

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELAYNE VIEIRA DIAS



**“PROCESSOS DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA AVERSIVA
EM POMBOS: ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA
QUINASE C (PKC)”**

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

Elayne Vieira Dias

e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

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

Orientadora: Profa. Dra. ELENICE APARECIDA DE MORAES FERRARI

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

D543p

Dias, Elayne Vieira

Processos de aprendizagem e memória aversiva em pombos: análise do envolvimento da proteína quinase C (PKC) / Elayne Vieira Dias. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Condicionamento clássico. 2. Proteína quinase C.
3. Memória. 4. Hipocampo (Cérebro). I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Aversive learning and memory processes in pigeons: analysis of involvement of protein kinase C.

Palavras-chave em inglês: Classical conditioning; Protein Kinase C; Memory; Hippocampus (Brain).

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Cláudio Antônio Barbosa de Toledo, Carlos Amílcar Parada.

Data da defesa: 26/09/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 26 de setembro de 2008

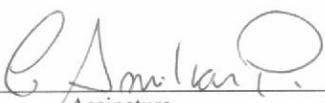
BANCA EXAMINADORA

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



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada



Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Antônio Barbosa de Toledo



Assinatura

Profa. Dra. Liana Lins Melo

Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

“Se as coisas são inatingíveis... or aí!
não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a mágica presença das estrelas!”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Agnaldo e Tereza, e meus irmãos, Nadinho, Renan e Lucinho, por serem pessoas tão essenciais na minha vida e estarem sempre ao meu lado!

Ao meu irmão Nadinho, em especial, pela confiança e incentivo!

A todos da minha família, por estarem sempre por perto!

Às minhas amigas Danielle, Ingrid, Ticiane e Amélia que me receberam tão bem e dividiram comigo além de casa e longas conversas, meus bons e maus momentos! À Amélia, em especial, pela paciência e pela força na fase de conclusão do trabalho.

À Magda, Francine e Grazielle pela amizade, pela força, pelas longas conversas ... pela vida que compartilhamos nesse tempo ... por serem pessoas especiais!

Aos meus colegas de laboratório, Fernando, Maria Luíza, Sabrina e Peterson, e de departamento, pela amizade, pela convivência, os sorrisos de todo dia!

Ao pessoal do laboratório 13, pela amizade, pelo carinho, pela paciência ... por terem me adotado! E pelos cafés no meio da tarde também!

Especialmente ao André, por estar por perto durante meu trabalho, ajudando, ensinando e trocando idéias; pela disponibilidade de sempre, por compartilhar todo seu conhecimento com empenho e paciência, por ser simples e amigo!

Ao prof. Francesco Langone por ceder sem restrições seu laboratório para que as análises bioquímicas fossem realizadas!

Ao prof. Marino-Neto da UFSC pela atenção e pela sugestão sobre a implantação das cânulas utilizadas nesse trabalho!

Ao prof. Parada pelas idéias, conversas e discussões sobre o trabalho, sobre a ciência e sobre a vida!

E principalmente à prof.ª Elenice, pela oportunidade de estar aqui; pela confiança, pelo carinho, pela amizade que senti durante esse tempo em que trabalhamos juntas. Pela dedicação e preocupação com o trabalho e com o desenvolvimento de quem faz o trabalho, enquanto aluno e enquanto pessoa. Foi um privilégio a convivência, com essa pessoa especial, minha orientadora!

Durante o desenvolvimento do trabalho a pesquisadora teve suporte financeiro do CNPq - bolsa de Mestrado. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento e no Laboratório de Neurobiologia, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, UNICAMP. Agradecemos o apoio financeiro do CNPq e da FAPESP outorgados à Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari e ao Dr. Francesco Langone, respectivamente.

Lista de abreviaturas

APH	Área parahipocampal
aPKC	Proteína quinase C atípica (do inglês <i>atypical protein kinase C</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
C1 e C2	Domínios ricos em cisteína
CA	Calfostina C
cm	Centímetro
cPKC	PKC convencional (do inglês <i>conventional protein kinase C</i>)
dB	Decibel
DG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido (do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>)
EC	Estímulo condicionado
ECA	Exploração Cautelosa
EI	Estímulo incondicionado
EPM	Erro padrão da média
ESC	Esquadrinhar
EXP	Exploratório
FS	Fosfatidilserina
FRZ	<i>Freezing</i> (Congelamento)
g	Gramas
G	Gauge
GAP-43	Proteína associada ao crescimento (do inglês <i>grown-associated protein 43</i>)
GC	Grupo Controle
GCC	Grupo Controle-Contexto
GCd	Grupo Condicionado

GCdCA	Grupo Condicionado Calfostina C
GCdVe	Grupo Condicionado Veículo
GCR	Grupo Controle Randômico
G1min	Grupo 1 minuto
G1h	Grupo 1 hora
G2h	Grupo 2 horas
G24h	Grupo 24 horas
h	Hora
HP	Hipocampo
Hz	Hertz
H-7	1-(5-isoquinolinesulfonil)-2-metilpiperazina
i.c.v.	Intra-cerebro-ventricular
IMHV	<i>Intermediomediale hiperstriatum ventrale</i>
IMM	<i>Mesopallium intermediomediale</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato (do inglês <i>inositol-1,4,5-triphosphate</i>)
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
LOC	Locomoção
LTP	Potenciação de longa duração
M	Molar
mA	Miliampere
MAN	Manutenção
MARCKS	Proteína-substrato da quinase C rica em alanina miristoilada (do inglês <i>myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>)
mg	Miligrama
min	Minuto

mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOV	Movimentos Isolados
ms	Milisegundo
nPKC	Proteína quinase C nova (do inglês <i>novel protein kinase C</i>)
PAR	Parado
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês <i>phosphate buffer saline</i>)
PDK-1	Proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo (do inglês <i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A (do inglês <i>protein kinase A</i>)
PKC	Proteína quinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PKD	Proteína quinase D (do inglês <i>protein kinase D</i>)
pPKC	Proteína quinase C fosforilada (do inglês <i>phospho-protein kinase C</i>)
PRE	Comportamentos Pré-exploratórios
RC	Resposta condicionada
RI	Resposta incondicionada
s	Segundos
V	Volts
VE	Veículo
VIG	Vigilância
W	Watts
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
ng	Nanograma

RESUMO

DIAS, E. V. **Processos de aprendizagem e memória aversiva em pombos: análise do envolvimento da proteína quinase C (PKC)**, 2008.

O condicionamento clássico aversivo é utilizado para investigar os mecanismos celulares e moleculares na formação da memória em diferentes espécies de animais. Estes envolvem processos sinápticos que desencadeiam mecanismos de sinalização intracelular com ativação de diferentes quinases em momentos específicos. A ativação da PKC é um dos mecanismos moleculares da plasticidade sináptica subjacente à formação de memória. O presente trabalho investigou o envolvimento da PKC α/β no condicionamento clássico aversivo em pombos. No Experimento 1, o inibidor da PKC, calfofina C foi administrado i.c.v. em um grupo de pombos (GCdCa, n=6; 5 μ l de solução 60 μ g/ml, DMSO 2%), 1h antes do condicionamento. Outro grupo recebeu veículo (GCdVe, n=5; DMSO 2% em salina). A sessão de condicionamento teve 20 min de duração e 3 pareamentos som-choque (treino). O teste ao contexto ocorreu 24h após o treino. O Experimento 2 usou grupos de pombos expostos ao contexto experimental (GCC), som e choque não pareados (GCR) ou som-choque pareados (GCd) para investigar a ativação da PKC α/β no hipocampo 2h após o treino, por meio de *Western blot*. No Experimento 3, grupos de pombos não treinados (GC, n=6) ou sacrificados em diferentes tempos após o treino - G1min (n=6), G1h (n=6), G2h (n=6) e G24h (n=6) – foram utilizados para investigar o curso temporal da ativação da PKC α/β e da fosforilação do substrato da PKC, GAP-43, no hipocampo. Todas as sessões foram gravadas em vídeo para posterior análise dos dados comportamentais. No Experimento 1 o GCdCa teve menor expressão da resposta condicionada de congelamento (*freezing*) ao contexto em comparação ao GCdVe ($p < 0,05$), indicando que a administração da calfofina C prejudicou a memória aversiva contextual. Não ocorreram diferenças significativas na ativação da PKC α/β entre os diferentes grupos (Experimentos 2 e 3; $p > 0,05$), mas houve maior imuno-marcação da GAP-43 fosforilada no G1min quando comparado ao GC (Experimento 3; $p < 0,05$). Esses dados indicam o envolvimento da PKC em mecanismos de aprendizagem e memória aversiva em pombos, e sugerem que outras isoformas além da PKC α/β podem participar desses processos.

Palavras-chave: condicionamento clássico aversivo, hipocampo, PKC, memória.

ABSTRACT

DIAS, E. V. **Processes of aversive learning and memory in pigeons: analysis of the involvement of protein kinase C (PKC)**, 2008.

The classical aversive conditioning is used to investigate cellular and molecular mechanisms of memory formation in different animal species. Those mechanisms involve synaptic processes that trigger intracellular signaling with activation of different kinases at specific time points. The PKC activation is one of the molecular mechanisms of synaptic plasticity underlying memory. This study investigated the involvement of PKC α in classical aversive conditioning in pigeons. In Experiment 1, the PKC inhibitor, calphostin C was administered i.c.v. in one group of pigeons (GCdCa, n=6; 5 μ l solution 60 μ g/ml, DMSO 2%), 1h before the conditioning. Another group received vehicle (GCdVe, n=5; DMSO 2% in saline). The session of conditioning had 20 min duration and 3 tone-shock pairings (training). The test to the context occurred 24h after training. Experiment 2 investigated with Western blot analysis the PKC α activation in the hippocampus 2h after the training in groups of pigeons that were exposed to unpaired (GCR) or paired (GCd) tone-shock presentations or to the experimental context only (GCC). In Experiment 3, groups of pigeons naive (GC, n=6) or sacrificed at different times after the training - G1min (n=6), G1h (n=6), G2h (n=6) and G24h (n=6) - were used to investigate the time course of the PKC α activation and phosphorylation of PKC substrate, GAP-43, in the hippocampus. All sessions were video recorded for analysis of behavioral data. In Experiment 1 GCdCa had lower expression of conditioned freezing response to the context in comparison to GCdVe ($p < 0.05$), indicating that calphostin C administration impaired contextual aversive memory. No significant differences in the PKC α activation were observed among the groups (Experiments 2 and 3; $p > 0.05$) but the immunolabeling of phosphorylated GAP-43 in G1min was higher as compared to GC (Experiment 3; $p < 0.05$). These data indicate the involvement of PKC in mechanisms of aversive learning and memory in pigeons and suggest that other isoforms besides PKC α may play a role in those processes.

Keywords: classical aversive conditioning, hippocampus, PKC, memory.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Condicionamento clássico aversivo, aprendizagem e memória	18
1.2 O condicionamento clássico aversivo e o hipocampo	22
1.3 Caracterização do sistema hipocampal de aves.....	25
1.4 A importância da PKC nos processos de aprendizagem e memória.....	27
1.5 PKC hipocampal e memória.....	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivos gerais.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Sujeitos.....	40
3.1.1 Experimento 1	40
3.1.2 Experimento 2.....	41
3.1.3 Experimento 3.....	42
3.2 Drogas e Reagentes.....	42
3.3 Equipamentos.....	43
3.4 Procedimentos Gerais	43
3.4.1 Adaptação às condições do biotério	43
3.4.2 Implante de eletrodos públicos	44
3.4.3 Cirurgia para implante de cânulas.....	44
3.4.4 Infusão intra-cerebro-ventricular (i.c.v.).....	46

3.4.5 Adaptação às condições do laboratório	46
3.4.6 Treino para condicionamento som-choque	47
3.4.7 Teste ao contexto de condicionamento.....	47
3.5 Análise Bioquímica	48
3.6 Análise dos dados comportamentais.....	51
3.7 Análise estatística.....	54
4 RESULTADOS	55
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	96

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura primária das isoformas de PKC	29
Figura 2	Modelo sumarizando a regulação espacial, estrutural e conformacional da PKC por 1. Fosforilação, 2. Ligação ao cofator e 3. Interação à proteína suporte (<i>scaffold</i>)	31
Figura 3	Valores percentuais dos comportamentos registrados durante as sessões de treino (superior) e de teste (inferior) do grupo tratado com calfofina C (GCdCa; CA) e o grupo tratado com veículo (GCdVe; VE) .	57
Figura 4	Valores médios dos comportamentos congelamento (<i>freezing</i>), vigilância e exploração registrados em oito blocos de 150 s nas sessões de treino e de teste dos grupos tratados com calfofina C (GCdCa, CA) e com veículo (GCdVe, VE)	60
Figura 5	Corte coronal do encéfalo do pombo mostrando a coloração do ventrículo realizada através de infusão do corante pela cânula implantada no animal	61
Figura 6	Valores percentuais dos comportamentos registrados durante as sessões de treino para os grupos condicionado (GCd), controle-contexto (GCC) e controle-randômico (GCR)	62
Figura 7	Valores médios dos comportamentos congelamento (<i>freezing</i>), vigilância e exploração registrados em oito blocos de 150 s nas sessões de treino dos grupos condicionado (GCd), controle-contexto (GCC) e controle-randômico (GCR)	64

Figura 8 Razão das densitometrias ópticas das bandas imunorreativas para pPKC α/β na fração de membrana e na fração citoplasmática Exp. 2 ...	65
Figura 9 Análises densitométricas das bandas imunorreativas para pPKC α/β nas porções de membrana e citoplasmática Exp. 2	66
Figura 10 Razão das densitometrias ópticas das bandas imunorreativas para pPKC α/β na fração de membrana e na fração citoplasmática Exp. 3 ...	67
Figura 11 Análises densitométricas das bandas imunorreativas para pPKC α/β nas porções de membrana e citoplasmática Exp. 3	68
Figura 12. Análise densitométrica das bandas imunorreativas para pGAP-43	69

1. INTRODUÇÃO

A sobrevivência de um ser vivo e, em última análise, a preservação da espécie a que pertence dependem da manutenção do equilíbrio e da integridade de seu organismo. Ao lado dos mecanismos homeostáticos essenciais para a manutenção do equilíbrio interno do organismo frente às variações do meio externo, a capacidade de aprender com as experiências e de armazenar as informações resultantes dessa aprendizagem conduz o indivíduo à adaptação ao ambiente em que vive. A aprendizagem possibilita o desenvolvimento de comportamentos que permitem a sobrevivência às adversidades apresentadas por esse ambiente. Ao longo de todo o processo evolutivo, vários desses comportamentos foram selecionados, dentre os quais a reação adequada aos perigos e ameaças, prevendo ou antecipando eventos aversivos e organizando respostas defensivas.

1.1 Condicionamento clássico aversivo, aprendizagem e memória.

O medo é uma resposta observada em situações de perigo presente ou iminente que contribui para a auto-preservação do organismo, sendo, portanto, considerada uma resposta defensiva (FENDT e FANSELOW, 1999; MAREN, 2001). Constitui uma resposta característica, robusta e bem definida, altamente conservada, que envolve vias e estruturas neuronais específicas, com ações centrais e reações vegetativas (FENDT e FANSELOW, 1999). Tal resposta pode ser condicionada e controlada experimentalmente permitindo o estudo e esclarecimento das vias e estruturas nela envolvidas. O medo condicionado é o

elemento central na maioria dos estudos de condicionamento aversivo, possibilitando a análise dos processos de aprendizagem e memória aversiva.

O condicionamento pavloviano, também chamado clássico, foi primeiramente descrito pelo fisiologista russo Ivan Petrovitch Pavlov, em 1927. Esse condicionamento ocorre quando dois estímulos são associados: um estímulo incondicionado (EI) apetitivo (alimento) ou aversivo (choque) que elicia respostas incondicionadas (RI) particulares e um estímulo (auditivo ou visual), considerado neutro para essas respostas. Como resultado dessa associação ocorre o processo de condicionamento, pelo qual o estímulo neutro adquire propriedade de estímulo condicionado (EC) e passa a eliciar respostas similares às aquelas controladas pelo estímulo incondicionado (MAREN, 2001).

O condicionamento clássico aversivo é uma forma de condicionamento pavloviano onde o sujeito é treinado numa situação em que a apresentação de um estímulo inócuo (neutro), como um som, antecede ou é pareada a um estímulo incondicionado aversivo, como um choque elétrico. Estabelece-se uma relação de contingência e a repetição desse pareamento entre os dois estímulos resulta numa alteração funcional de modo que o estímulo inicialmente inócuo torna-se condicionado (EC) ao estímulo aversivo (EI), adquirindo a função de predizer a ocorrência do EI e eliciar respostas defensivas condicionadas. A reação comportamental de imobilidade tensa ou congelamento motor (*freezing*), juntamente com respostas vegetativas diversas como dilatação da pupila e aumento da pressão arterial e das frequências cardíaca e respiratória, é considerada como uma resposta condicionada (RC) a estímulos previamente associados à ocorrência de riscos e ameaças reais. O ambiente ou contexto em

que tais associações ocorrem também adquire propriedades aversivas condicionadas (FENDT e FANSELOW, 1999; MAREN, 2001; MAREN e QUIRK, 2004; PEZZE e FELDON, 2004; KIM e JUNG, 2006). A expressão ou manifestação dessa resposta de medo condicionado é interpretada como evidência de memória aversiva. O condicionamento aversivo além de proporcionar um tipo de aprendizagem simples que elicia no animal respostas evidentes e de mensuração relativamente fácil, permite a manipulação e o controle pelo experimentador, constituindo um dos principais modelos de estudo da aprendizagem associativa e memória em laboratório (LEDOUX, 2000; SANDERS, WILTGEN e FANSELOW, 2003).

O estabelecimento e a manifestação da memória dos eventos aversivos condicionados ou incondicionados (memória aversiva) envolvem diferentes estágios, que dependem de diferentes substratos neurais (THOMPSON e KIM, 1996). A formação de uma memória aversiva de longa duração compreende uma fase de aquisição, de consolidação da memória de longa duração, de recuperação/evocação, de persistência ou de extinção (McGAUGH e IZQUIERDO, 2000; BEKINSCHTEIN et al., 2007). Frequentemente, é impossível dissociar a aquisição da memória e a fase inicial da consolidação porque ambos os processos ocorrem em grande proximidade temporal (ZHANG, BAST e FELDON, 2001). A recuperação e a persistência da memória dependem de sua prévia consolidação. A recuperação da memória aversiva envolve a ativação da representação da associação EC-EI – uma vez que tenha sido estabelecida pelo condicionamento – em resposta ao EC sozinho. A expressão da memória aversiva necessariamente envolve a recuperação e também a tradução da associação em uma resposta

apropriada e coordenada de medo. Com repetidas apresentações do EC sozinho, após o condicionamento, ocorre atenuação e completo desaparecimento da resposta aversiva, o que define a extinção (KIM e JUNG, 2006).

No processo de memória há uma fase independente da síntese de RNA e de proteína definida como memória de curto prazo que dura de minutos a 1-3 horas e uma fase dependente de síntese de RNA e de proteínas que apresenta maior duração, de muitas horas a dias, semanas, meses ou por toda vida e constitui a memória de longa duração (McGAUGH, 1966; IZQUIERDO e MEDINA, 1998; McGAUGH, 2000). Bekinschtein et al. (2007) recentemente propuseram que, à semelhança do processo de formação da memória de longa duração, a persistência da memória de longa duração também depende de síntese proteica. Também com relação à persistência da memória, Eckel-Mahan et al. (2008) consideraram a possibilidade de que as vias bioquímicas subjacentes à memória devam ser reativadas repetidamente para sustentar os níveis de proteína que são requeridos para a persistência da memória, sugerindo, para tanto, ciclos recorrentes de consolidação.

Quando se investigam os mecanismos neurais que medeiam a formação da memória aversiva, há três diferentes momentos em que as manipulações podem ser feitas. Manipulações antes do treino afetam a aquisição do medo condicionado, enquanto manipulações antes do teste afetam a expressão do medo condicionado. Se a consolidação é o alvo, a manipulação é feita imediatamente ou algum tempo após a aquisição (FENDT e FANSELOW, 1999).

Sendo um processo complexo, a memória aversiva recruta muitas vias neuronais para que as informações sejam armazenadas no sistema nervoso de

forma adequada e eficiente. A amígdala é uma estrutura essencial para a formação e expressão do medo condicionado (FENDT e FANSELOW, 1999; LEDOUX, 2000; MAREN, 2001; KIM e JUNG, 2006). Outras estruturas neurais como córtex medial pré-frontal, córtex insular, córtex perirrinal, cerebelo e núcleo *accumbens* parecem participar desse processo (KIM e JUNG, 2006). O hipocampo é outra estrutura neural também relacionada à memória aversiva no que diz respeito ao contexto onde o condicionamento ocorreu.

1.2 O condicionamento clássico aversivo e o hipocampo

O conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos processos de aprendizagem e memória teve um grande desenvolvimento por meio de estudos com modelos animais e de diferentes situações de aprendizagem, dentre as quais destacamos o condicionamento clássico aversivo (ANTONIADIS E McDONALD, 2000; SCHAFE et al., 2001).

A amígdala teve ênfase inicialmente nos trabalhos de LeDoux (1990) e a partir daí foi considerada um componente central do circuito neural do medo, um lugar de plasticidade importante para a formação e armazenamento de memórias aversivas (LEDOUX et al., 1990; PHILLIPS e LEDOUX, 1994; MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997). Hall, Thomas e Everitt (2001) mostraram, trabalhando com ratos, que os neurônios dos núcleos basal, lateral e central da amígdala desempenham um papel importante na recuperação de memórias de medo ao som.

Posteriormente aos estudos referentes à amígdala, o hipocampo passou a receber maior atenção quanto ao seu envolvimento no processo de aprendizagem

e memória aversiva (KIM et al., 1991; PHILLIPS e LEDOUX, 1992; IZQUIERDO e MEDINA, 1993; FANSELOW e KIM, 1994; MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997; HALL, THOMAS e EVERITT, 2001; PANG e LU, 2004). A amígdala e o hipocampo desempenham um importante papel na organização e no controle de diversas respostas motoras e vegetativas, relativas ao condicionamento aversivo, como por exemplo, a locomoção, o congelamento (*freezing*), e as vocalizações ultrassônicas (TEYLER e DISCENNA, 1985).

O trabalho de Kim e Fanselow (1992) foi um marco na análise do papel do hipocampo na consolidação da memória emocional aversiva em ratos. Nesse trabalho, foi usado o pareamento som-choque em ratos submetidos a lesões hipocampais, 1, 7, 17 ou 28 dias após o treino. Os animais com lesão 1 dia após o treino tiveram menor intensidade de congelamento (*freezing*) quando re-expostos ao contexto. No teste realizado em outro contexto com reapresentação do som, todos os grupos apresentaram congelamento (*freezing*). Esses dados mostraram o papel do hipocampo na formação de memórias contextuais e indicaram um processamento diferente para o armazenamento das informações aversivas relativas aos estímulos contextuais e ao estímulo discreto pareados ao choque.

Muitos trabalhos analisaram como o contexto influencia a aprendizagem e a memória, e principalmente as relações das funções do hipocampo com a memória contextual (MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997; HOLT e MAREN, 1999; MAREN e HOLT, 2000; SMITH e MIZUMORI, 2006). Em nosso laboratório, Reis et al. (1999) demonstraram a participação do hipocampo na memória contextual de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo sendo esse dado confirmado por trabalhos subseqüentes (SPERANDÉO, 2005; BRITO, BRITTO e

FERRARI, 2006; DENADAI, 2008). Na espécie humana, também já é bem conhecida a influência da informação contextual sobre o comportamento (PENICK e SOLOMON, 1991). A informação contextual é dada por um estímulo multimodal, dessa forma, o contexto é caracterizado como uma configuração de estímulos (MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997). Assim, o condicionamento a um contexto implica a aquisição e retenção do valor funcional de uma situação ou contexto que foi associado a eventos particulares, podendo ambos, contexto e eventos, adquirirem valores positivos ou negativos (ANTONIADIS e McDONALD, 2000). Portanto, foi proposto que uma função do hipocampo seria montar uma representação contextual que, por ela mesma, poderia se tornar associada com o estímulo incondicionado, tal como um choque (FANSELOW, 2000). Assim, os mecanismos de plasticidade e de memória no hipocampo seriam fundamentais no circuito neural do condicionamento aversivo (IZQUIERDO e MEDINA, 1993; PHILLIPS e LEDOUX, 1994; MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997; PANG e LU, 2004).

Embora muitos dos dados referentes à função do hipocampo no condicionamento de medo sejam provenientes de estudos com lesões (KIM e FANSELOW, 1992; CHOWDHURY, QUINN e FANSELOW, 2005; LEHMANN, LACANILAO e SUTHERLAND, 2007; JI e MAREN, 2008) é necessário considerar que as lesões de uma estrutura neural causam danos estruturais nos corpos celulares e também destroem fibras de passagem. Assim, mesmo as lesões excitotóxicas em uma região podem causar alterações em estruturas para as quais ela se projeta e resultar em disfunção no próximo estágio do circuito neural específico (ANAGNOSTARAS, GALE e FANSELOW, 2002). Desse modo, uma

alternativa eficaz para as intervenções que utilizam lesões de tecido neural é mostrada pelos estudos que utilizam intervenção farmacológica (JERUSALINSKY et al., 1994; ZHAO et al., 1994; SERRANO et al., 1995; PARATCHA et al., 2000; IZQUIERDO et al., 2002; SPERANDÉO, 2005; AMARAL et al., 2007; BONINI et al., 2007). De fato, por meio da inativação temporária e do bloqueio da ação de neurotransmissores ou de enzimas numa determinada região, é possível investigar as funções de núcleos específicos no circuito neural subjacente ao condicionamento de medo (SANDERS, WILTGEN e FANSELOW, 2003).

Muitos estudos focalizaram os efeitos de alterações funcionais nas vias neuroquímicas do hipocampo e abrangeram a análise dos diferentes neurotransmissores que atuam nos circuitos hipocampais (STIEDL et al., 2000; WALLENSTEIN, VAGO e WALBERER, 2002; GALE, ANAGNOSTARAS e FANSELOW, 2001; IZQUIERDO et al., 2002; BAST, ZHANG e FELDON, 2003), enquanto outros avaliaram o papel de diferentes enzimas e/ou da transcrição de diferentes genes e os efeitos de intervenções em suas vias bioquímicas que, possivelmente, sustentam os processos de aprendizagem e memória no nível celular (SHEU et al., 1993; ZHAO et al., 1994; JERUSALINSKY et al., 1994; SERRANO, et al., 1995; CAMMAROTA, et al., 1997; SWEATT et al., 1998; PARATCHA et al., 2000; WEEBER et al., 2000; WALLENSTEIN, VAGO e WALBERER, 2002; YOUNG et al., 2002; SPERANDÉO, 2005).

1.3 Caracterização do sistema hipocampal de aves

O hipocampo, estrutura cerebral envolvida na formação da memória, encontra-se em mamíferos localizado bilateralmente no lobo temporal. Essa

estrutura é formada por uma dobra interna da parte ântero-medial do próprio lobo temporal, que se curva em direção ao ventrículo lateral. Em aves a formação hipocampal está localizada bilateralmente no telencéfalo dorsomedial e é dividida em duas regiões: a área parahipocampal (APH) e o hipocampo (HP) propriamente dito, apresentando uma organização com camadas de células em forma de “V” (CAMPBELL e HODOS, 1970). A relação anatômica mais direta entre a região hipocampal de mamíferos e aves apóia-se no fato de que nos dois grupos de animais, a região considerada hipocampo fica às margens do ventrículo lateral. Porém, a topografia apenas não garante relações de proximidade funcional. Assim, as investigações sobre as relações de equivalência entre o hipocampo de aves e de mamíferos também envolveram análises de sistemas neuroquímicos e de neurotransmissores que resultaram em propostas de organização do hipocampo e da APH em diferentes regiões e sub-regiões (ERICHSEN, BINGMAN e KREBS, 1991; KREBS, ERICHSEN e BINGMAN, 1991; SUÁREZ et al., 2006).

Gagliardo, Ioalé e Bingman (1999), entre outros, mostraram que a formação hipocampal de aves e a de mamíferos têm papel similar na cognição espacial. Paralelamente a essa semelhança funcional, há similaridades de dimensões neuroanatômicas e neurofisiológicas incluindo morfologia neuronal (TÖMBÖL et al., 2000), expressão gênica durante o desenvolvimento (PUELLES et al., 2000), perfil neuroquímico (ERICHSEN, BINGMAN e KREBS, 1991; ROSINHA, FERRARI e TOLEDO, 2008), vias de conexão com outras regiões encefálicas (ATOJI et al., 2002), propriedades neurofisiológicas tais como a presença de ritmo theta (SIEGEL, NITZ e BINGMAN, 2000) e as características eletrofisiológicas dos tipos neuronais (SIEGEL, NITZ e BINGMAN, 2000).

Considerando a conectividade interna do hipocampo, Kahn et. al. (2003) injetando marcadores retrógrados e anterógrados na região da formação hipocampal de pombos sugeriu a existência de um circuito trissináptico equivalente ao encontrado no hipocampo de mamíferos. Com relação à conectividade com outras regiões encefálicas, observa-se que o hipocampo de aves, através de suas aferências e eferências, faz parte de uma rede neural que envolve área septal, núcleo taênia, núcleo amigdalóide palial posterior, tálamo e hipotálamo, envolvida com processos de aprendizagem e memória, cujas estruturas recebem e processam informações somato-sensoriais.

1.4 A importância da PKC nos processos de aprendizagem e memória

O armazenamento de informações no cérebro envolve alterações persistentes, dependentes da atividade, na eficiência da transmissão sináptica. Diferentes vias de sinalização têm sido identificadas e descritas como participantes da transdução de sinais nas vias celulares que sustentam a formação da memória.

A investigação dos mecanismos celulares e moleculares básicos do processamento de sinais mostra que os neurônios seguem regras relativamente elementares para traduzir os sinais em processos bioquímicos extremamente complexos. A sinalização intracelular pode começar pelo influxo de cálcio que, entre outras funções (BERRIGDE, BOOTMAN e LIPP, 1998), gera reações de fosforilação/desfosforilação (WANG e KELLY, 1996). O balanço entre esses dois sistemas enzimáticos está, supostamente, relacionado ao tamanho do sinal de cálcio (MALENKA, 1994; TEYLER et al., 1994; NEVEU e ZUCKER, 1996). A

fosforilação é uma modificação química covalente usada pelas células para controle das propriedades de uma ampla variedade de proteínas tais como enzimas, receptores e canais iônicos. É um processo reversível (como observado inicialmente por FISCHER e KREBS em 1955, *apud* NISHIZUKA, 2003) que depende da disponibilidade celular de quinases ou fosfatases, e seus substratos. As proteínas quinases são fosfotransferases que catalisam a transferência do grupo α -fosforil do trifosfato de adenosina (ATP) para o grupo álcool da serina e treonina, ou o grupo fenol da tirosina em cadeias laterais do peptídeo (MICHEAU e RIEDEL, 1999). Enquanto ativam e desativam seus substratos, as próprias quinases estão sujeitas à regulação, através de seus domínios regulatórios, que liberam ou não o domínio catalítico para atividade.

Entre as quinases que estão criticamente envolvidas nos processos celulares de armazenamento de informações está a proteína quinase C (PKC), descoberta em 1977 pelo grupo de Nishizuka, na Universidade do Japão, em Kobe (NISHIZUKA, 2003), clonada na década de 80 (segundo NEWTON, 2001) e amplamente estudada (LIU, 1995; NEWTON, 1995_{a e b}; TOKER, 1998; NAKHOST et al., 1999; PAREKH et al., 2000; NEWTON, 2001; NISHIZUKA, 2003; NEWTON, 2003; SEKI et al., 2005; CORBALÁN-GARCIA e GÓMEZ-FERNANDEZ, 2006; MARTELLI et al., 2006).

PKC é uma família de serina/treonina quinases, de aproximadamente 80kDa, que desempenham importante papel na transdução de sinais e na regulação de várias funções celulares. Todos os membros possuem em comum um domínio quinase conservado C-terminal e um domínio regulatório N-terminal. O domínio regulatório tem uma seqüência auto-inibitória (pseudosubstrato) e um

ou dois módulos de ligação à membrana (domínios C1 e C2) (NEWTON, 2001). As isoformas, baseado na estrutura de seus domínios regulatórios, são classificadas em três grupos (NISHIZUKA, 1995; NEWTON, 1995_{a e b}; PAREKH et al., 2000; SEKI et al., 2005; CORBALÁN-GARCIA e GÓMEZ-FERNANDEZ, 2006): I) PKCs convencionais ou clássicas (cPKCs; α , β , β II e γ), contêm dois domínios ricos em cisteína (C1A e C1B) seguidos por um domínio C2 que se ligam, respectivamente, ao diacilglicerol (DG) e ao cálcio; II) PKCs novas (nPKCs; δ , ϵ , ζ /L e η), apresentam o domínio C2 não responsivo ao cálcio e precedendo os domínios C1 (C1A e C1B) na seqüência primária, sendo ativadas de forma DG-dependente e cálcio-independente; III) PKCs atípicas (aPKCs; ξ e λ), são desprovidas de domínio C2, apresentam somente um domínio C1 não responsivo ao DG, sendo, portanto, independentes de cálcio e do DG (Figura 1). Além disso, há PKC μ e ν que alguns consideram constituir uma quarta classe e outros consideram como membros de uma família distinta chamada PKD (NEWTON, 2001).

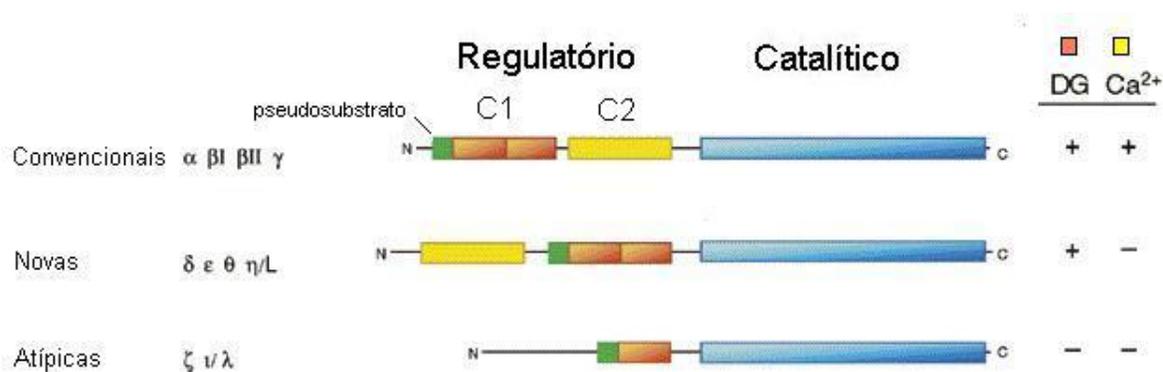


Figura 1. Estrutura primária das isoformas de PKC. O sítio catalítico conservado em todas as isoformas (em azul) e o sítio regulatório constituído pelos domínios C1 (em laranja), C2 (amarelo) e pseudosubstrato (verde). DG: diacilglicerol. (Modificado de NEWTON, 2001)

As isoformas da PKC devem passar por três fosforilações ordenadas para adquirir competência catalítica (NEWTON, 2001). A primeira fosforilação é dependente da PDK-1 e ocorre em um *loop* próximo ao sítio catalítico, o *loop* de ativação. Ela leva à autofosforilação de um domínio rico em prolina, seguida pela autofosforilação do sítio hidrofóbico, assim chamado por ser circundado por resíduos hidrofóbicos. Para ser ativada a proteína fosforilada deve se ligar ao segundo mensageiro lipídico, diacilglicerol (DG), o que resulta na translocação da maioria das isoformas do citosol, onde são mantidas na conformação inativa, para a membrana, onde ela se torna alostericamente ativa (NEWTON, 1995_b), com o sítio catalítico liberado pela saída do pseudo-substrato. O DG na membrana das células neurais é disponibilizado a partir da interação de um neurotransmissor (como por exemplo, o glutamato) a seu receptor acoplado à proteína G (receptor metabotrópico – como o mGluR no caso do glutamato) que leva à ativação da fosfolipase C e conseqüente hidrólise do fosfolípido de membrana, fosfatidilinositol-4-5-bifosfato, em inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e DG. Além dos processos de fosforilação e ativação alostérica, há um terceiro mecanismo que é central na funcionalidade da PKC: a interação com proteínas de suporte (*scaffold*) que posicionam a enzima em locais intracelulares específicos (Figura 2).

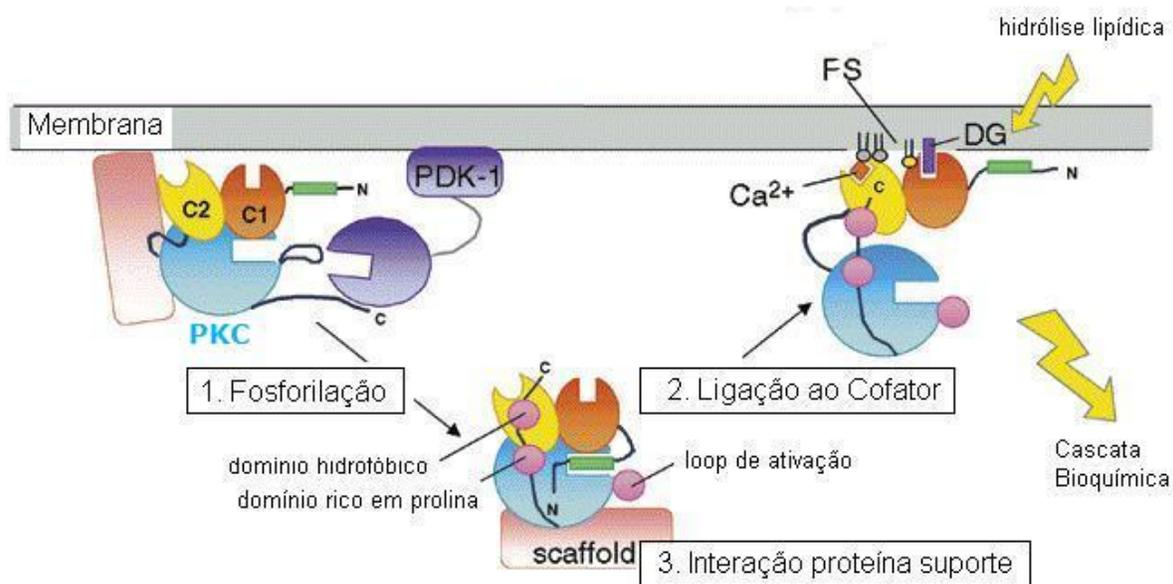


Figura 2. Modelo resumindo a regulação espacial, estrutural e conformacional da PKC por 1. Fosforilação, 2. Ligação ao cofator e 3. Interação à proteína suporte (*scaffold*). A PKC traduzida (mostrada em azul) se associa à membrana em uma conformação que expõe o *loop* de ativação para fosforilação e o C-terminal para ligação da PDK-1. O primeiro passo na modificação pós-traducional da PKC é a fosforilação do *loop* de ativação pela PDK-1 (os círculos em rosa representam fosfatos). Essa fosforilação alinha os resíduos para catálise. A PDK-1 se desliga da PKC e ocorre autofosforilação de dois sítios C-terminais (domínio hidrofóbico e domínio rico em prolina). A proteína fosforilada é liberada para o citoplasma, onde é mantida em sua conformação auto-inibida pelo pseudosubstrato (em verde) e em uma conformação estável, fosfatase-resistente, pela re-estruturação das interações C-terminais. Geração de diacilglicerol (DG) e, para as PKCs convencionais, mobilização de Ca²⁺, possibilitam a alteração alostérica, tornando a proteína ativa. Isso é alcançado quando os domínios C1 (laranja) e C2 (amarelo) se ligam à membrana, assim fornecendo energia para liberar o pseudosubstrato do sítio ativo, permitindo a ligação do substrato e catálise. Além disso, as proteínas suporte (*scaffold*) desempenham um papel chave na função da PKC por posicionar isoformas específicas em locais intracelulares particulares (Modificado de NEWTON, 2001).

Uma das particularidades da PKC é a regularidade de sua associação a processos de aprendizagem e memória na evolução filogenética. Em invertebrados, foi mostrada a participação da enzima nos mecanismos intracelulares de plasticidade induzida pela aprendizagem. Schwartz, Calignato e Sacktor (1990), trabalhando com *Aplysia*, observaram a ativação da PKC após a sensibilização comportamental do reflexo de retirada, o que também foi demonstrado no condicionamento clássico em *Hermisenda* (MATZEL, LEDERHENDLER e ALKON, 1990). Os resultados desses trabalhos mostram o envolvimento da PKC tanto nos processos de aprendizagem não associativa quanto naqueles de aprendizagem associativa.

Estudos realizados em aves, mostraram que o treino de esquiva passiva (inibitória) com pintainhos de 1 dia que aprendem a evitar contos embebidas em substância de sabor desagradável, induziu ativação da PKC que foi demonstrada *in vitro* através de imunomarcção (BURCHULADZE, POTTER e ROSE, 1990). Estudos conduzidos por Ali, Bullock e Rose (1988), Burchuladze, Potter e Rose (1990), Zhao et al. (1994) e Serrano et al. (1995) confirmaram a participação da PKC no processo de memória *in vivo*, pela administração intracerebral de inibidores da enzima antes ou após o treino, visto que o inibidor foi capaz de provocar efeitos amnésicos. O grupo de Routtenberg (SHEU et al., 1993) avaliou a atividade da PKC em pintainhos treinados em *imprinting* (estampagem) a um objeto, através da análise quantitativa de substratos fosforilados, mostrando que houve um aumento após o treino na região do *mesopallium intermediomediale* (IMM – REINER et al., 2004 - anteriormente chamada IMHV), área relacionada à memória.

Em mamíferos, a distribuição da PKC no cérebro está estreitamente correlacionada às estruturas cerebrais envolvidas nos processos de memória (NOGUÊS, 1997), como córtex pré-frontal, córtex cingulado, neocórtex, hipocampo e amígdala. Embora o estudo da PKC no cérebro inteiro possa fornecer muitos dados sobre a organização das estruturas cerebrais durante a atividade cognitiva, grande parte dos estudos tem se voltado para a formação hipocampal.

1.5 PKC hipocampal e memória

Um dos primeiros artigos publicados sobre a influência do comportamento sobre a atividade da PKC hipocampal foi de Bank et al. (1988) e forneceu resultados que estavam de acordo com o modelo de ativação da PKC. Este estudo mostrou que o condicionamento clássico da membrana nictante em coelhos induziu a translocação de 30% da PKC citosólica para a membrana. A partir disso, vários trabalhos, *in vitro* e *in vivo*, foram realizados investigando a relação da PKC com os processos de aprendizagem e memória no hipocampo (revisão de VAN DER ZEE et al., 1997). Em 2000, Weeber et al. produziram animais *knock-out* para o gene da PKC β . Verificaram déficit de aprendizagem nesses animais submetidos ao condicionamento clássico aversivo e ao condicionamento contextual, apesar de não exibirem déficits na transmissão sináptica ou potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo, onde a expressão de PKC β é pronunciada.

Jerusalinsky et al. (1994) demonstraram que o bloqueio bilateral da PKC hipocampal levou ratos à amnésia completa da tarefa de esquiva inibitória quando o inibidor seletivo da PKC, CGP 41321, foi injetado imediatamente ou 30 min após o treino, o que não ocorreu quando administrado 120 ou 180 min após o treino. Utilizando essa mesma tarefa, Paratcha et al. (2000) também investigaram o envolvimento da PKC α hipocampal na formação de memória, observando que o bloqueio intrahipocampal pré ou pós-treino de PKC α e/ou β , através do inibidor seletivo dessas isoformas, Gö 6976, prejudicou a aprendizagem. Além disso, encontrou um aumento seletivo da PKC α nas membranas sinápticas hipocampais de ratos sacrificados 0, 30 e 120 min após o treino, realizando *Western blot* com fracionamento de membrana e citoplasma. Não houve alteração significativa na quantidade de PKC β entre os animais controles e treinados. Observou também um aumento nos níveis de PKC α e β ligadas à membrana no hipocampo de ratos treinados e sacrificados 120 min após o treino. Esse aumento, porém, não se mostrou específico para o treino de esquiva inibitória, uma vez que ocorreu também nos animais expostos somente ao choque. Esses resultados sugeriram o requerimento da PKC α e/ou β hipocampais nas fases iniciais da formação de memória na tarefa de esquiva inibitória.

Em contrapartida, dados de Sweatt et al. (1998) indicaram um aumento de fosforilação da PKC, em cortes hipocampais estimulados para indução de LTP, 45 a 60 min após a estimulação. Atkins et al. (1998) realizando experimentos em ratos, sacrificou os animais em diferentes intervalos de tempo após o condicionamento (1 min, 1h, 2h e 24h) e verificou maior fosforilação da PKC α/β no hipocampo 1h após o treino de condicionamento clássico aversivo e 24h após

o condicionamento contextual. Outro trabalho com condicionamento aversivo (YOUNG et al., 2002), mostrou um aumento na atividade da quinase 15 min após o treino, que permaneceu elevada por tempo considerável, variável de acordo com a isoforma, após o condicionamento. Esse trabalho verificou que os níveis de PKC α na membrana aumentaram no intervalo compreendido entre 15 a 90 min pós-treino, retornando então aos níveis basais, enquanto os níveis de PKC β na membrana não mostraram alterações significativas. A PKC γ aumentou significativamente na membrana em diferentes tempos (30 e 90 min; 48 a 72h) após o condicionamento. Wallenstein, Vago e Walberer (2002), utilizando um potente inibidor de PKC e PKA em diferentes intervalos de tempo, verificaram um significativo prejuízo na consolidação da memória do condicionamento aversivo, que era máximo quando as quinases eram inibidas aos 90 min após o treino.

Cammarota et al. (1997) e Young et al. (2002) avaliaram a atividade da PKC hipocampal indiretamente pela análise da atividade da proteína dependente da PKC ativada, GAP-43, confirmando a participação da quinase e seu substrato nos mecanismos de plasticidade subjacentes aos processos de aprendizagem e memória. A GAP-43 é um substrato da PKC implicado na aprendizagem e modelos de plasticidade sináptica, também conhecida como B-50, proteína F1, P-57 e neuromodulina. É uma proteína associada à membrana específica das células neurais, localizada em cones de crescimento e terminais pré-sinápticos, e está envolvida com crescimento de neuritos, regeneração e plasticidade. No cérebro adulto sua expressão está restrita ao hipocampo e estruturas prosencefálicas (YOUNG et al, 2000). Alterações de sua fosforilação foram demonstradas no cérebro de pintainhos submetidos ao *imprinting* (SERRANO et

al., 1995) e à esquiva passiva (SHEU et al., 1993). Cammarota et al. (1997) mostraram um aumento da fosforilação da GAP-43 no hipocampo de ratos 30 min após o treino para a tarefa de esquiva inibitória.

Apesar de variados, considerando as tarefas de aprendizagem, as isoformas da PKC envolvidas nos processos de aprendizagem e memória e seu curso temporal, os trabalhos são unânimes quanto à participação da PKC nesses processos. A partir desses dados, decidiu-se investigar o envolvimento da PKC nos processos de aprendizagem e memória aversiva em pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo. Baseado no conhecimento prévio do envolvimento da região hipocampal na formação da memória contextual (KIM et al., 1991; PHILLIPS e LEDOUX, 1992; IZQUIERDO e MEDINA, 1993; FANSELOW e KIM, 1994; MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997; HALL, THOMAS e EVERITT, 2001; PANG e LU, 2004) analisou-se a participação da PKC no hipocampo após o treino. Para tanto, foi investigada a ativação da isoforma PKC α (de acordo com ATKINS et al., 1998) diretamente, através da análise semi-quantitativa por *Western blot* da proteína, e indiretamente, pela análise da forma fosforilada da proteína dependente de PKC, GAP-43, na região hipocampal de pombos submetidos e não submetidos ao pareamento de estímulos característico do condicionamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Verificar a participação da PKC nos processos de aprendizagem e memória aversiva em pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos da administração i.c.v. do inibidor da PKC sobre as respostas comportamentais de pombos submetidos a uma sessão de treino para condicionamento clássico aversivo e testados 24h após.
- Verificar o envolvimento da isoforma PKC α / β nos processos de aprendizagem e memória aversiva no hipocampo de pombos submetidos ao treino para condicionamento clássico aversivo.
- Identificar o curso temporal da ativação da PKC α / β e da proteína substrato da PKC, GAP-43, no hipocampo de pombos treinados para condicionamento clássico aversivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Foram utilizados pombos, machos, adultos, com aproximadamente 18 meses de vida, peso médio de 350 g, da espécie *Columba livia*, adquiridos de um único criadouro local. No biotério, os animais tiveram seus olhos e bicos examinados e, quando necessário, tratados. Foram alojados em grupos de 4 a 5, em gaiolas-viveiro (50x50x50cm), por 7 dias. Após essa semana, os animais foram alojados em gaiolas individuais (50x50x50cm). Durante todo o período de experimento os animais receberam água e alimentação à vontade e foram mantidos sob ciclo claro-escuro de 12:12h, com luz acesa às 06:00h e apagada às 18:00h. A alimentação consistiu de uma mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração para aves, areia e farinha de ostra. Além disso, receberam complementação com complexo vitamínico diluído na água do bebedouro, uma vez por semana. Todos os procedimentos seguiram o protocolo experimental de respeito aos princípios éticos em experimentação animal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob o protocolo de número 1193-1 (Anexo).

3.1.1 Experimento 1

Esse experimento teve como objetivo analisar os efeitos da administração i.c.v. do inibidor da PKC sobre as respostas comportamentais de pombos submetidos a uma sessão de treino para condicionamento clássico aversivo e testados 24h após. Os pombos foram distribuídos, de forma aleatória, em dois grupos:

I – Grupo Condicionado-Veículo (GCdVe; n=5): administração via intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) de veículo, 1h antes da sessão de condicionamento.

II – Grupo Condicionado-Calfostina C (GCdCa; n=6): submetidos à injeção i.c.v. do inibidor da PKC, calfostina C, 1h antes da sessão de condicionamento.

3.1.2 Experimento 2

Esse experimento investigou o envolvimento da isoforma PKC α no processos de aprendizagem e memória aversiva no hipocampo de pombos submetidos ao treino para condicionamento clássico aversivo.

Os pombos foram distribuídos, de forma aleatória, em quatro grupos:

I – Grupo Controle (GC; n=6): animais levados ao laboratório, mantidos por 5 minutos sobre a bancada, sem exposição à câmara experimental ou a qualquer estímulo.

II – Grupo Controle-Contexto (GCC; n=6): animais expostos à câmara experimental, por 20 min, sem apresentação de estímulos.

III – Grupo Controle-Randômico (GCR; n=6): animais expostos à câmara experimental com apresentação de estímulos, som e choque, não pareados e distribuídos ao acaso ao longo da sessão.

IV – Grupo Condicionado (GCd; n=6): animais submetidos ao treino na câmara experimental, com exposição aos estímulos (som e choque) pareados.

Os animais foram sacrificados 2h após os procedimentos experimentais.

3.1.3 Experimento 3

O objetivo desse experimento foi identificar o curso temporal da ativação da PKC α e da proteína substrato da PKC, GAP-43, no hipocampo de pombos treinados em condicionamento clássico aversivo. Os pombos foram distribuídos, de forma aleatória, em grupos para determinação da janela temporal de ativação da PKC e de fosforilação da sua proteína-substrato, GAP-43. Esses animais foram submetidos ao treino na câmara experimental e separados em quatro grupos de acordo com o tempo aguardado para o sacrifício após o treino – 1 min (G1min; n=6); 1h (G1h, n=6), 2h (G2h, n=6) e 24h (G24h; n=6). Para análise da GAP-43 foi utilizado n=5.

3.2 Drogas e Reagentes

O composto calfostina C (Calbiochem, La Jolla, USA), inibidor seletivo da PKC, foi dissolvido em DMSO e salina, resultando em uma solução de 60 $\mu\text{g/ml}$, DMSO a 2%. Os animais experimentais (GCdCa) receberam 5 μl (300ng) da droga via intra-cerebro-ventricular (i.c.v.). Os animais do GCdVe receberam 5 μl de veículo (DMSO 2% em solução salina). Os animais dos demais grupos não foram submetidos ao tratamento com calfostina C ou veículo. A solução administrada aos animais foi armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, em alíquotas de 50 μl que foram descongeladas e mantidas em geladeira (4°C) no período do experimento.

A dose de calfostina C foi definida a partir de trabalhos que usaram inibidor da PKC. Foram analisadas as doses eficazes de um outro inibidor (queletrina) utilizado em aves (SERRANO et al., 1995) e em roedores (FLEEGAL e

SUMNERS, 2003) e as doses eficazes de calfofina C utilizadas em roedores (GALEOTTI, BARTOLINI E GHELARDINI, 2003; KUMAR, KHISTI e MORROW, 2005), considerando-se as relações entre espécies, peso corporal, região de administração e doses utilizadas.

3.3 Equipamentos

Para a realização das sessões experimentais de treino, foi utilizada uma câmara de observação (30x30x40 cm), com teto, assoalho e paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira.

Nessa câmara, havia um alto-falante embutido no teto, ligado a um áudio-estimulador, com variação de frequência entre 125 e 8000 Hz ; como também um fio em espiral para entrada de energia. Os choques elétricos foram aplicados através dos eletrodos, instalados bilateralmente no osso pélvico do animal, utilizando uma fonte (Foringer, USA), controlada por marcadores de tempo eletromecânicos. A câmara experimental foi iluminada com uma lâmpada vermelha de 25W, acoplada em sua parede lateral. Todas as sessões foram registradas em computador por um sistema de filmagem digital.

3.4 Procedimentos Gerais

3.4.1 Adaptação às condições do biotério

Após a mudança para as gaiolas-viveiro individuais, os animais foram submetidos à adaptação às condições do biotério por um período mínimo de 15

dias, sendo mantidos sob temperatura média de 25 C, ciclo claro-escuro 12:12h e com alimentação *ad libitum*.

3.4.2 Implante de eletrodos púbicos

O animal foi retirado do biotério para o laboratório e manipulado de forma a expor a protuberância do osso da pelve, pelo afastamento das penas. Com um algodão embebido em álcool etílico 70% foi feita assepsia local. Um fio de aço ortodôntico (0,5 mm de espessura, 10 cm de comprimento) foi introduzido ao redor de cada osso púbico e conectado a fios ligados a uma pequena tomada fixa numa jaqueta de couro sintético no dorso do animal. Essa jaqueta possui duas aberturas destinadas a acomodar as asas do animal, o que faz com que ela se mantenha presa a ele.

3.4.3 Cirurgia para implante de cânulas

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketamina Agener 10%, Agener União) 100 mg/kg de massa corporal (1 ml/kg), e cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer) 20 mg/kg de massa corporal (1 ml/kg), via intramuscular. Após remoção das penas do dorso da cabeça, os animais foram colocados em aparelho estereotáxico. Foi realizada assepsia da região com peróxido de hidrogênio a 3% e uma incisão de aproximadamente 20 mm na pele, para exposição da calota craniana, seguida de remoção do periósteo. A seguir, com auxílio de uma broca odontológica de aço-carbono esférica (número 1/2), adaptada a um motor de baixa rotação, o crânio foi perfurado nas coordenadas A9mm e L1mm (de acordo com atlas de Karten e Hodós, 1967). Uma cânula-guia

de aço inoxidável 23G (*gauge*), com 10 mm de comprimento, foi então implantada através desse orifício, atingindo a profundidade de 3 mm em relação à calota craniana, e mantida em posição com auxílio de resina acrílica auto-polimerizável (L.D. Caulk, Milford, DE, USA). Uma agulha gengival 30G, com 10 mm de comprimento, e espessura igual ao diâmetro interno da cânula, foi introduzida na cânula-guia para que a mesma permanecesse obliterada até o momento da administração das soluções. Ao final destes procedimentos, os animais retornaram para suas gaiolas-viveiro, lá permanecendo por um período de sete dias para recuperação.

Para confirmar a localização da cânula, i.c.v., 3 µl de um corante (azul de Evans) foi injetado após os experimentos, sendo utilizados apenas os dados daqueles animais em que foi observada, após decapitação e remoção do encéfalo, a coloração no interior do ventrículo.

Os animais do grupo controle foram levados ao laboratório, mantidos por 5 min sobre a bancada, em decúbito dorsal, e devolvidos às suas gaiolas-viveiro, sem exposição à câmara experimental ou aos estímulos. Esse procedimento foi realizado por quatro dias consecutivos, sendo os animais sacrificados no quinto dia, e teve por objetivo minimizar o estresse dos animais no dia da decapitação.

Os animais de todos os outros grupos foram pesados e habituados por quatro dias consecutivos precedentes ao dia do treino. Os animais foram colocados em uma câmara de 60x60x60 cm, com teto, assoalho e três paredes revestidas de fórmica branca, com parede frontal de vidro unidirecional e com iluminação feita por lâmpada fria, fosforescente, onde permaneceram por 40 min, sem receber qualquer estímulo.

3.4.4 Infusão intra-cerebro-ventricular (i.c.v.)

Após recuperação da cirurgia e adaptação ao laboratório, os animais com as cânulas implantadas foram selecionados, aleatoriamente, para administração de calfostina C (GCdCa) ou de veículo (GcdVe). A administração foi realizada 1h antes do treino, através de uma seringa de 10 µl (Hamilton, Reno, NV, USA) acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha gengival 30G fixada em sua extremidade. A seringa Hamilton foi adaptada a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil) regulada para injeção de 4 µl/min. Para infusão, a agulha 30G foi inserida na cânula-guia, passando 0,5 mm além do seu comprimento. A agulha permaneceu posicionada por 30 s após o término da infusão para evitar um possível refluxo da solução infundida.

O tempo de 1h previamente ao procedimento para administração da droga foi escolhido baseado em trabalhos utilizando a calfostina C no sistema nervoso central de ratos e camundongos (GALEOTTI, BARTOLINI e GHELARDINI, 2003; MATSUSHITA et al., 2007) e que obtiveram o efeito inibitório desejado.

3.4.5 Adaptação às condições do laboratório

Todos os animais submetidos ao condicionamento clássico com associações som-choque foram pesados e habituados por quatro dias consecutivos antes do treino. Após a pesagem, os animais eram colocados em uma câmara (60x60x60 cm), com três paredes revestidas em fórmica branca, parede frontal de vidro e iluminação com luz branca fluorescente, onde permaneciam por quarenta minutos. Os animais que serviram como controles nos Experimentos 2 e 3 eram apenas retirados da gaiola-viveiro, transportados até o

laboratório, pesados e reconduzidos ao biotério, não sendo habituados à câmara experimental.

3.4.6 Treino para condicionamento som-choque

O treino para condicionamento clássico som-choque foi feito em uma sessão de 20 min. Os pombos foram removidos de suas gaiolas individuais, transportados até o laboratório, pesados e levados à câmara experimental. Durante essa sessão, ocorreu a apresentação de um som (1000 HZ, 83 dB, 1s) cujo término coincidiu com a apresentação de um choque (10 mA, 35 ms). Os estímulos foram apresentados aos 5, 10 e 15 min da sessão de treino.

O treino dos animais do grupo controle randômico (GCR) consistiu numa sessão de 20 min na câmara experimental, onde os estímulos sonoros e os elétricos foram apresentados sem relação de contingência e/ou contigüidade na seguinte sequência: aos 2 min, som; aos 5 min, choque; aos 9 min, choque; aos 12 min, som; aos 13 min, som e aos 17 min, choque. Os pombos do grupo controle contexto (GCC) foram expostos somente ao contexto de condicionamento, a câmara experimental, por 20 min, e não receberam qualquer estímulo. Após o treino os animais foram reconduzidos às suas gaiolas-viveiro.

3.4.7 Teste ao contexto de condicionamento

O teste de memória aversiva ao contexto, ou de medo condicionado, foi realizado 24h após o treino. Nesse teste os animais, GCdCa e GCdVe, foram recolocados na mesma câmara de condicionamento som-choque durante 20 min

sem apresentação de qualquer estímulo. Após o teste, todos foram reconduzidos ao biotério.

3.5 Análise Bioquímica

A análise bioquímica foi realizada para os animais dos grupos do Experimento 2, GC, GCC, GCR e GCd, e Experimento 3, G1min, G1h e G24h.

Para análise da atividade da PKCá/β no hipocampo desses animais, foi empregada a metodologia de *Western Blot*, com fracionamento das porções de membrana e de citoplasma. O fracionamento foi o procedimento de escolha visto que a ligação da PKC à membrana plasmática sináptica é um passo crítico na ativação da proteína.

A região hipocampal do pombo foi dissecada após decapitação do animal e remoção do encéfalo. A dissecação foi realizada de acordo com as coordenadas do atlas de Karten e Hodós (1967). Esse material foi imediatamente acondicionado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado à temperatura de -80°C até sua utilização.

Para a extração de proteínas, o tecido congelado foi pesado para determinação da quantidade de tampão necessária para homogeneização, sendo que o peso da amostra correspondeu a 10% da quantidade de tampão adicionada ao tecido. A extração foi realizada em duas etapas, com tampões 1 e 2. O tampão 1 consistiu de 20 mM de tampão fosfato, 320 mM de sacarose, 2 mM de EDTA e 1% de coquetel inibidor de protease (P8340 Sigma). O tampão 2 foi composto de 20 mM de tampão fosfato, 320 mM de sacarose, 2 mM de EDTA, 1% de inibidor de protease e 0,5% de Triton X-100 (protocolo adaptado de YOUNG et al., 2002).

O material foi homogeneizado em tampão 1, a 4 °C, num gerador 20s Politron PTA (Modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA) em velocidade máxima por 15 s e, depois, centrifugado a 4 °C, 100g, por 4 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o precipitado foi descartado. A amostra colhida foi novamente centrifugada a 4°C, 17000g, por 20 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e correspondeu à fração citoplasmática; o *pellet* foi suspenso em tampão 2 (metade do volume do tampão 1 colocado no tecido inicialmente) no gerador Politron, e representou a fração de membrana. As concentrações protéicas de todas as amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando como referencial uma curva padrão de albumina.

Às amostras foi adicionado tampão de amostra Laemmli (LAEMMLI, 1970), numa proporção 1:1 (50 µl Laemmli/50 µl de amostra). A seguir, as amostras foram mantidas por 5 min em banho-maria a 95 °C. Para eletroforese, foi utilizado gel bifásico de 1,5 mm de espessura: gel de empilhamento a 4% (*Stacking*; 4,48 ml de água deionizada, 700 µl de acrilamida 40%, 1,75 ml de tampão Tris-ácido fosfórico 0,5M pH6,9, 70 µl de SDS 10%, 35 µl de APS 10% e 7 µl de Temed) e gel de resolução a 8% (*Resolving*; 4,86 ml de água deionizada, 1,8 ml de acrilamida 40%, 2,25 ml de tampão 1,5M pH 8,9 Tris-HCl, 90 µl de SDS 10%, 45 µl de APS 10% e 4,5 µl de Temed). As amostras foram aplicadas no gel em volume correspondente a uma concentração de 30 µg de proteína. A corrida ocorreu a 200 V por aproximadamente 1h e 30 min em tampão de corrida (100 ml de Tris-glicina, 300 ml de água deionizada e 4 ml de SDS 10%). As proteínas

foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 mm, BioRad), *overnight* (aproximadamente 12h), 90 mA, banhada com tampão de transferência (200 ml de Tris-glicina, 440 ml de água deionizada, 160 ml de metanol e 1,4 ml de SDS 10%).

Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (0,05 g de Ponceau S, 47,5 ml de água deionizada e 2,5 ml de ácido acético) para confirmação da presença de bandas com proteínas. O corante foi removido através de lavagem da membrana com NaOH 0,1M. A membrana foi, então, lavada com tampão fosfato (PB) 0,05M e seus sítios de ligações inespecíficas bloqueados com uma solução de 5% de leite em pó desnatado (0,5 g de leite em pó desnatado em 10 ml de solução de PBS Tween – 50mM PB pH 7,4, 150mM NaCl, 0,01% Tween 20) por 1h.

A PKC α foi detectada na membrana de nitrocelulose por incubação, *overnight*, à temperatura de 4°C, com anticorpo primário (9375, anti-phospho-PKC α Thr 638/641, polyclonal rabbit, Cell Signaling Technology, USA), diluição de 1:500 (20 μ l de anticorpo diluídos em 10 ml de albumina 0,3% em solução de PBS Tween). No dia seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada por 5 min com solução de PBS Tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax anti-rabbit, Zymed Laboratories, USA), diluído 1:2000 (5 μ l de anticorpo em 10 ml de leite em pó desnatado 0,3% em solução de PBS Tween), por 1h, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com solução de PBS-Tween, sendo as bandas imunorreativas detectadas

por autoradiografia em um filme Kodak GBX2 utilizando-se kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Pierce Biotechnology, USA).

Para detecção da GAP-43 foram utilizados gel de resolução a 12% e amostra total (membrana e citoplasma). A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo primário (G8043, anti-phospho-GAP-43 pSer41, polyclonal rabbit, Sigma-Aldrich, USA, 1:500) e com anticorpo secundário (Zymax anti-rabbit, Zymed Laboratories, USA, 1:2000).

Para controle interno das membranas foi utilizada a marcação para á-tubulina (anticorpo primário: T6199, anti-á-tubulina, monoclonal mouse, Sigma-Aldrich, USA, 1:1000; anticorpo secundário: Zymax anti-mouse, Zymed Laboratories, USA, 1:2000).

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

3.6 Análise dos dados comportamentais

As gravações digitais das sessões de treino dos GCC, GCR, GCd, GCdCa e GCdVe, e de teste do GCdCa e do GcdVe, foram transcritas com registros de todos os comportamentos, no momento em que os animais os apresentavam, utilizando-se o programa EthoLog 2.2 (Ethological Transcription Tool, 1995-99; Ottoni, 2000).

A partir da seqüência comportamental obtida foram computados os comportamentos registrados em intervalos de 30 s. A análise foi feita considerando-se a freqüência acumulada em blocos de cinco intervalos de

registro, obtendo-se, assim, um total de oito blocos de intervalos de registro para cada sessão.

O registro dos comportamentos foi feito de acordo com a descrição e definição das categorias e itens comportamentais, contidas no catálogo de comportamento de pombos (REIS et al., 1999). Essas categorias foram:

- Exploração (EXP): movimentos relacionados à orientação para investigação de partes ou do ambiente como um todo. Compreende estender o pescoço (alongamento do pescoço no eixo vertical – sentido cabeça-pé, aumentando a distância entre o tronco e a cabeça); explorar (movimentos seqüenciais, rápidos e repetidos de rotação, inclinação e balanço da cabeça, combinados com alongamento do pescoço. Postura em pé ou agachada.); alerta (postura ereta – em pé, pescoço com extensão total no sentido cabeça-pé; ocorre direcionamento da cabeça para um ponto (fixar), seguido por movimentos de inclinação em várias direções e oscilação da cabeça); rotar a cabeça (deslocamento lateral da cabeça no plano horizontal em torno do eixo vertical, num ângulo igual ou maior que 45°. Postura em pé ou agachada.).
- Esquadrinhar (ESC): deslocamento lateral da cabeça no plano horizontal, com rotação lenta da cabeça, percorrendo ponto a ponto um ângulo de 180° em torno do eixo vertical. Postura ereta ou agachada.
- Vigilância (VIG): fixar. Orientação da cabeça para um ponto do ambiente, com extensão restrita do pescoço (ângulo > 30° em relação ao tronco), permanecendo imóvel ou com movimentos de pequena inclinação e oscilação da cabeça.

- Exploração cautelosa (ECA): estando o animal em postura de congelamento, ocorre extensão do pescoço e orientação da cabeça para uma determinada região do ambiente, seguido por encolhimento do pescoço e retorno à condição anterior (periscópio).
- 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.
- Comportamentos pré-exploratórios (PRE): constituem reações reflexas que foram geralmente observadas antecedendo o explorar, como o sobressalto e o estremeçamento.
- Locomoção (LOC): deslocamento do corpo no espaço, em relação a um ponto qualquer que não ele mesmo, envolvendo andar, pisotear, esvoaçar, pular, circular.
- Manutenção (MAN): comportamentos relacionados com ajustes corporais e vegetativos (bocejar, deglutir, piscar), auto-limpeza e estimulação, coçar a cabeça e o corpo.
- Parado (PAR): ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte desse; o animal interrompe o movimento em curso ou fica sem se mover, em pé, geralmente no centro da câmara experimental e sem apoio peitoral, com o pescoço encolhido ou em pequena extensão, com o bico voltado para a direção dos pés e com ângulo entre o bico e o papo < 60°.
- Congelamento (*freezing* – FRZ): o comportamento de congelamento (*freezing*) foi registrado cada vez que foram observados no mínimo 5 dos seguintes critérios: a)

flexão total ou parcial das pernas (agachado ou encolhido); b) separação ampla entre os pés (base de apoio alargada); c) cauda e asas desalinhas; d) região ventral ou peitoral do corpo em contato com o piso ou com uma das paredes da câmara; e) pescoço com extensão restrita ou encolhido; f) olhos totalmente abertos; g) cabeça imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente; h) respiração acelerada e, i) ausência de outros comportamentos observáveis.

Os registros foram discutidos e revistos por observadores-controles, para fins de controle da validade dos dados.

3.7 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados comportamentais percentuais nas sessões de treino e de teste, foi utilizada ANOVA de uma via, sendo o comportamento, a variável dependente e grupo, a variável independente. Foi utilizada ANOVA para medidas repetidas para comparar os grupos de animais e os blocos de intervalos de registro (variáveis independentes) quanto aos comportamentos de congelamento (*freezing*), vigilância e exploração (variáveis dependentes) durante as sessões de treino e de teste. As análises *post hoc* foram realizadas com o teste para múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Para a análise estatística dos dados moleculares, os valores de densidade óptica obtidos por *Western blot* foram analisados utilizando-se o teste *t* pareado. Considerou-se diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Experimento 1

Na Figura 3 são apresentados os dados percentuais de ocorrência dos comportamentos no GCdCa e no GCdVe, durante as sessões de treino para condicionamento e de teste ao contexto. Foi utilizada ANOVA para a análise dos dados. Na sessão de treino os grupos apresentaram variabilidade comportamental, indicada pela ocorrência de diferentes comportamentos. Houve maior ocorrência dos comportamentos EXP, VIG e FRZ nos dois grupos, sem diferença significativa na ocorrência desses comportamentos entre os grupos (para EXP $F_{1,9} = 0,78$; $p = 0,40$; para VIG $F_{1,9} = 3,7$; $p = 0,08$; para FRZ $F_{1,9} = 0,01$; $p = 0,92$). Os valores percentuais dos outros comportamentos registrados (PRE, ESC, LOC, MOV e MAN) não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos ($p > 0,05$). Na sessão de teste também foram observados vários comportamentos com predominância de EXP, VIG, FRZ nos dois grupos, sendo FRZ significativamente mais observado no GCdVe ($F_{1,9} = 9,40$; $p = 0,015$) e EXP no GCdCa ($F_{1,9} = 20,62$; $p = 0,001$). Os demais comportamentos ocorreram com uma frequência menor nos dois grupos e, de acordo com a análise estatística realizada, não apresentaram diferença significativa entre eles.

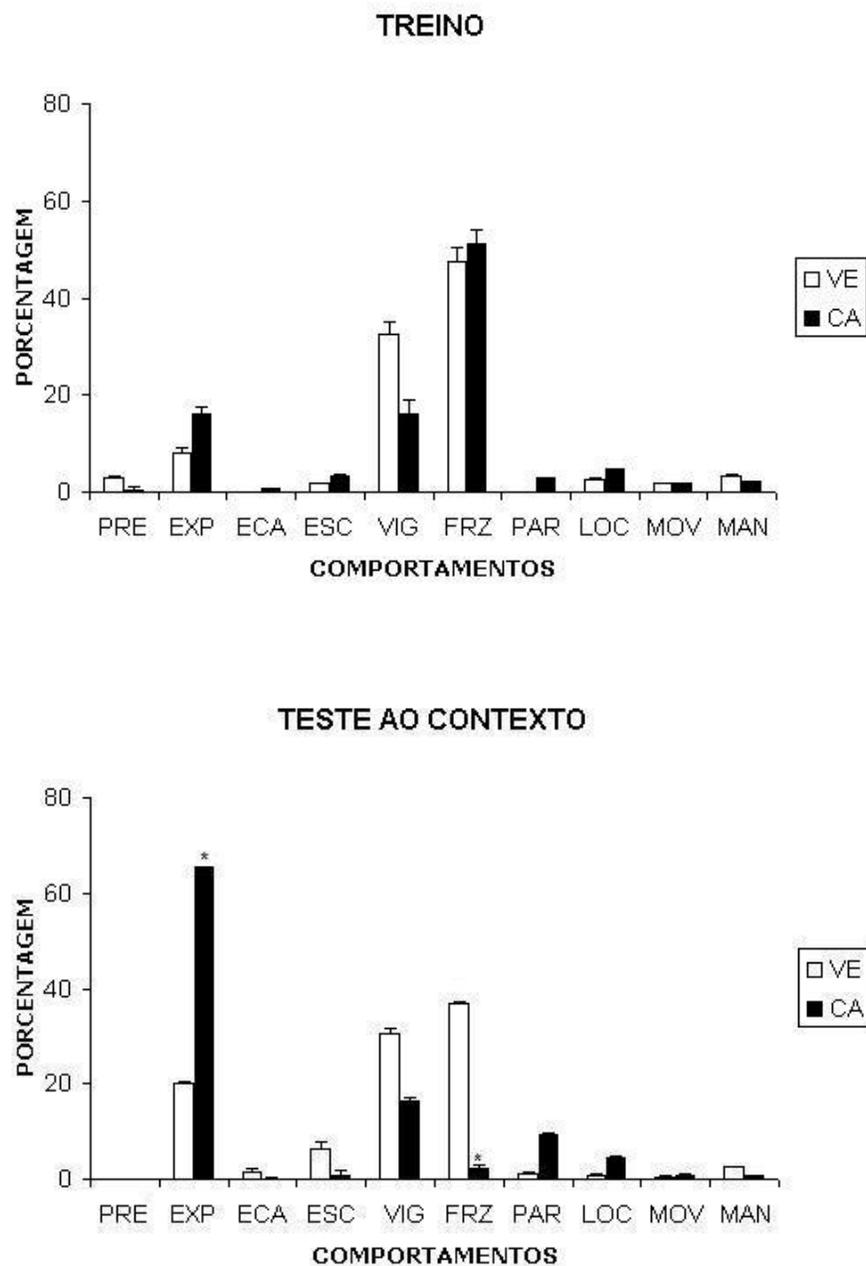


Figura 3. Valores percentuais (+EPM) dos comportamentos registrados durante as sessões de treino (superior) e de teste (inferior) do grupo tratado com calfofostina C (GCdCa; CA; 5 μ l – 300 μ g em DMSO 2% em salina) e o grupo tratado com veículo (GCdVe; VE; 5 μ l – DMSO 2% em salina). PRE, pré-exploratório; EXP, exploratório; ECA, exploração cautelosa; ESC, esquadrinhar; VIG, vigilância; FRZ, congelamento (*freezing*); PAR, parado; LOC, locomoção; MOV, movimento isolado; MAN, manutenção. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via: * $p < 0,05$.

A Figura 4 apresenta os dados médios da ocorrência dos comportamentos de congelamento (*freezing*), vigilância e exploração em função dos blocos de cinco intervalos de 30 s durante as sessões de treino e de teste ao contexto para os grupos que receberam infusão i.c.v. de calfostina C ou de veículo. Na sessão de treino, observa-se um aumento da ocorrência de congelamento (*freezing*) ao longo da sessão e uma diminuição do comportamento de vigilância, nos dois grupos. A exploração mostra menores valores de ocorrência que se mantêm de forma regular por toda a sessão, nos dois grupos. A análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas não indicou diferença significativa entre os grupos para ocorrência de congelamento (*freezing*) ($F_{1, 9} = 0,56$; $p = 0,47$) e mostrou um efeito significativo de blocos ($F_{1, 7} = 5,71$; $p < 0,001$). Análises com múltiplas comparações feitas com o teste de Tukey-Kramer indicaram que o bloco 1 diferiu significativamente dos blocos 6 e 8 ($p < 0,05$) e o bloco 2 diferiu significativamente de todos os demais ($p < 0,05$), exceto do bloco 1. Com relação à ocorrência de vigilância, a ANOVA não evidenciou diferença significativa entre os grupos ($F_{1, 9} = 0,14$; $p = 0,72$), porém, mostrou um efeito significativo de blocos ($F_{1, 7} = 3,17$; $p < 0,01$). O teste Tukey-Kramer de múltiplas comparações indicou que o bloco 2 do GCdVe foi significativamente diferente dos blocos 6, 7 e 8 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa para a ocorrência do comportamento exploratório entre os grupos ($F_{1, 9} = 0,88$; $p = 0,37$) e nem entre os blocos ($F_{1, 7} = 1,52$; $p = 0,18$). No teste ao contexto observa-se uma diferença entre os grupos nos valores de ocorrência de congelamento (*freezing*) e exploração, com valores mais elevados de congelamento (*freezing*) no GCdVe e valores mais elevados de exploração no GCdCa. As curvas com valores médios de ocorrência de vigilância nos dois

grupos mostram sobreposição. A análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre os grupos para ocorrência de congelamento (*freezing*) ($F_{1,9} = 5,57$; $p = 0,043$), mas não entre os blocos ($F_{1,7} = 1,82$; $p = 0,1$). Análises com múltiplas comparações feitas com o teste de Tukey-Kramer indicaram diferença significativa entre cada bloco do GcdVe em relação aos blocos correspondentes do bloco GCdCa ($p < 0,05$). Com relação à ocorrência de exploração, ANOVA evidenciou que houve diferença significativa entre os grupos ($F_{1,9} = 18,29$; $p = 0,002$) e um efeito significativo de blocos ($F_{1,7} = 2,23$; $p = 0,043$). O teste Tukey-Kramer de múltiplas comparações indicou diferença significativa entre cada bloco do GCdVe em relação aos blocos correspondentes do bloco GCdCa ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa para a ocorrência do comportamento de vigilância entre os grupos ($F_{1,9} = 1,21$; $p = 0,30$) e nem entre os blocos ($F_{1,7} = 1,07$; $p = 0,39$).

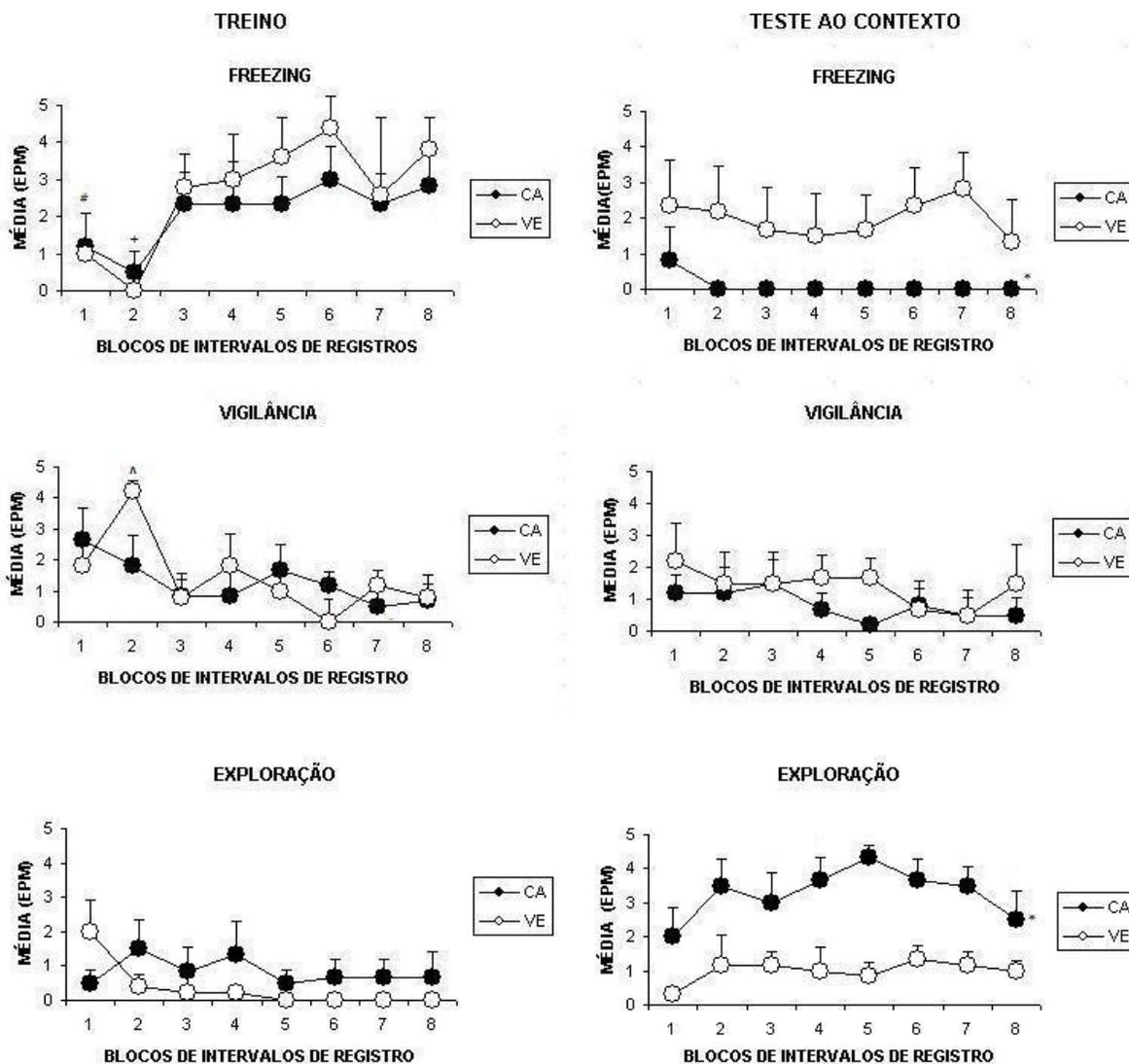


Figura 4. Valores médios (+EPM) dos comportamentos de congelamento (*freezing*), vigilância e exploração registrados em oito blocos de 150 s nas sessões de treino e de teste dos grupos tratados com calfofina C (GCdCa, CA) e com veículo (GCdVe, VE). Para análise estatística foi utilizada ANOVA para medidas repetidas. $p < 0,05$ * mostra diferença entre os grupos; # diferença em relação aos blocos 6 e 8; + diferenças em relação a todos os blocos exceto o bloco 1 e ^ diferença em relação aos blocos 6, 7 e 8.

A Figura 5 ilustra secções do encéfalo de pombos com coloração por azul de Evans. Foram analisados apenas os dados dos animais que apresentaram

coloração no ventrículo após injeção do corante azul de Evans, indicando que a cânula estava posicionada i.c.v..

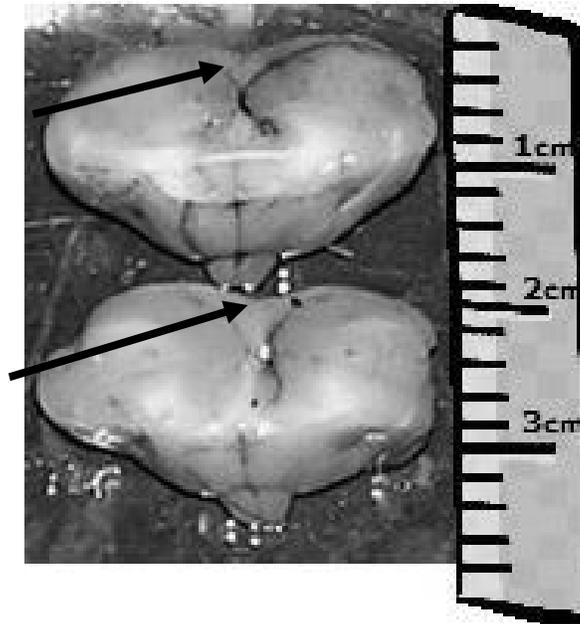


Figura 5. Corte coronal do encéfalo do pombo mostrando a coloração do ventrículo realizada através de infusão do corante pela cânula implantada no animal. Esse procedimento foi realizado em todos os animais do Experimento 1 para verificar a localização da cânula (i.c.v.). As setas indicam os ventrículos corados com azul de Evans. A régua ilustrada permite uma referência de medida do corte apresentado.

Experimento 2

Análise dos dados comportamentais

Os comportamentos exibidos na sessão de treino pelos três grupos manipulados (GCC, GCR e GCd) são mostrados na Figura 6. Os animais experimentais apresentaram variabilidade comportamental, analisada por ANOVA. A figura mostra que o GCC apresentou maior ocorrência de PAR ($F_{2, 15} = 14,39$; $p = 0,0003$) durante a sessão de 20 min que o GCR e o GCd. Além disso, o GCC e

o GCR apresentaram valores para ocorrência de EXP significativamente maiores ($F_{2, 15} = 3,95$; $p = 0,0417$) que aquele apresentado pelo GCd. Em contraste, FRZ foi significativamente mais observado ($F_{2, 15} = 7,53$; $p = 0,0054$) no GCd e no GCR em relação ao GCC. O GCR mostrou maior frequência de LOC ($F_{2, 15} = 4,81$; $p = 0,0243$) comparado aos outros dois grupos. Os demais comportamentos mantiveram baixos valores de ocorrência e não diferiram significativamente entre os grupos ($p > 0,05$).

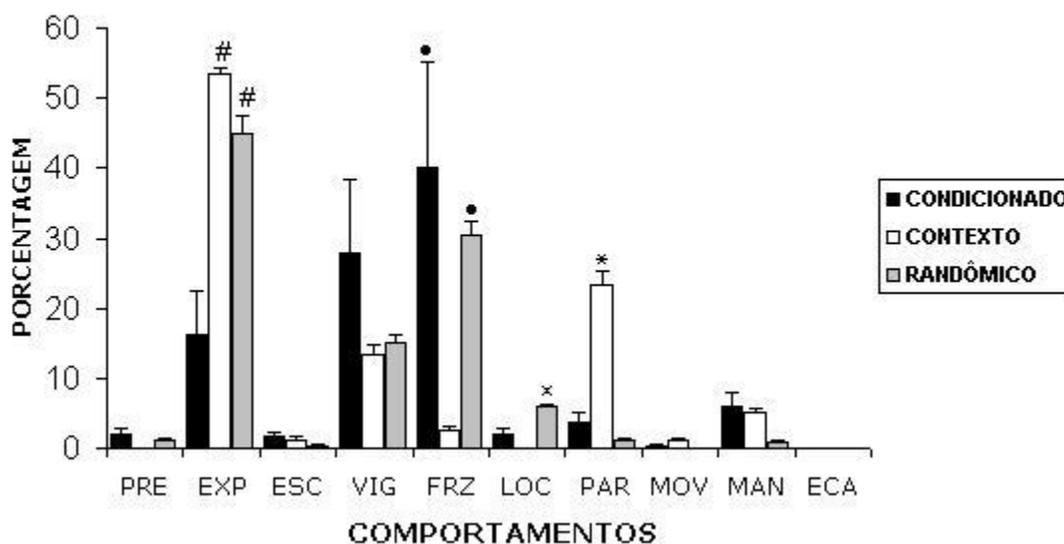


Figura 6. Valores percentuais (+EPM) dos comportamentos registrados durante as sessões de treino para os grupos condicionado (GCd), controle-contexto (GCC) e controle-randômico (GCR). PRE, pré-exploratório; EXP, exploratório; ECA, exploração cautelosa; ESC, esquadrinhar; VIG, vigilância; FRZ, freezing; PAR, parado; LOC, locomoção; MOV, movimento isolado; MAN, manutenção. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) são indicadas pelos símbolos # em relação ao grupo condicionado; • em relação ao GCC; x em relação ao GCd e ao GCC e * em relação ao GCd e GCR.

A Figura 7 mostra as médias dos comportamentos de congelamento (*freezing*), vigilância e exploração para os grupos GCC, GCR e GCd, em função dos blocos de cinco intervalos de 30 s, durante sessão de 20 min. O GCC não mostrou congelamento (*freezing*) durante a sessão e a exploração foi o comportamento com maior ocorrência nesse grupo. Por outro lado, o GCd exibiu menores valores médios de exploração, em relação ao GCC e GCR, e um valor crescente de congelamento (*freezing*) ao longo da sessão. As curvas que mostram os valores médios de vigilância para os três grupos se sobrepõem. A análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre os grupos para ocorrência de congelamento (*freezing*) ($F_{2,15} = 7,34$; $p = 0,0059$) e mostrou um efeito significativo de blocos ($F_{1, 7} = 4,54$; $p < 0,001$). Análises com múltiplas comparações feitas com o teste de Tukey-Kramer indicaram que o bloco 2 do GCd diferiu significativamente dos blocos 5 e 8 ($p < 0,05$). A exploração apresentou uma diferença significativa entre grupos ($F_{2,15} = 4,11$; $p = 0,038$) e entre blocos ($F_{1, 7} = 3,85$; $p < 0,05$) quando analisada por ANOVA. O teste Tukey-Kramer de múltiplas comparações indicou que o bloco 2 e o bloco 5 do GCR foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Com relação à ocorrência de vigilância, a ANOVA não evidenciou diferença significativa entre os grupos, embora p tenha valor marginal ($F_{2,15} = 3,61$; $p = 0,052$), e nem entre blocos ($F_{1, 7} = 0,70$; $p = 0,68$), mas, houve uma interação significativa entre grupos e blocos ($F_{2,14} = 0,70$; $p = 0,032$).

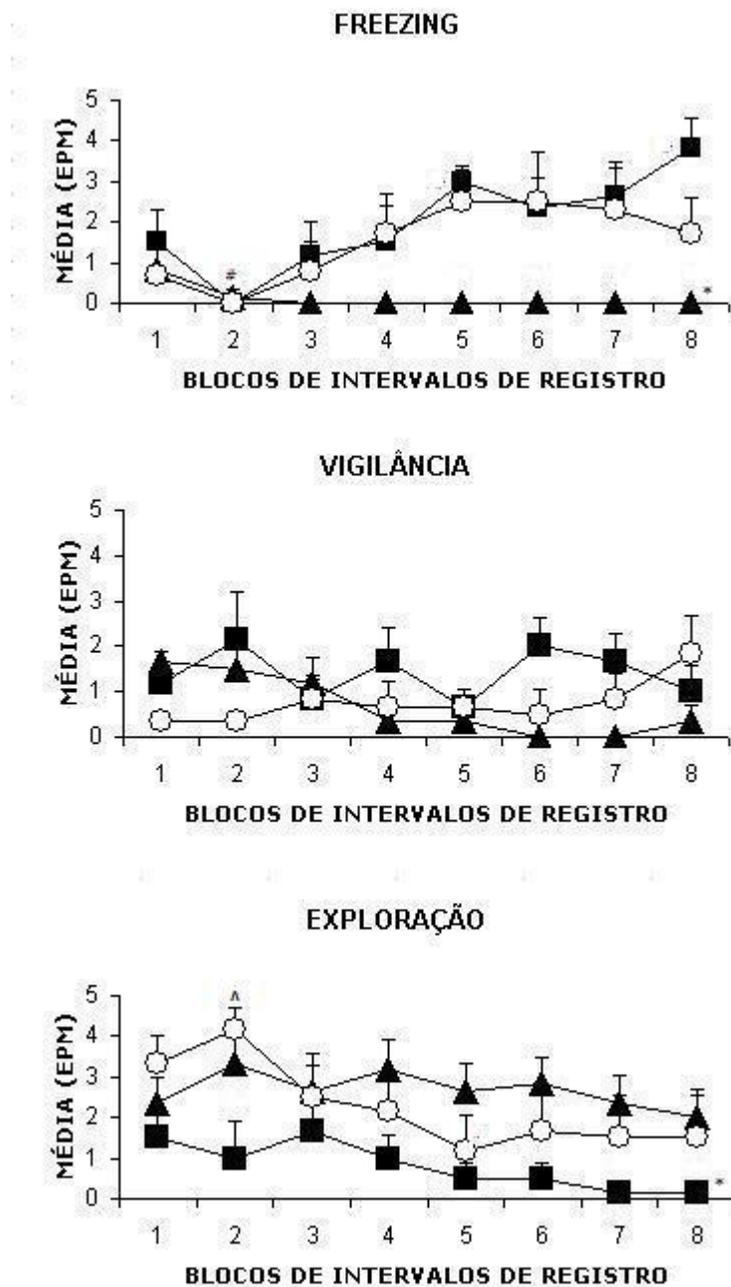


Figura 7. Valores médios (+EPM) dos comportamentos congelamento (*freezing*), vigilância e exploração registrados em oito blocos de 150 s nas sessões de treino dos grupos condicionado (GCd), controle-contexto (GCC) e controle-randômico (GCR). Legenda: (condicionado), (contexto) e o (randômico). Para análise estatística foi utilizada ANOVA para medidas repetidas. $p < 0,05$ * mostra diferença entre os grupos; # diferença em relação aos blocos 5 e 8 e ^ diferença em relação ao bloco 5.

Análise dos dados moleculares

Como a ativação da PKC depende de sua translocação para a membrana, ela foi analisada por *Western blot* com fracionamento de membrana e citoplasma, nos grupos GC, GCC, GCR e GCd. A Figura 8 mostra a razão entre os valores de densitometria óptica encontrados para a pPKC α/β ligada à membrana e aqueles encontrados para pPKC α/β citoplasmática. A análise dos dados por teste *t* pareado não mostrou diferença significativa entre os grupos.

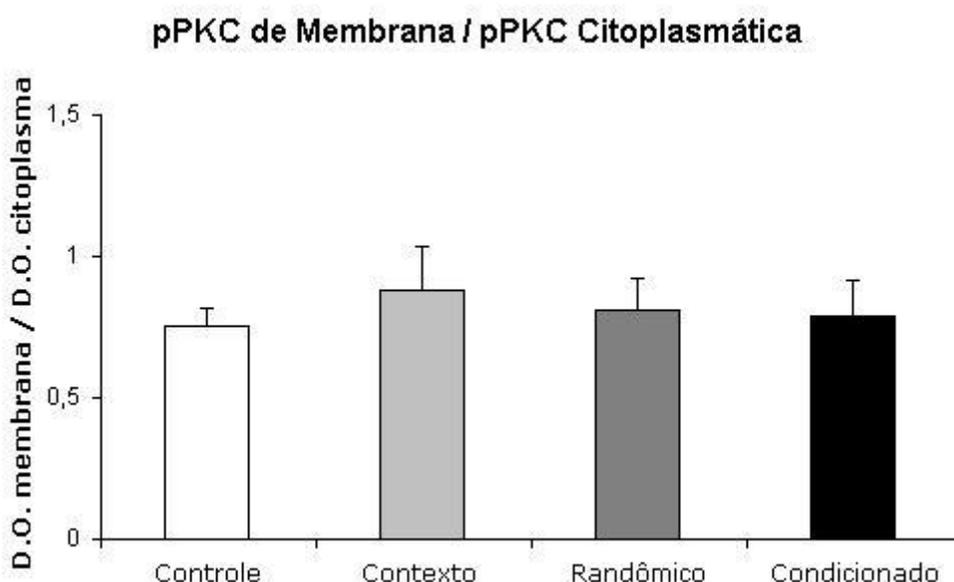


Figura 8. Razão das densitometrias ópticas das bandas imunorreativas para pPKC α/β na fração de membrana e na fração citoplasmática (+EPM). Análise estatística utilizada: teste *t* pareado.

Na Figura 9 observa-se os dados médios da densitometria óptica referentes ao *Western blot*, frações de membrana e citoplasmática, dos grupos GC, GCC, GCR e GCd. Os dados são expressos como uma porcentagem do grupo Controle e representam a média +EPM. De acordo com teste *t* pareado, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

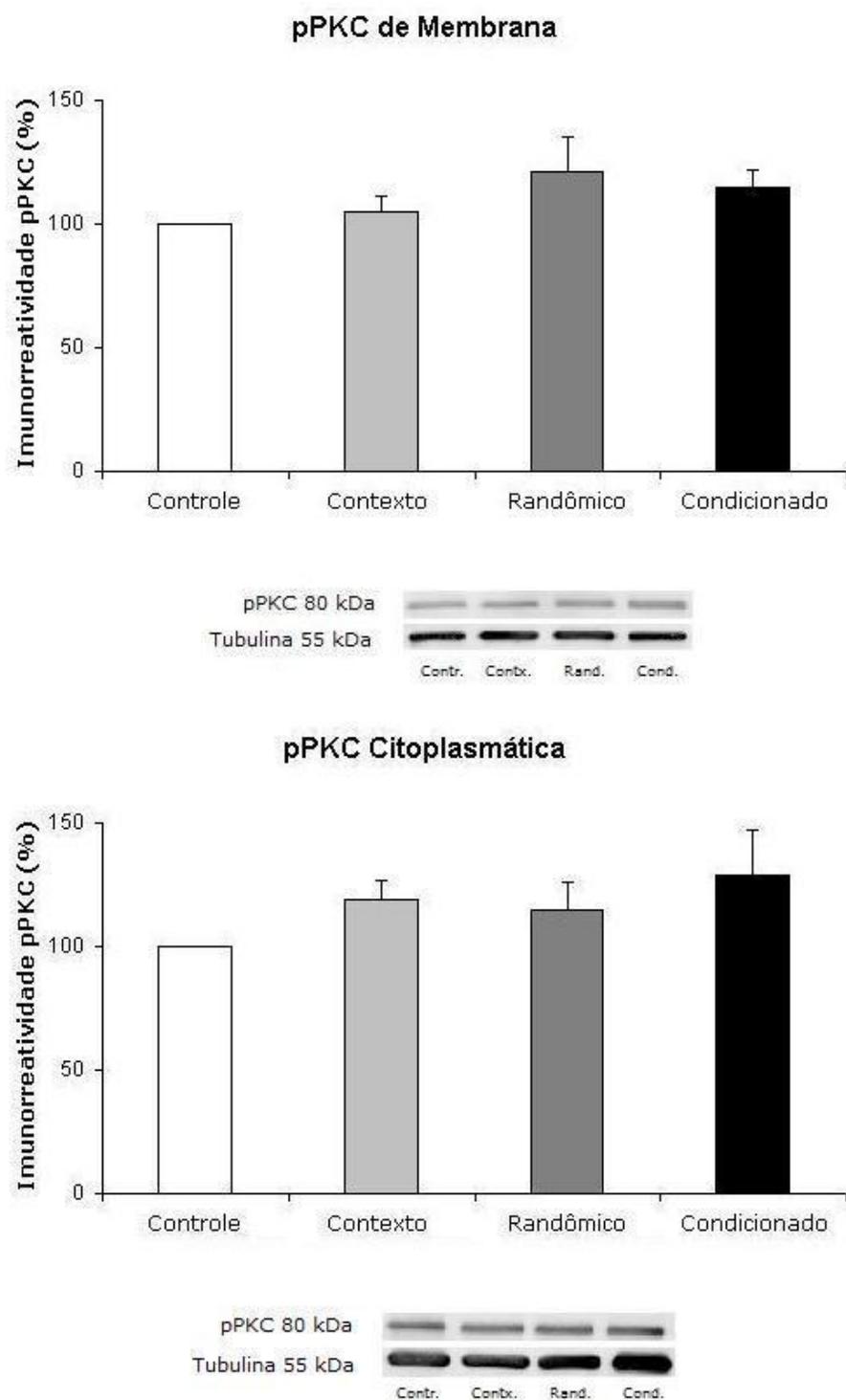


Figura 9. Análises desintométricas das bandas imunorreativas para pPKC α/β nas porções de membrana e citoplasmática. Os dados foram expressos como porcentagem dos valores do controle e representam as médias (+EPM). Bandas imunorreativas representativas para pPKC α/β e α -tubulina são mostrados na parte inferior do gráfico. Análise estatística utilizada: teste *t* pareado.

Experimento 3

Para determinar o curso temporal de ativação da pPKC α / β , foi realizado *Western blot* com fracionamento de membrana e citoplasma com as amostras dos animais pertencentes aos grupos G1 min (sacrificado 1 min após o treino), G1h (sacrificado 1h após o treino), G2h (sacrificado 2h após o treino) e G24h (sacrificado 24h após o treino). Os animais controle (GC) não foram treinados. Os valores médios da densitometria, tanto para a razão entre pPKC α / β na membrana e pPKC α / β citoplasmática (Figura 10), quanto para a pPKC α / β ligada à membrana ou pPKC α / β citoplasmática (Figura 11), não mostraram diferença significativa quando analisados por teste *t* pareado ($p > 0,05$).

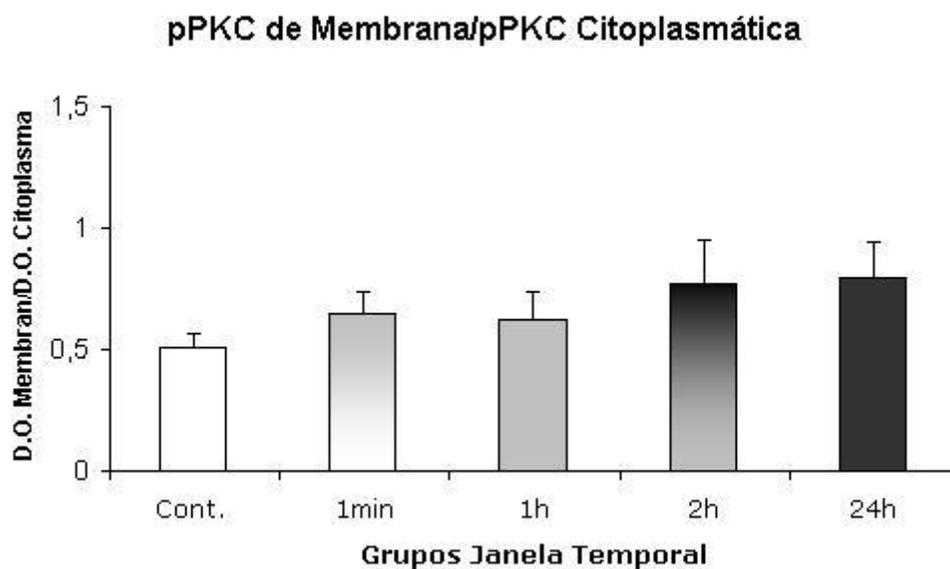


Figura 10. Razão das densitometrias ópticas das bandas imunorreativas para pPKC α / β na fração de membrana e na fração citoplasmática (+EPM). Análise estatística utilizada: teste *t* pareado.

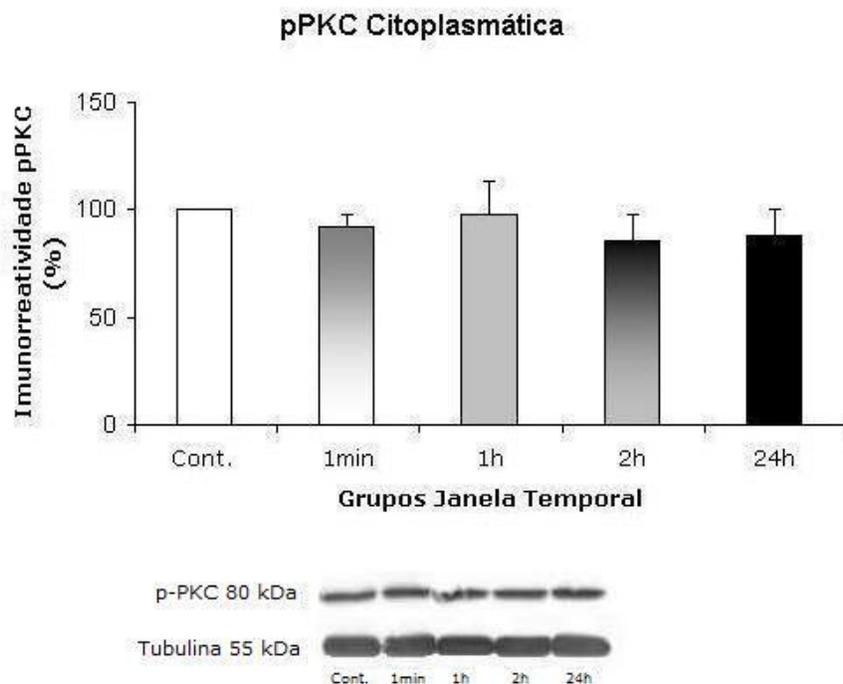


Figura 11. Análises densitométricas das bandas imunorreativas para pPKC α/β nas porções de membrana e citoplasmática. Os dados foram expressos como porcentagem dos valores do controle e representam as médias (+EPM). Bandas imunorreativas representativas para pPKC α/β e α -tubulina são mostrados na parte inferior do gráfico. Análise estatística utilizada: teste *t* pareado.

A Figura 12 apresenta os dados médios da densitometria óptica das bandas imunorreativas para pGAP-43, nas amostras totais (membrana e citoplasma) dos grupos GC, G1min, G1h, G2h e G24h. Os dados são expressos como uma porcentagem do grupo Cont. e representam a média +EPM. De acordo com teste *t* pareado, houve diferença significativa entre GC e G1min ($t_4 = 6,296$; $p < 0,01$) e uma diferença com significância marginal entre GC e G24h ($t_4 = 2,655$; $p = 0,0567$).

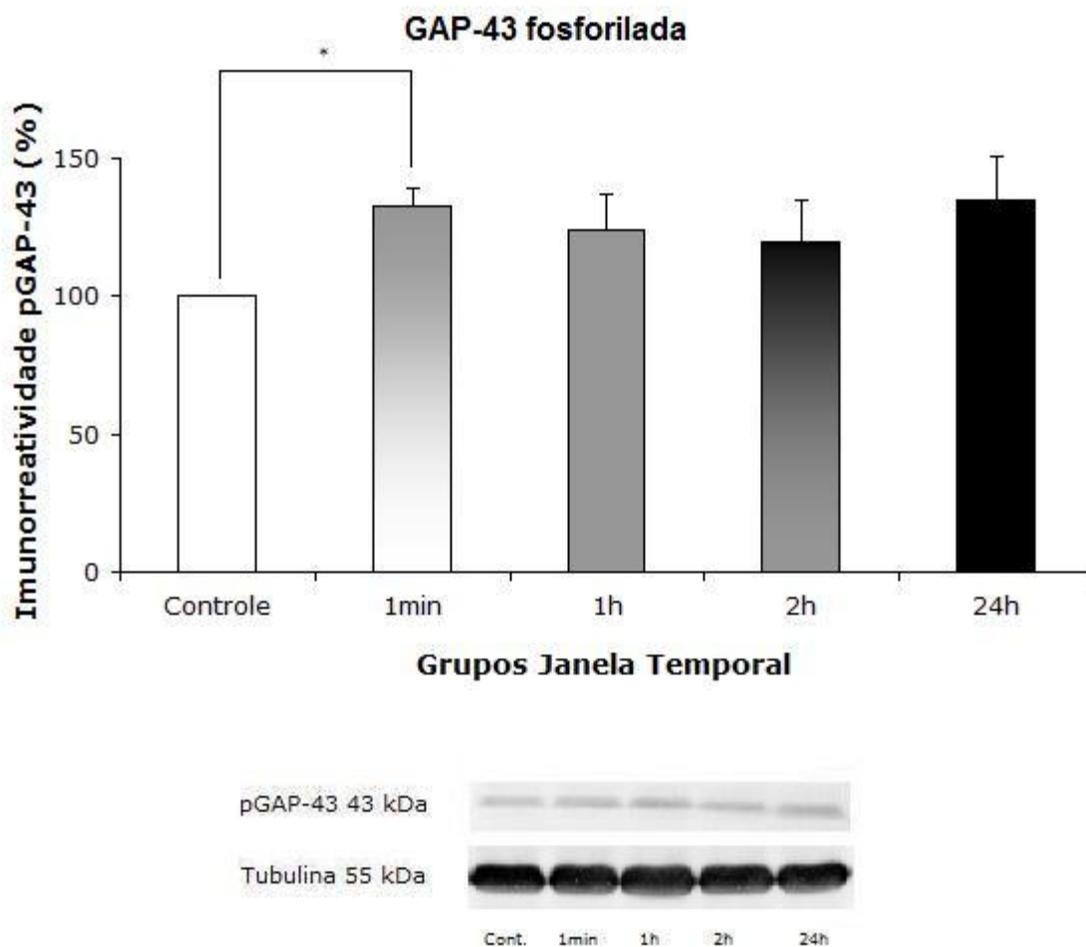


Figura 12. Análise densitométrica das bandas imunorreativas para pGAP-43. Os dados foram expressos como porcentagem dos valores do controle e representam as médias (+EPM). Bandas imunorreativas representativas para pGAP-43 e α -tubulina na parte inferior do gráfico. A análise estatística utilizada foi teste *t* pareado e mostrou diferença significativa do grupo G1min em relação ao GC. * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam o envolvimento da PKC nos processos de aprendizagem e memória em pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo, e, assim, confirmam dados da literatura obtidos com outras aves e roedores e também com outras tarefas de aprendizagem (ALI, BULLOCK e ROSE, 1988; BANK et al., 1988; BURCHULADZE, POTTER e ROSE, 1990; SHEU et al., 1993; ZHAO et al., 1994; JERUSALINSKY et al., 1994; SERRANO et al., 1995; CAMMAROTA et al., 1997; SWEATT et al. 1998; PARATCHA et al., 2000; YOUNG et al., 2002). Neste trabalho, a participação da PKC foi evidenciada através dos efeitos amnésicos provocados pela injeção i.c.v. do inibidor dessa proteína, calfostina C, e observados pela menor expressão de congelamento (*freezing*) quando os animais que receberam a droga foram re-expostos ao contexto de treino. O envolvimento da PKC hipocampal pôde ser verificada por meio da fosforilação do substrato da PKC, GAP-43, observada por *Western blot*. Contudo, as análises semi-quantitativas de *immunoblot* pós-treino da PKC α no hipocampo não indicaram diferenças significativas em relação aos grupos controles.

A calfostina C, potente inibidor seletivo da PKC, é um composto fotossensível produzido pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*. Ela interage de modo irreversível com uma região no domínio regulatório que é comum a todas as isoformas da PKC (KOBAYASHI et al., 1989), impedindo sua translocação para a membrana. Os dados indicam que a administração de calfostina C 1h antes do treino interferiu com a expressão da resposta de medo condicionado avaliada no teste 24h após o treino, o que não ocorreu nos animais tratados com veículo.

Esses resultados estão em acordo com trabalhos realizados em mamíferos que demonstraram os efeitos amnésicos de outros inibidores da PKC sobre a memória para diferentes tarefas de aprendizagem (JERUSALINSKY et al., 1994; PARATCHA et al., 2000; BONINI et al., 2007). Zhao, Sedman e Gibbs (1994) e Serrano et al. (1995) também observaram prejuízo da memória para esquivas inibitórias em pintainhos submetidos ao tratamento com inibidores da PKC.

No condicionamento clássico aversivo há uma associação entre um EC (som) e um EI (choque). Como resultado o EC adquire a propriedade de eliciar a resposta antes eliciada pelo choque. O EI também se associa ao contexto em que ocorreu o condicionamento (MAREN, AHARONOV e FANSELOW, 1997; REIS et al., 1999; MAREN e HOLT, 2000). Os animais dos grupos GCdCa e GCdVe foram expostos ao pareamento som-choque, na sessão de treino para condicionamento clássico aversivo e não mostraram diferenças comportamentais quando comparados entre si. Os comportamentos de exploração, vigilância e congelamento (*freezing*) foram os mais evidentes durante o treino. Isso se deve ao fato de que quando é exposto a um ambiente novo o animal faz uma avaliação desse ambiente expressando comportamentos de exploração, que diminuem ao longo da sessão de treino. A vigilância é inferida como uma avaliação de risco que constitui, segundo Blanchard & Blanchard (1988), o primeiro nível de comportamento defensivo e ocorre quando o ambiente é novo, implicando potencial perigo ou ameaça, ou quando o perigo não está presente no ambiente onde ele foi apresentado previamente (SHUHAMA et al., 2007). No decorrer da sessão de treino, à medida que o estímulo aversivo (choque) é apresentado, os comportamentos de exploração e vigilância dão lugar a uma maior expressão da

resposta de congelamento (*freezing*), que constitui o segundo nível de defesa (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). O congelamento (*freezing*) é usualmente caracterizado em roedores por uma total ausência de movimentos, exceto aqueles requeridos para a respiração. Essa resposta é usada como um índice de medo em estudos experimentais, quando ocorre em ambientes fechados que não permitem a fuga em resposta ao estímulo que sinaliza o estímulo nocivo (SHUHAMA et al., 2007). As estratégias básicas de defesa são conservadas através das espécies, determinadas por sua função adaptativa comum. São observadas em estudos realizados com os mais diversos animais, contudo, a maneira com que cada espécie executa a mesma estratégia defensiva varia consideravelmente. Em pombos o congelamento (*freezing*) é caracterizado por: 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; pescoço com extensão restrita ou encolhido; olhos totalmente abertos; cabeça imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente; respiração acelerada e ausência de outros comportamentos observáveis (REIS et al., 1999; BRITO, BRITTO e FERRARI, 2006).

Na sessão de teste ao contexto, os animais foram re-expostos ao ambiente do treino, local que apresenta propriedades aversivas condicionadas. Esse teste constitui, na realidade, um teste de evocação/recuperação das informações aversivas, 24h após o treino. Assim sendo, os animais apresentam uma resposta condicionada de medo ao contexto anteriormente associado à experiência aversiva, indicando a evocação da memória aversiva.

O GCdVe apresentou uma maior ocorrência de congelamento (*freezing*) durante a sessão de teste comparado ao GCdCa, evidenciando que a memória aversiva ao contexto de condicionamento nesses animais, que receberam apenas veículo, não foi prejudicada. O GCdVe demonstrou, portanto, uma consolidação da memória de associação do evento aversivo ao contexto em que foi apresentado (MAREN e HOLT, 2000; SANDERS, WILTGEN e FANSELOW, 2003). Por outro lado, o GCdCa mostrou maior ocorrência de exploração e menor ocorrência de congelamento (*freezing*) quando re-exposto ao contexto, o que pode ser interpretado como evidência de prejuízo na memória aversiva provavelmente devido aos efeitos do inibidor da PKC, administrado antes do treino. Considera-se que essa interferência negativa sobre o condicionamento aconteça devido à ação inibitória da calfostina C sobre a PKC. A ligação da calfostina C com o sítio regulatório da PKC impede a translocação da proteína para a membrana, a sua mudança para a forma ativa e a fosforilação dos seus substratos. Dessa forma, ocorre um bloqueio dos mecanismos de sinalização intracelular que são mediados pela PKC e que participam dos processos de aprendizagem e memória. É interessante notar que durante a sessão de treino ambos os grupos, GCdVe e GCdCa, exibiram a mesma variabilidade comportamental, tornando evidente que a droga não estaria interferindo na capacidade geral de expressão dos comportamentos nos animais tratados. É importante considerar, no entanto, uma possível interferência do inibidor da PKC sobre as áreas paliais, em íntima relação com os ventrículos, e ligadas a aspectos motivacionais do animal. Essa possível interferência pode ter colaborado para a intensificação da atividade motora e

conseqüente expressivo aumento do comportamento exploratório, como evidenciado pelo GCdCa durante a sessão de teste.

Através de intervenções antes do treino tanto a aquisição quanto a fase inicial da consolidação da memória podem ser afetadas. A análise dos dados comportamentais no presente estudo não evidenciou efeitos da calfostina C sobre a expressão de comportamentos durante a sessão de treino, fundamentando a interpretação de que a fase de aquisição não foi afetada. Assim, pode ser considerado que a infusão i.c.v. de calfostina C 1h antes do treino utilizada no Experimento 1 afetou a memória contextual possivelmente por interferir na fase inicial de consolidação da memória.

Serrano et al. (1995) investigaram os efeitos amnésicos da queleritrina injetada no IMM (*Mesopallium intermediomediale*, anteriormente chamado IMHV, *Intermediomediale hiperstriatum ventrale*) 15, 10 ou 5 min antes do treino de esQUIVA inibitória em pintainhos e 5 ou 10 min após o treino. Os resultados mostraram que a queleritrina prejudicou a formação da memória quando injetada 5 min antes do treino, fornecendo evidência de que a ativação da PKC é necessária para a formação da memória. Esses resultados são consistentes com conceitos relativos aos estágios de formação de memória (GIBBS e NG, 1977; *apud* SERRANO, 1995) e com a seqüência de ativação das vias de sinalização intracelular (ROSE, 1991; *apud* SERRANO, 1995). Os resultados do Experimento 1 estão em acordo com essas considerações.

A observação dos efeitos amnésicos da calfostina C sobre a memória contextual aversiva poderia estar relacionada com alterações em circuitos do hipocampo que envolvem sinalização via PKC. No Experimento 2, portanto, foi

analisada a participação da PKC α no hipocampo de pombos após o treino em condicionamento clássico aversivo. Apesar das evidências comportamentais e diferenças entre os grupos, a análise molecular por *Western blot* realizada com fracionamento de membrana e citoplasma no Experimento 2, não mostrou diferença significativa na ativação da PKC α entre os grupos GCC, GCR e GCd.

O grupo GCC, submetido a uma sessão de 20 min de exposição ao contexto de condicionamento apenas, sem apresentação de estímulos, mostrou uma discreta resposta inicial de congelamento (*freezing*) e alta incidência de exploração. Isso é justificável pelo fato de estar sendo exposto a um ambiente novo, mas, inócuo, sem qualquer valor aversivo que mantenha a resposta de congelamento (*freezing*). Apresentou, também, grande ocorrência do comportamento parado que se deve provavelmente a uma habituação ao contexto ao longo da sessão. O GCR foi exposto a uma sessão de 20 min no contexto de condicionamento com apresentação dos estímulos (som e choque) de forma aleatória, sem relação de contingência. Apesar de apresentarem altos valores de ocorrência de exploração e congelamento (*freezing*), os animais desse grupo mostraram um padrão de comportamento diferente daqueles apresentados tanto por GCC quanto por GCd, com uma alta incidência de locomoção. Devido à falta de contingência e contigüidade, esses animais não conseguem prever a apresentação do estímulo, nem formar uma relação funcional entre eles, diferentemente do GCd. O GCd passou por uma sessão de treino para condicionamento clássico aversivo, exibindo variabilidade comportamental e valores crescentes de congelamento (*freezing*) ao longo da sessão. É interessante notar que esse grupo exibiu padrão de comportamento semelhante àquele

apresentado pelos grupos GCdVe e GCdCa durante a sessão de treino, no Experimento 1.

Vários trabalhos descrevem diferentes picos de ativação para a PKC após o treino (JERUSALINSKY et al., 1994; CAMMAROTA et al., 1997; ATKINS et al., 1998; PARATCHA et al., 2000; WALLENSTEIN, VAGO e WALBERER, 2002; YOUNG et al., 2002). No trabalho de Atkins (1998), o sacrifício dos animais foi realizado em diferentes pontos temporais após o treino: imediatamente (1 min), 1h, 2h e 24h, sendo verificada maior fosforilação da PKC no hipocampo 1h após o treino de condicionamento clássico aversivo e 24h após o condicionamento contextual. Num outro trabalho com condicionamento aversivo (YOUNG et al., 2002) mostrou-se um aumento na atividade da PKC 15 min após o treino que se manteve por um período de tempo variável de acordo com a isoforma. Os níveis de PKC α na membrana aumentaram no intervalo compreendido entre 15 a 90 min pós-treino, retornando então aos níveis basais, enquanto os níveis de PKC β na membrana não mostraram alterações significativas. A PKC γ aumentou significativamente na membrana em diferentes tempos (30 e 90 min; 48 a 72h) após o condicionamento. Por outro lado, Paratcha et al. (2000) relataram um aumento significativo de PKC β ligada à membrana 0, 30 e 120 min após o treino, mas, nenhuma alteração significativa de PKC α . Cammarota et al. (1997) analisaram a atividade da PKC através do estudo *in vitro* da fosforilação de seu substrato específico, B-50/GAP-43, que aconteceu aos 30 min, mas não aos 10 ou 60 min pós-treino.

Outros trabalhos analisaram o intervalo de tempo para ativação da PKC após o treino indiretamente pela administração de inibidores. Jerusalinsky et al. (1994) observaram que quando CGP 41321 foi infundido no hipocampo imediatamente ou 30 min após o treino ocorreu amnésia completa da tarefa de esQUIVA inibitória diferentemente do que aconteceu quando a infusão foi realizada aos 120 ou 180 min após o treino. Wallenstein, Vago e Walberer (2002) encontraram que H-7, inibidor de PKC e PKA, produziu déficits na memória aversiva de ratos, avaliados no teste, quando administrado 90 ou 180 min após o treino para condicionamento clássico aversivo, sendo que o efeito máximo foi observado no grupo em que a administração ocorreu 90 min após o treino.

Considerando a diversidade dos resultados encontrados na literatura em relação ao ponto temporal de ativação da PKC no hipocampo e os resultados obtidos no Experimento 2, é possível questionar se o intervalo de 2h pós-treino utilizado para análise da ativação da PKCá/âll na região hipocampal foi adequado. Desse modo, seria interessante verificar a ativação da PKC em outros intervalos de tempo.

O Experimento 3 seguiu a mesma seqüência de intervalos temporais utilizada por Atkins et al. (1998) em seu experimento com ratos submetidos ao condicionamento clássico aversivo. Assim, foi realizada análise por *Western blot* para verificar a ativação da PKCá/âll no hipocampo de pombos sacrificados imediatamente (1 min), 1h, 2h e 24h após o treino. Não houve diferença entre os grupos condicionados e nem entre esses e o grupo controle. Esse resultado está em acordo com aqueles obtidos por Paratcha et al. (2000) que, trabalhando com ratos submetidos à tarefa de esQUIVA inibitória, mostraram não haver aumento

significativo específico do treino da PKC α , β II e γ na fração de membrana em qualquer ponto temporal analisado (0, 30 e 120 min). Observaram também que a PKC β I teve seus níveis aumentados na fração de membrana aos 0, 30 e 120 min pós-treino indicando que essa isoforma participa na fase inicial de formação da memória de esQUIVA inibitória. No entanto esses dados são contraditórios àqueles apresentados por Young et al. (2002) para o condicionamento aversivo de que os níveis de PKC α estão aumentados na membrana dos 15 aos 90 min após o treino e que os níveis de PKC β II na fração de membrana diminuem de 15 a 30 min após o treino. Esses autores ainda observaram que não houve alteração significativa na quantidade de PKC β I na membrana, exceto por um pequeno decréscimo 48h depois do treino e que a PKC γ aumentou significativamente de 30 a 90 min e 48-72h após o treino. Sugeriram, assim, que PKC α , PKC β I e PKC γ são responsáveis pela fase inicial da formação de memória.

Considerando essa diversidade nos resultados relativos às isoformas da PKC envolvidas na formação de memória para diferentes tarefas de aprendizagem, poderia ser questionado se a ativação de uma determinada isoforma seria específica para uma determinada tarefa. Outra explicação para essa diversidade de resultados poderia ser a regionalização na expressão das isoformas. Van der Zee et al. (1995) realizaram um trabalho mostrando a distribuição diferencial das células imunorreativas para as isoformas da PKC no cérebro de pintainhos e evidenciaram a presença de PKC α/β em partes restritas da região hipocampal. Essa regionalização restrita na expressão da PKC α/β poderia proporcionar uma diferença sutil entre os níveis da proteína ligada à

membrana nas condições basal e pós-treino, suficiente para desencadear a cascata bioquímica envolvida na formação da memória, mas, não para ser detectada pelo método utilizado nesse trabalho.

As cascatas bioquímicas de sinalização intracelular amplificam os sinais que chegam até a célula. Por essa razão é possível que o substrato de uma determinada enzima esteja presente na célula em uma quantidade maior que aquela da enzima em questão, *upstream* a ele. Alguns trabalhos avaliaram a atividade da PKC através da análise de proteínas cuja ativação é dependente da PKC como MARCKS (SHEU et al., 1993) e GAP-43 (SHEU et al., 1993; CAMMAROTA et al., 1997; YOUNG et al., 2002). Partindo desse princípio foi analisada a ativação da GAP-43, proteína pré-sináptica substrato da PKC, específica do tecido neural e importante para os mecanismos de plasticidade sináptica envolvidos com a aprendizagem e memória. A análise semi-quantitativa por *Western blot* mostrou um aumento significativo da GAP-43 fosforilada no G1min em relação ao GC fornecendo uma evidência indireta da ativação da PKC no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo, na fase inicial da formação da memória. Também foi observado um aumento marginalmente significativo no grupo 24h em relação ao GC. Young et al. (2002) que indicaram uma alteração bifásica na fosforilação da GAP-43 no hipocampo de ratos, com uma redução no período logo após o condicionamento – 15 a 30 min, seguida por uma volta ao nível basal aos 60 min e um aumento duradouro a partir dos 90 min até 72h pós-treino. Esses autores ainda propuseram uma diferença espécie-específica na fosforilação da GAP-43, visto que os mesmos estudos realizados em ratos e em camundongos não apresentaram os mesmos resultados.

Izquierdo e seu grupo (CAMMAROTA et al., 1997) relataram aumento da GAP-43 fosforilada 30 min após o treino para a tarefa de esquiva inibitória. Devem, portanto, ser levadas em consideração para interpretação desses diferentes resultados, as diferentes espécies de animais e tarefas de aprendizagem utilizadas nos estudos.

Com relação à isoforma da PKC envolvida, segundo Sheu et al. (1990) e Benowitz e Routtenberg (1997) a GAP-43 é preferencialmente fosforilada pela PKC α . Paratcha et al. (2000) encontraram pontos temporais semelhantes para ativação da PKC α e fosforilação da GAP-43 no hipocampo de ratos submetidos à tarefa de esquiva inibitória. Em contraste, Young et al. (2002) trabalhando com condicionamento aversivo em ratos propuseram que a PKC β seria responsável pela fosforilação da GAP-43, por apresentarem um curso temporal de ativação similar. Diante do exposto, e considerando que a GAP-43 é preferencialmente fosforilada pela isoforma α da PKC, é possível que a PKC β hipocampal esteja envolvida na ativação da GAP-43, 1min pós-treino observada no Experimento 3, apesar da variação em sua atividade não ter sido demonstrada pelos experimentos utilizando *Western blot*. Também pode ser considerado o envolvimento de outras isoformas da PKC nesse processo, que não a PKC β .

Os dados do presente trabalho tomados em conjunto, sugerem o envolvimento da PKC nos mecanismos subjacentes aos processos de aprendizagem e memória aversiva em pombos. Particularmente, o aumento significativo da GAP-43 fosforilada no hipocampo indica a participação da PKC hipocampal. Contudo, não evidencia precisamente o envolvimento da PKC β sugerindo que outras isoformas da PKC podem estar atuando. Dessa forma,

esses resultados contribuem para o conhecimento sobre o condicionamento aversivo em pombos com evidências experimentais inéditas quanto a seus mecanismos moleculares subjacentes e levantam questões para serem avaliadas, analisadas e respondidas por trabalhos subseqüentes.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho insere-se numa seqüência de estudos sobre condicionamento clássico aversivo em pombos desenvolvidos em nosso laboratório, acrescentando informações que contribuem para a análise dos fundamentos comportamentais, celulares e moleculares dos processos de aprendizagem e memória de eventos aversivos. Os resultados obtidos em conjunto indicam que:

1. o processo de memória contextual aversiva em pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo envolve mecanismos de plasticidade sináptica mediados pela PKC.

2. a administração i.c.v. de calfostina C, inibidor da PKC, resulta em prejuízo na consolidação da memória contextual aversiva, evidenciado por menor expressão da resposta condicionada de medo ao contexto.

3. o processo de memória contextual aversiva em pombos envolve a ativação da PKC no hipocampo como indicado pelo aumento significativo de seu substrato, GAP-43, fosforilado.

4. a participação da PKC hipocampal estaria relacionada com a fase inicial da consolidação da memória contextual aversiva em pombos.

REFERÊNCIAS

ALI, S. M.; BULLOCK, S.; ROSE, S. P. R. Protein kinase C inhibitors prevent long-term memory formation in the one-day-old chick. **Neurosc. Res. Comm.**, v. 3, p. 133-140, 1988.

AMARAL, O. B.; LUFT, T.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; ROESLER, R. Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory. **Behav. Brain Res.**, v. 180, p. 113-118, 2007.

ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. The hippocampus and Pavlovian fear conditioning: reply to Bast et al.. **Hippocampus**, v. 12, p. 561-565, 2002.

ANTONIADIS, E. A.; McDONALD, R. J. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. **Behav. Brain Res.**, v. 108, n.1, p. 1-19, 2000.

ATKINS, C. M.; SELCHER, J. C.; PETRAITIS, J. J.; TRZASKOS, J. M.; SWEATT, J. D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. **Nat. Neurosci.**, v. 1, p. 602-609, 1998.

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

BANK, B. DEWEER, A.; KUZIRIAN, A. M.; RASMUSSEN, H.; ALKON, D. L. Classical conditioning induces long-term translocation of protein kinase C in the rabbit hippocampal CA1 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 1988-1992, 1988.

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, n. 6, p. 657-675, 2003.

BENOWITZ, L. I.; ROUTTENBERG A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. **TRENDS Neurosc.**, v. 20, p. 84-91, 1997.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L. M.; BEVILAQUA, L. R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261-277, 2007.

BERRIDGE M. J.; BOOTMAN M. D.; LIPP P. Calcium – a life and death signal. **Nature**, v. 395, p. 645-648, 1998.

- BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Ann. Rev. Psychol.**, v. 39, p. 43– 68, 1988.
- BONINI, J. S.; DA SILVA, W. C.; BEVILAQUA, L. R. M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spacial memory. **Neuroscience**, v. 147, p. 37-45, 2007.
- BRITO, I.; BRITTO, L. R. G.; FERRARI, E. A. M. Classical tone–shock conditioning induces Zenk expression in the pigeon (*Columba livia*) hippocampus. **Behav. Neurosci.**, v. 120, n. 2, p. 353-361, 2006.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BURCHULADZE, R.; POTTER, J.; ROSE, S. P. R. Memory formation in the chick depends on membrane-bound protein kinase C. **Brain Res.**, v. 535, p. 131-138, 1990.
- CAMMAROTA, M.; PARATCHA, G.; STEIN, M. L.; BERNABEU, R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. **Neuroch. Res.**, v. 22, n. 4, p. 499-505, 1997.
- 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.
- CHOWDHURY N.; QUINN J.J.; FANSELOW M. S. Dorsal hippocampus involvement in trace fear conditioning with long, but not short, trace intervals in mice. **Behav. Neurosci.**, v. 119, n. 5, p. 1396-1402, 2005.
- CORBALÁN-GARCIA, S.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1761, p. 633-654, 2006.
- DENADAI, M. A. **Efeitos do 7-nitroindazole, um inibidor da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS), sobre o condicionamento contextual em pombos (*Columba livia*).** (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Fisiologia) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2008.
- 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 for memory persistence. **Nat. Neurosci.**, v. 11, n. 9, p. 1074-1082, 2008.

ERICHSEN J. T.; BINGMAN V. P.; KREBS J. R. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. **J. Comp. Neurol.**, v. 314, n. 3, p. 478-492, 1991.

FANSELOW, M. S.; KIM, J. J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of a NMDA receptor agonist D-L-2 amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behav. Neurosci.**, v. 108, p. 210-212, 1994.

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

FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci. Biobeh. Rev.**, v. 23, p. 743-760, 1999.

FLEEGAL M.A.; SUMNERS C. Drinking behavior elicited by central injection of angiotensin II: roles for protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, n. 3, p. 632-640, 2003.

GAGLIARDO A.; IOALÉ P.; BINGMAN V. P. Homing in pigeons: the role of the hippocampal formation in the representation of landmarks used for navigation. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 1, p. 311-315, 1999.

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.

GALEOTTI N.; BARTOLINI A.; GHELARDINI C. The phospholipase C-IP3 pathway is involved in muscarinic antinociception. **Neuropsychopharm.**, v. 20, n. 5, p. 888-897, 2003.

HALL, J.; THOMAS, K. L.; EVERITT, B. J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. **J. Neurosci.**, v. 21, n.6, p. 2186-2193, 2001.

HOLT, W.; MAREN, S. Muscimolin activation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 20, p. 9054-9062, 1999.

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, I.; MEDINA, J.H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. **TRENDS Neurosci.**,v. 21, p. 423-426, 1998.

- IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; VIANNA, M. R. M.; COITINHO, A.; DeDAVID e SILVA, T.; CHOI, H.; MOLETTA, B.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 22, n. 3, p. 269-287, 2002.
- JERUSALINSKY, D.; QUILLFELDT, J. A.; WALZ, R.; DA SILVA, R. C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Post-training intrahippocampal infusion of PKC inhibitors causes amnesia in the rat. **Behav. Neural Biol.**, v. 61, p. 107-109, 1994.
- JI J.; MAREN S. Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. **Learn. Mem.**, v. 15, n. 4, p. 244-251, 2008.
- KAHN, M. C.; HOUGH, G. E.; EYCK, G. R. T.; BINGMAN, V. P. Internal connectivity of the homing pigeon (*Columba livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. **J. Comp. Neurol.**, v. 459, p. 127-141, 2003.
- KARTEN, H. J.; HODOS, W. **A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*)** The Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, 1967.
- KIM, J. J.; DECOLA, J. P.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; FANSELOW, M. S. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. **Behav. Neurosci.**, v. 105, n.1, p. 126-133, 1991.
- KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-677, 1992.
- KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 30, p.188-202, 2006.
- KOBAYASHI, E.; NAKANO, H.; MORIMOTO, M.; TAMAOKI, T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 159, n. 2, p. 548-553, 1989.
- KREBS J. R.; ERICHSEN J. T.; BINGMAN V. P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon. **J. Comp. Neurol.**, v. 314, p. 467-477, 1991.
- KUMAR S.; KHISTI R.T.; MORROW A.L. Regulation of native GABAA receptors by PKC and protein phosphatase activity. **Psychopharmacol.**, v. 183, n.2, p. 241-247, 2005.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- LEDOUX, J. E.; CICCETTI, 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 circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 155-184, 2000.
- LEHMANN, H.; LACANILAO, S.; SUTHERLAND, R. J. Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. **Eur. J. Neurosci.**, v. 25, p. 1278–1286, 2007.
- LIU, J. P. Protein kinase C and its substrates. **Mol. Cell. Endroc.**, v. 116, p. 1-29, 1996.
- MALENKA, R. C. Synaptic plasticity in the hippocampus: LTD and LTD. **Cell**, v. 78, p. 535-538, 1994.
- 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.
- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 24, p. 897-931, 2001.
- MAREN, S.; QUIRK, G. J. Neuronal signalling of fear memory. **Nature Rev.**, v. 5, p. 844-852, 2004.
- MARTELLI, A. M.; EVANGELISTI, C.; NYAKERN, M.; MANZOLI, F. A. Nuclear protein kinase C. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1761, p. 542-551, 2006.
- MATSUSHITA Y.; ISHIKAWA M.; ABE K.; UTSUNOMIYA I.; CHIKUMA T.; HOJO H.; HOSHI K.; QUOCK R.M.; TAGUCHI K. Involvement of the protein kinase Cgamma isoform in development of tolerance to nitrous oxide-induced antinociception in mice. **Neuroscience**, v. 148, n.2, p. 541-547, 2007.
- MATZEL, L. D.; LEDERHENDLER, I. I.; ALKON, D. L. Regulation of short-term associative memory by calcium-dependent protein kinase. **J. Neurosci.**, v. 10, n. 7, p. 2300-2307, 1990.
- McGAUGH, J.L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, v. 153, p. 1351–1358, 1966.
- McGAUGH, J.L. Memory—a century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248–251, 2000.

- McGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **TRENDS Pharmacol. Sci.**, v.21, p. 208-210, 2000.
- MICHEAU, J.; RIEDEL G. Protein kinases: which one is the memory molecule? **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 55, p. 534-548, 1999.
- NAKHOST, A.; DYER, J.R.; PEPIO, A. M.; FAN, X.; SOSSIN, W.S Protein kinase C phosphorylated at a conserved threonine is retained in the cytoplasm. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 41, p. 28944-28949, 1999.
- NEVEU, D. e ZUCKER, R. S. Postsynaptic levels of $[Ca^{2+}]_i$ needed to trigger LTD and LTP. **Neuron**, v. 16, p. 619-629, 1996.
- NEWTON, A. C. Protein kinase C. Seeing two domains. **Curr. Biol.**, v.5, p. 973-976, 1995a.
- NEWTON, A. C. Protein kinase C: structure, function, and regulation. **J. Bio. Chem.**, v. 270, n. 48, p. 28495-28498, 1995b.
- NEWTON, A. C.; Protein kinase C: structural and spacial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2353-2364, 2001.
- NEWTON, A. C.; Regulation of the ABC kinases by phospsorylation: protein kinase C as a paradigm. **Bioch. J.**, v. 370, p. 361-371, 2003.
- NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J.**, v. 9, p. 484-496, 1995.
- NISHIZUKA, Y. Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue. **J. Biochem.**, v. 133, p. 155-158, 2003.
- NOGUÊS, X. Protein kinase C, learning and memory: a circular determinism between physiology and behaviour. **Prog. Neuro-Psyc. and Biol. Psyc.**, v. 21, p. 507-529, 1997.
- OTTONI, E. B. EthoLog 2.2: a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. **Behav. Res. Methods Instrum. Comput.**, v. 32, n. 3, p. 446-449, 2000.
- 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.
- PARATCHA, G.; FURMAN, M.; BEVILAQUA, L.; CAMMAROTA, M.; VIANNA, M.; STEIN, M, L.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Involvement of hippocampal PKC α

isoform in the early phase of memory formation of na inhibitory avoidance learning. **Brain Res.**, v. 855, p. 199-205, 2000.

PAREKH, D. B.; ZIEGLER, W.; PARKER, P. J. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. **The EMBO J.**, v.19, n. 4, p.496-503, 2000.

PAVLOV, I. P. **Conditioned reflexes.** Tradução de G. V. Anrep. Londres: Oxford University Press. Reprinted 1960, Dover Publ., Nova Yorque.

PENICK, S.; SOLOMON, P. R. Hippocampus, context, and conditioning. **Behav. Neurosci.**, v. 105, n. 5, p. 611-617, 1991.

PEZZE, M. A.; FELDON, J. Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. **Prog. Neurobiol.**, v. 74, p. 301-320, 2004.

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.

PHILLIPS, R. G.; LEDOUX, J. E. Lesion of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. **Learn. Mem.**, v.1, p. 34-44, 1994.

PUELLES L.; KUWANA E.; PUELLES E.; BULFONE A.; SHIMAMURA K.; KELEHER J.; SMIGA S.; RUBENSTEIN J. L. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. **J. Comp. Neurol.**, v. 424, n. 3, p. 409-438, 2000.

REINER, A. et al. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. **J. Comp. Neurol.**, v. 473, p. 377-414, 2004.

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.

ROSINHA, M. U.; FERRARI, E. A. M.; TOLEDO, C. A. B. Immunohistochemical distribution of AMPA-type label in the pigeon (*C. livia*) hippocampus. **Submetido**, 2008.

SANDERS, M. J.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M. S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **Eur. J. Pharmacol.**, v.463, p. 217-223, 2003.

SCHAFE, G. E.; NADER, K.; BLAIR, J.; LEDOUX, J. E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a celular and molecular perspective. **TRENDS Neurosc.**, v. 24, n. 9, p. 540-546, 2001.

SCHWARTZ, J. H.; CALIGNANO, A.; SACKTOR, T. C. The role of protein kinase in learning and memory in *Aplysia*. **Prog. Cell Res.**, v. 1, p. 279-286, 1990.

SEKI, T.; MATSUBAYASHI, H.; AMANO, T.; SHIRAI, Y.; SAITO, N.; SAKAI, N. Phosphorylation of PKC activation loop plays an important role in receptor-mediated translocation of PKC. **Genes to Cells**, v. 10, p. 225-239, 2005.

SERRANO, P. A.; RODRIGUEZ, W. A.; POPE, B.; BENNETT, E. L.; ROSENZWEIG, M. R. Protein kinase C inhibitor chelerythrine disrupts memory formation in chicks. **Behav. Neurosci.**, v. 109, n. 2, p. 278-284, 1995.

SIEGEL J. J.; NITZ D.; BINGMAN V. P. Hippocampal theta rhythm in awake, freely moving homing pigeons. **Hippocampus**, v. 10, n. 6, p. 627-631, 2000.

SHEU, F. S.; MARAIS, R. M.; PARKER, P. J.; BAZAN, N. G.; ROUTTENBERG, A. Neuron-specific protein F1/GAP-43 shows substrate specificity for the beta subtype of protein kinase C. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 171, p. 1236-1243, 1990.

SHEU, F. S.; McCABE, B. J.; HORN, G.; ROUTTENBERG, A. Learning selectively increases protein kinase C substrate phosphorylation in specific regions of the chick brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 2705-2709, 1993.

SHUHAMA, R.; DEL-BEN, C. M.; LOUREIRO, S. R.; GRAEFF, F. G. Animal defense strategies and anxiety disorders. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 79, n. 1, p. 97-109, 2007.

SMITH D. M.; MIZUMORI S. J. Hippocampal place cells, context, and episodic memory. **Hippocampus**, v. 16, n. 9, p. 716-729, 2006.

SPERANDÉO, M. L. A. **Evocação da memória aversiva: participação do receptor NMDA e análise da ativação de Zenk no hipocampo de pombos.** (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Fisiologia) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2005.

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. Calcium-binding proteins, neuronal nitric oxide synthase, and GABA help to distinguish different pallial areas in the developing and adult chicken. I. Hippocampal formation and hyperpallium. **J. Comp. Neurol.**, v. 497, n. 5, p. 751-771, 2006.

SWEATT, J. D.; ATKINS, C. M.; JOHNSON, J.; ENGLISH, J.D.; ROBERSON, E. D.; CHEN, S. J.; NEWTON, A. C.; KLANN E. Protected-site phosphorylation of

- protein kinase C in hippocampal long-term potentiation. **J. Neuroch.**, v. 71, n. 3, 1075-1085, 1998.
- TEYLER, T. J.; DISCENNA, P. The role of hippocampus in memory: a hypothesis. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 9, n. 3, p. 377-389, 1985.
- TEYLER, T. J.; CAVUS, I.; COUSSENS, C.; DISCENNA, P.; GROVER, L.; LEE, Y. P. et al. Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity. **Hippocampus**, v. 4, p. 623-634, 1994.
- THOMPSON, R. F., KIM, J. J. Memory systems in the brain and localization of a memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 13438-13444, 1996.
- TOKER, A. Signaling through protein kinase C. **Front. Biosci.**, v. 3, p. 1134-1147, 1998.
- TÖMBÖL T.; DAVIES D. C.; NÉMETH A.; ALPÁR A.; SEBESTÉNY T. A golgi and a combined Golgi/GABA immunogold study of local circuit neurons in the homing pigeon hippocampus. **Anat. Embryol.**, v. 201, n. 3, p. 181-196, 2000.
- VAN DER ZEE, E. A.; BOLHUIS, J. J.; SOLOMIA, R. O.; HORN, G.; LUITEN, P. G. M. Differential distribution of protein kinase C (PKC α/β e PKC γ) isoenzyme immunoreactivity in the chick brain. **Brain Research**, v. 676, p. 41-52, 1995.
- VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M.; DISTERHOFT, J. F. Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. **Prog. Neuro-Psyc. Biol. Psyc.**, vol. 21, p. 531-572, 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, 2002.
- WANG J. H.; KELLY P. T. The balance between postsynaptic Ca²⁺-dependent protein kinase and phosphatases activities controlling synaptic strength. **Learn. Mem.**, v. 3, p. 170-181, 1996.
- WEEBER, E. J.; ATKINS, C. M.; SELCHER, J. C.; VARGA, A. W.; MIRNIKJOO, B.; PAYLOR, R.; LEITGES, M.; SWEATT J. D. A role for the protein kinase C in fear conditioning. **J. Neurosci.**, v. 20, n. 16, p. 5906-5914, 2000.
- YOUNG, E. A.; OWEN, E. H.; MEIRI, K. F.; WEHNER, J. M. Alterations in hippocampal GAP-43 phosphorylation and protein level following contextual fear conditioning. **Brain Res.**, v. 860, p. 95-103, 2000.
- YOUNG, E.; CESENA, T., MEIRI, K.; PERRONE-BIZZOZERO N. Changes in protein kinase C (PKC) activity, isozyme translocation, and GAP-43

phosphorylation in the rat hippocampal formation after a single-trial contextual fear conditioning paradigm. *Hippocampus*, v. 12, p. 457-464, 2002.

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

ZHAO, W. Q.; SEDMAN, G. L.; GIBBS, M. E.; NG, K. T. Effect of PKC inhibitors and activators on memory. *Behav. Brain Res.*, v. 60, p. 151-160, 1994.

ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de mestrado/doutorado intitulada “Processos de aprendizagem e memória aversiva em pombos: análise do envolvimento da proteína quinase C (PKC)”

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1193-1). pp 27/2/07

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Elayne Vieira Dias.

Aluna: Elayne Vieira Dias

Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Nome:
Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAMB - UNICAMP