em direção ao hipocampo formam a via perfurante e inervam os dendritos das células granulares na região da camada molecular do giro denteado (GD). Os axônios das células granulares (fibras musgosas) projetam-se para as células piramidais da região de CA3, que por sua vez emitem fibras para a região de CA1, chamada via colateral de Schaffer. De CA1, as fibras projetam-se para o complexo subicular e então para as camadas profundas do córtex entorrinal. O circuito CE-GD-CA3-CA1 é denominado via tri-sináptica (BRODAL, 1979; MATHERN *et al.*, 1997; KANDEL, 2001).

Embora a organização morfológica da formação hipocampal de aves seja diferente da descrita para mamíferos, os aspectos topográficos, neuroquímicos e funcionais são similares. O hipocampo margeia o ventrículo lateral tanto em mamíferos quanto em aves.

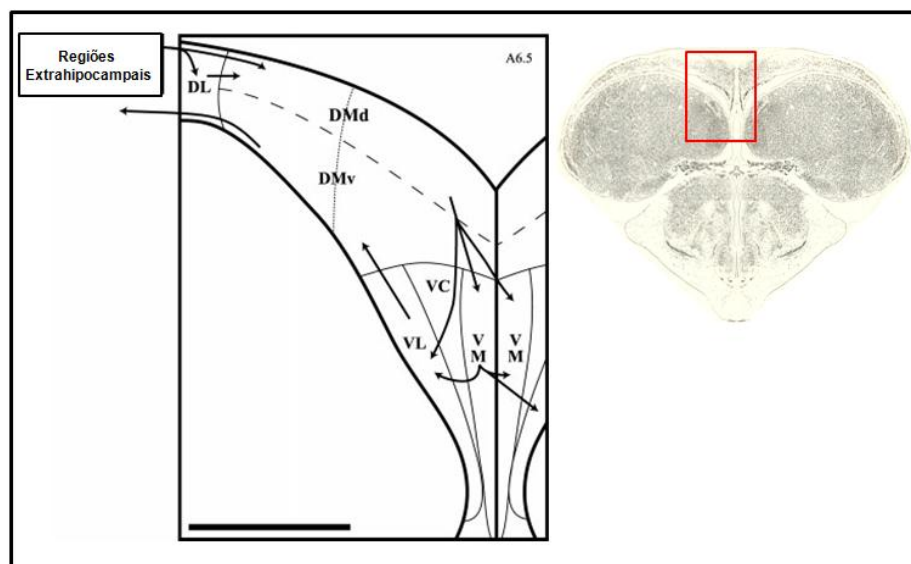
Anatomicamente, a formação hipocampal de aves se localiza na porção dorso-medial do cérebro anterior e está dividida em duas frações com camadas celulares distintas: a área para-hipocampal, localizada dorso-lateralmente, e o hipocampo propriamente dito, que fica ventro-medialmente (CAMPBELL & HODOS, 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. A entrada sensorial se localiza na área dorsolateral, como ocorre no córtex entorrinal. Da área dorsolateral seguem projeções para área dorsomedial, como ocorrem as projeções pela via perfurante do córtex entorrinal para o giro denteado. Da área dorsomedial seguem projeções para as áreas ventromedial e ventrolateral, como ocorre do giro denteado para a área CA3. Da área ventrolateral seguem projeções ipsilaterais para a área ventromedial e para a área ventrolateral contralateral, como ocorrem em mamíferos as projeções da região CA3 para a CA1 ipsilateral e contralateral. Em mamíferos a área CA1 se projeta para o *subiculum*, em pombos a área ventrolateral se projeta para área dorsomedial. O *subiculum* e a área dorsomedial se projetam para fora da formação hipocampal em mamíferos e em aves (ATOJI *et al.*, 2002; KAHN *et al.*, 2003) (Figura 6).

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 6 - 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 fibras imunorreativas 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 imuno-histoquímica, verificaram a distribuição da sintase neuronal de óxido nítrico, que medeia a síntese de NO em diversas regiões cerebrais, principalmente na região ventral do *Mesopallium* (*Hiperstriatum ventrale*) o qual está envolvido com processos de aprendizado e memória, como a esquia inibitória. O NO também é encontrado 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 *hiperpallium* 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 (GluN1, GluN2/3 e GluN4) no hipocampo de pombos.

1.8. Justificativa do trabalho

O presente trabalho, como outros já desenvolvidos no nosso laboratório, baseia-se na consideração de que estudos que investiguem algumas questões centrais para o entendimento das funções básicas do hipocampo em aves podem contribuir o conhecimento de aspectos comparativos das funções do hipocampo entre diferentes espécies (EICHENBAUM, OTTO & COHEN, 1992). Nesse sentido, o sistema hipocampal, cuja importância é muito bem descrita em estudos com roedores e primatas, também é estudado em aves para se investigar questões que, principalmente, envolvem relações espaciais e contextuais de aprendizagem e memória, e, particularmente, na reconsolidação, persistência e extinção dessas memórias.

Assim, baseando-se nas evidências experimentais apresentadas nas seções anteriores, considera-se que a investigação dos processos de plasticidade neuronal, no hipocampo de pombos, relativos à reconsolidação e extinção da memória de medo contextual, por intervenções farmacológicas e análise comportamental poderá contribuir para o conhecimento dos eventos celulares e moleculares subjacentes a essas diferentes fases.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a síntese de novas proteínas e a ativação dos receptores NMDA no hipocampo de pombos, nos processos de reconsolidação (Experimento 1) e extinção (Experimento 2) da memória contextual aversiva.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Experimento 1

- 1- Avaliar os padrões de comportamento exibidos durante o treino, teste (24 h após o treino) e reteste 2d (72 horas depois do treino). A ANI e o MK-801 foram infundidos imediatamente após o teste, no hipocampo de pombos submetidos ao medo condicionado ao contexto;
- 2- Avaliar a expressão proteica de ZENK e de BDNF no hipocampo após o reteste 2d da memória de medo contextual (48 horas após a infusão de ANI e MK-801).

2.2.2. Experimento 2

1. Avaliar os padrões de comportamento exibidos durante o treino, teste (24 h após o treino), reteste 2d (72 horas depois do treino) e reteste 9d (9 dias após o treino). A ANI e o MK-801 foram infundidos imediatamente após o teste, no hipocampo de pombos submetidos ao medo condicionado ao contexto;
2. Avaliar a expressão proteica de ZENK e de BDNF no hipocampo após o reteste 9d da memória de medo contextual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. 1. Experimento 1

3.1.1. Sujeitos

Foram utilizados 21 pombos adultos, derivação não controlada da espécie *Columba livia*, adquiridos de um mesmo fornecedor. Após a chegada ao biotério de aves, os animais foram mantidos em quarentena, recebendo banho e tratamento anti-parasitas. Durante esse período, os animais passaram por manipulações de caráter desensibilizatório, profilático e terapêutico. Em seguida, alojados em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum* (mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração especial para aves, areia e farinha de ostra). Além disso, recebiam complementação com o complexo vitamínico Vitalgold diluído na água do bebedouro, uma vez por semana. Os pombos foram identificados numericamente e catalogados. O peso do animal foi acompanhado durante seis dias antes do experimento. Os animais foram mantidos em ambiente com ventilação promovida por exaustores, em temperatura controlada de 25°C e em um ciclo claro-escuro de 12:12 h (luz se acendendo às 6:00h). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – IB – UNICAMP, Protocolo nº 3100-1 por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os pombos foram distribuídos, de forma aleatória nos seguintes grupos:

- 1) Grupo condicionado salina pós-reativação (Grupo SAL-PR; n=5): administração via intrahipocampal de solução salina imediatamente após o final do teste;
- 2) Grupo condicionado anisomocina pós-reativação (Grupo ANI-PR; n=5): administração via intrahipocampal de solução de anisomicina imediatamente após o final do teste;
- 3) Grupo condicionado MK-801 pós-reativação (Grupo MK-PR; n=5): administração via intrahipocampal de solução de MK-801 imediatamente após o final do teste;

4) Grupo não condicionado - não tratado - grupo manipulação (NÄIVE; n=6): durante 4 dias os animais foram retirados das gaiolas-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério. Este grupo foi utilizado para controle das análises da expressão proteica de ZENK e BDNF no hipocampo, na condição basal.

O grupo SAL-PR foi o controle dos grupos tratados com as drogas, anisomicina e MK-801 (grupos: ANI-PR e MK-PR), respectivamente.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Drogas e reagentes

A solução de anisomicina (Sigma-Aldrich) foi preparada com 0,001 g de anisomicina dissolvida em 5 µl de 3 N HCL (0,15 M) e 5 µl de 3 N NaOH (0,15 M), pH de 7,3. A infusão intrahipocampal foi de 0,8 µl contendo 80 µg de anisomicina, totalizando uma solução de 100µg/µl, em cada hipocampo (POWER *et al.*, 2006; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007). O MK-801 (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em salina isotônica a 9% para uma concentração de 12,5 mg/ml por agitação. A infusão foi de 6,25 µg/0,5µl em cada hipocampo. O grupo salina foi infundido com 0,5 µl por hemisfério de solução salina a 9%. As soluções foram preparadas no dia do experimento (ZHANG, BAST & FELDON, 2001; BAST, ZHANG & FELDON, 2003).

3.2.2. Adaptação às condições do biotério

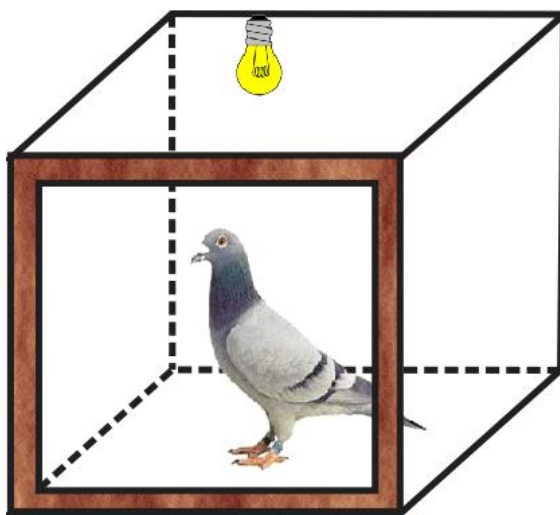
Os animais foram submetidos às condições do biotério por um período mínimo de 15 dias antes do início dos procedimentos experimentais.

3.2.3. Adaptação às condições do laboratório

Os animais de todos os grupos foram pesados e colocados por quatro dias consecutivos, durante 30 min, antes da sessão de treino, em uma câmara para se adaptarem às condições do laboratório e minimizar os efeitos de estresse. Esta apresentava dimensões de 60 x 60 x 60 cm, com as três paredes e o teto revestidos de

fórmica branca e a quarta parede feita de vidro espelhado unidirecional. A câmara era iluminada com uma lâmpada branca, fluorescente, 40 w (Figura 7).

Figura 7 – Câmara de adaptação



Medidas da câmara: 60 x 60 x 60 cm iluminada com luz branca fluorescente.

3.2.4. Implante cirúrgico das cânulas-guia e colocação dos eletrodos púbicos

Os animais foram anestesiados profundamente com cloridrato de cetamina (Ketamina Agener 10%, Agener União, 20 mg/kg) e cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer, 10 mg/kg) via intramuscular e colocados em um aparelho esterotáxico (David Kopf, mod. 1204, USA, com um adaptador Revzin para pombos). Após assepsia local, foi feita a incisão para expor a calota craniana, na qual foram feitas duas trepanações (2-3 mm) na área látero-medial para implantação da cânula guia de aço inoxidável: (26 x 0.60 mm e 10 mm de comprimento) em cada hipocampo, direcionadas nas coordenadas: ântero-posterior (AP) 6.75 mm; V, 1.5 mm; L, 0.8 mm (Atlas de Karten e Hodos 1967). As cânulas foram fixadas no crânio com resina acrílica dental (Dentsply, USA). Para prevenir o fechamento das cânulas foi colocado dentro das mesmas um fio de aço inoxidável, o qual foi removido antes da infusão. Os eletrodos de aço inoxidável

(0,5 mm; 0.020”) foram implantados nos ossos púbicos dos animais, que eram então ligados a um colete de tecido que continha um plugue de tomada elétrica (fêmea), a qual foi conectada no plugue de tomada elétrica (macho) da caixa experimental.

Os animais iniciaram o período experimental sete dias após a cirurgia. Após os procedimentos experimentais foi confirmada a localização da cânula no hipocampo injetando-se 0,5µl de uma solução corante contendo azul de Evans.

3.2.5. Infusão da droga

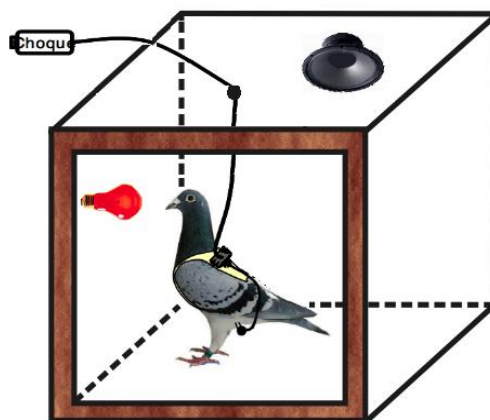
No procedimento de infusão da droga, os fios inseridos no interior das cânulas foram removidos. A administração foi realizada através de uma seringa de 10-µl (Hamilton, Reno, NV, USA) acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha gengival, calibre 30mm fixada em sua extremidade. A seringa Hamilton era adaptada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) e regulada para injeção de 0,25 µl/min. Para a infusão, a agulha 30mm foi inserida na cânula-guia, e permaneceu posicionada por 5 min para evitar um possível refluxo da solução infundida.

3. 3. Procedimentos comportamentais

3.3.1. Câmara experimental

As sessões experimentais de condicionamento som-choque, teste e reteste 2d ao contexto foram realizadas numa câmara experimental (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 câmara foi feita com lâmpada vermelha de 20 W, localizada numa parede lateral. 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 (Figura 8).

Figura 8 - Câmara experimental



Medidas: (30 x 30 x 40 cm) usada no treino, teste, reteste 2d e reteste 9d.

3.3.2. Treino em condicionamento som-choque

Durante a sessão de treino (TR) ocorreu a apresentação de um som (1000Hz, 83dB, 1-s) cujo término coincidia com a apresentação de um choque (10mA, 35-ms). Os estímulos foram apresentados no quinto, décimo e décimo quinto min durante a sessão de 20 min.

3.3.3. Teste ao Contexto de Condicionamento

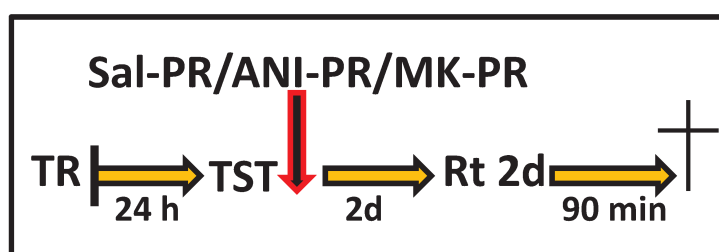
O teste (TST) de memória aversiva ao contexto, ou de medo condicionado foi realizado 24 h após o treino. Nesse teste os animais dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR foram recolocados na mesma câmara de condicionamento som-choque durante 05 min sem apresentação programada de qualquer estímulo. Após o final do teste os animais foram infundidos com as drogas ou salina e conduzidos para suas gaiolas-viveiro.

3.3.4. Reteste

O reteste 2d (Rt 2d) de memória aversiva ao contexto, ou de medo condicionado ocorreu 2 dias após a infusão de salina, anisomicina ou MK-801 com duração de 5 min

na mesma câmara experimental usada para o TR e TST. Os animais foram sacrificados 90 min após o final da sessão, os cérebros foram rapidamente removidos, os tecidos hipocampais dissecados, colocados em microtubo tipo Eppendorf e conservados em temperatura de -80°C para futuras preparações de Western blotting. Na figura 9 tem-se o esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais do experimento 1.

Figura 9 - Esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais do Experimento 1



As sessões de treino consistiram na apresentação de três associações do estímulo condicionado (EC) (som) com o estímulo incondicionado (EI) (choque); o teste ocorreu 24h depois na ausência do EC e do EI. As soluções: Sal, ANI e MK foram administradas via intrahipocampal imediatamente após o final do teste. Dois (2) dias após a infusão os grupos foram retestados ao contexto (Rt 2d) sem a apresentação do EC e EI. Noventa min após o término da sessão de Rt 2d os animais foram sacrificados por decapitação.

3.4. Análise dos dados comportamentais

Os comportamentos dos pombos nas sessões de TR, TST, Rt 2d foram gravados com sistema digital para posterior transcrição e registros dos dados comportamentais. As gravações das sessões experimentais de todos os grupos foram transcritas com a utilização do software EthoLog 2.2 (Ethological Transcription Tool, 1995-99, Ottoni, 2000).

A partir da sequência comportamental obtida foram computados os comportamentos registrados em blocos de 30 segundos. A análise foi realizada considerando-se a frequência acumulada em blocos compostos por cinco (5) intervalos de registro (2,5 min) obtendo-se assim um total de oito (8) blocos de intervalos de registro para a sessão de treino e 2 blocos para as sessões de teste e reteste 2d.

A descrição dos comportamentos é baseada na descrição contida no catálogo de comportamentos de pombos (REIS *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2006; FARIA, 2013a) conforme se segue:

1- Congelamento (CONG): o comportamento de congelamento/imobilidade tensa foi registrado cada vez que foram observados no mínimo 5 dos seguintes critérios: a) flexão total ou parcial das pernas (agachado ou encolhido); b) separação ampla entre os pés (base de apoio alargada); c) cauda e asas desalinhadas; d) região ventral ou peitoral do corpo em contato com o piso ou com uma das paredes da câmara; e) pescoço com extensão restrita ou encolhido; f) olhos totalmente abertos (midríase); g) cabeça imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente; h) respiração acelerada e, i) ausência de outros comportamentos observáveis. (Figura 10).

Figura 10 – Fotografia de pombos durante a sessão de treino (CONG)



Comportamento de congelamento

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.

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.

4- Comportamentos pré-exploratórios (PRE): constituem reações que foram geralmente observadas antecedendo o explorar (sobressalto, murchar, estremecer o corpo).

5- 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.

6- Parado (PAR): ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte deste; o animal interrompe o movimento em curso ou fica sem se mover, em pé, geralmente no centro da câmara experimental e sem apoio peitoral, com o pescoço encolhido ou em pequena extensão, com o bico voltado para a direção dos pés e com ângulo entre o bico e o papo $< 60^\circ$. (Figura 11).

Figura 11 – Fotografia de pombos durante a sessão de treino (PAR)



Comportamento postura de parado.

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

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

9- 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.

Para a realização da análise estatística, os comportamentos foram agrupados da seguinte forma:

- 1- CD - comportamentos defensivos, os quais englobam os comportamentos de CONG, VIG e CAU;
- 2- EXP - comportamentos exploratórios, que agrupam os PRE e EXP;
- 3- AG - atividades gerais, que reúnem os LOC, MAN e MOV;
- 4- PAR - postura de parado;
- 5- CONG - comportamento de congelamento, o qual foi também analisado sozinho.

3. 5. Procedimentos moleculares

3.5.1. Análise proteica de ZENK e de BDNF por Western blotting

As amostras foram utilizadas para a análise da expressão quantitativa das proteínas ZENK e BDNF no hipocampo. A análise da expressão proteica foi realizada em homogenatos de hipocampo de todos os grupos em um microlitro de tampão de extração de proteína (Tris 100mM Ph 7,5: EDTA 10mM Ph 7,0: inibidor de protease Roche®). Após a homogeneização, foram adicionados 100 µl de Triton X-100 10% em

cada amostra, mantidas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 16.000 g por 40 min. Alíquotas contendo 100 µg de proteína foram diluídas em 25 µl de tampão de Laemmli (Fosfato de Sódio 50mM, Glicerol 25%, SDS 1% e Azul de Bromofenol 0,01%) contendo 200mM de DTT, as quais foram fervidas durante 5 minutos a 100°C. Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12%. A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética é a seguinte: Tris (50mM), glicina (380 mM), SDS (0,1%). A separação eletroforética das proteínas foi realizada à intensidade de corrente constante (60 mA), durante aproximadamente 2 horas. Após a separação por eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, aplicando-se uma voltagem constante de 15 V. A composição do tampão empregado para a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: Tris (25mM), glicina (192 mM), SDS (0,02%) e metanol (20%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 1% de albumina diluída em tampão TBS-t pH 7,5 (10mM de Tris, 150mM NaCl e 20% de Tween-20) sob agitação constante durante duas horas. A seguir, as membranas foram incubadas overnight, a 4°C com anticorpo policlonal anti-BDNF (SC-546) ou anti-ZENK (Cell Signaling®) (coelho, 1:1000, diluído em tampão TBS-t). Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (3 vezes durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (HRP, feito em cabra e diluído 1:5000 em TBS-t), durante uma hora. Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com TBS-t e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência com o reagente de revelação ECL (Amersham®) e reveladas no fotodocumentador UVITEC. Após a revelação das bandas, as membranas foram incubadas 30 minutos em temperatura ambiente com 10 ml de solução “stripping” pH 2,8 (glicina 0,2M e NaCl 0,2M) para retirada do anticorpo e posterior incubação com o controle interno (anti alfa-tubulina). A seguir, as membranas foram lavadas novamente três vezes em TBS-t e submetidas a novo bloqueio e finalmente ao anticorpo anti alfa-tubulina (1:5000, Cell Signalling®, EUA). O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular DualColor® (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 QuantityOne (Bio-Rad, EUA).

3.6. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas foi usada para as comparações estatísticas dos dados comportamentais apresentados em todas as sessões com o comportamento de congelamento usado como a variável dependente e grupo, sessão e bloco de intervalo de tempo como variáveis independentes. Para a análise dos dados moleculares foi usada a análise de variância (ANOVA) de uma via. As análises *post hoc* foram realizadas com o teste para múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

3.7. Experimento 2

Foram utilizados 48 pombos distribuídos aleatoriamente em grupos pós-reativação e grupos sem-reativação.

Os grupos pós-reativação foram:

- 1) Grupo condicionado salina pós-reativação (Grupo SAL-PR; n=8): administração via intrahipocampal de solução salina imediatamente após o final do teste;
- 2) Grupo condicionado anisomocina pós-reativação (Grupo ANI-PR; n=11): administração via intrahipocampal de solução de anisomicina imediatamente após o final do teste;
- 3) Grupo condicionado MK-801 pós-reativação (Grupo MK-PR; n=11): administração via intrahipocampal de solução de MK-801 imediatamente após o final do teste.

Grupos sem reativação:

4) Grupo condicionado salina sem reativação (Grupo SAL-SR; n=6): administração via intrahipocampal de solução salina 24h após o treino, porém sem a sessão de teste;

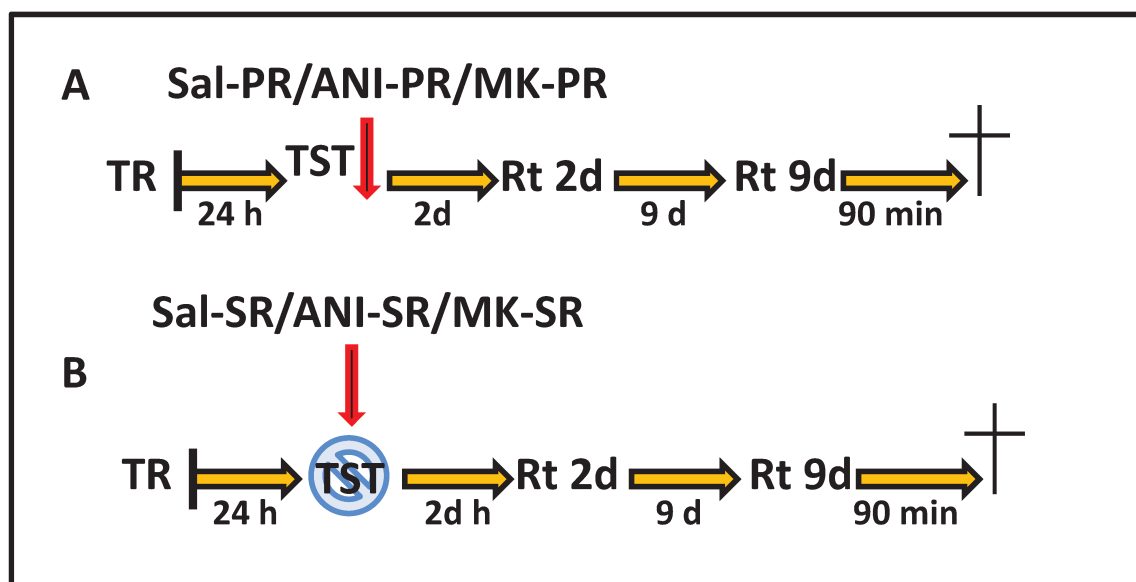
5) Grupo condicionado anisomicina sem reativação (Grupo ANI-SR; n=6): administração via intrahipocampal de solução de anisomicina 24h após o treino, porém sem a sessão de teste;

6) Grupo condicionado MK-801 sem reativação (Grupo MK-SR; n=6): administração via intrahipocampal de solução de MK-801 24h após o treino, porém sem a sessão de teste;

O grupo SAL-SR foi o controle dos grupos tratados com as drogas, anisomicina e MK-801 (ANI-SR e MK-SR), respectivamente. Estes três grupos foram controles dos três grupos pós-reativação.

Todos os procedimentos experimentais, bem como material e métodos foram idênticos aos utilizados no Experimento 1, com exceção do teste que não foi realizado nos grupos sem reativação. Além disso, no Experimento 2, os animais tiveram um segundo reteste, Reteste 9d (Rt 9d). Este foi realizado 9 dias após a infusão da anisomicina e MK-801 ou da solução salina, com o objetivo de avaliar a persistência ou a extinção da memória de longa-duração do medo condicionado ao contexto. O Rt 9 d foi realizado na mesma câmara experimental usada para as sessões de TR, TST e Rt 2d e os animais permaneciam na caixa por 30 min sem a apresentação do EI. A sessão foi gravada para posterior transcrição e análise dos comportamentos. O comportamento de congelamento (assim como todos os outros comportamentos) foi analisado considerando-se a frequência obtida por amostragem em intervalos de 30 s, acumulada em blocos compostos de cinco (5) intervalos de registro (2,5 min) obtendo-se assim um total de doze (12) blocos de intervalos de registro para a sessão de Rt 9d (Figura 12).

Figura 12 - Esquema ilustrativo dos procedimentos experimentais dos grupos com e sem reativação do Experimento 2



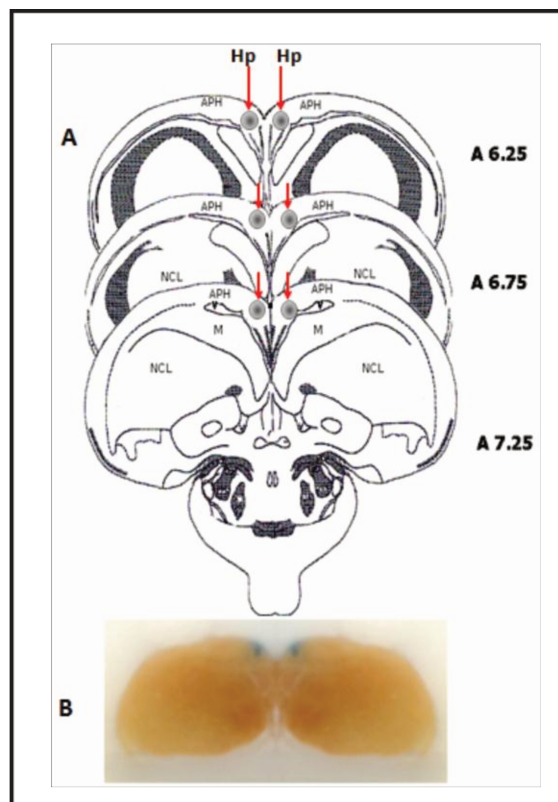
(A) Grupos pós-reativação: as sessões de treino consistiram em três apresentações de associação do estímulo condicionado (EC) (som) com o estímulo incondicionado (EI) (choque); o teste ocorreu 24h depois na ausência do EC e do EI. As soluções: Sal, ANI e MK foram administradas via intrahipocampal imediatamente após o final do teste; 2 dias após a infusão os grupos foram retestados ao contexto (Rt 2d) e 9 dias após a infusão foram novamente retestados (Rt 9d) sem a apresentação de EC e EI. (B) Grupos SAL, ANI e MK sem reativação: tiveram os mesmos procedimentos, mas sem a sessão de teste. As soluções: Sal, ANI e MK foram administradas via intrahipocampal 24 h após a sessão de treino. Noventa min após o final da sessão de Rt 9d todos os animais de todos os grupos foram sacrificados por decapitação.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1

A Figura 13A mostra a representação esquemática de cortes coronais de cérebro de pombo. As setas vermelhas indicam os locais da inserção das cânulas-guia e os círculos cinza representando o local da infusão no hipocampo (Hp). Os desenhos estão de acordo com o atlas do cérebro de pombos de Karten & Hodos (1967) e incluem a nova nomenclatura usada para as estruturas dos cérebros de aves; 13B fotografia de um corte frontal (A-P, 6.75) de um cérebro congelado de pombo, mostrando duas regiões demarcadas com uma solução corante contendo azul de Evans que foi infundida nos Hp pela cânula para a comprovação do sítio correto da injeção.

Figura 13 – (A) Representação esquemática da localização aproximada das cânulas-guia (setas vermelhas) nos Hp; (B) Corte frontal de um cérebro congelado de pombo no nível do Hp (A-P, 6.75)



(A) Os círculos cinza representam os locais da infusão. A nova nomenclatura para as estruturas do cérebro de aves para: APH: *area parahippocampalis*; Hp: *hippocampus*; M: *Mesopallium*; NCL: *Nidopallium caudolaterale*; V: *ventriculus*. (B) As áreas azuis correspondem ao local da infusão da solução corante de azul de Evans.

As Figuras 14 e 15 mostram a duração percentual média dos comportamentos durante as sessões de treino, de teste e de Rt 2d ao contexto para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. Cada barra corresponde à porcentagem média calculada considerando como 100% o valor da duração total geral de comportamentos registrados na sessão, para todas as categorias.

A figura 14A mostra a duração percentual média de ocorrência dos comportamentos defensivos (CD) considerados pela somatória das durações dos comportamentos de VIG, CAUT e CONG, nas sessões de treino, teste e Rt 2d para os grupos SAL-PR, ANI-PR e ML-PR; a figura 13B mostra a porcentagem de ocorrência do comportamento de CONG em separado.

Em relação aos CD, verifica-se que na sessão de treino o grupo SAL-PR teve variação de porcentagem média entre 70 a 80% e tratados de 40 a 78%. No teste houve variação entre 80 e 95% para os três grupos.

Durante o Rt 2d, ocorrido 24h após o tratamento com salina, anisomicina ou MK-801 intra-hipocampo, o grupo SAL-PR manteve valores percentuais elevados para os CD, em torno de 60%, enquanto que os grupos ANI-PR e MK-PR apresentaram redução acentuada na duração percentual, com valores menores que 5%. Essa redução percentual nos CD na sessão de Rt 2d, observada para os grupos ANI-PR e MK-PR sugere que a reativação da memória aversiva contextual foi prejudicada pelos tratamentos realizados nos pombos desses grupos (Figura 11A).

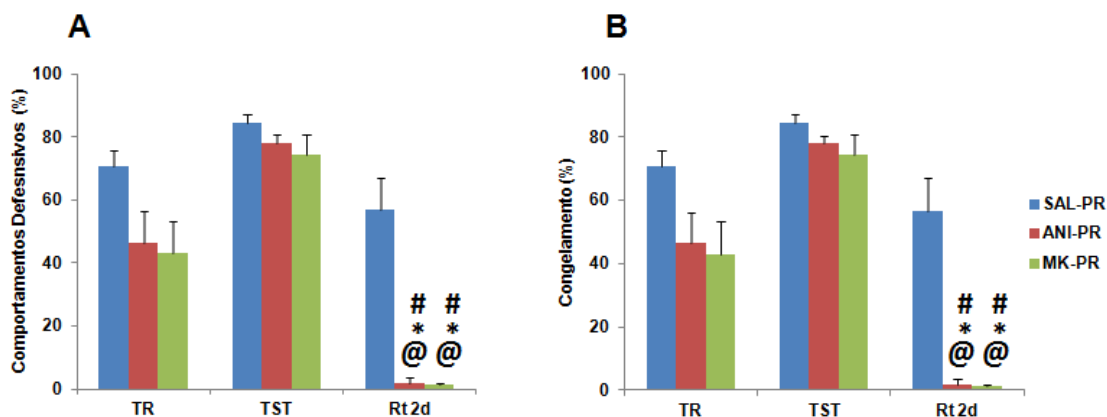
A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para a duração percentual média dos CD ($F_{2,12} = 9,23$; $p < 0,01$), diferença significativa entre as sessões ($F_{2,12} = 73,26$; $p < 0,0001$) e interação entre grupos e sessão ($F_{2,4} = 5,26$; $p < 0,01$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey- Kramer indicaram que os grupos ANI-PR e MK-PR foram diferentes do grupo SAL-PR. A sessão de Rt 2d dos grupos ANI e MK foram diferentes do treino e do teste dos três grupos e do Rt 2d do SAL-PR ($p < 0,05$).

Na figura 14B tem-se a porcentagem de ocorrência somente do comportamento de CONG, cujos valores percentuais para grupos e sessões não mostraram variações significativas em relação aos CD. Isto indica que os CD foram basicamente de CONG.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas mostrou diferença significativa entre os grupos para a duração percentual média de CONG ($F_{2,12} = 9,35$; $p < 0,01$), entre sessões ($F_{2,12} = 72,78$; $p < 0,0001$) e interação entre grupo e sessão ($F_{2,4} = 5,24$; $p < 0,01$).

As análises com múltiplas comparações e *post hoc* realizadas com o teste Tukey - Kramer indicaram que a sessão Rt 2d dos grupos ANI-PR e MK-PR foram diferentes de todas as sessões do grupo SAL-PR, como também do treino e do teste deles mesmos ($p < 0,05$).

Figura 14 - Porcentagem média (+EPM) da duração total durante as sessões de treino, teste e Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto, para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. (A) CD; (B) CONG



(A e B) @ diferença significativa em relação ao grupo SAL-PR ($p < 0,01$). * diferença significativa em relação às sessões de treino e teste do SAL-PR, ANI-PR e MK-PR ($p < 0,0001$). # diferença significativa em relação ao Rt 2d do SAL-PR ($p < 0,0001$).

A Figura 15A mostra a duração percentual média de ocorrência dos comportamentos exploratórios (EXP), considerados pela somatória dos pré-exploratórios e exploratórios; a figura 15B o comportamento parado (PAR) e a figura 14C atividades gerais (AG), considerados pela somatória dos MAN, LOC e MOV, nas sessões de treino, teste e Rt 2d para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR.

A figura 15A mostra que na sessão de treino, o grupo SAL-PR apresentou duração de EXP com um valor médio em torno de 5%, ANI-PR e MK-PR em torno de 20%. Na sessão de teste os três grupos apresentaram redução na duração de comportamentos EXP, com valor em torno de 5%. Na sessão Rt 2d os grupos ANI-PR e MK-PR apresentaram aumento de duração na ocorrência de EXP, com um valor médio de 60%, enquanto que o grupo SAL-PR apresentou um valor médio de 5%. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para ocorrência dos EXP ($F_{2,12} = 4,28$; $p < 0,05$), entre as sessões ($F_{2,12} = 19,17$; $p < 0,0001$) e interação entre grupos e sessão ($F_{2,4} = 3,77$; $p < 0,01$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste de Tukey- Kramer para o comportamento EXP indicaram que o grupo SAL-PR diferiu significativamente dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,05$) e que a sessão Rt 2d foi significativamente diferente do treino e do teste ($p < 0,05$). Diferenças intra-grupos foram observadas para os grupos ANI-PR e MK-PR, mas não para o SAL-PR. As sessões de treino, teste e Rt 2d do grupo SAL-PR não apresentaram diferenças ($p > 0,05$), mas diferiram significativamente do Rt 2d dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,05$). A sessão Rt 2d nos grupos ANI-PR e MK -PR diferiu significativamente das suas respectivas sessões de treino e de teste como também das sessões do grupo SAL-PR ($p < 0,05$).

A Figura 15B mostra o comportamento parado. Na sessão de treino, os grupos apresentaram uma duração de PAR com valor médio em torno de 5%. Na sessão de teste os três grupos apresentaram durações reduzidas para PAR com valor em torno de 1%. Na sessão de Rt 2d o grupo MK-PR apresentou aumento de ocorrência de comportamento PAR, com um valor médio de 20%, e o grupo ANI-PR um valor médio de 18%.

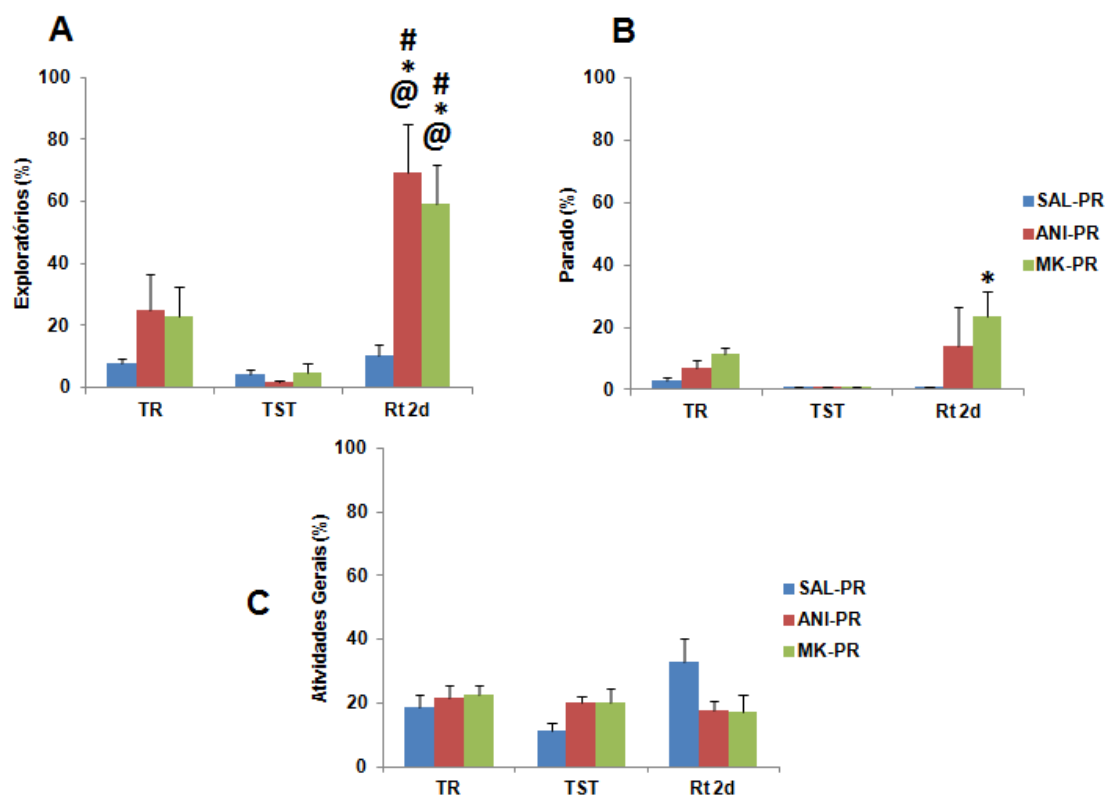
A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre as sessões de treino, teste e Rt 2d para ocorrência de PAR ($F_{2,12} = 3,84$; $p < 0,03$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* indicaram que a sessão Rt 2d do grupo MK-PR diferiu significativamente de todas as sessões dos grupos SAL-PR, ANI-PR e das demais sessões dele mesmo ($p < 0,05$).

A Figura 14C mostra os comportamentos AG. Todos os grupos em todas as sessões exibiram AG de forma equivalente, com valores regulares, em torno de 18%.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas não indicou diferenças significativas para ocorrência de AG entre os grupos ($F_{2,12} = 0,04$, $p > 0,05$) e sessões ($F_{1,12} = 1,06$, $p > 0,05$).

Figura 15 - Porcentagem média (+EPM) da duração total durante as sessões de treino, teste e Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto, para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. (A) EXP; (B) PAR e (C) AG



(A) @ diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). * diferença significativa em relação às sessões do grupo SAL-PR e suas demais sessões ($p < 0,0001$). # diferença significativa em relação a SAL-PR ($p < 0,05$). (B) * diferença significativa em relação às sessões do grupo SAL-PR e suas demais sessões ($p < 0,03$). (C) A análise estatística não indicou diferenças significativas para AG ($p > 0,05$).

A Figura 16 mostra os dados médios da frequência acumulada em blocos de registro do comportamento de CONG analisado durante as sessões de treino, teste e Rt 2d ao

contexto. A partir da sequência comportamental obtida foram computados os comportamentos registrados em blocos de 30 segundos. A análise foi realizada considerando-se a frequência acumulada em blocos de cinco (5) intervalos de registro (2,5 min) obtendo-se assim um total de oito (8) blocos de intervalos de registro para a sessão de treino e 2 blocos para as sessões de teste e Rt 2d.

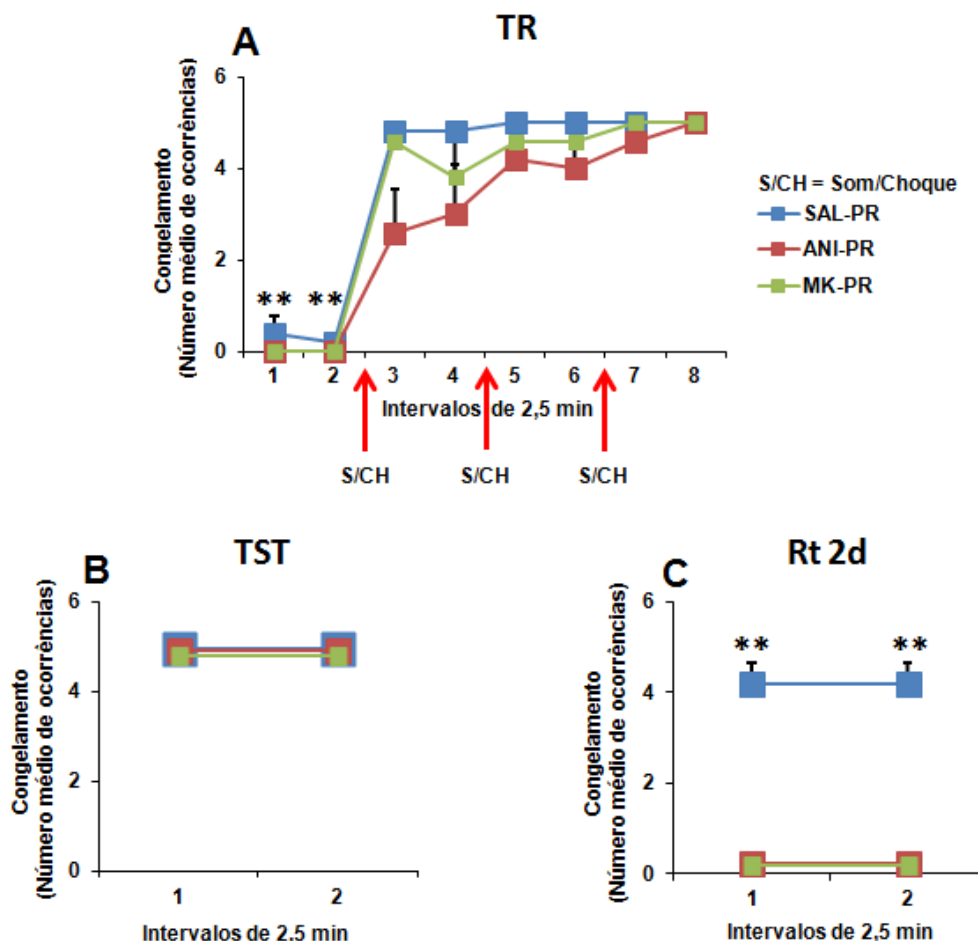
Na sessão de treino, o comportamento de CONG, aumentou significativamente o número médio de ocorrência, após o primeiro pareamento dos estímulos som-choque, e permaneceu alto até o final da sessão (Figura 16 A). A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de treino indicou diferença significativa entre os blocos ($F_{2,7} = 75,29$; $p < 0,0001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que essas diferenças foram significativas para os blocos 1 e 2 em relação a todos os outros blocos nos três grupos ($p < 0,05$).

Durante o teste de evocação da memória o comportamento de CONG continuou alto semelhante ao final da sessão de treino. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de teste não mostrou diferenças (Figura 16 B).

Os grupos ANI-PR e MK-PR apresentaram redução da ocorrência de CONG no Rt 2d em relação ao treino e teste do grupo SAL-PR e ao teste deles mesmos, sugerindo prejuízo da reconsolidação da memória aversiva contextual de longa duração, nos animais tratados com anisomicina e MK-801 (Figura 15 C).

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de Rt 2d indicou diferenças significativas para o grupo SAL-PR em relação aos grupos ANI-PR e MK-PR ($F_{2,12} = 59,26$; $p < 0,0001$). As análises *post hoc* indicaram que os blocos 1 e 2 do grupo SAL-PR foram diferentes dos blocos 1 e 2 de ANI-PR e MK-PR ($p < 0,05$).

Figura 16 - (A) Valores médios (+EPM) do comportamento de CONG registrado em blocos de intervalos de 2,5 min nas sessões de treino, (B) teste e (C) Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto



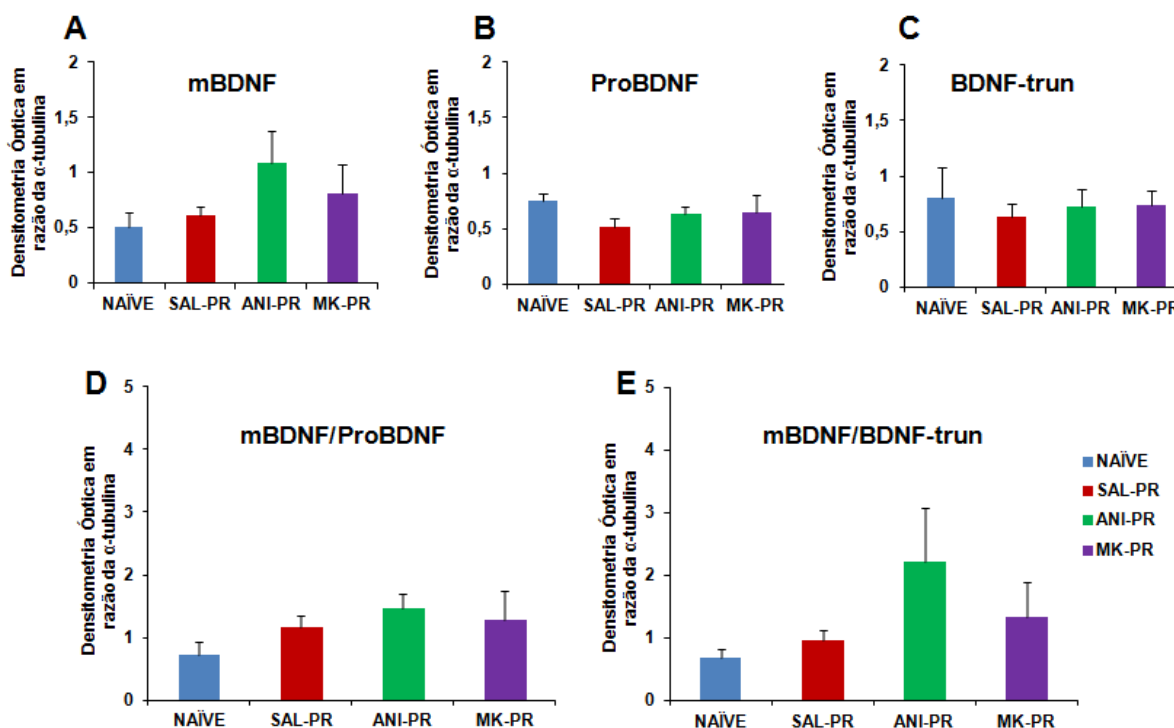
(A) ** diferença significativa em relação a todos os outros blocos dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR ($p < 0,0001$). (B) Não apresentou diferença significativa. (C) ** diferença significativa em relação aos dois blocos dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,0001$), mas não entre os blocos do grupo SAL-PR.

4.1. 1. Análise da densitometria óptica de BDNF e ZENK

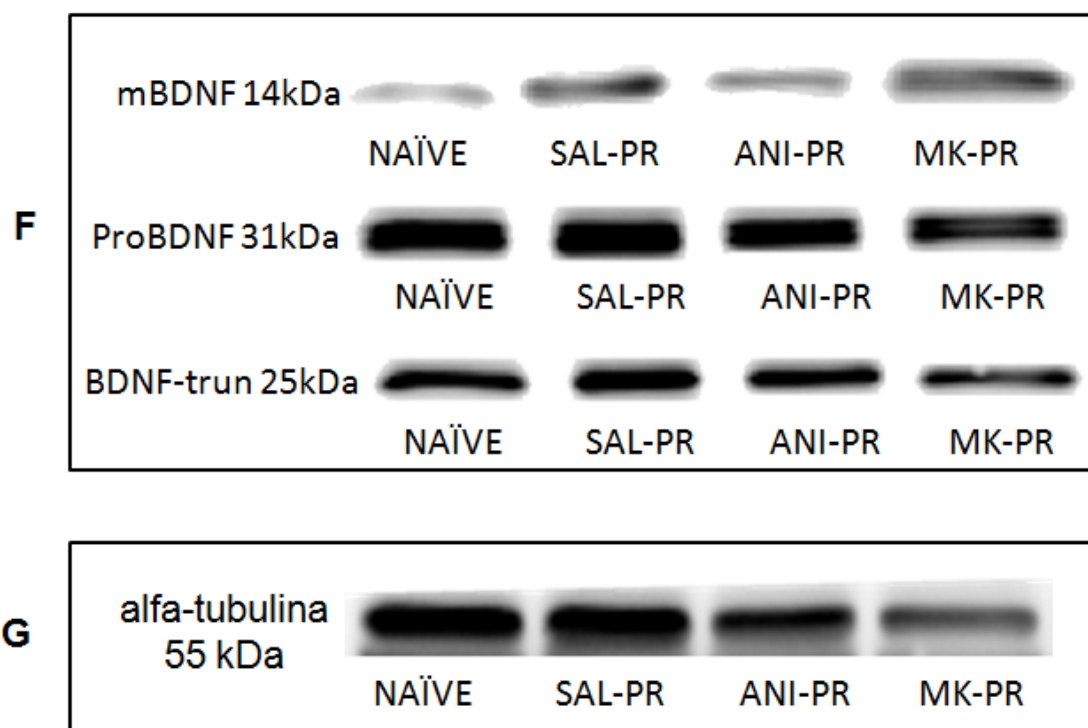
Na Figura 17 observam-se valores da densitometria óptica das bandas imunorreativas à proteína BDNF-madura (mBDNF; 17A), BDNF-precursora (proBDNF; 17B) e BDNF-truncada (BDNF-trun; 17C) normalizadas pela quantidade total de proteína alfa-tubulina detectadas no hipocampo após o Rt 2d de pombos dos grupos SAL-PR, ANI-PR, MK-PR e dos controles NAÏVE. Também são apresentados valores

da razão mBDNF/proBDNF (17D) e mBDNF/BDNF-trun (17E). As imagens das bandas imunorreativas para cada proteína e da alfa-tubulina são mostradas abaixo dos respectivos gráficos. Os dados de densitometria óptica de cada uma das isoformas de BDNF, bem como dos valores referentes às razões mBDNF/proBDNF e mBDNF/BDNF-trun foram analisados estatisticamente com o teste ANOVA de uma via. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto ao conteúdo das isoformas mBDNF ($F_{3,16} = 0,68$; $p > 0,05$), proBDNF ($F_{3,16} = 0,44$; $p > 0,05$), BDNFtrun ($F_{3,16} = 0,43$; $p > 0,05$), nem para os valores de razão mBDNF/proBDNF ($F_{3,16} = 1,25$; $p > 0,05$) e mBDNF/BDNF-trun ($F_{3,16} = 1,65$; $p > 0,05$). Na figura 17F são apresentadas as bandas das isoformas mBDNF, proBDNF, BDNF-trun para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. Na figura 17G as bandas de alfa-tubulina.

Figuras 17 – Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para as isoformas da proteína BDNF em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina



(A) mBDNF; (B) proBDNF; (C) BDNFtrun; (D) razão mBDNF/proBDNF e (E) razão mBDNF/BDNF-trun. Não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA de uma via).

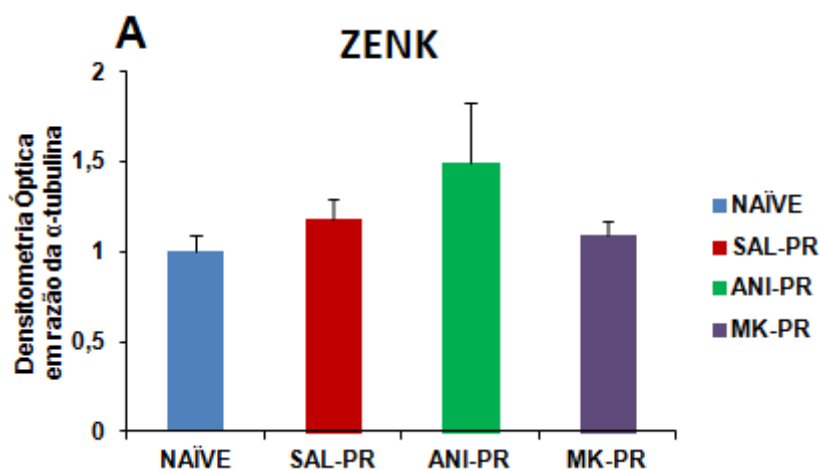


(F) Bandas imunorreativas representativas para mBDNF, proBDNF e BDNF-trun.

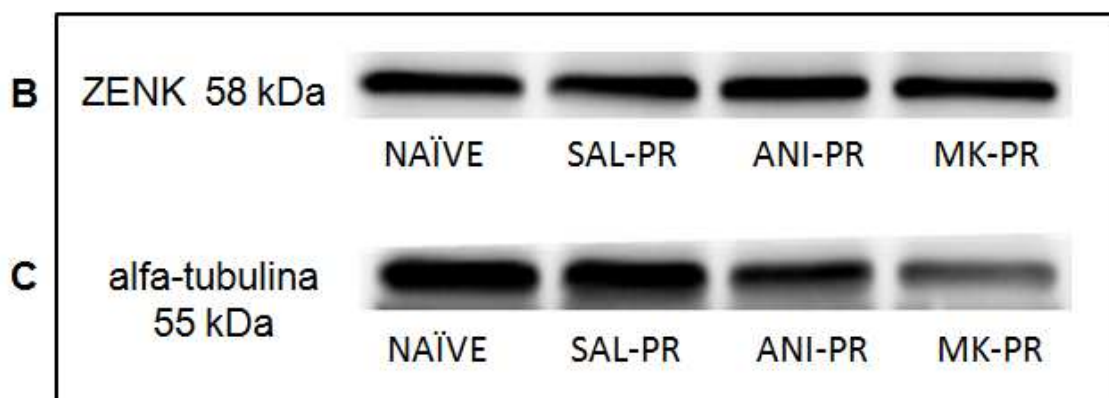
(G) Bandas imunorreativas representativas para as isoformas da proteína BDNF quantidade total da proteína alfa-tubulina.

Na Figura 18 tem-se os valores da densitometria óptica das bandas imunorreativas à proteína ZENK (18A) normalizadas pela quantidade total de proteína alfa-tubulina detectadas no hipocampo após o Rt 2d de pombos dos grupos SAL-PR, ANI-PR, MK-PR e dos controles NAÏVE, (18B) bandas imunorreativas e (18C) da alfa-tubulina. Os dados de densitometria óptica de ZENK foram analisados estatisticamente com o teste ANOVA de uma via e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,16} = 1,52$; $p > 0,05$).

Figuras 18 – Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para a proteína ZENK em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina



(A) Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA de uma via).



(B) Bandas imunorreativas representativas para ZENK. (C) Bandas imunorreativas representativas para ZENK quantidade total da proteína alfa-tubulina.

4.2. Experimento 2

As Figuras 19 e 20 mostram a duração percentual média dos comportamentos durante as sessões de treino, teste, Rt 2d e Rt 9d ao contexto para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. Cada barra corresponde à porcentagem média calculada considerando como 100% o valor da duração total geral de comportamentos registrados na sessão, para todas as categorias.

A figura 19 mostra a duração percentual média dos CD e duração percentual média de CONG dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR.

Na figura 19A verifica-se que nas sessões de treino e de teste os grupos SAL, ANI e MK apresentaram duração dos CD com valores que variaram de 50% a 70% e em torno de 80%, respectivamente. Durante o Rt 2d e 9d ocorridos 2 dias e 9 dias após o tratamento com salina, anisomicina ou MK-801 intra-hipocampo, o grupo SAL-PR manteve valores de duração dos CD em torno de 40%, enquanto que os grupos ANI-PR e MK-PR apresentaram redução acentuada na duração percentual, menores que 15%. Essa redução sugere que a reativação da memória contextual aversiva foi prejudicada pelos tratamentos realizados nos pombos desses grupos.

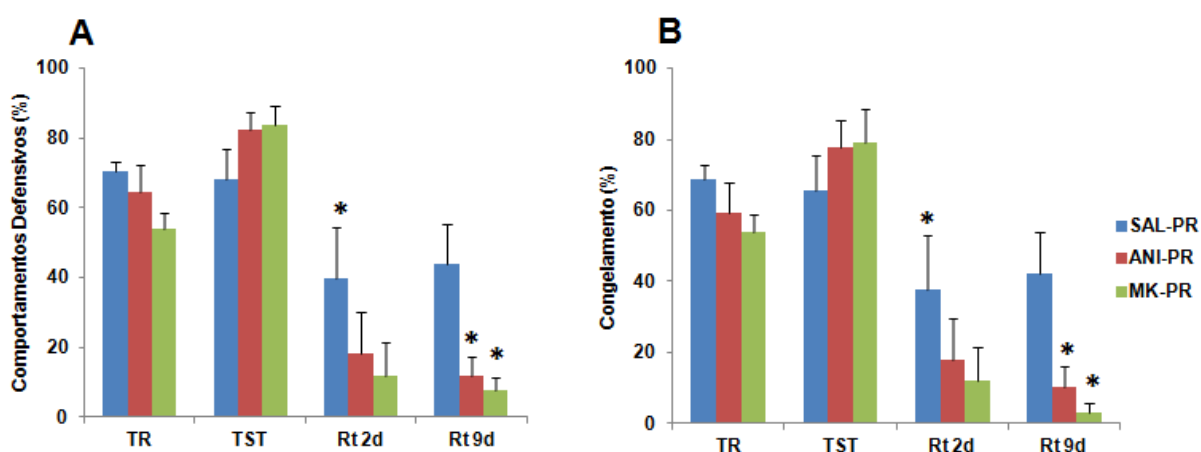
A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre sessões para ocorrência dos CD ($F_{3,27} = 35,97$; $p < 0,0001$) e interação entre grupos e sessão ($F_{2,6} = 5,30$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que as sessões Rt 9d dos grupos ANI-PR e MK-PR e Rt 2d de MK-PR diferiram significativamente das sessões de treino e teste deles mesmos e de SAL-PR, como também de Rt 2d de SAL-PR ($p < 0,05$).

Na figura 19B tem-se a porcentagem de ocorrência do comportamento de CONG, para os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR, e nota-se que os valores são semelhantes aos dos CD. Isto indica que dentre os CD o comportamento de CONG foi o que mostrou maior ocorrência.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas mostrou diferença significativa entre as sessões ($F_{3,27} = 13,62$; $p < 0,0001$) e interação entre grupos e

sessão ($F_{2,6} = 7,33$; $p < 0,0001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o Rt 9d do grupo ANI-PR e MK-PR foram diferentes de todas as sessões do grupo SAL-PR, como também do treino e teste deles mesmos ($p < 0,05$).

Figura 19 - Porcentagem média (+EPM) da duração total dos CD (A) e CONG (B), durante as sessões de treino, teste, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR



(A e B) * diferença significativa em relação às sessões de treino e de teste dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR e Rt 2d dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,0001$).

Na Figura 20 tem-se os comportamentos exploratórios (EXP), parado (PAR) e atividades gerais (AG).

A figura 20A mostra que na sessão de treino, o grupo SAL-PR apresentou duração percentual de EXP com um valor médio em torno de 5%, ANI-PR e MK-PR em torno de 20%. Na sessão de teste os três grupos apresentaram durações reduzidas de EXP com valores em torno de 5%. Na sessão Rt 2d e 9d o grupo ANI-PR apresentou aumento acentuado na duração percentual, maiores que 30%.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para ocorrência de EXP ($F_{2,27} = 12,49$; $p < 0,001$), entre as

sessões ($F_{3,27} = 7,83$; $p < 0,001$) e interação entre grupos e sessão ($F_{2,6} = 3,05$; $p < 0,01$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o grupo ANI-PR diferiu significativamente do SAL-PR e MK-PR. Em relação às sessões, a sessão de Rt 2d do grupo ANI-PR diferiu significativamente das sessões de treino, teste, Rt 2d e Rt 9d dos grupos MK-PR e SAL-PR, como também do treino e teste dele mesmo ($p < 0,05$).

A Figura 20B mostra o comportamento PAR. Observa-se que nas sessões de treino e de teste os três grupos apresentaram duração percentual do comportamento PAR com valores que variaram entre 1% a 5% e em torno de 1%, respectivamente. Durante o Rt 2d e 9d mantiveram valores de duração do comportamento PAR em torno de 8%, enquanto que o grupo MK-PR apresentou aumento acentuado na duração percentual, valores maiores que 20%.

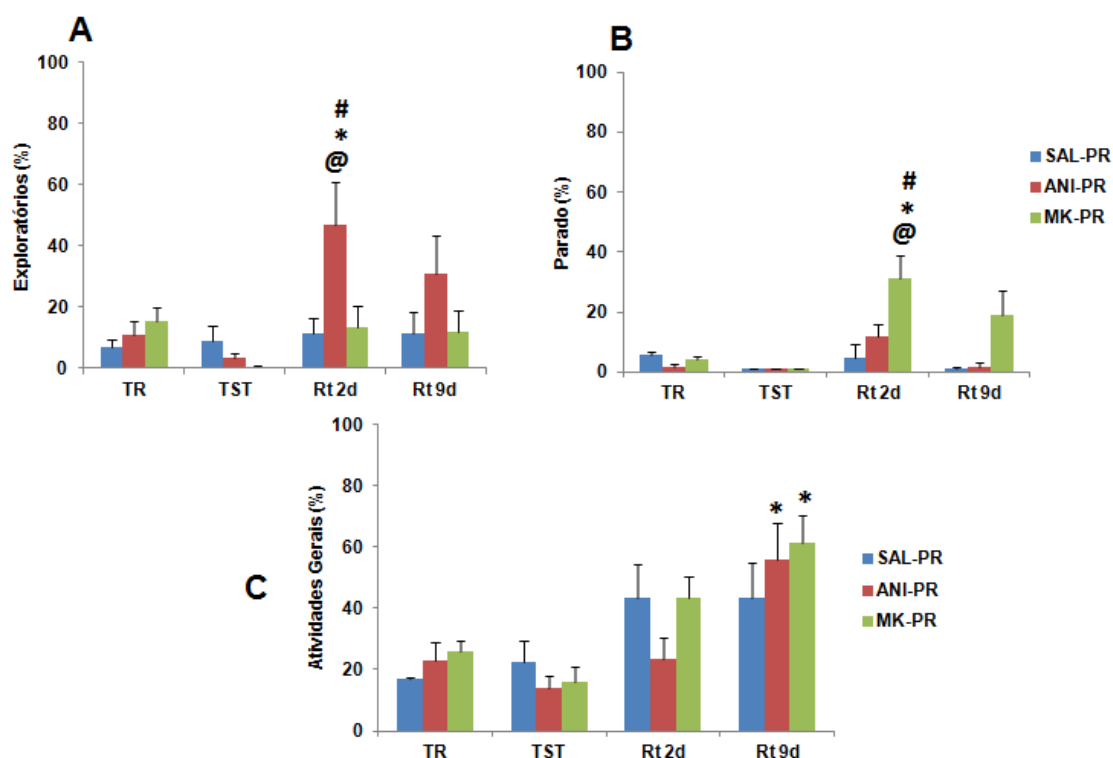
A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre os grupos para ocorrência de PAR ($F_{3,27} = 2,74$; $p < 0,05$). Houve diferença significativa entre as sessões ($F_{3,27} = 2,39$; $p < 0,05$) e interação entre grupos e sessão ($F_{2,6} = 4,72$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a sessão de Rt 2d do grupo MK-PR diferiu significativamente de todas as sessões de SAL-PR e ANI-PR, como também do treino e teste dele mesmo ($p < 0,05$).

A Figura 20C mostra os comportamentos de AG considerados pela somatória dos comportamentos de manutenção, locomoção e movimentos isolados. Nota-se que nas sessões de treino e de teste os três grupos apresentaram duração ao redor de 20%. Durante o Rt 2d mantiveram valores entre 20% e 40%. No Rt 9d os grupos ANI-PR e MK-PR apresentaram valores em torno de 60%.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre sessões para ocorrência de AG ($F_{3,27} = 11,61$; $p < 0,0001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a sessão de Rt 9d dos grupos MK-PR e ANI-PR diferiram

significativamente do treino e teste dos três grupos, como também do Rt 2d do grupo ANI-PR ($p < 0,05$).

Figura 20 - Porcentagem média (+EPM) da duração total dos comportamentos de EXP, PAR e AG durante as sessões de treino, teste, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR

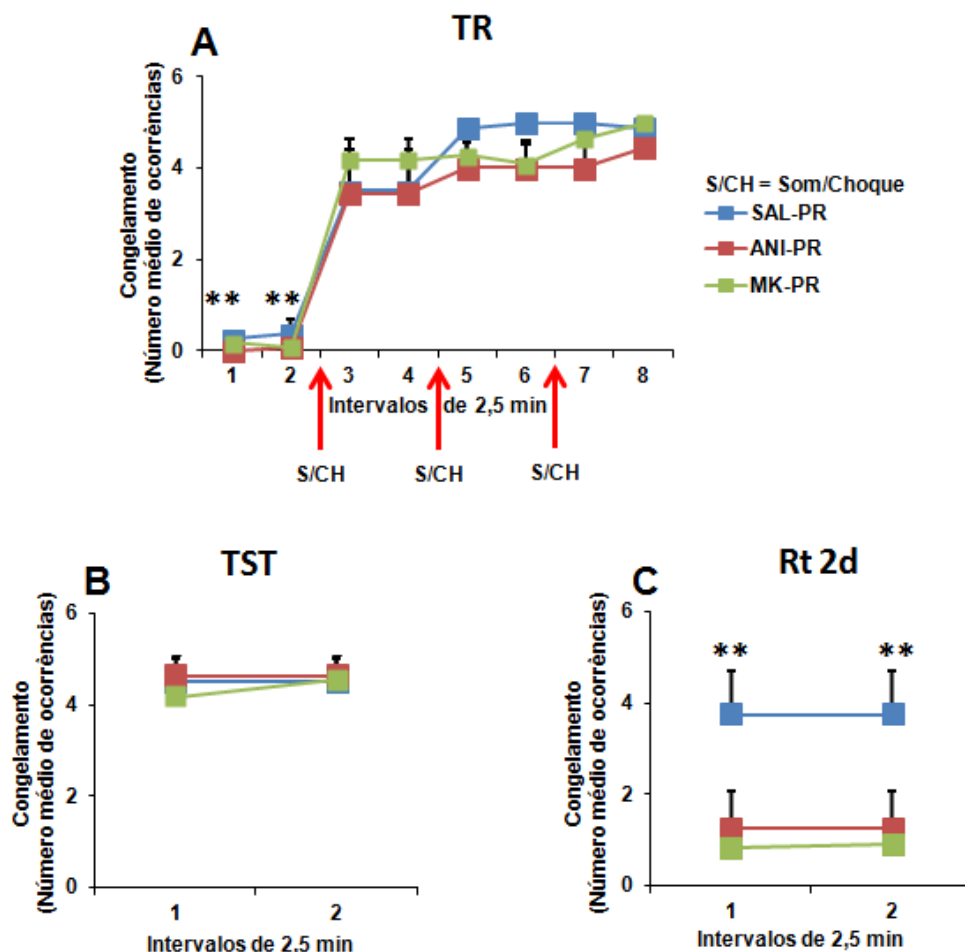


(A) @ diferença significativa em relação aos grupos SAL-PR e MK-PR ($p < 0,001$). * diferença significativa em relação às sessões de treino e teste de SAL-PR e MK-PR e dele mesmo ($p < 0,001$). # diferença significativa em relação ao Rt 2d e 9d de SAL-PR e MK-PR ($p < 0,05$). (B) @ diferença significativa em relação aos grupos SAL-PR e ANI-PR ($p < 0,05$). * diferença significativa em relação a todas as sessões dos grupos SAL-PR e ANI-PR, treino e teste dele mesmo ($p < 0,05$). # diferença significativa em relação ao Rt 2d dos grupos SAL-PR e ANI-PR ($p < 0,05$). (C) * diferença significativa em relação ao treino e teste dos três grupos e Rt 2d de ANI-PR ($p < 0,05$).

A Figura 21 mostra os dados médios da ocorrência do comportamento de CONG analisado durante a sessão do treino, teste e Rt 2d ao contexto, em função dos blocos de cinco intervalos de registro (2,5 min) obtendo-se assim um total de oito (8) blocos de intervalos de registro para a sessão de treino, 2 blocos para as sessões de teste e Rt 2d. Os grupos ANI-PR e MK-PR apresentaram redução da ocorrência de CONG na sessão de Rt 2d em relação à sessão de Rt 2d do grupo SAL-PR, sugerindo prejuízo na reconsolidação da memória aversiva contextual de longa duração nos grupos tratados

com anisomicina e MK-801. Na sessão de treino o comportamento de CONG aumentou significativamente após o primeiro pareamento dos estímulos som-choque, e permaneceu alto até o final da sessão (Figura 21A). A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de treino indicou diferença significativa entre os blocos ($F_{2,7} = 108,05$; $p < 0,0001$), embora não tenha ocorrido diferença entre grupos ($F_{2,27} = 0,73$; $p > 0,05$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que essas diferenças foram significantes para os blocos 1 e 2 dos três grupos em relação a todos os outros blocos ($p < 0,05$). Durante o teste de evocação da memória o comportamento de congelamento continuou alto semelhante ao final da sessão de treino (Figura 21B). A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de teste não mostrou diferença entre os grupos ($F_{2,27} = 0,11$; $p > 0,05$). Na figura 21C tem-se a sessão de Rt 2d. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas confirmou diferença significativa entre grupos ($F_{2,27} = 5,55$; $p < 0,05$) e blocos ($F_{2,1} = 13,68$; $p > 0,0001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que os dois blocos da sessão de Rt 2d do grupo SAL-PR foram diferentes dos blocos dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,05$).

Figura 21 - (A) Valores médios (+EPM) de CONG registrado nas sessões de treino, (B) teste e (C) Rt 2d do condicionamento aversivo ao contexto



(A) ** diferença significativa em relação a todos os outros blocos dos três grupos ($p < 0,0001$). (B) Não houve diferença significativa. (C) ** diferença significativa em relação aos dois blocos dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,0001$), mas não entre os blocos do grupo SAL-PR.

A Figura 22 mostra os dados médios da ocorrência do comportamento de CONG analisado durante a sessão de extinção (30 min), Rt 9d, em função dos blocos de cinco intervalos de registro (2,5 min) obtendo-se assim, um total de doze (12) blocos de intervalos de registro.

Na figura 22A têm-se os cinco minutos iniciais da sessão. O grupo SAL-PR iniciou a sessão de extinção com elevada ocorrência do comportamento de CONG, o grupo ANI-PR também apresentou ocorrência, mas em menor extensão e o grupo MK-PR praticamente não mostrou a ocorrência do comportamento. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para os cinco minutos iniciais da sessão de Rt 9d

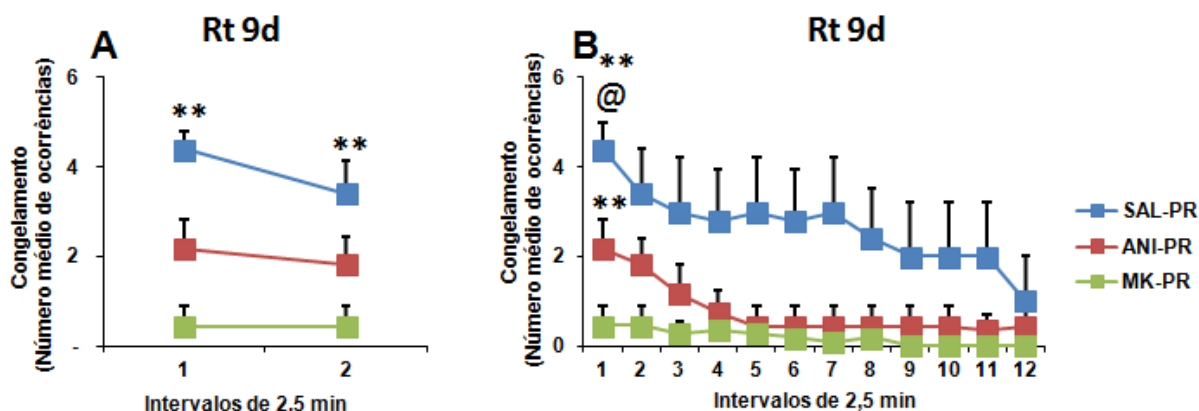
mostrou diferença entre os grupos ($F_{2,27} = 9,32$; $p < 0,001$), entre blocos ($F_{2,1} = 6,65$; $p < 0,05$) e interação entre grupos e blocos ($F_{2,2} = 4,01$; $p < 0,05$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o grupo SAL-PR foi diferente dos grupos MK-PR e ANI-PR e, que seus blocos 1 e 2 foram diferentes de todos os blocos dos grupos MK-PR e ANI-PR ($p < 0,05$).

Na figura 22B é apresentada a sessão completa do Rt 9d. Os grupos SAL-PR e ANI-PR tiveram um decréscimo gradual do comportamento de CONG durante os primeiros quatro blocos. O grupo ANI-PR estabilizou neste bloco, mas o grupo SAL-PR continuou a sessão com uma curva de oscilação até o oitavo bloco e, novamente ocorreu um decréscimo até se aproximar do ANI-PR no final da sessão de 30 min, chegando estes grupos próximos da total extinção da memória aversiva contextual. Entretanto, o grupo MK-PR, continuou a sessão sem apresentar o comportamento de CONG.

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de Rt 9d mostrou diferença entre os grupos ($F_{2,27} = 5,59$; $p < 0,01$), entre blocos ($F_{2,11} = 10,89$; $p < 0,0001$) e interação entre grupos e blocos ($F_{2,22} = 2,56$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o grupo SAL-PR foi significativamente diferente do MK-PR. O primeiro bloco do grupo SAL-PR teve diferenças significativas em relação a todos os blocos dos grupos ANI-PR e MK-PR, bem como dos seus próprios blocos a partir do sexto ($p < 0,05$). O primeiro bloco do grupo ANI-PR foi significativamente diferente do grupo MK-PR a partir do seu terceiro bloco ($p < 0,05$). O grupo MK não apresentou diferenças entre blocos.

Figura 22 - (A) Valores médios (+EPM) de CONG registrados nos 5 minutos iniciais da sessão do Rt 9d e (B) sessão completa do Rt 9d para os animais do grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR do condicionamento aversivo ao contexto



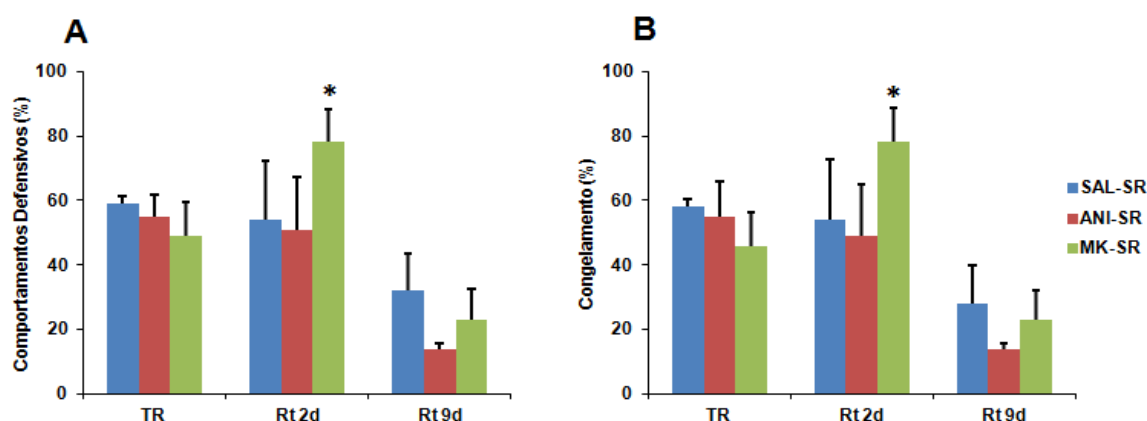
(A) ** diferença significativa em relação aos dois blocos dos grupos ANI-PR e MK-PR ($p < 0,001$); (B) @ significantemente diferente do grupo MK-PR; ** diferença significativa em relação a todos os blocos dos grupos ANI-PR e MK-PR, bem como dos seus próprios blocos a partir do sexto ($p < 0,001$); ** o primeiro bloco do grupo ANI-PR apresentou diferenças significativas em relação ao grupo MK-PR a partir do terceiro bloco ($p < 0,05$).

Na Figura 23 tem-se a porcentagem de ocorrência de CD e CONG para os animais que não foram expostos à sessão de teste, porém receberam infusão intrahipocampal de solução salina (grupo SAL-SR), anisomicina (grupo ANI-SR) e MK-801 (grupo MK), no mesmo tempo, 24 horas depois do treino, que os demais grupos.

Na sessão de treino apresentaram valores percentuais para CD em torno de 50%. Durante o Rt 2d o grupo MK-SR apresentou valores percentuais maiores, em torno de 80%, enquanto que os grupos ANI-SR e SAL-SR mantiveram-se em torno de 50%. Já no Rt 9d os três grupos apresentaram decréscimo nos valores percentuais de CD. O grupo ANI-SR com valores por volta de 15%, MK-SR de 20% e SAL-SR de 30% (Figura 23A). A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para CD mostrou diferença significativa entre as sessões ($F_{2,15} = 10,87$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que o Rt 2d do grupo MK-SR foi diferente das sessões de Rt 9d dele mesmo e do grupo ANI-SR ($p < 0,05$).

Na figura 23B tem-se a porcentagem de ocorrência do comportamento de CONG, para os grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR, e nota-se que os valores são semelhantes aos dos CD. Portanto, os comportamentos defensivos foram praticamente de CONG. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para CONG mostrou diferença significativa entre as sessões ($F_{3,27} = 11,02$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a sessão de Rt 2d do grupo MK-SR foi diferente das sessões de Rt 9d de ANI-SR e dele mesmo ($p < 0,05$).

Figura 23 - Porcentagem média (+EPM) da duração total dos CD e CONG durante as sessões de treino, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais dos grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR



(A e B) * diferença significativa em relação às sessões de Rt 9d dos grupos ANI-SR e MK-SR ($p < 0,001$).

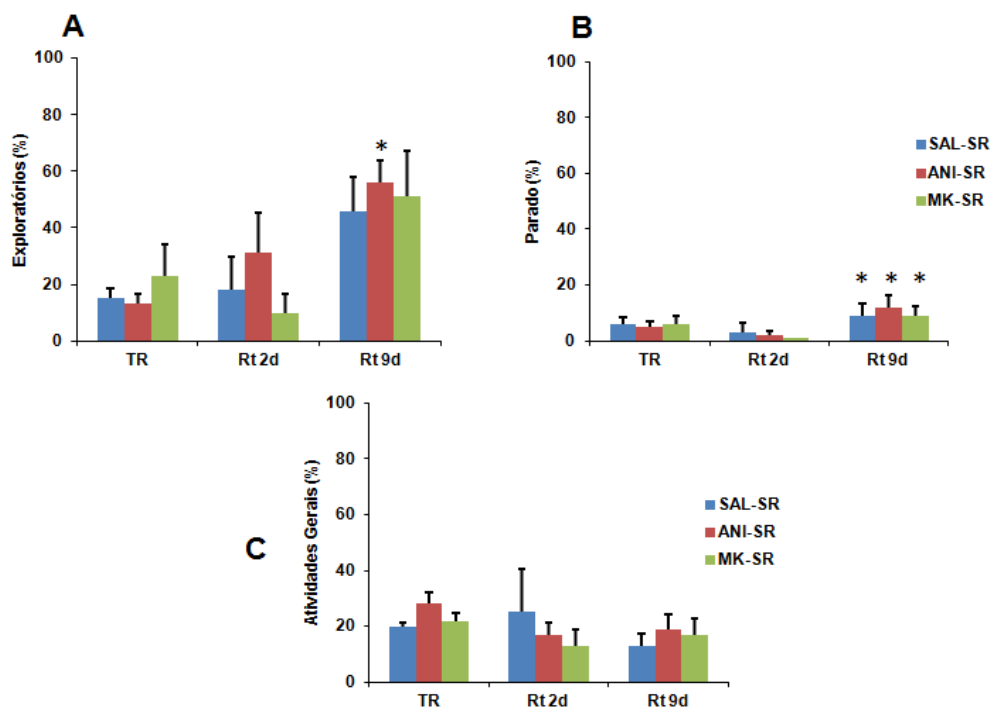
Na Figura 24 têm-se os comportamentos EXP, PAR e AG para os grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR.

Na figura 24A os grupos apresentam valores percentuais para o comportamento EXP, na sessão de treino ao redor de 15%. Na sessão de Rt 2d variam de 5% a 20% e no Rt 9d variam de 45% a 55%. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre sessões para ocorrência de EXP ($F_{2,15} = 11,79$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a sessão de Rt 9d do grupo ANI-SR foi diferente da sessão de Rt 2d de MK-SR ($p < 0,05$).

Em 24B, os grupos controle apresentam no treino, valores percentuais para PAR, em torno de 5%, no Rt 2d de 2% e na sessão de Rt 9d de 10%. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas indicou diferenças significativas entre sessões para ocorrência de PAR ($F_{2,15} = 5,37$; $p < 0,05$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a sessão de Rt 9d foi diferente da Rt 2d ($p < 0,05$).

Na figura 24C tem-se os valores percentuais de ocorrência de AG, que no treino, no Rt 2d e Rt 9d estão ao redor de 20%. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas não indicou diferenças significativas para AG ($F_{2,15} = 0,31$; $p > 0,05$).

Figura 24 - Porcentagem média (+EPM) da duração total dos comportamentos de EXP, PAR e AG durante as sessões de treino, Rt 2d e Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR



(A) * diferença significativa em relação à sessão de Rt 2d do grupo MK-SR ($p < 0,05$). (B) * a sessão Rt 9d apresenta diferença significativa em relação às sessões de Rt 2d ($p < 0,05$). (C) não apresentou diferenças significativas.

A Figura 25 mostra os dados médios da ocorrência do comportamento de CONG, analisado durante a sessão do treino, Rt 2d ao contexto, os cinco minutos iniciais da sessão de Rt 9d e sessão completa de Rt 9d em função dos blocos de cinco intervalos de registro (2,5 min) obtendo-se assim um total de oito (8) blocos de intervalos de registro para a sessão de treino, dois (2) blocos para a sessão de Rt 2d, e doze (12) blocos para a sessão de Rt 9d, para os grupos controle SAL-SR, ANI-SR e MK-SR.

Na sessão de treino o comportamento de CONG aumentou significativamente após o primeiro pareamento dos estímulos som-choque, e permaneceu alto até o final da sessão (Figura 25A).

A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de treino indicou diferença significativa entre os blocos ($F_{2,7} = 63,83$; $p < 0,0001$), embora não tenha ocorrido diferença entre grupos ($F_{2,27} = 0,77$; $p > 0,05$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que essas diferenças foram significativas para os blocos 1 e 2 dos três grupos em relação a todos os outros blocos ($p < 0.05$).

Na figura 25B tem-se a sessão de Rt 2d, que mostra os três grupos com elevada ocorrência média de CONG. A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas não indicou diferenças ($F_{2,27} = 1,44$; $p > 0,05$).

A Figura 25C mostra os cinco minutos iniciais da sessão de Rt 9d; no primeiro bloco da sessão os três grupos apresentaram elevada ocorrência média de CONG, já no segundo bloco é evidenciado um decréscimo na ocorrência.

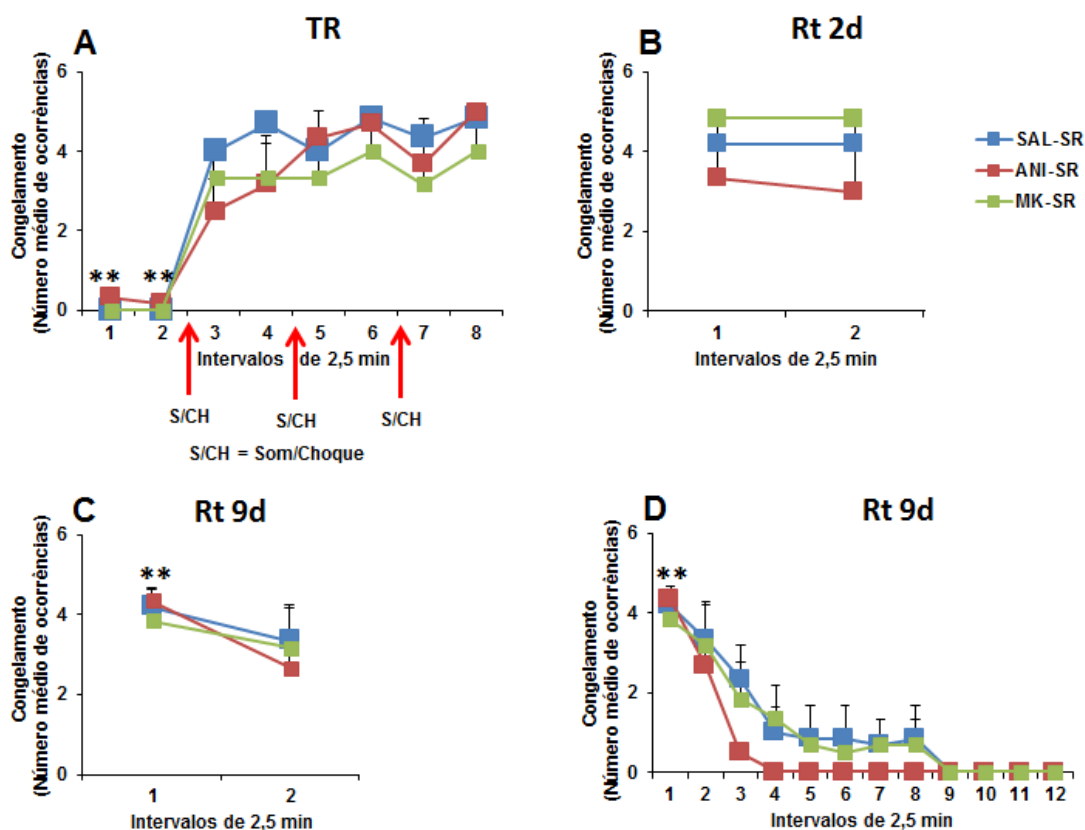
A análise estatística com ANOVA de medidas repetidas para os cinco minutos iniciais da sessão de Rt 9d indicou diferença significativa entre blocos ($F_{2,1} = 15,43$; $p < 0,01$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que o primeiro bloco de ANI-SR foi significativamente diferente do seu segundo bloco ($p < 0.05$).

Na figura 25D é mostrada a sessão completa do Rt 9d, na qual os três grupos apresentam um declínio de ocorrência de CONG até o quarto bloco, com ANI-SR chegando a zero. Os grupos SAL-SR e MK-SR estabilizam a ocorrência de CONG num valor médio de 1. Depois do oitavo bloco esses dois últimos grupos apresentam outro declínio, e terminam a sessão com completa extinção de CONG. A análise estatística

com ANOVA de medidas repetidas para a sessão de Rt 9d indicou diferenças significativas entre blocos ($F_{2,11} = 32,36$; $p < 0,0001$).

As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que o primeiro bloco de ANI-SR foi significativamente diferente a partir do terceiro bloco de MK-SR e dos demais blocos dele mesmo, como também a partir do quarto bloco de SAL-SR ($p < 0,05$).

Figura 25 - (A) Valores médios (+EPM) de CONG registrado nas sessões de treino, (B) Rt 2d, (C) cinco minutos iniciais da sessão de Rt 9d e (D) sessão completa de Rt 9d do condicionamento aversivo ao contexto, para os animais do grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR



(A) ** diferença significativa em relação a todos os outros blocos dos três grupos ($p < 0,0001$). (B) Não houve diferença significativa. (C) ** diferença significativa do primeiro bloco de ANI-SR em relação ao seu segundo bloco ($p < 0,01$), (D) ** diferença significativa do grupo ANI-SR em relação ao grupo MK-SR a partir do seu terceiro bloco, dos demais blocos dele mesmo, e a partir do quarto bloco do grupo SAL-SR ($p < 0,05$).

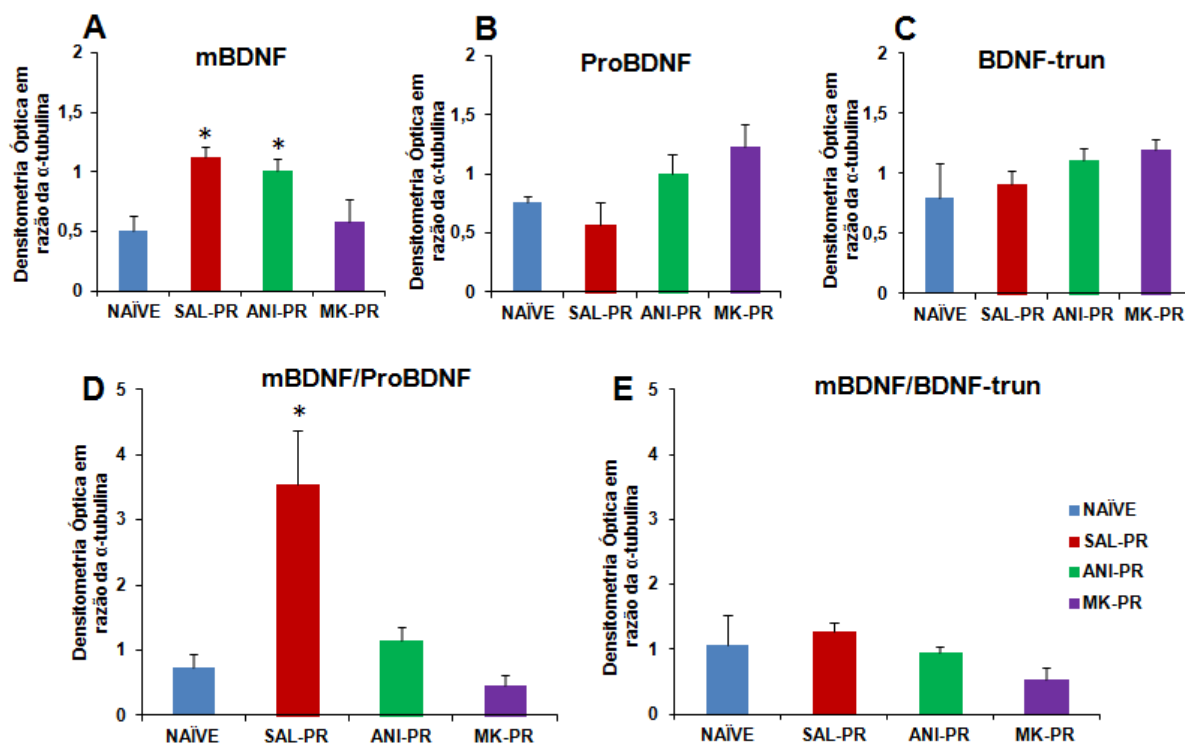
4.2.2. Análise da densitometria óptica de BDNF e ZENK

Na Figura 26 observam-se valores da densitometria óptica das bandas imunorreativas à proteína BDNF-madura (mBDNF; 26A), BDNF-precursora (proBDNF; 26B) e BDNF-truncada (BDNF-trun; 26C) normalizadas pela quantidade total de proteína alfa-tubulina detectadas no hipocampo após o Rt 9d de pombos dos grupos SAL-PR, ANI-PR, MK-PR e dos controles NAÏVE. Também são apresentados valores da razão mBDNF/proBDNF (26D) e mBDNF/BDNF-trun (26E). As imagens das bandas imunorreativas para cada proteína e da alfa-tubulina são mostradas abaixo dos respectivos gráficos. Os dados de densitometria óptica de cada uma das isoformas de BDNF, bem como dos valores referentes às razões mBDNF/proBDNF e mBDNF/BDNF-trun foram analisados estatisticamente com o teste ANOVA de uma via. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto ao conteúdo da isoforma BDNF-trun ($F_{3,16} = 1,14$; $p > 0,05$). Para a isoforma proBDNF foi encontrada uma diferença marginal ($F_{3,16} = 2,63$; $p = 0,08$).

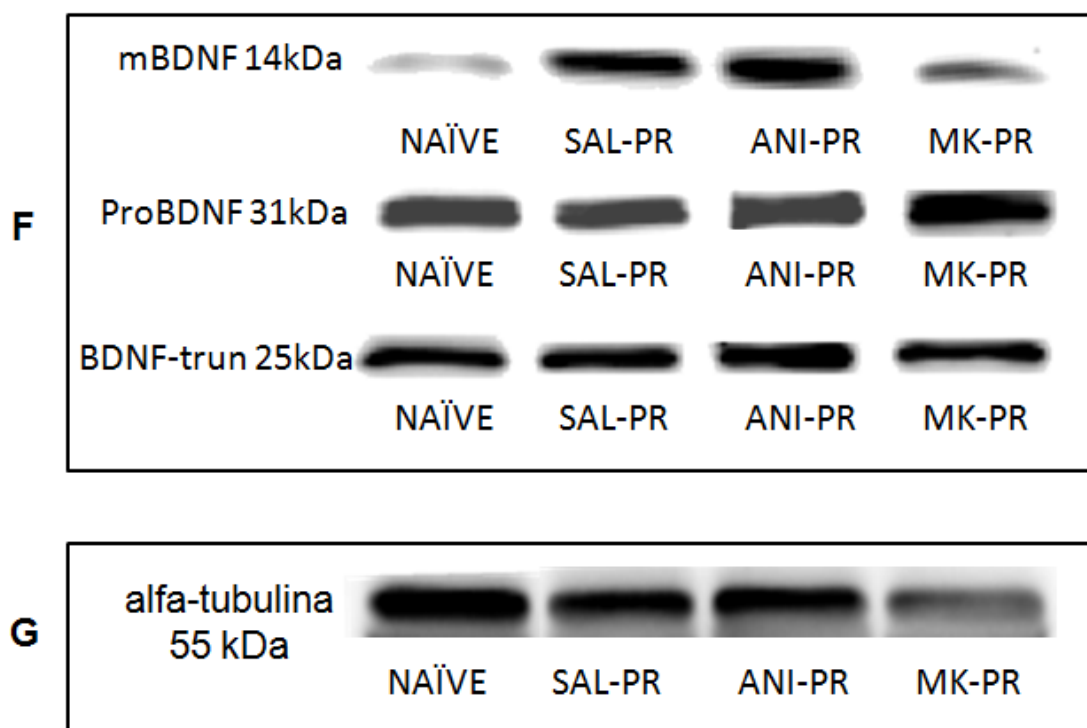
O teste ANOVA de uma via indicou para a isoforma mBDNF diferença significativa ($F_{3,16} = 9,18$; $p < 0,001$). As análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que os grupos ANI-PR e SAL-PR foram diferentes de MK-PR e NAÏVE ($p < 0,05$).

O teste ANOVA de uma via indicou para os valores de razão mBDNF/proBDNF diferença significativa ($F_{3,16} = 6,14$; $p < 0,05$) e as análises com múltiplas comparações *post hoc* realizadas com o teste Tukey-Kramer mostraram que o grupo SAL-PR foi diferente de todos os outros grupos ($p < 0,05$). Para os valores de razão mBDNF/BDNF-trun não indicou diferenças ($F_{3,16} = 1,39$; $p > 0,05$). Na figura 26F têm-se as bandas das isoformas mBDNF, proBDNF, BDNF-trun para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. Na figura 26G as bandas de alfa-tubulina.

Figuras 26 – Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para as isoformas da proteína BDNF em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina



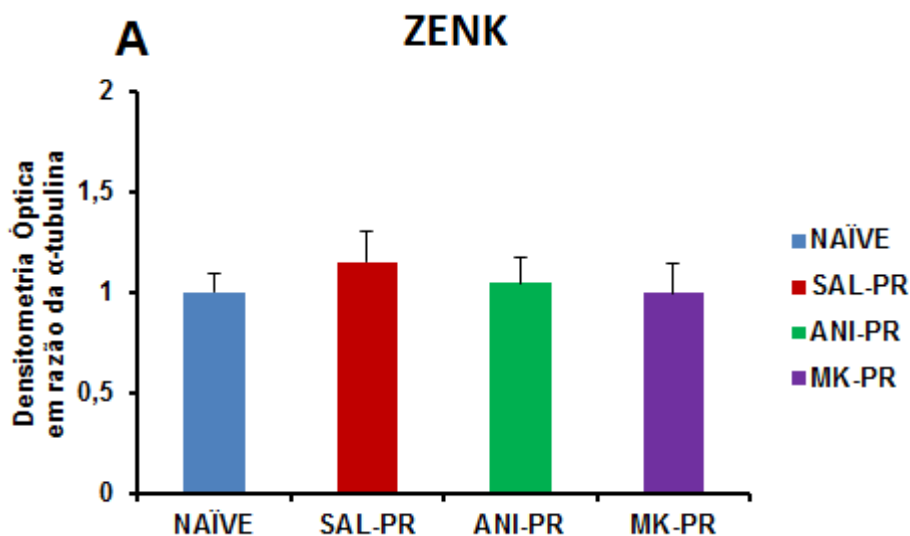
(A) mBDNF; (B) proBDNF; (C) BDNFtrun; (D) razão mBDNF/proBDNF e (E) razão mBDNF/BDNF-trun. (A) * diferença significativa em relação aos grupos MK-SR e NAÏVE. (D) * diferença significativa em relação aos demais grupos.



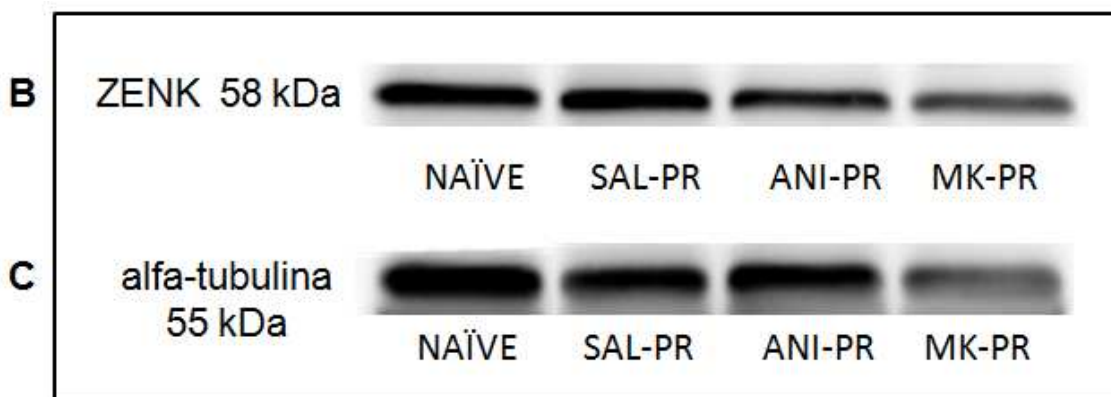
(F) Bandas imunorreativas representativas para mBDNF, ProBDNF e BDNFtrun. (G) quantidade total da proteína alfa-tubulina.

Na Figura 27 tem-se os valores da densitometria óptica das bandas imunorreativas à proteína ZENK (27A) normalizadas pela quantidade total de proteína alfa-tubulina detectadas no hipocampo após o Rt 9d de pombos dos grupos SAL-PR, ANI-PR, MK-PR e dos controles NAÏVE, (27B) bandas imunorreativas e (27C) da alfa-tubulina. Os dados de densitometria óptica de ZENK foram analisados estatisticamente com o teste ANOVA de uma via e não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($F_{3,16} = 0,06$; $p > 0,05$).

Figuras 27 – Médias (+EPM) das análises densitométricas das bandas imunorreativas para a proteína ZENK em amostras de homogenato de hipocampo normalizadas com a quantidade total de proteínas para os grupos NAÏVE, SAL-PR, ANI-PR e MK-PR em razão da α -tubulina



(A) Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$; ANOVA de uma via).



(B) Bandas imunorreativas representativas para ZENK. (C) Bandas imunorreativas representativas para ZENK quantidade total da proteína alfa-tubulina.

5. DISCUSSÃO

O condicionamento aversivo ao contexto resulta de um treinamento onde há uma associação entre um estímulo inócuo e um estímulo aversivo incondicionado (EI), tal como a associação som-choque usada neste estudo, sendo que nesta situação o ambiente onde esses estímulos foram apresentados, o contexto do condicionamento som-choque, adquire propriedades aversivas condicionadas (EC) que são eliciadoras de comportamentos defensivos. Assim, os pombos que foram treinados com o condicionamento som-choque e testados no mesmo contexto após 24 h apresentaram elevada ocorrência de comportamento de congelamento, evidenciando que a memória de medo ao contexto foi adquirida, consolidada e evocada. A reativação de uma memória durante a reexposição ao contexto no teste induz um processo de plasticidade que é conhecida como reconsolidação da memória (NADER & HARDT, 2009). A reconsolidação pode servir para atualizar as memórias e é reconhecida como um processo crítico para a memória de longo prazo. No presente estudo este processo foi particularmente analisado no Experimento1. Quando a reexposição ao EC sem o EI é prolongada a reativação pode ser seguida pelo processo de extinção. No presente estudo analisou-se o processo de extinção da memória de medo contextual no Experimento 2.

Os animais do grupo SAL-PR (Experimentos1 e 2) que foram infundidos com a solução salina, imediatamente após o final do teste de evocação, quando recolocados no mesmo contexto de condicionamento, 2 dias depois do teste, (Rt 2d), exibiram uma elevada ocorrência do comportamento de congelamento, o que denota uma reativação da memória aversiva contextual e sua intacta reconsolidação. Ou seja, a infusão de salina intrahipocampal não prejudicou o processo de reconsolidação. Contudo, nos animais dos grupos ANI-PR e MK-PR (Experimentos 1 e 2) que receberam infusão intrahipocampal de ANI ou de MK-801, após o teste de evocação, quando retestados 2 dias depois (Rt 2d) apresentaram redução significativa da ocorrência de congelamento, indicando um prejuízo na reconsolidação da memória e, conseqüentemente, da sua reativação.

Como os animais do grupo SAL-PR não tiveram prejuízo na reconsolidação no Rt 2d e os grupos ANI-PR e MK-PR mostraram prejuízo, pode-se afirmar que tanto a ANI como o MK-801 interferiram nos mecanismos celulares e moleculares necessários à

reconsolidação da memória de medo contextual hipocampo-dependente. Essa interpretação é reforçada pelos dados dos grupos ANI-SR e MK-SR, os quais não foram submetidos ao teste de evocação, mas receberam infusões intrahipocampais de ANI ou de MK-801, 24 h após o treino. Ou seja, a droga foi infundida sem que tivesse ocorrido evocação da memória, e, desse modo, não houve o efeito prejudicial da droga sobre o processo de reconsolidação. Então, pode-se deduzir que o teste de evocação da memória previamente consolidada, seja uma condição essencial para a reconsolidação da memória de medo contextual (LEE *et al.*, 2006; LEE & HYND, 2013).

Uma vez que o reteste ao contexto constitui um teste de reativação da memória aversiva de longa duração (Rt 2d), pode-se interpretar que os animais do grupo SAL-PR, demonstraram a memória de longa duração do contexto potencialmente perigoso na medida que expressaram alta ocorrência do comportamento de congelamento. Esses dados indicam que houve reconsolidação da memória aversiva e (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; LEDOUX, 1994; SANDERS *et al.*, 2003). Do mesmo modo, os animais que não tiveram interferência farmacológica no processo de reconsolidação, grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR, mostraram a reativação da memória aversiva ao contexto sessão de Rt 2d, ou seja, exibindo elevada ocorrência de congelamento.

No Experimento 2, além da análise da evocação da memória aversiva no teste e da sua reativação no reteste 2d, os pombos passaram por uma sessão de reteste de memória de longa duração, 9 dias após o teste (Rt 9d). Esse teste teve 30 min de duração, de modo a permitir analisar tanto a reconsolidação (nos 5 min iniciais), como a extinção da memória de longa duração. Conforme observado nos cinco minutos iniciais dos Rt 9d para cada um dos grupos, os valores de ocorrência de congelamento indicaram a reativação da memória no início da sessão para os grupos SAL-PR e ANI-PR, SAL-SR, ANI-SR e MK-SR. Com a continuada exposição ao contexto durante os 25 min finais do teste, verificou-se que a ocorrência de congelamento foi decaindo ao longo do tempo, demonstrando que a reativação inicial da memória foi seguida pelo processo de extinção. Tais observações não ocorreram para os animais do grupo MK-PR, os quais apresentaram a ocorrência de congelamento próxima a zero desde o início da sessão de Rt 9d. Desse modo, embora os animais ANI-PR tenham apresentado

evidências de recuperação espontânea do comportamento de congelamento, o mesmo não pode ser afirmado para o grupo MK-PR. Ambos os grupos, ANI-PR e MK-PR apresentaram um padrão de comportamento semelhante na sessão de Rt 2d com robusta diminuição na ocorrência de congelamento quando comparados ao grupo SAL-PR. Esses dados sugerem que a infusão intrahipocampal de ANI e MK-801 após o teste teria um efeito semelhante sobre a reconsolidação da memória de medo contextual. Porém, essa suposição não é confirmada quando se analisa os dados do grupo MK-PR na sessão de Rt 9d considerando que o grupo ANI-PR teve recuperação espontânea, embora de baixa amplitude, enquanto que o mesmo não foi observado para o grupo MK-PR. Assim, esses dados sugerem que o bloqueio do receptor NMDA imediatamente após o teste teria afetado de uma maneira irreversível a reconsolidação da memória, enquanto que o efeito da ANI não teria prejudicado irreversivelmente o traço de memória.

Na interpretação dos dados dos animais do grupo ANI-PR que mostraram recuperação espontânea da memória no início da sessão de Rt 9d e tiveram extinção no final da sessão, é interessante lembrar que a ANI age no ribossomo inibindo a ação da peptil transferase, ou seja, na tradução das proteínas, no nível citoplasmático (TYLER *et al.*, 2002; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; LEE & HYND, 2013). No entanto, para os animais do grupo MK-PR, que não apresentaram recuperação da memória desde o início até o final da sessão Rt 9, deve-se considerar que o MK-801 bloqueia os receptores NMDA e, assim inibe as inúmeras cascatas de eventos bioquímicos que se iniciam com o aumento do influxo de cálcio, as quais vão regular a transcrição gênica e controlar mecanismos essenciais para a memória de longa duração. Isto poderia explicar os efeitos diferentes da ANI e do MK-801 no início da sessão de Rt 9d nos grupos ANI-PR e MK-PR.

Os grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR, que não tiveram a sessão de teste de evocação da memória apresentaram alta ocorrência de congelamento, tanto semelhante nas respectivas sessões de Rt 2d e no início da sessão Rt 9d, com padrão comportamental semelhante ao do grupo SAL-PR. Isto denota que apesar de terem sido tratados com ANI e com MK-801 não sofreram prejuízo na reconsolidação da

memória. Esses três grupos apresentaram um decréscimo gradual de congelamento a partir do segundo bloco de 2,5 min de reexposição ao contexto, sendo que o grupo ANI-SR entrou em completa extinção a partir do quarto bloco, enquanto os grupos MK-SR e SAL-SR entraram em completa extinção a partir do nono bloco. Dessa forma, quando os tratamentos com ANI e MK-801 foram aplicados independentemente do teste não afetaram a persistência e nem a extinção da memória.

As análises das diferentes classes comportamentais permitiram avaliar que durante o treino e teste no Experimento 1 e 2 os animais apresentaram ocorrências de diferentes categorias de comportamentos mostrando que os diferentes grupos tiveram um padrão comportamental semelhante. De fato durante o treino observou-se um aumento de congelamento após o primeiro pareamento som-choque. Os pombos reagiram à apresentação do choque com reações de sobressalto e locomoção e também algumas tentativas de esvoaçar. Essas respostas eram associadas com a exploração de curta duração que eram então seguidas de imobilidade tensa, característica da resposta de congelamento. Esse padrão de comportamento resultante da estimulação aversiva promovida pelo choque é comparável àquelas já descritas para roedores e pombos (REIS *et al.*, 1999; FANSELOW, 2000; BAST *et al.*, 2001; BRITO *et al.*, 2006). O congelamento é considerado um comportamento de defesa que ocorre quando a possibilidade de perigo é elevada, principalmente quando não existe a possibilidade de fuga (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Durante o teste, quando os pombos foram reexpostos ao contexto, onde ocorreu a apresentação som-choque observou-se a predominância do congelamento, indicando que o contexto adquiriu o valor de estímulo aversivo condicionado eliciador de comportamento defensivo.

Durante as sessão de Rt 2d, os grupos ANI-PR e MK-PR (Experimentos 1 e 2) apresentaram baixa ocorrência de comportamentos defensivos como o congelamento, mas tiveram elevada ocorrência de outros comportamentos como os EXP, PAR e AG, característicos de um ambiente neutro, que não oferece perigo. Esses dados reforçam o prejuízo na reconsolidação da memória mostrado pelos animais desses grupos. De maneira oposta, os animais ANI-SR, SAL-SR e MK-SR apresentaram expressão elevada de congelamento durante o Rt 2d indicativa da memória de que o contexto era

potencialmente perigoso. Como esses animais não passaram pelo teste, esses dados indicam que a memória consolidada durante o treino foi evocada no Rt 2d (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; LEDOUX, 1994; SANDERS *et al.*, 2003).

Durante a sessão de Rt 9d (Experimento 2), o grupo ANI-PR apresentou baixa ocorrência de comportamentos defensivos como o congelamento, mas teve elevada ocorrência de EXP e AG, já o grupo MK-PR expressou mais comportamentos de PAR e AG. Os grupos SAL-SR, ANI-SR e MK-SR tiveram elevada ocorrência de comportamentos exploratórios. Esses dados reforçam a evidência do processo de extinção indicando que houve o aumento de comportamentos indicativos da perda do valor aversivo do contexto. De acordo com a proposição de que durante a extinção ocorre outro processo de aprendizagem pode-se dizer que os animais aprenderam que o contexto deixou de ser perigoso. Desse modo, pode-se considerar que as análises das diferentes categorias de comportamentos que são exibidas em sessões de treinamento, teste, reteste e extinção do condicionamento clássico aversivo ampliam a compreensão das relações estabelecidas entre os estímulos e os processos de memória.

Em sessões de longa duração, a extinção ocorre porque quando o EC persiste ou é repetido sem a presença do EI, acontece um enfraquecimento das relações de contingência entre EC-EI, levando a um progressivo enfraquecimento da resposta condicionada e da expressão do medo (KIRTLEY & THOMAS, 2010). Atualmente se considera que a extinção não é permanente, porque ela não modifica diretamente a memória existente, o que pode ser evidenciado pela ocorrência de recuperação espontânea. Ao contrário, a extinção levaria à formação de uma nova memória que suprimiria a ativação do traço inicial (PAVLOV, 1927; ROWE & CRASKE, 1998; PEDREIRA & MALDONADO, 2003; SUZUKI *et al.*, 2004; LEE, MILTON & EVERITT, 2006; KIRTLEY & THOMAS, 2010). A eficácia desta inibição é fortemente contingente às variáveis espaciais, sensoriais e temporais (WESTBROOK *et al.*, 2002). A extinção parece empregar muitos dos mesmos mecanismos de consolidação como os requisitados pela aquisição de uma associação de estímulos (LIN, *et al.*, 2003; SANTINI *et al.*, 2004), e presumivelmente, seja também dependente de síntese de proteína, uma

vez que ocorre na extinção a aquisição de nova memória (BOUTON, 2004). Adicionalmente, os receptores NMDA atuam tanto nos processos de reconsolidação como de extinção da memória (BAKER & AZORLOZA, 1996; SUZUKI *et al.*, 2004). Muitos estudos relatam que quando uma memória estabilizada é reativada, esta se torna sensível a prejuízos e a sua manutenção requer nova síntese de proteínas (NADER *et al.*, 2000; DEBIEC., *et al.*, 2002; DUDAI, 2002; LEE, 2008; LEE & HYND, 2013). De fato, a formação de memória de longa duração a partir de experiências de aprendizagem associativa depende de transcrição gênica e síntese proteica induzida pelo processo de condicionamento. 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 (MAYFORD & KANDEL, 1999).

Por outro lado, como visto no presente estudo, a infusão de MK-801, durante o processo de reconsolidação iniciado durante o teste, alterou a funcionalidade dos receptores NMDA e, conseqüentemente, os processos requeridos para a reconsolidação, persistência e extinção da memória de medo contextual dependente de hipocampo também foram afetados (KIM & FANSELOW, 1992; FANSELOW & KIM, 1994; BAKER & AZORLOSA, 1996). Adicionalmente, a ativação dos receptores NMDA tem um papel fundamental no aumento da expressão de RNA mensageiro de BDNF no hipocampo, como demonstrado em trabalhos com mamíferos (HUGHES *et al.*, 1993; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; LEE & HYND, 2013; KIRTLEY & THOMAS, 2010), e também com aves (FREEMAN & ROSE, 1995; ROSE, 2000). O hipocampo é uma estrutura que tem os mais altos níveis de RNA mensageiro de BDNF entre todas as regiões do cérebro (HOFER *et al.*, 1990). Deve-se notar que o BDNF tem uma implicação direta na função dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no hipocampo, devido à sua habilidade em facilitar o influxo de Ca^{2+} na espícula dendrítica, podendo assim modular a transmissão sináptica hipocampal, pela sua ação em aumentar a atividade dos receptores NMDA, mecanismos celulares envolvidos em aprendizagem e memória (LEVINE *et al.*, 1995; LEVINE *et al.*, 1998). Adicionalmente, o BDNF e seu receptor TrkB são co-expressos muitas vezes no mesmo neurônio

(KOKAIA *et al.*, 1993), e localizados em espículas dendríticas, no núcleo, ao redor do citoplasma, em axônios e terminais axônicos de neurônios hipocampais (MURER *et al.*, 2001). Assim, o BDNF quando ativa seu receptor TrkB pode disparar sinal de transdução tanto em neurônios pré como pós-sinápticos (TYLER *et al.*, 2002). No hipocampo o receptor TrkB é fortemente ativado na LTP de maneira dependente de receptor NMDA (DRAGUNOV *et al.*, 1997). Bekinschtein *et al.*, (2007) demonstraram em camundongos a existência de um pico tardio de expressão de BDNF, cerca de 12h após o treino que é crítico para a persistência da memória. Além disso, a expressão de RNA mensageiro de BDNF é aumentada no hipocampo 24 h após o condicionamento de medo, sugerindo que a sinalização de BDNF pode contribuir para a plasticidade sináptica nesta forma de aprendizagem (HALL *et al.*, 2000). O BDNF foi requerido para os processos de consolidação da memória em ratos treinados em tarefa de esQUIVA inibitória (MA *et al.*, 1998). Também, Faria *et al.*, (2013) demonstraram a ocorrência de um pico tardio de expressão de BDNF no hipocampo e na amígdala de pombos treinados em condicionamento clássico aversivo, 12 h após a sessão de treino.

Essas evidências com relação aos eventos celulares e moleculares subjacentes aos processos de aquisição, consolidação, reconsolidação e persistência da memória fundamentam a importância de análises moleculares que auxiliem a compreensão dos complexos mecanismos celulares envolvidos. Assim, no presente estudo foram realizadas análises do conteúdo hipocampal das proteínas BDNF e ZENK após o Rt 2d no Experimento 1 e após o Rt 9d no Experimento 2. Desse modo, foi possível analisar a expressão dessas proteínas induzidas pelo processo de reconsolidação, ocorrido no Rt 2d e pelo processo de extinção, ocorrido durante o Rt 9d. Com relação ao conteúdo hipocampal de BDNF após a reconsolidação no Rt 2d, avaliado no Experimento 1, observou-se que as análises não indicaram diferenças entre os grupos SAL-PR, ANI-PR e MK-PR. Apesar dos grupos ANI-PR e MK-PR apresentarem valores mais elevados de mBDNF, com relação aos grupos SAL-PR e NAÏVE, essa diferença não foi suficiente para alcançar a significância estatística, provavelmente devido a alta variabilidade nos dados.

No Experimento 2, as análises de densitometria óptica das isoformas de mBDNF para os grupos SAL-PR e ANI-PR foram significativamente diferentes do grupo MK-PR.

Contudo, os valores de razão mBDNF-proBDNF foram mais altos para o grupo SAL-PR em relação aos grupos ANI-PR e MK-PR. Isto mostra que os animais do grupo SAL-PR apresentaram valores de mBDNF no hipocampo após o processo de extinção que foram maiores do que os dos do grupo ANI-PR. Esses dados relacionados com os processos de extinção dos grupos SAL-PR e ANI-PR sugerem o papel do BDNF durante o processo de extinção da memória (KIRTLEY & THOMAS, 2010). Pode-se, assim, considerar que o BDNF e a sinalização pelo receptor TrkB que é ativado pelo mBDNF são requeridos para a extinção de memórias aversivas (HELDT *et al.*, 2007).

Assim, o estímulo aversivo induziria no hipocampo, a abertura dos canais glutamatérgicos NMDA causando uma alteração na concentração de íons Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico. O influxo de Ca^{2+} pelos receptores NMDA junto com a via de sinalização BDNF-receptores TrkB podem promover a ativação das cascatas de eventos intracelulares requeridas para os processos da memória como a ativação das proteínas PKA e MEK. Isso resulta na ativação da proteína ERK que se transloca para o núcleo, ativando fatores de transcrição incluindo CREB e GElis como o Zenk (*Zif268*) (HALL, THOMAS & EVERITT, 2001; KELLY, LAROCHE & DAVIS, 2003; SHAFE & LEDOUX, 2008; LEE & HYND, 2013).

Os GElis c-Fos e *Zif268* são induzidos em neurônios hipocámpais tratados com BDNF. A ação do BDNF durante processamento de memória pode produzir modificações sinápticas, ligando-se a esses fatores de transcrição para atingir elementos promotores-alvo pode regular a expressão de uma grande parte de genes de resposta tardia com uma variedade de funções. Esses resultados indicam que eventos de transcrição gênica e tradução proteica participam nos mecanismos de manutenção de memória (ALDER *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; RING *et al.*, 2006; VALJENT *et al.*, 2006).

Adicionalmente, o BDNF também pode atuar na reativação da memória de medo contextual, interagindo com *Zif268*, sendo que a facilitação ou prejuízo desses processos dependerá do equilíbrio dessas moléculas (KIRTLEY & THOMAS, 2010). Em tarefa de esquiva inibitória, a associação entre o aumento da expressão de BDNF e

Zif268 foi relacionada ao armazenamento e persistência da memória de longa duração (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

Essas considerações, entre outras encontradas na literatura ressaltam a interação entre as proteínas ZENK e BDNF e a complexidade dos mecanismos envolvidos nos processos de memória. A inibição do Zif268 (ZENK) no hipocampo de roedores facilitaria a extinção, de modo que os eventos hipocampais mediados por Zif268 poderiam atuar no sentido de atenuar a extinção, pelo menos na extinção de curta duração (KIRTLEY & THOMAS, 2010).

Além disso, os mecanismos translacionais envolvidos com a consolidação e a reconsolidação da memória de medo contextual no hipocampo apresentam dupla dissociação. A expressão de BDNF é requerida para o início da consolidação e o fator de transcrição Zif268 é seletivamente necessário para a reconsolidação (LEE *et al.*, 2004). A exposição prolongada ao contexto foi acompanhada por um aumento de Zif268 enquanto que a exposição curta ao contexto condicionado correlacionou-se tanto com a indução da expressão de Zif268 como de BDNF (KIRTLEY & THOMAS, 2010). Assim, a regulação dos mecanismos moleculares envolvidos pode variar dependendo de se o nível de BDNF é elevado e do Zif268 é baixo ou vice-versa, ou quando ambos estão aumentados ou diminuídos (KIRTLEY & THOMAS, 2010).

Embora os mecanismos que ocorrem na membrana celular tenham um requisito comum, ou seja, dependem da atividade do receptor NMDA, as vias divergem no nível de cascatas de sinalização intracelular e subsequentes expressão gênica (LEE & HYND, 2013). Essa dissociação entre o BDNF e o Zif268 foi demonstrada por vários estudos da literatura embora ainda necessite de mais pesquisas para a sua compreensão precisa. Desse modo, os mecanismos iniciados quando os receptores NMDA são ativados resultam em padrões complexos de eventos moleculares que podem envolver vias neurobiológicas divergentes que ocorrem no hipocampo, e que são importantes para processos de consolidação, reconsolidação, persistência e extinção de memória de medo contextual (LEE *et al.*, 2004; LEE & HYND, 2013).

No presente trabalho, no Experimento 1 foi analisada a reconsolidação da memória de medo contextual após o Rt 2d e os valores tanto de BDNF quanto de ZENK

não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Esses dados não confirmam os relatos para roedores, possivelmente devido a protocolos experimentais divergentes.

Já no Experimento 2 foi analisada a extinção da memória contextual aversiva e verificou-se diferença significativa para os valores da razão de mBDNF/ProBDNF para o grupo SAL-PR, mas não para ZENK. Esses dados estão em concordância com os relatos para roedores, uma vez que ambos, BDNF e ZENK interagem nos processos de extinção da memória. O fato de não ter sido encontrado diferenças na expressão hipocampal de ZENK no Experimento 1, após o Rt 2d, ainda necessita de maior investigação.

O Zif268 (ZENK) tem um papel na memória de medo ao contexto, na medida em que, foi observado um aumento seletivo de sua expressão na camada CA1 no hipocampo de roedores após a evocação da memória de medo ao contexto (HALL, THOMAS & EVERITT, 2001). Essa análise foi realizada com a técnica de quantificação celular por hibridização *in situ* do tecido hipocampal. Brito *et al.*, (2006) demonstraram que o treinamento em condicionamento clássico aversivo induziu a expressão de ZENK na região ventromedial do hipocampo de pombos. Sperandéo (2005) demonstrou a expressão de ZENK na região ventromedial do hipocampo de pombos após o teste de evocação da memória aversiva ao contexto. Nesses trabalhos a expressão de ZENK foi analisada por imunohistoquímica e a quantificação de células ZENK positivas nas regiões do hipocampo dorsal, ventro-medial e ventro-lateral. Assim, foi possível identificar a diferença regional da imunomarcacão da proteína ZENK. No presente trabalho, foi utilizada a técnica de quantificação do conteúdo de proteína ZENK no tecido hipocampal a partir da dissecação do hipocampo total. Assim, a técnica de Western blotting não permite a análise da distribuição regional de populações neuronais que tiveram expressão de ZENK. Dessa forma, possíveis diferenças regionais no conteúdo da proteína ZENK não puderam ser evidenciadas por esse tipo de análise. É importante lembrar que a ativação do ZENK está diretamente relacionada com processos sinápticos mediados por glutamato. Deste modo, a distribuição de neurônios ZENK positivos deve estar relacionada com a distribuição de sinapses glutamatérgicas em circuitos hipocampais. Tal como em hipocampo de mamíferos, o hipocampo de

pombos apresenta uma ampla distribuição de neurônios glutamatérgicos nas suas diferentes regiões. De fato, Rosinha e colaboradores (2009) relataram intensa marcação de células GluR1, GluR2 e R3 – positivas na área dorsomedial do hipocampo (receptores AMPA).

É interessante lembrar que os estudos envolvendo a extinção do condicionamento de medo desperta interesses não apenas pelo conhecimento dos processos comportamentais, dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes, mas também pelo fato de que oferecem possibilidades de aplicação na medida em que também contribuem com conhecimento de processos subjacentes de transtornos analisados na clínica psiquiátrica e psicológica.

A amnésia é um distúrbio na memória das informações armazenadas na memória de longa duração, que se opõe à memória de curta duração, manifestado pela incapacidade total ou parcial de lembrar experiências passadas. Para que a memória de curta duração passe a ser memória de longa duração, ela deve passar pelo processo de consolidação que requer repetidos ciclos de síntese proteica. Durante esse processo, se algo acontecer como uma intervenção farmacológica, ou trauma, que interrompa os ciclos de síntese proteica, a memória de curta duração não consegue se consolidar, portanto esta memória não será armazenada como memória de longa duração, ocorrendo a amnésia (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000; MILLER & SWEATT, 2006). Contudo, quando se considera memórias de eventos negativos ou traumáticos que são mal adaptativos o enfraquecimento ou a perda dessas memórias podem ser clinicamente interessantes. Assim, tanto o bloqueio da reconsolidação como a potenciação da extinção foi proposto como abordagens para o tratamento de transtornos causados por memórias de eventos negativos ou traumáticos, tais como, o estresse pós-traumático, pânico e fobias (LEE, MILTON & EVERITT, 2006). Contudo, o sucesso no uso dessas abordagens depende criticamente das características em que ocorre a reativação da memória ou treino de extinção. Por exemplo, no bloqueio da reconsolidação os agentes amnésicos podem prejudicar a extinção e favorecer a reconsolidação dependendo da duração da reativação da memória. Além disso, se os parâmetros de reexposição aos estímulos condicionados não forem considerados

adequadamente existe um grande risco de que as memórias negativas sejam preservadas ou mesmo fortalecidas em vez de promover extinção.

Finalmente, deve-se considerar que existem muitos estudos concernentes aos processos de aquisição, consolidação, reconsolidação, persistência e extinção da memória contextual aversiva em mamíferos (FANSELOW, 2000; BAST *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007; LEE & HYND, 2013). Contudo este trabalho realizado em pombos contribui não apenas para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que medeiam as fases de reconsolidação e extinção da memória do medo contextual, mas também para a análise comparativa desses processos em mamíferos e aves (REIS *et al.*, 1999; SPERANDÉO, 2005; BRITO *et al.*, 2006; FARIA, 2013; FARIA *et al.*, 2013). Este estudo corrobora as pesquisas desenvolvidas sobre condicionamento clássico aversivo e contribui para expandir os modelos experimentais usados nas investigações que objetivam a compreensão da memória.

6. CONCLUSÕES

1. O condicionamento aversivo contextual ocorreu em pombos que foram expostos a uma associação entre um estímulo condicionado (som) um estímulo aversivo incondicionado (choque), demonstrado pela ocorrência de comportamentos de defesa, particularmente do congelamento. A reconsolidação da memória do medo foi verificada pela ocorrência de congelamento (medo condicionado), durante o teste de evocação realizado 24 h depois do treino. Contudo, a reconsolidação da memória aversiva contextual foi prejudicada pela infusão de ANI e MK-801 imediatamente após o final do teste, mas não pela infusão de salina, conforme verificado pela redução da ocorrência do comportamento de congelamento, apresentada pelos pombos dos grupos ANI-PR e MK-PR durante o Rt 2d.
2. A reconsolidação da memória foi dependente da evocação durante o teste realizado 24 h após a aquisição da memória como pela ausência de prejuízos da memória em grupos que não passaram por este teste (SAL-SR, ANI-SR e MK-SR), mas foram tratados com ANI ou MK-801, 24 h após o treino.
3. Os efeitos do bloqueio dos receptores NMDA imediatamente após o teste teve efeito persistente na expressão da memória, impedindo a recuperação espontânea e parecendo afetar irreversivelmente a memória. Esse efeito persistente não foi observado nos animais tratados com ANI após o teste.
4. A exposição prolongada ao contexto aversivo condicionado resultou na redução gradual do congelamento (Rt 9d) indicando o processo de extinção nos animais de todos os grupos, exceto os do grupo MK-PR.
5. A razão entre os valores da expressão das isoformas mBDNF/proBDNF foi maior para o grupo SAL-PR após a extinção verificada no Rt 9d, sugerindo o papel do BDNF no processo de extinção do medo contextual.

6. Não foram observadas variações na expressão da proteína ZENK, em função da reconsolidação ou da extinção. Pode-se sugerir que isto tenha ocorrido devido a uma distribuição regionalizada de células ZENK positivas no hipocampo de pombos (SPERANDÉO, 2005; BRITO *et al.*, 2006), que com a técnica de Western blotting não foi observada, pois esta analisa o hipocampo inteiro.

7. O presente trabalho contribuiu com considerações pertinentes à importância fundamental do hipocampo nos processos de reconsolidação, persistência e extinção da memória adquirida pelo condicionamento clássico aversivo em pombos. Certamente, estimula novos questionamentos na tentativa de melhor elucidar essas relações tanto em aves como em mamíferos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol.** v. 11, n. 2, p. 180-7, 2001.

ABELIOVICH, A.; R. PAYLOR; C. CHEN; J.J. KIM; J.M. WEHNER; S. TONEGAWA. PKC γ mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. **Cell.** v. 75, p. 1263-1271, 1993.

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.

ALDER, J.; THAKKER-VARIA, S.; BANGASSER, D. A.; KUROIWA, M.; PLUMMER, M. R.; SHORS, T. J.; BLACK, I. B. Brain-derived neurotrophic factor-induced gene expression reveals novel actions of VGF in hippocampal synaptic plasticity. **J Neurosci.** v. 23(34), p. 10800-8, 2003.

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.

ARONIADOU, V. A.; TEYLER, T. J. The role of NMDA receptors in long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in rat visual cortex. **Brain Res.** v. 562, n. 1, p. 136-43, 1991.

ATOJI, Y.; WILD, J. Anatomy of the avian hippocampal formation. **Rev. Neurosci.** v. 17, n.1-2, p. 3-15, 2006.

ATOJI, Y.; WILD, J. M.; YAMAMOTO, Y.; SUSUKI, Y. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (C. lívia). **J. Comp. Neurol.** v. 447, n. 2, p.177-199, 2002.

BAKER, J. D.; AZORLOZA, J. L. The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. **Behav. Neurosci.** v. 110, n. 3, p. 618-20, 1996.

BAST, T.; ZHANG, W. N.; FELDON, J. Hippocampus and classical fear conditioning. **Hippocampus.** v. 11, n. 6, p. 828-31, 2001.

BAST, T.; ZHANG, W. N.; FELDON, J. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. **Hippocampus.** v. 13, p. 657-75, 2003.

BECKMANN, A. M.; WILCE, P. A. EGR transcription factors in the nervous system. **Neurochem Int,** v. 31, n. 4, p.477-510; 517-6, 1997.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L. M.; BEVILAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Persistence of long-term memory storage requires a late synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**. v. 53, p.261-277, 2007.

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.

BLAKEMORE, C. **Mechanics of the mind**. Cambridge, MA: Cambridge Univ. Press. 1977.

BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol**. v. 81, n. 2, p. 281-90, 1972 .

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

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.

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.

BLISS, T. V. P.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J. Physiol**. v. 232, p. 331-356, 1973.

BON, C. L.; GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal longterm potentiation. **J Neurosci**. v. 23, n. 5, p. 1941-8, 2003.

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.

BONTEMPI, B.; LAURENT-DEMIR, C.; DESTRADE, C.; JAFFARD, R. Timedependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. **Nature**. v. 400, n. 6745, p. 671-75, 1999.

BOUTON, M. F. Context and behavioral processes in extinction. **Learn Mem**. v. 11, p. 485-494, 2004.

BOUTON, M. E.; BOLLES, R. C. Contextual control of the extinction of conditioned fear. **Learn Motiv**. v.10, p. 445- 466, 1979.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**. v. 8; n. 1; p. 3-11, 1992.

BRITO, I. Análise da expressão de produto do proto-oncogene Zif/268 no hipocampo de pombos após o treino em condicionamento clássico aversivo. 39f. (Dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - **Universidade Estadual de Campinas**, São Paulo, 2002.

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.

BRODAL, A. **Anatomia neurológica com correlações clínicas**. São Paulo: Roca, 1979.

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.

BURGHARDT, N. S.; BAUER, E. P. Acute and chronic effects of selective serotonin reuptake inhibitor treatment on fear conditioning: Implications for underlying fear circuits. **Neuroscience**. v. 1, n. 247C, p. 253-272, 2013.

BUTELMAN, E. R. A novel NMDA antagonist, MK-801, impairs performance in a hippocampal-dependent spatial learning task. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 34, p. 13-16, 1988.

BUTLER, K. Anisomycin. II. Biosynthesis of anisomycin. **J Org Chem**. v. 31, n. 1, p. 317-20, 1966.

CALABRESE, F.; MOLTENI, R.; RACAGANI, G.; RIVA, M. A. Neuronal plasticity: a link between stress and mood disorders. **Psychoneuroendocrinology**. v. 1, p. S208-16, 2009.

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**. v. 76, n. 3, p. 573-82, 2004.

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.

CANOVA, F. Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos (*C. livia*). 94

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

CARLSON, N. R. Fisiologia do comportamento. 7ª edição. São Paulo: **Manole**. 2002.

CATANIA, A. C. Query: Did Pavlov's Research Ring a Bell? **PSYCOLOQUY**. Newsletter, Tuesday, June 7, 1994.

CATANIA, A. C. In: Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição. P. Alegre: **Artmed Editora**. 1999.

CHRISTY, B.; NATHANS, D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 86, n. 22, p. 8737-41, 1989.

CHUGANI, H. T.; KUMAR, A.; MUZIK, O. GABA(A) receptor imaging with positron emission tomography in the human newborn: a unique binding pattern. **Pediatr Neurol**. v. 48, n. 6, p. 459-62. 2013.

CLAYTON, D. F. The genomic action potential. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 74, n. 3, p. 185-216, 2000.

COLE, A. J.; SAFFEN, D. W.; BARABAN, J. M.; WORLEY, P. F. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neuron by synaptic NMDA receptor activation. **Nature**. v. 340, p. 474-476, 1989.

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.

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

DAVIS, S.; BOZON, B.; LAROCHE, S. How necessary is the activation of the immediate early gene zif 268 in synaptic plasticity and learning? **Behav. Brain. Res.** v. 142, p. 17-30, 2003.

DRACHMAN, D. A.; ARBIT, J. Memory and hippocampal complex II. Is memory a multiple process? **Arch Neuro**. v. 15, p. 52-61, 1966.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**. v. 36, p. 527-538, 2002.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. **Current Opinion In Neurobiology**. v.12, p.211-216, 2002.

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.

DUMAN, R. S.; MALBERG, J.; NAKAGAWA, S.; DÍSA, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol Psychiatry**. v. 48, p. 732-739, 2000.

DUVARCI, A.; NADER, K. Characterization of fear memory reconsolidation. **The Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 42, p. 9269-9275, 2004.

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. 2, n.15, p. 747-55. 2008.

DRAGUNOW, M.; HUGHES, P.; MASON-PARKER, S. E.; LAWLOR, P.; ABRAHAM, W. C. TrkB expression in dentate granule cells is associated with a late phase of long-term potentiation. **Brain Res Mol Brain Res**. v. 46, n. 1-2, p. 274-80, 1997.

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.

EICHENBAUM, H. The secret life of memories. **Neuron**. v. 50, n. 3, p. 350-352, 2006.

EICHENBAUM, H.; OTTO, T.; COHEN, N. J. The Hippocampus-What does it do? **Behav. Neural. Biol.** v. 57, p. 2-36, 1992.

EISENBERG, M.; KOBILO, T.; BERMAN, D. E.; DUDAI, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**. v. 301, p. 1102-1104, 2003.

EINARSSON, E. O.; NADER, K. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. **Learn Mem**. v. 19, n. 10, p. 449-52, 2012.

FALKENBERG, T.; MOHAMMED, A. K.; HENRIKSSON, B.; PERSSON, H.; WINBLAD, B.; LINDEFORS, N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. **Neurosci Lett**. v. 138, p. 153-156, 1992.

FANSELOW, M. S.; KIM, J. J. Acquisition of contextual pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist d,l-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behav Neurosci**. v. 108, p. 210-212, 1994.

FANSELOW, M. S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res.** v. 110, n. 1-2, p. 73-81, 2000.

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*). (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, Fisiologia) - **UNICAMP** - São Paulo, 2013.

FARIA, R. S.; SARTORI, C. R.; CANOVA, F.; FERRARI, E. A. M. Classical aversive conditioning induces increased expression of mature-bdnf in the hippocampus and amygdala of pigeons. **Neuroscience**. No prelo. 2013.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 23, n. 5, p. 743-60, 1999.

FIGUROV, A.; POZZO-MILLER, L. D.; OLAFSSON, P.; WANG, T.; LU, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. **Nature.** v. 381, p. 706-709, 1996.

FINKBEINER, S.; TAVAZOIE, S. F.; MALORATSKY, A.; JACOBS, K. M.; HARRIS, K. M.; GREENBERG, M. E. CREB: A major mediator of neuronal neurotrophin responses. **Neuron.** v. 19, p. 1031–1047, 1997.

FRANKLAND, P. W.; DING, H.; TAKAHASHI, E.; SUZUKI, A.; KIDA, S.; SILVA, A. J. Stability of recent and remote contextual fear memory. **Learn. Mem.** v. 13, p. 451-457, 2006.

FREEMAN, F. M.; ROSE, S. P.; SCHOLEY, A. B. Two time windows of anizomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the day-old chick. **Neurobiol Learn Mem.** v. 63 (3), p. 291-5, 1995.

GALE, G. D.; ANAGNOSTARAS, S. G.; FANSELOW, M. S. Cholinergic modulation of Pavlovian fear conditioning effects of intrahippocampal scopolamine infusion. **Hippocampus.** v. 11, p. 371-376, 2001.

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

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

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

GILMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. In: **The Pharmacological Basis Of Therapeutics**. N.Y.: McGraw-Hill. 1993.

GLORIOSO, C.; SABATINI, M.; UNGER, T.; HASHIMOTO, T.; MONTEGGIA, L. M.; LEWIS, D. A.; MIRNICS, K. Specificity and timing of neocortical transcriptome changes in response to BDNF gene ablation during embryogenesis or adulthood. **Mal Psychiatry**. v. 11, n. 7, p. 633-48, 2006.

GOTTSCHALK, W.; POZZO-MILLER, L. D.; FIGUROV, A.; LU, B. Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by Brain-Derived Neurotrophic Factor in the developing hippocampus. **J. Neurosci**. v. 18, p. 6830-6839, 1998.

GOULD, T. J.; MCCARTHY, M. M.; KEITH, R. A. MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. **Behav. Pharmacol**. v. 13, p. 287-94, 2002.

GROLLMAN, A. Inhibitors of protein biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 242, p.3226-3233, 1967.

HAMASU, K.; SHIGEMI, K.; TSUNEYOSHI, Y.; YAMANE, H.; SATO, H.; DENBOW, D. M.; FURUSE, M. Intracerebroventricular injection of L-proline and D-proline induces sedative and hypnotic effects by different mechanisms under an acute stressful condition in chicks. **AminoAcids**. v. 38, n. 1, p. 57-64, 2010.

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.

HALL, J.; THOMAS, M. K. L.; EVERITT, M. B. J. Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. **Nature Neuroscience**. v. 3, p. 533-535, 2000.

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, p. 2186-2193, 2001.

HARTMANN, M.; HEUMANN, R.; LESSMAN, L. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. **EMBO J**. v. 20, p. 5887–5897, 2001.

HELDT, S. A.; STANEK, L.; CHHATWAL, J. P.; RESSLER, K. L. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol Psychiatry**. v. 12, p. 656-670, 2007.

HERDEGEN, T.; LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res. Brain Res.** v. 28, p. 370-490, 1998.

HITCHCOCK, J. M.; DAVIS, M. The efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm. **BehNeuros**. v. 105, p. 826-842, 1991.

HOFER, M.; PAGLIUSI, S. R.; HOHN, A.; LEIBROCK, J.; BARDE, Y. A. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. **Eur. molec. Biol. Org. J.** v. 9, p. 2459–2464, 1990.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annu Ver Neurosci**. v. 24, p. 677–736, 2001.

HUME, R. I.; DINGLELINE, R.; HEINEMAMM, S. F. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. **Science**. v. 253, p. 1028-1031, 1991.

HUGHES, P.; BEILHARZ, E.; GLUCKMAN, P.; DRAGUNOW, M. Brain-derived neurotrophic factor is induced as an immediate early gene following *N*-methyl-D-aspartate receptor activation. **Neuroscience**. v. 57, n. 2, p. 319-28, 1993.

ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A.; ALBECK, D. S.; MOHAMMED, A. H.; GRANHOLM, A. C. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Exp Neurol**. v. 164, p. 45-52, 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; VIANA, M. R. M.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav. Brain. Res.** v. 103, p. 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I. E.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**. p.517-534, 2000.

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.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the medial septum and hippocampus of the rat. **Behav Neural Biol.** v. 58, p. 16-26. 1992.

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.573-589, 1993.

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.

IWASAKI, Y.; GAY, B.; WADA, K.; KOIZUMI, S. Association of the Src family tyrosine kinase Fyn with TrkB. **J Neurochem.** v. 71, p. 106–111, 1998.

JAFARI-SABET, M. NMDA receptor blockers prevents the facilitatory effects of post-training intra-dorsal hippocampal NMDA and physostigmine on memory retention of passive avoidance learning in rats. **Behavioural Brain Research.** v. 169, p. 120-127. 2006.

JARVIS, C. R.; XIONG, Z. G.; PLANT, J. R.; CHURCHILL, D.; LU, W. Y.; MACVICAR, B. A.; MACDONALD, J. F. Neurotrophin modulation of NMDA receptors in cultured murine and isolated rat neurons. **J Neurophysiol.** v. 78, p. 2363–2371, 1997.

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.

JONES, M. W.; ERRINGTON, M. L.; FRENCH, P. J.; FINE, A.; BLISS, T. V.; GAREL, S.; CHARNAY, P.; BOZON, B.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. **Nature Neurosci.** v. 4, p. 289-296, 2001.

KAHN, M. C.; HOUGH II, G. E.; EYCK, G. R. T.; BINGMAN, V. P. Internal connectivity of the homing pigeon (Columbia Livia) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. **J. Comp. Neurol.** v. 459, p.127-141, 2003.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science.** v. 294, n. 5544, p. 1030-8, 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. In: **Principles of Neural Science.** N.Y.: McGraw-Hill. 2000.

KANG, H.; WELCHER, A. A.; SHELTON, D.; SCHUMAN, E. M. Neurotrophins and time: Different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. **Neuron**. v. 19, p. 653–664, 1997.

KANG, H.; SCHUMAN, E. M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. **Science**. v. 267, n. 5204, p. 1658-52, 1995.

KAPLAN, D. R.; STEPHENS, R. M. Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. **J Neurobiol**. v. 25, p. 1404–1417, 1994.

KARTEN, H. J.; HODOS, W. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba Livia*). **The Johns Hopkins Press**. Baltimore, Maryland. 1967.

KASSAM, G.; CHOI, K. S.; GHUMAN, J.; KANG, H. M.; FITZPATRICK, S. L.; ZACKSON, T.; ZACKSON, S.; TOBA, M.; SHINOMIYA, A.; WAISMAN, D. M. The role of Annexin II Tetramer in the activation of plasminogem. **J Biol Chem**. v. 273, n. 8, p. 4790-4799, 1998.

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **J. Neurosci**. v. 23, p. 5354–5360, 2003.

KIDA, S.; JOSSELYN, A. A.; DEORTIZ, S. P.; KOGAN, J. H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A. J. CREB required for the stability of new reactivated fear memories. **Nat Neurosci**. v. 5, p. 348-355, 2002.

KIM, M.; DAVIS, M. Lack of a temporal gradient os retrograde amnesia in rats with amygdala lesion assessed with the fear-potentiated startle paradigm. **Behav Neurosci**. v.107, n. 6, p. 1088-92, 1993.

KIM, J.; HAJJAR, K. A. Annexin II: a plasminogem-plasminogem activator co-receptor. **Front Biosci**. v. 7, p. 341-8, 2002.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**. v. 256, p. 75-677, 1992.

KIRTLEY, A.; THOMAS, K. L. The exclusive induction of extinction is gated by BDNF. **Learn. Mem**. v. 17, p. 612-619, 2010.

KISHIOKA, A.; UEMURA, T.; FUKUSHIMA, F.; MISHINA, M. Consolidation of auditory fear memories formed by weak unconditioned stimuli requires NMDA receptor activation and de novo protein synthesis in the striatum. **Mol Brain**. v. 6, p. 6-17, 2013.

KOHARA, K.; KITAMURA, A.; MORISHIMA, M.; TSUMOTO, T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. **Science**. v. 291, p. 2419-2423, 2001.

KOKAIA, Z., BENGZON, J., METSIS, M., KOKAIA, M., PERSSON, H., LINDVALL, O. Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 6711-6715, 1993.

KORTE, M.; CARROLL, P.; WOLF, E.; BREM, G.; THOENEN, H.; BONHOEFFER, T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 92, p. 8856-8860, 1995.

KORTE, M.; KANG, H.; BONHOEFFER, T.; SCHUMAN, E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 553-559, 1998.

KOVALCHUK, Y.; HANSE, E.; KAFITZ, K. W.; KONNORTH, A. Postsynaptic induction of BDNF-mediated long-term potentiation. **Science**. v. 295, p. 1729-1734, 2002.

KREBS, J. R.; ERICHSEN, J. T.; BINGMAN, V. P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the Dorsomedial Telencehalon of the pigeon. **J. Comp. Neurol.** v. 314, p. 467-477, 1991.

LANAHAN, A.; WORLEY, P. Immediate-early genes and synaptic function. **Neurobiol. Learn. Mem.** v. 70, p. 37-43, 1998.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Context and Pavlovian conditioning. **Braz J Med Biol Res**. v. 29, n. 2, p. 149-73, 1996.

LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. **Curr Op Neurobiol.** v. 2, p. 191-197, 1992.

LEDOUX, J. E. Rethinking the emotional brain. **Neuron**. v. 73, n. 4, p. 653-76, 2012.

LEDOUX, J. E.; CICHETTI, P.; XAGORARIS, A.; ROMANSKI, L. M. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **J. Neurosci.** v. 10, p. 1062-1069, 1990.

LEDOUX, J. E. Emotion, memory and the brain. **Sci Am.** v. 270, n. 6, p. 50-7, 1994.

LEE, J. L. C. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science.** v. 304, p. 839-843, 2004.

LEE, J.; EVERITT, B. Reactivation-dependent amnesia in Pavlovian approach and instrumental transfer. **Learn Mem.** v. 15, n. 8, p. 597-602, 2008.

LEE, J. L. C. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. **Nature Neuroscience.** v. 11, p. 1264-1266, 2008.

LEE, J. L. C.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Research Articles.** v. 304, p. 839-843, 2004.

LEE, J. L. C.; HYND, R. E. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Hippocampus.** v. 23, p. 233-244, 2013.

LEE, J. L. C.; MILTON, A. L.; EVERITT, B. J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. **The Journal of Neuroscience.** v. 26, n. 39, p. 10056-10051, 2006.

LEE, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Cell Press.** v. 32, n. 8, p. 413-420, 2009.

LEE, J.L. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. **Front Behav Neurosci.** v.11, n. 4, p. 168, 2010.

LEE, R.; KERMANI, P.; TENG, K. K.; HEMPSTEAD, B. L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science.** v. 294, p. 1945-1948, 2001.

LEWIS, D. J. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychol. Bull.** v. 86, p. 1054-1083, 1979.

LEVER, I. J.; BRADBURY, E. J.; CUNNINGHAM, J. R.; ADELSON, D. W.; JONES, M. G.; MCMAHON, S. B.; MARVIZÓN, J. C.; MALCANGIO, M. Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. **J Neurosci.** v. 21, n. 12, p. 4469-77, 2001.

LEVINE, E. S.; DREYFUS, C. F.; BLACK, I. B.; PLUMMER, M. R. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 92, p. 8074-8077, 1995.

LEVINE, E. S.; CROZIER, R. A.; BLACK, I. B.; PLUMMER, M. R. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing *N*-methyl-D-aspartic acid receptor activity. **Proc Natl Acad Sci.** v. 95, p. 10235-10239, 1998.

LIN, S. Y.; WU, K.; LEVINE, E. S.; MOUNT, H. T.; SUEN, P. C.; BLACK, I. B. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. **Brain Res Mol Brain Res.** v. 55, p. 20-27, 1998.

LIN, C. H.; YEH, S. H.; LU, H. Y.; GEAN, P. W. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. **J Neurosci.** v. 23, p. 8310-8317, 2003.

LIU, I. Y.; LYONS, W. E.; MAMOUNAS, L. A.; THOMPSON, R. F. Brain-derived neurotrophic factor plays a critical role in contextual fear conditioning. **Journal of Neuroscience.** v. 24, p. 7958-7963, 2004.

LONERGAN, M. E.; GAFFORD, G. M.; JAROME, T. J.; HELMSTETTER, F. J. Time-dependent expression of Arc and zif268 after acquisition of fear conditioning. **Neural Plast.** v. 2010, p. 1-12, 2010.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nat Rev Neurosci.** v. 6, p. 603-614, 2005.

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.

MA, Y. L.; WANG, H. L.; WU, H. C.; WEI, C. L.; LEE, E. H. Brain-derived neurotrophic factor antisense oligonucleotide impairs memory retention and inhibits long-term potentiation in rats. **Neuroscience.** v. 82, p. 957-967, 1998.

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

MCGAUGH, J. L. Memory - a century of consolidation. **Science.** v. 287, n. 5451, p. 248-51, 2000.

MADDEN, D. E. The structure and function of glutamate receptor ion channels. **Nature Rev. Neurosci.** v. 3, p. 91-101, 2002.

MATHERN, G. W.; KUHLMAN, P. A.; MENDOZA, D.; PRETORIUS, J. K. Human fascia dentata anatomy and hippocampal neuron densities differ depending on the epileptic syndrome and age at first seizure. **J Neuropathol Exp Neurol.** v. 56, p. 199-212. 1997.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci.** v. 24, p. 897-931, 2001.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M. S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behav. Brain. Res.** v. 88, p.261-274, 1997.

MAREN, S.; HOLT, W. The hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behav. Brain. Res.** v. 110, p. 97-108, 2000.

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

MAYFORD, M.; KANDEL, E.R. Genetic approaches to memory storage. **Trends Genet.** v.15, n. 11, p. 463-470, 1999.

MCKENZIE, S; EICHENBAUM, H. Consolidation and Reconsolidation: Two Lives of Memories? **Neuron.** v. 28, n. 71, p. 224-33, 2011.

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.

MELLO, C. V. Identification and analysis of vocal communication pathways in birds through inducible gene expression. **Ann Acad Bras Cienc.** v. 76, n. 2, p. 243-6, 2004.

MILLER, C, A.; SWEATT, J. D. Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. **Learn Mem.** v. 13, p. 498–505. 2006.

MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of consolidated memory trace. **Science.** v. 160, p. 554-555. 1968.

MISERENDINO, M. J.; SANANES, C. B.; MELIA, K. R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature.** v. 21, n. 345, p. 716-8, 1990.

MONFILS, M.; COWANSAGE, K. K.; KLANN, E.; LEDOUX, J. E. Extinction-Reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. **Science.** v. 324, p. 951-955. 2009.

MORGAN, J. I.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L.; CURRAN, T. Mapping expression patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. **Science.** v. 237, p. 192-7, 1987.

MORRIS, R. G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G. S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**. v. 319, p. 774-776, 1986.

MOWLA, S. J.; FARHADI, H. F.; PAREEK, S.; ATWAL, J. K.; MORRIS, S. J.; SEIDAH, N. G.; MURPHY, R. A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **J Biol Chem**. v. 276, p. 12660-6, 2001.

MURER, M. G., YAN, Q., RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.** v. 63, p. 71-124, 2001.

MYERS, K.; DAVIS, M. Behavioral and neural analysis of extinction. **Neuron**. v. 36, n. 4, p. 567-584, 2002.

NADER, K.; LEDOUX, J. E. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. **Behav Neurosci**. v. 113, n. 5, p. 891-901, 1999.

NADER, K. Memory traces unbound. **TRENDS Neurosci**. v. 26, n. 2, p. 65-72, 2003.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**. v. 406, p. 722-726, 2000.

NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nat Rev Neurosci**. v. 10, n. 3, p. 224-34, 2009.

NAKAMURA, S.; MURAYAMA, N.; NOSHITA, T.; KATSURAGI, R.; OHNO, T. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid- β and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. **European Journal of Pharmacology**. v. 548, p. 115-122, 2006.

OBERMEIER, A.; BRADSHAW, R. A.; SEEDORF, K.; CHOIDAS, A.; SCHLESSINGER, J.; ULLRICH, A. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC γ . **EMBOJ**. v. 13, p. 1585-1590, 1994.

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.

PARSONS, C. H.; ROGERS, L. J. Pharmacological extension of the sensitive period for imprinting in *Gallus domesticus*. **Physiol Behav**. v. 62, n. 6, p. 1303-10, 1997.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. **Curr. Opin. Neurobiol.** v. 11, p. 272-280, 2001.

PATTERSON, S. L.; ABEL, T.; DEUEL, T. A.; MARTIN, K. C.; ROSE, J. C.; KANDEL, E. R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. **Neuron.** v. 16, p. 1137-1145, 1996.

PAVLOV, I. P. **Conditioned Reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex.** Translated and Edited by G. V. Anrep. London: Oxford University Press. p. 142, 1927.

PEDREIRA, M. E.; PEREZ-CUESTA, L. M.; MALDONADO, H. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA type glutamatergic receptors. **J Neurosci.** v. 22, p. 8305-8311. 2002.

PEDREIRA, M. E.; MALDONADO, H. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. **Neuron.** v. 38, p. 863-869, 2003.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behav. Neurosci.** v. 106, p. 274-285, 1992.

PITKÄNEN, M.; SILVIÖ, J.; MACDONALD, E.; NIEMI, S.; EKONSALO, T.; RIEKKINEN, P. The effects of D-cycloserine and MK-801 on the performance of rats in two spatial learning and memory tasks. **Eur. Neuropsychopharmacol.** v. 5, n. 4, p. 457-463, 1995.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci.** v. 2, n. 1, p. 24-32, 2001.

POWER, A. E.; BERLAU, D. J.; MCGAUGH, J. L.; STEWARD, O. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration. **Learn Mem.** v. 13, n. 1, p. 27-34, 2006.

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

REIS, F.; SCHENKA, A. A.; MELO, L. L.; FERRARI, E. A. M. Role of the hippocampus in the contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). **Braz. Med. Biol. Res.** v. 32, p. 1127-1131, 1999.

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

RESCORLA, R. A. Behavioral studies of Pavlovian conditioning. **Annu Rev Neurosci.** v. 11, p. 329-352, 1988.

RESCORLA, R. A. Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** v. 27, n. 2, p. 115-124, 2001.

RIBEIRO, S. Dream, memory and Freud's reconciliation with the brain. **Rev Bras. Psiquiatr.** Supl II, p. 59-63, 2003.

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.

RICHARDSON, C. L.; TATE, W. P.; MASON, S. E.; LAWLOR, P. A.; DRAGUNOW, M.; ABRAHAM, W. C. Correlation between the induction of an immediate early gene, zif/268, and long-term potentiation in the dentate gyrus. **Brain. Res.** v. 580, p. 147-154, 1991.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav. Brain. Res.** v. 140, p. 1-47, 2003.

RING, R. H.; ALDER, J.; FENNELL, M.; KOURANOVA, E.; BLACK I. B.; THAKKERVARI, S. Transcriptional profiling of brain-derived-neurotrophic factor-induced neuronal plasticity: a novel role for nociceptin in hippocampal neurite outgrowth. **J Neurobiol.** v. 66, n. 4, p. 361-77, 2006.

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.

ROSE, S. P. God's organism? The chick as a model system for memory studies. **Learn Mem.** v. 7, n. 1, p. 1-17, 2000.

ROSINHA, M. U.; FERRARI, E. A.; TOLEDO, C. A. Immunohistochemical distribution of AMPA-type label in the pigeon (*C. livia*) hippocampus. **Neuroscience.** v. 159, n. 2, p. 438-50, 2009.

ROWE, M. K.; CRASKE, M. G. Effects of varied-stimulus exposure training on fear reduction and return of fear. **Behav. Res. Ther.** v. 36, n. 7-8, p. 719-34, 1998.

SANDERS, M. J.; WILTGEN, B. J.; FANSELOW, M. S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **Eur J Pharmacol.** v. 463. n. 1-3, p. 217-23, 2003.

SANTINI, F.; GE, H.; REN, K.; PEÑA DE ORTIZ, S.; QUIRK, G. J. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. **J. Neurosci.** v. 24, p. 5704-5710, 2004.

SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learn Mem.** v. 7, n. 2, p. 73-84, 2000.

SARTORI, C. R.; VIEIRA, A. S.; FERRARI, E. M.; LANGONE, F.; TONGIORGI, E.; PARADA, C. A. The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. **Neuroscience.** v. 28, n. 180, p. 9-18. 2011.

SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase a in the amygdale. **J Neurosci.** v. 20, p. 1-5, 2000.

SCHAFE, G. E.; NADER, K. BLAIR J, LEDOUX J E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **TRENDS Neurosci.** v. 24, p. 540-546, 2001.

SCHENBERG, E. E.; OLIVEIRA, M. G. Effects of pré or posttraining dorsal hippocampus D-AP5 injection on fear contioning to tone, background, and foreground context. **Hippocampus.** v. 18, n. 11, p. 1089-93, 2008.

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.

SKINNER, B. F. **The behavior of organisms: an experimental analysis.** New York: Apleton-Century-Crofts. 1938.

SKINNER, B. F. In: **Science and Human Behavior.** New York: Macmillan. 1953.

SPERANDÉO, M. L. A. Evocação da memória aversiva: Participação do receptor NMDA e análise da ativação de ZENK no hipocampo de pombos. Tese de Mestrado pela **Universidade Estadual de Campinas**, 2005.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória. Da mente às moléculas.** São Paulo: Artmed. 2003.

SQUIRE, L. R.; ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. **Curr Opin Neurobiol.** v. 5, n. 2, p. 169-77, 1995.

STAUBLIN, U.; THIBAUT, O.; DILORENZO, M.; LYNCH, G. Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. **Behav. Neurosci.** v. 103, n.1, p. 54-60, 1989.

STEPHENS, R. M.; LOEB, D. M.; COPELAND, T. D.; PAWSON, T.; GREENE, L. A.; KAPLAN, D. R. Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- γ 1 to mediate NGF responses. **Neuron.** v. 12, p. 691–705, 1994.

STIEDL, O.; MISANE, I.; SPIESS, J.; OGREN, O. Involvement of the 5-HT_{1A} receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice. **J. Neurosci.** v. 20, p. 8515-8527, 2000.

SUÁREZ, J.; DÁVILA, J. C.; REAL, M. A.; GUIRADO, S.; MEDINA, L. Calciumbinding 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.

SUEN, P. C.; WU, K.; LEVINE, E. S.; MOUNT, H. T.; XU, J. L.; LIN, S. Y.; BLACK, I. B. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. **Proc Natl Acad Sci.** v. 94, p. 8191-8195, 1997.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S. A.; FRANKLAND, P. W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A. J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The Journal Of Neuroscience.** v. 24, n. 20, p. 4787-4795, 2004.

SVENNINGSSON, P.; GREENGARD, P. p11(S100A10) – an inducible adaptor protein that modulates neuronal functions. **Curr Opin Pharmacol.** v. 7, n. 1, p. 27-32, 2007.

SZABÒ, C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. **Brain Res Bull.** v. 41, n. 3, p. 131-41, 1996.

SZÉKELY, A. D. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. **Behav Brain Res.** v. 98, n. 2, p. 219-25, 1999.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J Neurochem.** v. 76, p. 1-10, 2001.

THIEL, G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. **Brain Pathol.** v. 3, n. 1, p. 87-95, 1995.

TSIEN, J. Z.; HUERTA, P. T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell.** v. 87, p. 1327-1338, 1996.

TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci.** v. 8, n. 4, p. 262-75, 2007.

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.

TYLER, W. J.; ALONSO, M.; BRAMHAM, C. R.; POZZO-MILLER, L. D. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. **Learn Mem.** v. 9, p. 224-237, 2002.

VAIDYAA, A.; JAINB, S.; JAINA, A. K.; AGRAWALA, A.; KASHAWA, S. K.; JAINA, S. K.; AGRAWALA, R. K. Metabotropic glutamate receptors: a review on prospective and therapeutic aspects. **Mini Rev Med Chem.** Apr 25. 2012.

VALJENT, E.; AUBIER, B.; CORBILLE, A. G.; BRAMI-CHERRIER, K.; CABOCHE, J.; TOPILKO, P.; GIRAULT, J. A.; HERVE, D. Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. **J. Neurosci.** v. 26, p. 4956-4960, 2006.

VENERO, C.; SANDI, C. Effects of NMDA and AMPA receptor antagonists on corticosterone facilitation on long-term memory in the chick. **Eur. J. Neurosci.** v. 9, n. 9, p. 1923-1928, 1997.

WALLENSTEIN, G. V.; VAGO, D. R.; WALBERER, A. M. Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. **Behav. Brain. Res.** v. 133, p. 159-164, 2001.

WALTON, M.; HENDERSON, C.; MASON-PARKER, S.; LAWLOR, P.; ABRAHAM, W. C.; BILKEY, D.; DRAGUNOW, M. Immediate early gene transcription and synaptic modulation. **J. Neurosci. Res.** v. 58, n. 1, p. 96-106, 1999.

WANG, Y. T.; SALTER, M. W. Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. **Nature.** v. 369, p. 233-235, 1994.

WESTBROOK, R. F.; IORDANOVA, M.; MCNALLY, G.; RICHARDSON, R.; HARRIS, J. A. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus: two roles for context. **J Exp Psychol Anim Behav Process.** v. 28, n.1, p. 97-110, 2002.

WHISHAW, I. Q.; AUER, R. N. Immediate and long-lasting effects of MK-801 on motor activity, spatial navigation in a swimming pool and EEG in the rat. **Psychopharmacology.** v. 98, n. 4, p. 500-7, 1989.

WORLEY, P. F.; CHRISTY, B. A.; NAKABEPPU, Y.; BHAT, R. V.; COLE, A. J.; BARABAN, J. M. Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. **Proc Natl Acad Sci.** v. 88, n. 12, p. 5106-10, 1991.

XU, X.; DAVIS, R. E. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 impairs learning but not memory fixation or expression of classical fear conditioning in goldfish (*Carassius auratus*). **Behav. Neurosci.** v. 106, n. 2, p. 307-14, 1992.

ZHANG, W.; 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. **Behavioural Brain Reserch.** v. 126, p. 159-174, 2001.