

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

FERNANDO CANOVA



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

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Fernando Canova*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari

CAMPINAS – SP, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

<b>C165o</b>	<p>Canova, Fernando</p> <p>Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos (<i>C. livia</i>) / Fernando Canova. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadora: Elenice Aparecida de Moraes Ferrari. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Condicionamento clássico aversivo. 2. Hipocampo (Cérebro). 3. Proteína Zenk. 4. Fotoperíodo esqueleto. I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

**Título em inglês:** Temporal organization of classical aversive conditioning processes and expression of Zenk protein in the hippocampus of pigeons (*C. livia*).

**Palavras-chave em inglês:** Classical aversive conditioning; Hippocampus (Brain); Zenk protein; Skeleton photoperiod.

**Área de concentração:** Fisiologia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, Cláudio Antônio Barbosa de Toledo, Luis Roberto Giorgetti Britto.

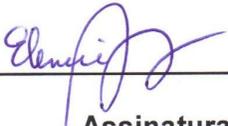
**Data da defesa:** 26/06/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 26 de Junho de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

Profª Drª Elenice Aparecida de Moraes Ferrari  
(Orientadora)

  
Assinatura

Prof Dr Cláudio Antônio Barbosa de Toledo

  
Assinatura

Prof Dr Luis Roberto Giorgetti Britto

  
Assinatura

Profª Drª Dora Maria Grassi Kassis

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profª Drª Maria Filomena Ceolim

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Quando seus amigos  
Te surpreendem  
Deixando a vida de repente  
E não se quer acreditar..  
Mas essa vida é passageira  
Chorar eu sei que é besteira  
Mas meu amigo!  
Não dá pra segurar..  
Desculpe meu amigo  
Mas não dá prá segurar..

Autores: Edgard Scandurra, Ricardo Gaspa, André Jung e Nasi

***Tese dedicada à memória de Francesco Langone***

**AGRADECIMENTOS**

A minha Família Sonia Maria Freire, Mônica Canova, José de Paula, Edgard Biccocchi, Terezinha Silva Biccocchi, Juliana Silva Biccocchi e Eliane Silva Biccocchi, pelo apoio e compreensão.

A inigualável Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, pela grande amizade, orientação, confiança e extremo incentivo para a realização deste trabalho, mais que uma orientadora, uma mãe.

A Prof<sup>a</sup>. Marly Unello Rosinha pela amizade e por me apresentar ao Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento.

Ao Dr. Luis Roberto Giorgetti Britto Laboratório de Neurobiologia Celular do ICB – USP por ceder seu laboratório para a execução das atividades de Imunoistoquímica.

Ao Especialista em Laboratório Adilson Alves do Laboratório de Neurobiologia Celular do ICB – USP pela ajuda na execução dos procedimentos de Imunoistoquímica.

A técnica em Laboratório Márcia Tsuruta do Laboratório de Neurobiologia da Universidade Cidade de São Paulo pela amizade e pela ajuda em diversas atividades.

Aos PROFS. DR. Carlos Amílcar Parada e Dr. Cláudio Barbosa de Toledo pela Amizade.

Aos amigos de Departamento: Alexandre Rezende, Aline Vilar, André Schwambach Vieira, Carlos Vinicius Almeida de Assis, César Sartori, Dionéia Araldi, Elayne Vieira Dias, Grazielle Fraga, Gustavo Facchini, Janice Rodrigues Nascimento, Karina Mie Furuzawa, Larissa Oliveira Melloni de Faria, Luis Otávio

Siqueira, Magda Aline Denadai, Peterson Dantas Bristotte, Priscila Amaral Ferreira, Rafaella Silvestre Ignarro, Sabrina Quintão Pereira, Terezinha de Jesus Menezes e ao grande amigo Washington Luis Gomes, obrigado a todos por cada segundo.

A UNICAMP por me acolher e dar a oportunidade de realizar este trabalho.

A FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado para realização deste trabalho.



“Sempre haverá esperança  
enquanto os anjos voarem”

***Hans Canova***

**? – 2005**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

µm	Micrometro
ABC	Complexo Avidina Biotina
ANOVA	Teste Estatístico para Análise de Variância
AP- 1	Ativador de Proteína 1
Cº	Graus Celsius
Ca <sup>++</sup>	Ion Cálcio
CA	Corno de Amon
CAU	Exploração Cautelosa
CC	Grupo Controle
CM	Grupo Manipulação
CS	Estimulo Condicionado
cm	Centímetro
dB	Decibel
DL	Hipocampo Dorso lateral
DMd	Hipocampo Medial Dorsal
DMv	Hipocampo Medial Ventral
DNA	Acido desoxiribonucleido
EC	Grupo Choque
EGR	Early Growth Response
EP	Grupo Pareado
EPM	Erro padrão da média
EXP	Exploração
FRZ	Congelamento
g	Gramas
GEI	Gene de Expressão Imediata
GS	Grupo Som
HpD	Hipocampo Dorsal
HpV	Hipocampo Ventral
HpVM	Hipocampo Ventro-Medial
HpVL	Hipocampo Ventro-Lateral

h	Hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidróxido de Hidrogênio
Hz	Hertz
kD	KiloDalton
kg	Quilograma
LOC	Locomoção
LTP	Potenciação de longa duração
M	Molar
mA	Miliampere
MAN	Manutenção
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado
MOV	Movimentos Isolados
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ms	Milissegundo
NaCL	Cloreto de Sódio
NP	Grupo Não Pareado
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
PAR	Parado
PB	Phosphate Buffer (Tampão Fosfato)
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês <i>phosphate buffer saline</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
PRE	Comportamentos Pré-exploratórios
RI	Resposta incondicionada
RNA	Ácido ribonucléico
s	Segundos
TXPB	Triton X 100 com Tampão Fosfato
US	Estímulo Incondicionado
V	Volts
VC	Área central do hipocampo ventral

---

***LISTA DE ABREVIATURAS***

VIG	Vigilância
W	Watts
Zif 268	Zink Finger - 268
ZENK	Acrônimo das primeiras letras das proteínas Zif- 268, EGR-1, NGFI-A e Krox 24.
ZT	Zeitgeber

## RESUMO

**CANOVA, F.** Organização temporal em processos de condicionamento clássico aversivo e expressão da proteína Zenk no hipocampo de pombos (*C. livia*); **2009.**

Uma grande parte do conhecimento sobre as bases e mecanismos neurais dos processos de aprendizagem, memória e amnésia fundamenta-se na investigação dos correlatos neurais do comportamento de animais não humanos em situações aversivas. Vários estudos têm resultados sugestivos de que o condicionamento clássico aversivo é afetado pelo sistema de temporização circadiana. As análises do condicionamento clássico aversivo e da resposta condicionada de congelamento (FRZ) são úteis para as análises do comportamento e dos processos mecanismos neurais subjacentes. Estudos prévios mostraram a indução da expressão de Zenk no hipocampo de pombos pelo treino em condicionamento clássico aversivo e pelo teste no contexto aversivo. O presente estudo investigou as variações dia - noite na aquisição e na evocação do condicionamento clássico aversivo e na expressão da proteína Zenk no hipocampo. O **Experimento I** avaliou o condicionamento ao contexto em pombos divididos em grupos condicionados (EC), controle (CC) e manipulação (CM) e o **Experimento II** investigou o condicionamento aversivo ao som previamente associado ao choque utilizando de animais que receberam som-choque pareados (EP), som-choque não pareados (NP) ou som (GS). Nos dois experimentos foi utilizado o fotoperíodo com pulsos de luz (15 min) às 6h (ZT00) e às 18h (ZT12), sendo as sessões realizadas nos horários ZT02 e ZT14. Os resultados do **Experimento I** indicaram diferença significativa na ocorrência de congelamento entre os grupos ( $p < 0,05$ ), mas não entre os horários ( $p > 0,05$ ). Comparações entre bloco final do treino e bloco inicial do teste mostraram queda significativa na ocorrência de congelamento no bloco inicial do teste no grupo EC ZT02 ( $p < 0,05$ , mas não no EC ZT14 ( $p > 0,05$ ). A análise de células Zenk positivas no hipocampo mostrou aumento significativo na região HpV em relação a HpD do grupo EC ZT02 em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), demonstrando uma diferença significativa de horário. Houve aumento significativo na marcação de núcleos Zenk-positivos em HpVM do grupo EC ZT02 em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) e em relação a HpVL ( $p < 0,05$ ). No **Experimento II** houve maior ocorrência de exploração cautelosa nos grupos EP e NP ( $p > 0,05$ ) em comparação aos grupos GS ( $p < 0,05$ ) e diferença significativa na ocorrência de congelamento entre os grupos EP e GS ( $p < 0,05$ ), mas não entre os horários ( $p > 0,05$ ). A marcação de núcleos Zenk-positivos em HpV foi maior do que em HpD nos animais que receberam som e choque pareados ou não-pareados ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas na marcação de Zenk em HpVL e HpVM nos diferentes grupos e nos dois horários ( $p > 0,05$ ). Os dois experimentos indicaram a expressão de diferentes padrões comportamentais frente ao contexto aversivo condicionado e ao som aversivo condicionado. As variações na expressão de Zenk são indicativas de ativação diferencial de HpD, HpVM e HpVL durante a evocação da memória do contexto e do som. A existência de variações dia - noite na ocorrência de condicionamento ao contexto e na expressão de Zenk no hipocampo sugere uma modulação do sistema temporizador circadiano sobre esses processos.

**Palavras-Chave:** Condicionamento clássico aversivo; Hipocampo; Proteína Zenk; Fotoperíodo esqueleto.

**ABSTRACT**

**CANOVA, F.** Temporal organization processes of aversive classical conditioning and Zenk protein expression in pigeons hippocampus (*C. livia*), **2009**.

Part of the knowledge about the mechanisms and neural basis of learning, memory and amnesia is based on the investigation of neural correlates of the behavior of non human animals in aversive situations. Moreover, many studies suggest that these behavioral processes are affected by the circadian timing system. The procedures of classical aversive conditioning and analysis of the conditioned freezing response are useful for the study of behavior and the underlying neural mechanisms. Previous studies showed the induction of Zenk expression in the hippocampus of pigeons after training in classical aversive conditioning. This study investigated day - night variations in the acquisition and retrieval of aversive classical conditioning and in the expression of Zenk protein in the hippocampus of pigeons. The **Experiment I** evaluated the conditioning to the context in pigeons attributed to conditioned (COND), control (CC) or naive groups (N). The **Experiment II** investigated the aversive conditioning to the tone in groups of pigeons that received tone-shock pairing (PS), unpaired tone and shock (NPS) or tone alone (TS). In both experiments a photoperiod was used with pulses of light (15 min) at 6h (ZT00) and 18h (ZT12) and the sessions were conducted at ZT02 and ZT14. The results of the **Experiment I** indicated between group differences in the occurrence of freezing ( $p < 0.05$ ). A significant decrease in freezing was observed in the initial block of the test as compared to the final block of the training session of the COND ZT02 ( $p < 0.05$ ), but not in the COND ZT14 group ( $p > 0.05$ ). The analysis of the Zenk-positive nuclei in the hippocampus showed a significant increase in the HpV of the COND ZT02 group compared with the other groups ( $p < 0.05$ ), indicating a significant time difference when compared to COND ZT14 ( $p < 0.05$ ). Higher density of Zenk-positive nuclei was found in HpVM of COND ZT02 group compared to HpVL ( $p < 0.001$ ) and to HpVM of other groups ( $p < 0.05$ ). **Experiment II** data showed higher occurrence of exploratory risk assessment in PS and NPS groups ( $p > 0.05$ ) as compared to TS ( $P < 0.5$ ). The occurrence of freezing in the PS groups was different from TS groups ( $p < 0,05$ ), but not from NPS groups ( $p > 0.05$ ). No significant time of the day variation of freezing was detected ( $p > 0.05$ ). Zenk- positive nuclei densities were higher in HpV than in HpD in the animals trained with paired or unpaired tone and shock stimulation ( $p < 0.05$ ). These PS and NPS groups showed no significant differences in the density of labeling of Zenk-positive nuclei in HpVL as compared to HpVM ( $p > 0.05$ ). Data from both experiments showed different behavioral patterns during the exposure to the conditioned aversive context and to the conditioned aversive tone. The variations in Zenk expression indicate differential activation of the HpD, HpVL and HpVM regions during retrieval of aversive memory of the context and of the tone. The day-night variation in the conditioned freezing to the context as well as in Zenk expression in the hippocampus suggests a modulation of these processes by the circadian timing system.

**Keywords:** Classical aversive conditioning; Hippocampus; Zenk protein. Skeleton photoperiod

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Condicionamento Clássico Aversivo .....	2
1.2. O Hipocampo de Mamíferos e Aves.....	7
1.3. O Sistema Temporizador em Mamíferos e Aves.....	11
1.4. Proteína Zenk.....	15
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo Geral .....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
No Experimento I .....	24
No Experimento II .....	25
<b>3. EXPERIMENTO I.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1.1. Sujeitos .....	28
3.1.2. Equipamentos .....	30
3.1.3. Fotoperíodo Esqueleto .....	30
3.1.4. Caixas Experimentais para Habituação e Condicionamento.....	32
3.1.5. Procedimentos Experimentais.....	34
3.1.5.1. Adaptação às Condições de Biotério .....	34
3.1.5.2. Habituação ao Contexto do Laboratório.....	34
3.1.5.3. Treino em Condicionamento Contextual .....	35
3.1.5.4. Teste ao Contexto de Condicionamento .....	35
3.1.5.5. Perfusão.....	36

3.1.5.6. Imunoistoquímica .....	36
3.1.5.7. Análise Comportamental .....	39
3.1.5.6. Análise Estatística .....	41
<b>3.2. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
3.2.1. Análise dos Comportamentos. ....	43
3.2.2. Análise da distribuição dos núcleos Zenk-positivos .....	50
<b>3.3. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>4. EXPERIMENTO II</b> .....	<b>65</b>
<b>4.1. MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>66</b>
4.1.1. Sujeitos .....	67
4.1.2. Equipamentos .....	68
4.1.3. Procedimentos Experimentais.....	69
4.1.3.1. Adaptação às Condições de Biotério .....	69
4.1.3.2. Habituação ao Contexto do Laboratório.....	69
4.1.3.3. Treino em Condicionamento Som – Choque .....	69
4.1.3.4. Teste ao Condicionamento do Som .....	70
4.1.3.5. Análise Comportamental.....	70
4.1.3.6. Análise Estatística.....	71
<b>4.2. RESULTADOS</b> .....	<b>72</b>
4.2.1. Análise dos Comportamentos. ....	73
4.2.2. Análise da distribuição dos núcleos Zenk-positivos .....	80
<b>4.3. DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>95</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>97</b>

**7. ANEXOS..... 116**

## **INDICE DE FIGURAS**

- Figura 1: Esquema de conectividade intrahipocampal obtida através da utilização de traçadores retrógrados e anterógrados no hipocampo de pombos. DL = região Dorso Lateral, a linha tracejada mostra a divisão da área dorsomedial (DM) em porção dorsal (DMd) e ventral (DMv). Setas representam as ligações entre subdivisões. VC = ventral área central; VL = camada ventrolateral; VM = camada ventromedial. Escala de Barra = 1mm. (Modificado de KAHN *et al.* 2003; KARTEN & HODOS,1967)..... 10
- Figura 2: Esquema representativo da estrutura secundária *do zink finger*; em vermelho é representada a alfa hélice, em verde as duas folhas beta, as estruturas em azul representam as Histidinas, em amarelo são representados as Cisteinas e o círculo central em cinza representa a molécula de zinco, COOH representa a carboxila terminal e NH<sub>2</sub> representa a amina terminal..... 18
- Figura 3: Esquema ilustrativo do mecanismo de ativação do gene zenk. Inicia-se com um estímulo (1), causando uma alteração na concentração de Cálcio [Ca<sup>++</sup>] (2), o que por sua vez causa a ativação da proteína denominada MEK (Quinase Regulada por Sinal Extracelular Ativada por Mitógeno) (3), essa ativação causa a ativação de outra proteína, denominada ERK (Quinase regulada por sinal extracelular) (4). Com esta a ativação, ERK transloca-se para o núcleo celular (5), causando a transcrição do RNAm que resultará na tradução da proteína ZENK (6). Por sua vez, ZENK atua como fator de transcrição, translocando-se para o núcleo, onde se ligará a sítios específicos do DNA (7) resultando assim na transcrição em RNAm que será traduzido em inúmeras proteínas (8). ..... 20
- Figura 4: Organograma representativo do planejamento experimental referente ao Experimento I. 54 pombos machos adultos, sob fotoperíodo esqueleto, foram submetidos ao condicionados ao contexto, divididos em 2 horários ZT02 e ZT14 e subdivididos em EC = grupo Experimental; CC = grupo Controle e CM = grupo Manipulação. .... 29

- Figura 5: (A): Colete de tecido (1) contendo um plugue de tomada elétrica (fêmea) (2) para conexão na caixa experimental, as pontas livres dos fios elétricos ligados no plugue (3) eram conectados nos eletrodos implantados nos animais, em 4 é mostrado a abertura para as asas. (B): Animal com colete e eletrodo implantados. .... 30
- Figura 6: Fotoperíodo esqueleto: Introdução gradual: Caracterizado por iluminação tênue contínua (Luz Vermelha), 01 pulso de luz branca matutino (ZT 00) e 01 pulso de luz branca vespertino (ZT 12). ZT 02 e ZT 14 indicam o início do treino ou do teste dos grupos experimentais. .... 32
- Figura 7: Situação experimental: Em “A”, caixa de habituação (medidas 50X50X50) onde os animais eram colocados por 4 dias durante 40 min. (1) Auto falante onde eram emitidos os estímulos sonoros no teste ao som. Em “B”, caixa experimental de condicionamento (medidas 30X40X40) onde os animais eram colocados e então eram apresentados os estímulos referentes a cada grupo experimental, (1) botão de acionamento do choque elétrico, 100mA , 35 ms e (2) auto falante onde eram emitidos os estímulos sonoros. .... 33
- Figura 8: Imagem digitalizada de uma região do hipocampo de pombos onde é demonstrada marcação de células Zenk-positivas utilizada na contagem. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Setas pretas indicam alguns tipos de marcação considerados para contagem; setas brancas ilustram elementos não considerados para contagem. .... 39
- Figura 9: Porcentagem das categorias comportamentais durante as sessões de treino e teste do condicionamento ao contexto, para os animais dos Grupos Condicionados (EC) ZT02 e ZT14 e Grupos Controles (CC) ZT02 e ZT14. Categorias comportamentais: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados. \*\*\* Diferença significativa em comparação aos grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,0001$ ); # diferença significativa em comparação ao grupo CC ZT14 ( $p < 0,05$ ); + diferença significativa em comparação ao grupo EC ZT14, sessões de treino e de teste ( $p < 0,05$ ); §

- diferença significativa em comparação ao grupo EC ZT14 e CC ZT14, sessão de treino ( $p < 0,05$ )..... 44
- Figura 10: Duração total do grupo em escala Logaritmica das categorias comportamentais durante a sessão de treino e teste do condicionamento ao contexto para os animais dos Grupos Condicionado (EC) ZT02 e ZT14 e Grupos Controle (CC) ZT02 e ZT14. Categorias comportamentais: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados. \*\*\* diferença significativa em comparação aos grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,001$ ); \*\* diferença significativa em comparação ao grupo EC ZT14 ( $p < 0,01$ ); + diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ); # diferença significativa em comparação ao EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,01$ ); § diferença significativa em comparação ao EC ZT14, CC ZT02 e CC ZT14; ¶ diferença significativa em comparação ao teste do EC ZT02, e ao treino e teste dos grupos CC ZT02 e CC ZT14..... 46
- Figura 11: Ocorrência das categorias comportamentais em resposta ao contexto a cada 150 segundos, para o Grupo Condicionado (EC) ZT02 e ZT14 e Grupo Controle (CC) ZT02 e ZT14. Cada ponto representa a ocorrência de cada comportamento em cinco blocos de registros, mais EPM. FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados..... 48
- Figura 12: Comparação do número médio de registros de congelamento verificado no bloco final da sessão de treino (150 segundos) e o bloco inicial da sessão de teste (150 segundos), para os Grupos Condicionados (EC) ZT02 e ZT14. \* diferença significativa em comparação ao treino ( $p < 0,05$ ).49
- Figura 13: No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpD, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Experimental Condicionado (EC ZT02 e ZT14), Grupos Controle (CC ZT02 e ZT14) e

Grupos Manipulação (CM ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50  $\mu$ m..... 51

Figura 14: No esquema, Representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo de pombos dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpV, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Experimental Condicionado (EC ZT02 e ZT14), Grupos Controle (CC ZT02 e ZT14) e Grupos Manipulação (CM ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50  $\mu$ m..... 52

Figura 15: Densidade Média de núcleos marcados Zenk-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao condicionamento ao contexto; EC = Grupo Experimental; CC = Grupo Controle e CM = Grupo Manipulação. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ) .. 53

Figura 16: Comparação da densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo de pombos, avaliado após o teste do condicionamento ao contexto. Em (A): as duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) e (B): entre as subdivisões do Hipocampo Ventral (HpVM - Hipocampo Ventro Medial e HpVL – Hipocampo Ventro Lateral) de animais dos grupos condicionado (EC)ZT 02 e ZT14, controle (CC) ZT02 e ZT14 e Manipulação (CM) ZT02 e ZT14. \*\*\* diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ); # diferença em relação HpD e HpV dos grupos CM ZT02 e CM ZT14(  $p < 0,05$ ); \*\* diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ )..... 55

Figura 17: Organograma representativo do planejamento experimental referente ao Experimento II. 54 pombos machos adultos, sobre fotoperíodo esquelético, foram submetidos ao condicionados ao contexto, divididos em 2 horários ZT02 e ZT14 e subdivididos em EP = Grupo som-choque Pareado; NP = Grupo som-choque Não pareado e GS = Grupo Som. .... 68

Figura 18: Porcentagem das categorias comportamentais observadas durante a sessão de treino e teste do condicionamento Som-Choque para os animais

dos Grupos Som-Choque Pareado (EP) ZT 02 e ZT 14, Som-Choque Não Pareado (NP) ZT02 e ZT 14 e Som (GS) ZT02 e ZT 14: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios, MOV = Movimentos Isolados e CAU = Exploração Cautelosa. \*  $p < 0,05$  em relação ao GS; +  $p < 0,05$  em relação ao EP e NP; #  $p < 0,05$  em relação aos grupos EP e NP. .... 74

Figura 19: Duração total em escala logarítmica das categorias comportamentais durante a sessão de treino e teste do condicionamento ao som para os animais dos Grupos Som-Choque Pareado (EP) ZT 02 e ZT14, Som-Choque Não Pareado (NP) ZT 02 e ZT14 e Som (GS) ZT 02 e ZT14. Categorias comportamentais: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados, CAU = Exploração Cautelosa. #  $p < 0,05$ , diferença de CAU significativa entre os demais grupos; (\*) diferença de FRZ significativa entre os demais grupos; (+) diferença de EXP significativa entre os demais grupos..... 77

Figura 20: Ocorrência das categorias comportamentais em resposta ao condicionamento ao som a cada 150 segundos, para os animais Grupos Som-Choque Pareado (EP) ZT 02 e ZT14, Som-Choque Não Pareado (NP) ZT 02 e ZT14e Som (GS) ZT 02. Cada ponto representa a ocorrência de cada comportamento em cinco blocos de registros, mais EPM. A legenda da figura indica as categorias comportamentais correspondentes: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados..... 79

Figura 21: No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpD, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Som-Choque Pareados (EP ZT02 e ZT14), Grupos Som-Choque Não Pareados (NP

ZT02 e ZT14) e Grupos Som (GS ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50  $\mu$ m..... 81

Figura 22: No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpV, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Som-Choque Pareados (EP ZT02 e ZT14), Grupos Som-Choque Não Pareados (NP ZT02 e ZT14) e Grupos Som (GS ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50  $\mu$ m..... 82

Figura 23: Densidade Média de núcleos marcados Zenk-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao condicionamento som-choque; EP = Grupo experimental Som-Choque Pareados; NP = Grupo Som-Choque Não Pareados e GS = Grupo Som.  $P < 0,05$ . \* diferença significativa com os grupos NP ZT02, NP ZT14, GS ZT02 e GS ZT14..... 83

Figura 24: Comparação da densidade média em  $\text{mm}^2$  de núcleos Zenk positivos em (A): as duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) e (B): entre as subdivisões do Hipocampo Ventral (HpVM - Hipocampo Ventro Medial e HpVL – Hipocampo Ventro Lateral) de animais os Grupos Som-Choque Pareados (EP) ZT 02 e ZT 14, Grupos Som-Choque Não Pareados (NP) ZT 02 e ZT 14 e Grupos Som (GS) ZT 02 e ZT 14. \* significativamente diferente dos outros grupos ( $p < 0,05$ ), com exceção da área HpV do EP ZT14 ( $p > 0,05$ ); # significativamente diferente dos grupos GS ( $p < 0,05$ )..... 85

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Condicionamento Clássico Aversivo**

Em uma palestra na Escola de Medicina da Universidade de Madrid, em 1903, intitulada “Psicologia Experimental e Psicopatologia em Animais”, o fisiologista russo Ivan Petrovich Pavlov (1849 – 1936) demonstrou uma das grandes descobertas científicas: O **Reflexo Condicionado**. Foi uma das primeiras abordagens realmente objetivas e científicas ao estudo da aprendizagem, principalmente porque forneceu um modelo que podia ser verificado e explorado de inúmeras maneiras (BOAKES, 2003, LEDOUX, 2000). No decorrer de uma experiência sobre secreções digestivas, Pavlov descobriu que além dos reflexos inatos (reações instintivas, independentes da aprendizagem), podem-se desenvolver nos animais e nos seres humanos reflexos aprendidos: verificou que o cão salivava não só quando via o alimento (reflexo inato), mas também perante outros sinais a ele associados, como os passos do tratador ou o som de uma campainha (reflexos aprendidos ou condicionados) (LEISING, 2007). Assim, realizou experimentos com cães em situações controladas de laboratório onde, utilizando a associação de dois estímulos, o som de uma campainha em seguida a chegada da tigela de alimento, conceituou o processo do reflexo condicionado. Esse condicionamento refere-se a um tipo de aprendizagem envolvendo relações de controle de estímulo no qual um estímulo sinaliza a apresentação de outro. No condicionamento clássico aversivo ocorre a associação de dois estímulos: um estímulo aversivo incondicionado (US) que tem propriedades eliciadoras de uma classe de respostas defensivas que foram biologicamente determinadas – por exemplo, um choque elétrico – e um outro estímulo que não tem relações de

controle com essas respostas – por exemplo, um som. Desta forma, após a repetição de pareamentos som-choque, o som adquire a capacidade de eliciar as respostas que, incondicionalmente, eram eliciadas pelo choque elétrico, ou seja, torna-se um estímulo condicionado (CS) e passa a eliciar respostas condicionadas. Os estímulos que caracterizam o ambiente onde ocorreram as associações CS - US - os estímulos contextuais – também adquirem propriedades condicionadas ao choque elétrico. Assim, a apresentação apenas do CS - som ou do CS - contexto induz respostas de congelamento (*freezing*) ou de potenciação de comportamentos exploratórios, acompanhadas por reações neurovegetativas tais como aumento da pressão sanguínea, elevação da taxa respiratória, taquicardia, midríase, alterações hormonais, como também alterações na sensibilidade a dor (PILZ & SCHNITZLER, 1996).

Num experimento comumente utilizado para avaliar o condicionamento do medo contextual, um rato é colocado em um novo ambiente dado pela câmara experimental, onde após alguns minutos de exploração, recebe um choque elétrico nas patas. Tipicamente, o choque elétrico é breve (0.5-2 s), suave (0.3-1.5 mA), casual (1 a 4 choques) e incontrolável. O animal mostra uma atividade locomotora vigorosa durante o choque elétrico, a qual persiste de uma forma diminuída por um período que segue a apresentação do choque elétrico. Este comportamento é substituído gradualmente por uma imobilidade profunda, caracterizando o congelamento (FANSELOW, 1999). Posteriormente, quando se apresenta apenas o som ou o contexto, as respostas defensivas condicionadas serão eliciadas por esses estímulos. Esta forma de condicionamento ocorre em praticamente todos os filis, tendo sido demonstrada em moscas, minhocas,

moluscos, peixes, pombos, coelhos, ratos, gatos, cães, macacos, e humanos (LEDOUX, 2000).

A situação de aprendizagem de condicionamento clássico aversivo geralmente é avaliada pelo comportamento de congelamento que ocorre durante a exposição ao CS, tanto ao som como ao contexto do condicionamento (KIM & FANSELOW, 1992; SIQUEIRA, 2004); também é avaliada pela magnitude das respostas ao som condicionado a um estímulo aversivo (HITCHOCK & DAVIS, 1991; PLAPPERT, *et al.*, 1999). Os estudos sobre o condicionamento clássico aversivo geralmente são referidos como condicionamento do medo, baseado no fato de que o comportamento de congelamento faz parte do repertório de defesa de roedores e outros animais (FANSELOW, 1999). O medo é identificado ou definido a partir da ocorrência de comportamentos observados em situações onde existe um perigo iminente ou mesmo onde exista perigo em potencial. Tais comportamentos contribuem para a auto-preservação do organismo, sendo, portanto, considerados como respostas defensivas (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; SHUHAMA, DEL-BEN, LOUREIRO & GRAEFF, 2007; MAREN, 2008).

O congelamento constitui uma resposta característica, robusta, bem definida e altamente conservada. Em roedores essa resposta é caracterizada pela ausência de movimentos observáveis, incluindo movimentos das vibrissas, exceto movimentos relacionados à respiração. O congelamento está geralmente, mas não necessariamente, relacionado com uma postura encolhida de encontro a uma das paredes da caixa (FANSELOW & BOLLES, 1979; MARCHAND, LUCK & DISCALA., 2003). Em pombos a resposta de congelamento foi definida como uma

postura de imobilidade tensa, com o animal geralmente posicionado num dos cantos da caixa experimental, mantendo o corpo encolhido ou inclinado, com sua base alargada, com apoio do peito, desnivelamento da asa em relação à cauda, apresentando extensão restrita do pescoço, cabeça direcionada para um ponto fixo do ambiente, olhos abertos e respiração ofegante (BRITO, BRITTO & FERRARI, 2006; REIS, SCHENKA, MELO & FERRARI, 1999).

A análise dos comportamentos relacionados com o medo condicionado é um elemento central na maioria dos estudos de condicionamento clássico aversivo, possibilitando, assim, o estudo dos processos de aprendizagem e memória aversiva. Muitos estudos indicam que a resposta de congelamento envolve vias e estruturas e sistemas neurais específicos no sistema nervoso central e ativação de reações vegetativas específicas (FENDT e FANSELOW, 1999; BRITO *et al.*, 2006; MAREN, 2001; MAREN, 2008). Inicialmente a amígdala foi enfatizada como sendo o componente central do circuito neural do medo, ou seja, uma área de plasticidade muito importante para a formação e armazenamento de memórias de medo (LEDOUX, 1992). Isto é notado quando ocorre o bloqueio farmacológico da atividade da amígdala, ou lesão localizada, e se observa que não ocorre o condicionamento de medo (MISERENDINO, SANANES, MELIA & DAVIS, 1990; RABINAK & MAREN, 2008). Além do mais, foi evidenciado que em ratos, neurônios dos núcleos basais da amígdala têm envolvimento na recuperação de memória relacionada com associações entre o som e situações aversivas (DAVIS, 1992). Isto é um indicativo da participação da amígdala na recuperação de memórias relacionadas com o medo ao som.

Porém, além dos estudos sobre a participação da amígdala em processos de medo condicionado, muitas investigações indicaram o envolvimento do hipocampo nesses processos de aprendizagem e memória (PHILLIPS e LEDOUX, 1992).

Estudos recentes mostraram fortes indícios de que o hipocampo está envolvido não só no condicionamento de medo contextual, mas também com o medo condicionado ao som (BAST *et al.*, 2001, ZHANG *et al.*, 2001). Foi comprovado que o hipocampo participa na organização e no controle de diversas respostas motoras e vegetativas envolvidas no condicionamento aversivo, como por exemplo, a locomoção, o congelamento e as vocalizações ultrassônicas (ANTONIADIS & MCDONALD, 2000; BAST *et al.*, 2001). KIM & FANSELOW (1992) chamaram a atenção para o papel do hipocampo na consolidação da memória emocional aversiva em ratos num estudo em que usaram o pareamento som e choque elétrico, e lesões no hipocampo 1, 7, 17 ou 28 dias após o treino. Os animais com lesão 1 dia pós-treino tiveram menor intensidade de congelamento quando reapresentados ao contexto. Quando testados em outro contexto com reapresentação do som, todos os grupos apresentaram congelamento. Esses dados mostraram o papel do hipocampo na formação de memórias aversivas e indicaram um processamento diferente para o armazenamento das informações dadas pelo pareamento ao contexto, e pelo som apresentado num outro ambiente.

Alguns estudos se preocuparam com as variações do condicionamento do medo no período circadiano, tal como relatado por CHAUDHURY & COLWELL (2002), foram programadas contingências com condicionamento de atraso e assim

medidas as respostas de congelamento ao contexto; apenas FERRARI *et al.* (1999) avaliaram as alterações condicionadas no sobressalto e exploração ao CS (som). VALENTINUZZI, KOLKER, VITATERNA & FERRARI, (2001) estudaram o condicionamento clássico aversivo durante a fase de atividade e repouso de camundongos submetidos ao fotoperíodo esqueleto. Os animais foram treinados ao condicionamento do contexto e do som em dois diferentes horários do dia. Os animais foram testados a cada 24h por 5 dias para analisar a resposta condicionada e a taxa de extinção. Uma diferença significativa foi observada entre os grupos da manhã e da noite na expressão e na extinção do medo condicionado dependente do contexto, mas não foram detectadas diferenças no condicionamento ao som. A evidência da variação temporal do condicionamento aversivo ao contexto, mas não do condicionamento ao som, sugeriu que o relógio biológico poderia ter um efeito modulatório no medo condicionado ao contexto que envolveria diferentes vias neurais.

## **1.2. O Hipocampo de Mamíferos e Aves**

O hipocampo de mamíferos localiza-se bilateralmente na região do lobo temporal, fazendo parte de um conjunto de estruturas denominado sistema límbico. É localizado em uma dobra interna da parte ínfero-medial do lobo temporal, que forma uma curva em direção ao ventrículo lateral (HENDELMAN, 2006). O nome hipocampo é derivado da palavra em latim para *Hippocampus* (cavalo marinho), devido ao seu formato curvado apresentado em secções coronais do cérebro humano. O hipocampo de mamíferos é dividido

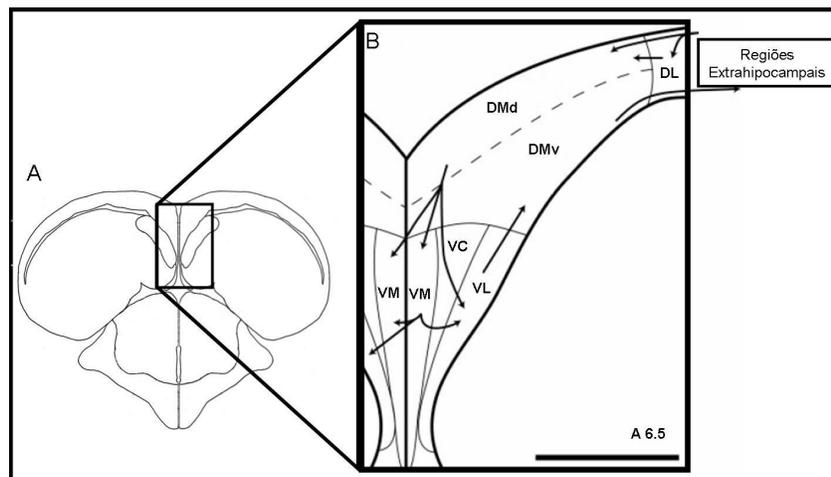
anatomicamente em quatro regiões CA1, CA2, CA3 e CA4 (do latim, *cornu ammonis* ou Corno de Amon (CA)), nome dado em referência a representação da divindade egípcia Amon, pela semelhança da estrutura do cérebro com os chifres de carneiro): a região CA1 ocupa a maior extensão da porção superior; a região CA3 se estabelece na maior extensão da porção inferior, enquanto que a região CA2 é uma pequena zona de transição entre CA1 e CA3, tanto CA2 quanto CA3 são formadas por grandes neurônios piramidais; a região CA4 fica na zona de transição entre o hipocampo e o giro denteado (BEAR *et al.*, 2002; KANDEL *et al.*, 2000). O hipocampo interconecta-se a várias estruturas funcionalmente próximas, consideradas como integrantes da formação hipocampal. Em mamíferos a formação hipocampal é constituída pelo hipocampo propriamente dito (Corno de Amon), o giro denteado, o subículo e o córtex entorrinal (MACHADO, 2004; BUTLER & HODOS, 1996). O giro denteado recebe projeções do córtex entorrinal e constitui a principal origem de aferências ao hipocampo. O subículo é uma estreita faixa de tecido cortical situado entre o hipocampo e o córtex entorrinal, no giro parahipocampal. As informações do córtex entorrinal chegam na formação hipocampal através da via perforante alcançando primeiramente o giro denteado. Por sua vez, as células granulares do giro denteado se projetam para CA3 pelas fibras musgosas. Essas fibras fazem sinapse com as células musgosas de CA4 e com células piramidais de CA3, que através de suas projeções, alcançam CA1 por vias eferentes formando o sistema colateral de Schaffer. A região CA1 envia projeções ipsilateralmente para o subículo e córtex entorrinal, de onde as informações processadas seguem para outras estações. Os campos da formação hipocampal estão ligados por conexões largamente unidirecionais. Este circuito e

suas conexões formam a via tri-sináptica hipocampal em mamíferos (KANDEL *et al.*, 2000).

Vários estudos evidenciaram que o hipocampo de aves poderia ser considerado homólogo ao hipocampo de mamíferos, tanto com relação à características embriológicas, aspectos topográficos e neuroquímicos (DUBBELDAM, 1998; KREBS *et al.*, 1998). O hipocampo tem origem na zona subventricular da eminência ganglionária embrionária situada na região dorsomedial do telencéfalo (PARNAVELAS, 2000). As relações topográficas entre o hipocampo de mamíferos e o de aves se dão pelo fato de que, em ambos, a região considerada hipocampo margeia o ventrículo lateral. Além disso, considerando os aspectos neuroquímicos, são encontrados vários neurotransmissores tanto no hipocampo de aves quanto em mamíferos como a serotonina, glutamato e nNOS (JOCA *et al.*, 2003; SILVA, 2007; FLORA FILHO, *et al.*, 2000; ROSINHA, 2003).

Recentemente, KAHN *et al.* (2003), investigando a organização das subdivisões do hipocampo de pombos com traçadores retrógrados (toxina colérica subunidade B) e anterógrados (aminadextrana biotinilada), sugeriram a existência de um circuito tri-sináptico no hipocampo de pombos, comparável ao existente no hipocampo de mamíferos. As fibras aferentes provenientes de regiões extra-hipocampais chegam ao hipocampo via região Dorso-Lateral e região Dorso-Medial dorsal. As projeções das regiões Dorso-Medial e Dorso-Medial dorsal estabelecem sinapses ipsolateralmente, com neurônios da região Ventro-Lateral e Ventro-Medial. A região Ventro-Medial, que recebe aferências da região Dorso-Medial dorsal ipsolateral e da Ventro-Medial contralateral tem projeções para a

região Ventro-Lateral ipsolateral. Por fim, a região Ventro-Lateral projeta-se para a região Dorso-Medial ventral, considerada uma região de saída hipocampal para Dorso-Lateral. Ao mesmo tempo, a região Dorso-Medial dorsal estabelece conexões contralaterais com a região Ventro-Medial, enquanto que a região Ventro-Medial tem projeções para as regiões Ventro-Lateral e Ventro-Medial do hipocampo contralateral (Figura 1).



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

Estudos sobre o hipocampo de aves indicam características funcionais comparáveis com o hipocampo de mamíferos. Reis *et al.* (1999) relataram que as lesões hipocampais realizadas 24 horas após o condicionamento clássico aversivo em pombos resultaram em menor porcentagem de ocorrência de congelamento durante o teste ao contexto. Como o condicionamento ao som foi mantido após a

lesão, esse estudo replica em pombos os dados obtidos por KIM & FANSELOW (1992) em ratos e enfatiza o papel do hipocampo na modulação da memória emocional aversiva em pombos. Mais recentemente, outro estudo (BRITO *et al*, 2006) verificou que a expressão do produto do gene de expressão imediata (GEI) *zif-268* ocorre no hipocampo de pombos submetidos à aquisição do condicionamento clássico aversivo. Além disso, Sperandéo (2005) verificou a marcação regionalizada de núcleos ZENK-positivos no hipocampo de pombos induzida pela evocação de memória contextual aversiva.

### **1.3. O Sistema Temporizador em Mamíferos e Aves**

Desde longa data sabe-se que os processos biológicos são cíclicos ou rítmicos em sua essência, ou seja, ocorrem em intervalos regulares. Os ciclos de atividade/repouso ou o ciclo vigília - sono observados em animais, plantas e na espécie humana, é um exemplo claro de um ciclo recorrente (MARQUES, 1987).

O primeiro estudo que constatou a presença de um ritmo biológico foi com experimentos realizados por Jean Jacques d'Ortous deMairan, onde observou que um exemplar de *Mimosa pudica* de seu observatório abriam suas folhas ao amanhecer e as fechavam durante a noite, o experimento consistia em deixar este exemplar de *Mimosa* em escuridão total no sótão de seu laboratório e pode-se notar que o ritmo de abrir as folhas de dia e fechá-las a noite permaneceu. Em outras palavras, os estímulos ambientais não causaram alteração dos ritmos, fato que sugeria que algum fator interno da planta era o responsável por tal comportamento.

Os ritmos biológicos dos organismos vivos têm períodos distribuídos em uma grande variedade de intervalos, que vão desde alguns segundos (descargas elétricas do sistema nervoso) até meses ou anos (ciclos sazonais). Um dos mais estudados é o ritmo circadiano (apresentam períodos em torno de 24 horas) (HALBERG, 1987).

A grande maioria dos organismos utiliza variáveis ambientais como o fotoperíodo, variações na temperatura, precipitação pluviométrica e disponibilidade de alimento para regular processos fisiológicos, como hibernação, reprodução e termorregulação (VIVIEN-ROELS *et al.*, 1988), no entanto, diferente dos osciladores biológicos, que têm a capacidade de antecipar as mudanças ambientais, os fatores externos apenas são indicadores das variações ambientais (VON SCHANTZ *et al.*, 2000).

Em mamíferos, o principal oscilador biológico ou marcapasso circadiano gerador da ritmicidade circadiana é o núcleo supraquiasmático (NSQ), que se localiza no hipotálamo, bilateralmente ao terceiro ventrículo (MOORE *et al.* 1983). Em roedores, o NSQ possui três divisões: uma pequena área rostral, uma área caudal maior, que contém a divisão dorsomedial e ventrolateral, cujo principal sinal para os ajustes desse marcapasso circadiano é o ciclo claro - escuro (GOLOMBEK *et al.*, 2004). Outras estruturas neurais envolvidas no controle da ritmicidade circadiana são as retinas e a glândula pineal (PITTENDRIGH, 1981).

Nas últimas décadas foram muito estudados os aspectos fisiológicos, histológicos e moleculares dos Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo em mamíferos. Porém, poucos estudos estão concentrados em esclarecer a localização e o funcionamento dos NSQ em aves (YOSHIMURA *et al.*, 2001).

INOUYE & KAWAMURA (1979) demonstraram que após a remoção cirúrgica do NSQ ocorreu uma dessincronização circadiana da atividade locomotora em ratos. Indicou-se, assim que essa estrutura é essencial para a manutenção da sincronização dessa atividade comportamental. Em outros experimentos observaram-se resultados semelhantes, indicando assim que o NSQ é essencial para a manutenção da ritmicidade (MOORE, 1979; RUSAK & ZUCKER, 1979).

Em aves, por outro lado, o sistema circadiano é bastante complexo envolvendo sistemas oscilatórios inter-relacionados e fotorreceptores que recebem informações acerca da luminosidade do ambiente e arrastam (atrasam) estes osciladores (GWINNER, 1989). Pelo menos quatro estruturas fazem parte de sistema circadiano de aves: olhos, glândula pineal, núcleos do hipotálamo lateral e fotorreceptores encefálicos (CASSONE E MENAKER, 1984). A glândula pineal secreta o hormônio melatonina durante a noite em todas as espécies estudadas, *in vivo* e *in vitro*, e acredita-se que essa liberação hormonal possa estar influenciando o comportamento circadiano do organismo (BINKLEY, 1981; TAKAHASHI e MENAKER, 1982; CANTWELL e CASSONE, 2002).

Em aves, o NSQ também desempenha um papel importante na sincronização do organismo por estímulos fóticos, da mesma forma que em mamíferos (CASSONE, 1988; YOSHIMURA, *et al.*, 2001). Porém, não há um conhecimento preciso de uma estrutura homóloga ao NSQ de mamíferos. Estudos anatômicos no cérebro de aves descreveram um grupo de células adjacentes à base do terceiro ventrículo, diretamente acima do quiasma óptico, chamado de NSQ, devido a sua similaridade com o NSQ de mamíferos (YOSHIMURA, 2001;

BRANDSTÄTTER e ABRAHAM, 2003). Os primeiros estudos de lesão sugeriram que este grupo de células podia, na verdade, representar a estrutura funcional equivalente ao NSQ de mamíferos (EBIHARA e KAWAMURA, 1981; SIMPSON *et al.*, 1981). Entretanto, os limites desse grupo de células em diferentes espécies de aves e a clara descrição na extensão rostro-caudal e das propriedades citoarquitetônicas ainda não são totalmente conhecidas (BRANDSTÄTTER & ABRAHAM, 2003).

Os componentes centrais dos controladores de ritmicidade biológica são definidos como genes dos quais os produtos protéicos são essenciais para a geração e regulação dos ritmos circadianos no interior das células, são denominados genes relógio (TAKAHASHI, 2004). Atualmente, se demonstrou a participação de dezenas de genes interagindo por meio alças de retroalimentação, como componentes centrais da regulação da ritmicidade circadiana em mamíferos. Estas alças envolvem interações proteína-proteína e repressão e ativação de transcrição gênica. Mutações nesses genes ou em seus equivalentes em *Drosófila* produzem animais com período em livre curso anormalmente curtos ou longos. Estas variações no período estão associadas a mudanças no ângulo de fase da sincronização pela luz (ALBRECHT & EICHELE, 2003).

Experimentos com diferentes espécies sugerem que o relógio circadiano tem uma função na organização dos processos de aprendizagem e memória, embora ainda existam questões importantes sobre as características dessa modulação. Além disso, os estudos com aves, tal como aqueles com mamíferos, podem contribuir como modelos animais interessantes para a análise comparativa da organização temporal desses processos e dos mecanismos neurais

subjacentes. A isso tudo, também se adiciona outro fato relativo aos resultados de estudos prévios que indicaram prejuízo na aprendizagem de habituação e de sensibilização das respostas a estímulos acústicos em função do horário do teste (VALENTINUZZI e FERRARI, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 2004; SOUZA, 1999).

O aumento da imunorreatividade a proteína Zenk no NSQ, região que recebe aferências da retina, foi observada em *hamsters* e camundongos expostos a pulsos luminosos no início e no final da noite subjetiva. Os camundongos apresentaram uma regionalização na expressão da imunorreatividade de Zenk e uma variação rítmica diferente da observada em *hamsters* (DONG *et al.*, 2002).

A marcação da expressão de Genes de Expressão Imediata através da imunorreatividade permite evidenciar a ativação neuronal polissináptica, a ação integrada de diferentes áreas cerebrais e a atividade de neurônios ativadas polissinápticamente subjacentes à organização de processos comportamentais complexos, tal como o condicionamento Pavloviano do medo (HALL, *et al.*, 2001). Assim, os dados sobre a expressão rítmica circadiana de GEIs tal como o gene *zenk* (DONG *et al.*, 2002) indicam que seria interessante analisar as relações entre a variação rítmica de GEIs e processos de aprendizagem e memória.

#### **1.4. Proteína Zenk**

Os primeiros genes que sofrem regulação de expressão após estimulação celular são aqueles que não requerem síntese *de novo* de novas proteínas, cuja indução ocorre em poucos minutos e é de natureza transitória, são denominados

genes de expressão imediata (GEIs). No sistema nervoso, a expressão de GEIs pode ser induzida por uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, neurotransmissores, peptídeos, despolarização, convulsões, isquemia, lesões cerebrais e estimulação sensorial (HERRERA, *et al.*, 1996). Além disso, os GEIs tem uma função importante em mecanismos neuroplásticos críticos para a consolidação de memórias (CORREIA-PINTO, 2007).

Os GEIs poderiam constituir uma resposta genômica precocemente requerida para o disparo dos mecanismos subjacentes às modificações persistentes das células (MORGAN *et al.*, 1987). Isso explicaria a sua ativação rápida e transitória, e sua resistência aos inibidores de síntese protéica. Os GEIs neuronais codificam fatores de transcrição, proteínas citoesqueléticas, fatores de crescimento, enzimas metabólicas, e proteínas envolvidas em sinais de tradução (LANAHAN & WORLEY, 1998; RIBEIRO, 2003; MELLO, 2004).

Entre os GEIs melhores caracterizados estão *C-FOS*, *C-jun*, *Krox-20* e *Zif 268*, este último, também é conhecido como *Krox - 24*, *EGR-1*, *TIS-8*, *NGFI-A* ou *zenk*, ambigüidade devida ao fato de que esse gene foi descoberto independentemente em laboratórios distintos. O termo ZENK (um acrônimo dos quatro primeiros nomes: Zif-268; EGR-1; NGFI-A e Krox-24) é usado para aves, em paralelo com os outros nomes (KNAPSKA & KACZMAREK, 2004; MELLO, 2004). Uma vez traduzidas no citoplasma, estas proteínas podem translocar-se para o núcleo e regular a transcrição de genes alvo.

O GEI *zenk*, que codifica a proteína Zenk, (comumente é usado *zenk* com todas as letras minúsculas para o gene e Zenk com a primeira ou todas as letras maiúsculas para a proteína codificada) tem alta expressão cerebral, e foi um dos

GEIs inicialmente clonados e encontrados no cérebro (COLE *et al.*, 1989; WORLEY CHRISTY, NAKABEPPU, BHAT, COLE & BARABAN, 1991), sendo uma ferramenta importante utilizada para mapeamento da atividade funcional do cérebro. Localizado no *locus* 5q23-q31 do cromossomo humano, ainda não tem os seus genes alvos identificados, embora já se conheça a seqüência específica de DNA: 5' - GC[ G / T ]GGGC – 3' (CHRISTY e NATHANS, 1989). Este gene codifica 2 *exons*, dos quais no *éxon* localizado na direção 3' do DNA, existem três sítios de ligação para a proteína e assim formar o *zink finger* (dedo de zinco). Os *zink finger* são domínios protéicos que têm a propriedade de se ligarem ao DNA. É composto por duas folhas-beta antiparalelas e uma alfa-hélice. O íon de zinco é fundamental para garantir a estabilidade deste tipo de domínio. Na ausência do íon, o domínio desdobra-se e torna-se demasiado pequeno para possuir um núcleo hidrofóbico (Figura 2).

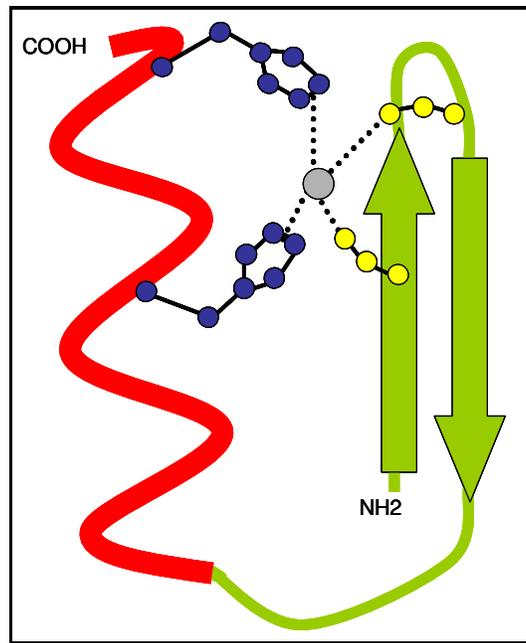


Figura 2: Esquema representativo da estrutura secundária do *zink finger*; em vermelho é representada a alfa hélice, em verde as duas folhas beta, as estruturas em azul representam as Histidinas, em amarelo são representados as Cisteínas e o círculo central em cinza representa a molécula de zinco, COOH representa a carboxila terminal e NH<sub>2</sub> representa a amina terminal.

Os fatores de transcrição codificados por GEIs como o *zenk* atuam como uma classe de terceiros mensageiros que, induzidos precocemente pela atividade neural, atuam no nível de transcrição gênica (HERDEGEN & LEAH, 1998; LANAHAH & WORLEY, 1998; WISDEN, ERRINGTON, WILLIAMS, DUNNETT, WATERS, HITCHCOCK EVAN, BLISS, HUNT, 1990; WORLEY et al., 1991). Uma função biológica importante dos GEIs em neurônios seria a sustentação ou estabilização da plasticidade neuronal e a formação de memórias de longo prazo. CLAYTON, (2000) postulou uma hipótese para o papel dos Genes de Expressão Imediata na consolidação de memória e na integração de múltiplos estímulos aplicados em neurônios individuais dentro do circuito.

Estudos recentes utilizando procedimentos que resultavam em deficiência do gene *zenk* em roedores confirmaram um papel fundamental para este gene em tarefas de memória dependentes do hipocampo (JONES, ERRINGTON, FRENCH, FINE, BLISS, GAREL, CHARNEY, BOZON, LAROCHE & DAVIS, 2001) e na tarefa de reconsolidação de memórias (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004).

O mecanismo de ativação do gene *zenk* inicia-se com um estímulo que atua nas sinapses, sendo transmitido via neurônio pré-sináptico; este resulta em liberação de neurotransmissor e ativação de receptores pós-sinápticos que controlam o influxo de cálcio e ativam vias de sinalização intracelular. A elevação dos níveis intracelulares de  $Ca^{++}$  e de segundos mensageiros, tais como, AMPc, GMPc, causa a ativação da proteína denominada MEK (Quinase Regulada por Sinal Extracelular Ativada por Mitógeno; molécula de 393 aminoácidos com 43.5 kD), que participa de vários processos celulares incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. Essa ativação de MEK resulta na ativação de outra proteína, denominada ERK (quinase regulada por sinal extracelular) que ativada se transloca para o núcleo celular. Essas enzimas catalisam a fosforilação de fatores de transcrição, tais como o gene *zenk*, que se ligam com alta afinidade a seqüências específicas de DNA, na região promotora da transcrição, ativando a RNA polimerase II, o que leva à tradução de proteínas como a proteína Zenk. Esta proteína, por também ser um fator de transcrição, tem a capacidade de ligar-se em sítios específicos no DNA e assim iniciar os processos de transcrição e tradução para outras proteínas (Figura 3).

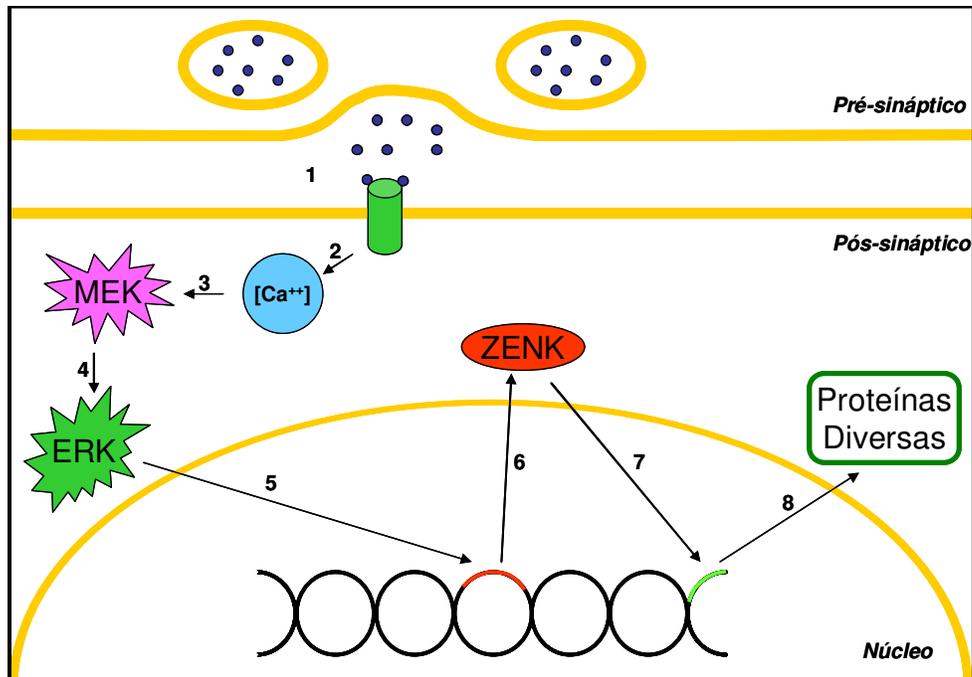


Figura 3: Esquema ilustrativo do mecanismo de ativação do gene zenk. A ativação do neurônio pré-sináptico, resultante do processamento de estímulo, induz a liberação de neurotransmissor que interage com receptores da membrana pós-sináptica (1), causando uma alteração na concentração de Cálcio  $[Ca^{++}]$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

As proteínas codificadas pelo gene de expressão imediata *zenk* têm a capacidade de regulação de genes distintos, tendo sido demonstrado o seu papel ativador da expressão das sinapsinas, as proteínas constituintes mais abundantes nas sinapses (THIEL, 1995). Estudos em camundongos *knockout* para o gene da sinapsina sugerem que as vesículas sinápticas podem ser desestabilizadas na ausência dessa proteína (THIEL, 1995). Além disso, demonstrou-se que o gene

*zenk* é necessário para a formação de novas memórias (RIBEIRO, 2003; LEE *et al.*, 2004). *Zenk* foi considerado também um fator para regular a expressão da sinaptobrevina II proteína presente na membrana das vesículas sinápticas, que é conhecida também como VAMP (PETERSOHN & THIEL, 1996).

No encéfalo, *Zenk* tem uma expressão basal mantida por atividade sináptica, neurohormonal ou neurotrófica (WORLEY *et al.*, 1991; HERDEGEN E LEAH, 1998; BECKMANN & WILCE, 1997). Os níveis basais elevados da proteína *Zenk* foram observados no córtex visual de várias espécies de mamíferos e no córtex somatossensorial de ratos (KACZMAREK & CHAUDHURI, 1997).

A primeira demonstração do aumento do nível da proteína *Zenk* resultou do estudo comportamental utilizando esQUIVA INIBITÓRIA feito por Nikolaev, Kamisnka, Tischmeyer, Matthies & Kaczmarek (1992). O experimento usou uma caixa experimental onde havia uma plataforma e uma grade de metal, de forma que os animais (*Rattus* sp) eram colocados sobre a plataforma e, quando colocavam as quatro patas nas grades, recebiam um som seguido de um choque elétrico. Observou-se um aumento da expressão de *Zenk* no hipocampo dos animais treinados nessa situação. Outra forma de se avaliar a expressão de *Zenk* no cérebro é com a utilização do condicionamento clássico, onde é possível verificar não apenas a expressão de *Zenk* no hipocampo de pombos, mas também que esta expressão é regionalizada (SPERANDÉO, 2005; BRITO *et al.*, 2006).

O presente estudo considera a investigação de quais são os processos comportamentais e neurais que estão envolvidos na expressão do medo condicionado e na sua modulação circadiana. Alguns trabalhos destacam um

papel funcional importante do hipocampo na aquisição da resposta condicionada em situações de condicionamento de medo (BAST *et al.*, 2001). O condicionamento ao contexto está relacionado a estruturas cerebrais que não estão necessariamente envolvidas no condicionamento entre um estímulo discreto inócuo e um estímulo aversivo, por exemplo, o condicionamento som-choque. Assim, novos experimentos que envolvam manipulações de contingências entre estímulos poderiam auxiliar no esclarecimento dessas questões.

O condicionamento Pavloviano do medo é um processo comportamental complexo que envolve a ativação neuronal polissináptica, com ação integrada de diferentes áreas cerebrais e a atividade de neurônios ativados polissinápticamente. A atividade da circuitaria neural subjacente ao medo condicionado pode ser evidenciada pela marcação da expressão de GEIs por meio da imunorreatividade às proteínas controladas por eles.

**2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi investigar, considerando um horário matutino e um vespertino, as variações temporais na aquisição e na evocação do condicionamento clássico aversivo e na ativação da proteína Zenk no hipocampo de pombos condicionados.

## **2.2. Objetivos Específicos**

Para atingir os objetivos específicos, foram realizados dois experimentos:

No **Experimento I** pretendeu-se analisar:

- a variação comportamental e expressão da memória aversiva ao contexto do condicionamento choque-contexto em dois horários do dia (08h00min e 20h00min).
- a expressão de diferentes categorias comportamentais - Congelamento; Movimentos Isolados; Parado; Exploração; Exploração Cautelosa; Locomoção; Movimentos Pré-Exploratórios e Manutenção – nas sessões de treino e de teste de condicionamento contexto-choque.
- a variação da expressão da proteína Zenk em diferentes áreas do hipocampo de pombos (Hipocampo Dorsal, Hipocampo Ventral, Hipocampo Ventro-Medial e Hipocampo Ventro-Lateral), após o teste de evocação da memória contextual aversiva em pombos submetidos ao condicionamento ao contexto, nos dois horários do dia (08h00min e 20h00min).

No **Experimento II** pretendeu-se analisar:

- a variação comportamental e expressão da memória aversiva ao som condicionado em dois horários do dia (08h00min e 20h00min).
- a expressão de diferentes categorias comportamentais - Congelamento (*freezing*); Movimentos Isolados; Parado; Exploração; Exploração Cautelosa; Locomoção; Movimentos Pré-Exploratórios; Manutenção e Exploração cautelosa- nas sessões de condicionamento som-choque e teste ao som.
- a variação da expressão da proteína Zenk em diferentes áreas do hipocampo de pombos (Hipocampo Dorsal, Hipocampo Ventral, Hipocampo Ventro-Medial e Hipocampo Ventro-Lateral), após o teste de evocação da memória aversiva ao som em pombos submetidos ao condicionamento de pareamento som-choque, nos dois horários do dia (08h00min e 20h00min).

**3. EXPERIMENTO I**

### **3.1. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1.1. Sujeitos

Foram utilizados neste experimento 54 pombos adultos, derivação não controlada da espécie *Columba livia*, adquiridos de um mesmo fornecedor. Após a chegada ao biotério de aves, os animais foram mantidos em quarentena, recebendo banho e tratamento anti-parasitas internos e externos. Durante esse período, os animais sofreram manipulações de caráter dessensibilizatório, profilático (administração de anti-helmínticos) e terapêutico (extinção de escabiose). Em seguida, alojados em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum* (mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração especial para aves, areia e farinha de ostra). Os pombos foram identificados numericamente e catalogados. O peso do animal foi acompanhado durante seis dias antes do experimento. Ventilação higiênica periódica foi promovida por exaustores e o controle de temperatura foi feito pelo uso de condicionadores de ar (22 °C). Nestas condições foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (luz se acendendo às 6:00h). A Figura 4 mostra o esquema dos grupos de animais e o planejamento experimental utilizado neste experimento.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007, Protocolo nº1195-1, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

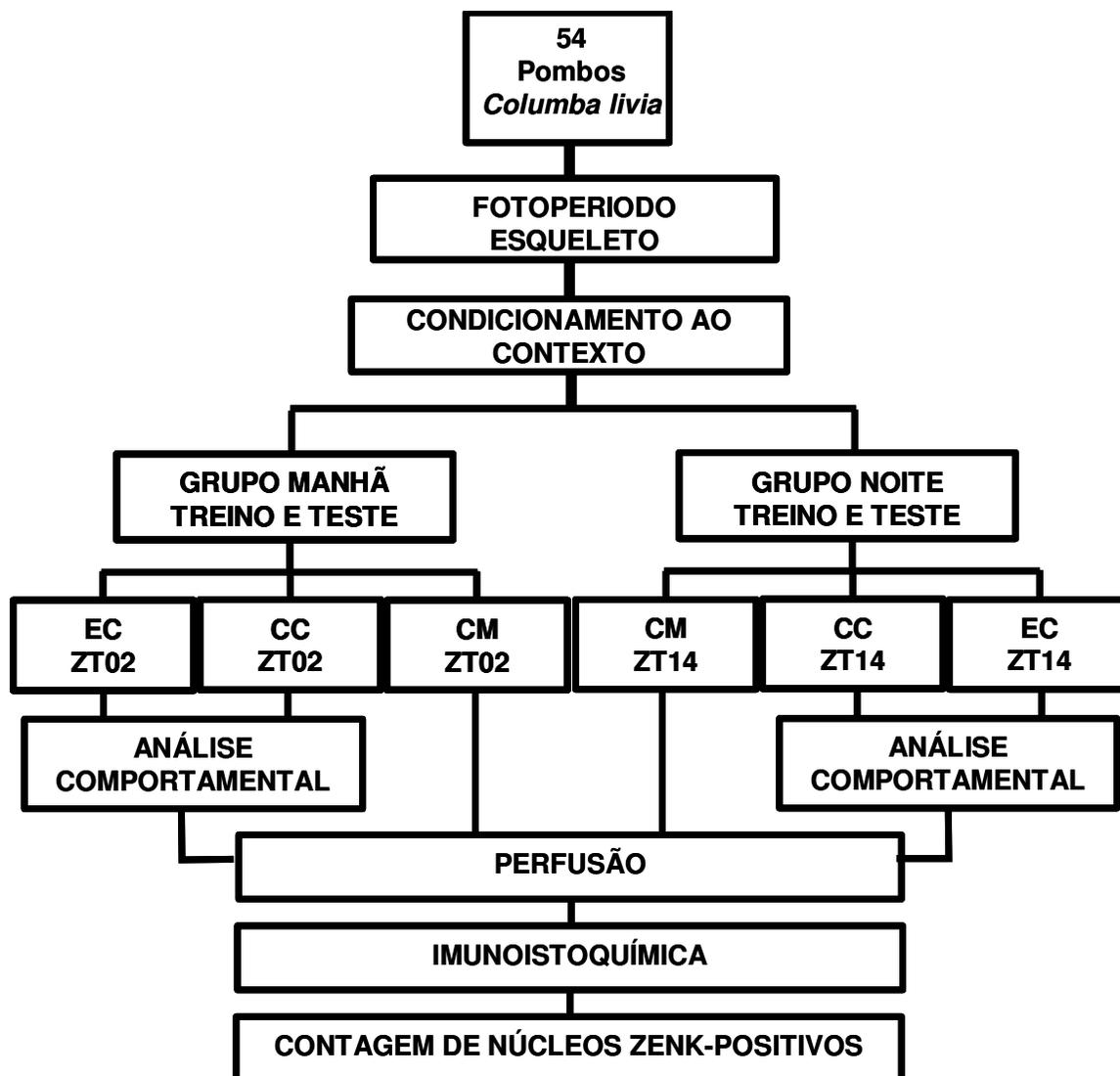


Figura 4: Organograma representativo do planejamento experimental referente ao Experimento I. 54 pombos machos adultos, sob fotoperíodo esquelético, foram submetidos ao condicionamento ao contexto, divididos em 2 horários ZT02 e ZT14 e subdivididos em EC = grupo Experimental; CC = grupo Controle e CM = grupo Manipulação.

### 3.1.2. Equipamentos

Inicialmente eram implantados eletrodos de aço inoxidável (0,5 mm; 0.020”) cronicamente nos ossos púbicos dos animais sob anestesia leve com éter etílico; eram então ligados a um colete de tecido (Figura 5) que continha um plugue de tomada elétrica (fêmea), a qual seria conectada no plugue de tomada elétrica (macho) da caixa experimental.

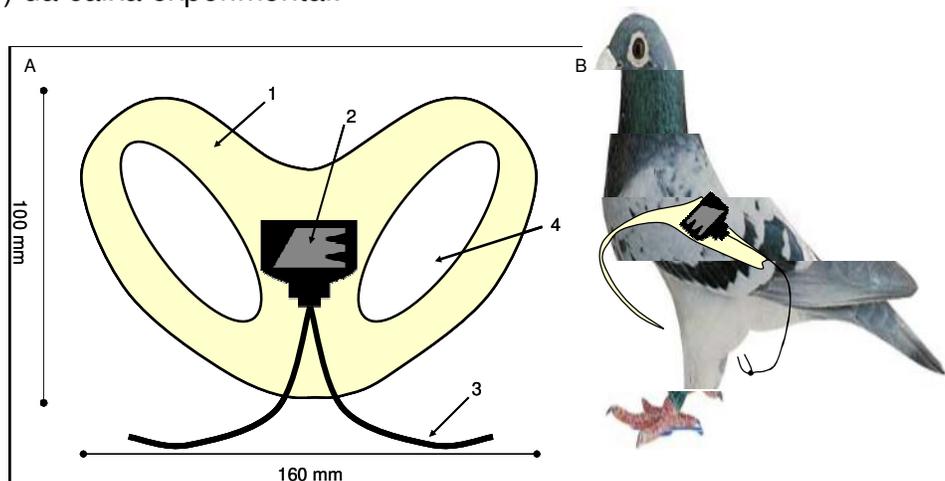


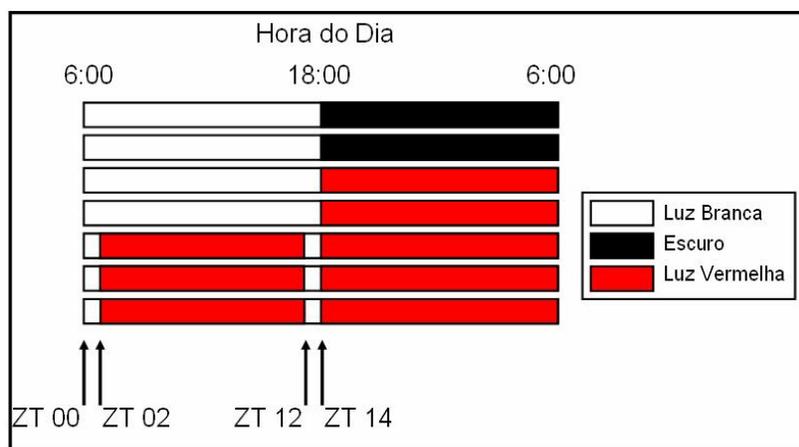
Figura 5: (A): Colete de tecido (1) contendo um plugue de tomada elétrica (fêmea) (2) para conexão na caixa experimental, as pontas livres dos fios elétricos ligados no plugue (3) eram conectados nos eletrodos implantados nos animais, em 4 é mostrado a abertura para as asas. (B): Animal com colete e eletrodo implantados.

### 3.1.3. Fotoperíodo Esqueleto

Com a utilização do ciclo claro-escuro que normalmente são submetidos os animais, pode ocorrer interferências nos resultados de variação circadiana. O mesmo problema pode ocorrer se os animais forem submetidos à iluminação constante (Claro constante ou escuro constante), os animais poderiam entrar em livre-curso, o que causaria a dessincronização do grupo analisado,

impossibilitando a comparação entre os grupos. Tendo feitas estas considerações, os pombos foram submetidos a um esquema de iluminação em fotoperíodo esqueleto no sentido de controlar efeitos de o mascaramento que ocorrem em iluminação com ciclo claro-escuro ou iluminação constante (ASCHOFF, 1987; PITTENDRIGH, 1965).

Depois de um período mínimo de 15 dias sob ciclo claro-escuro e dois dias antes do treino, o ciclo de iluminação era gradualmente mudado para uma condição de fotoperíodo esqueleto (Figura 6). A fase de escuro era substituída por 12 horas de luz tênue ( $\leq 5$  lux) vermelha, condição que continuou por dois ciclos. Imediatamente após dois dias, começou um fotoperíodo esqueleto, dado por dois pulsos de luz intensa branca de 15 minutos de duração, separados por 11 horas e 45 min. de luz tênue vermelha (i.e., 0.15 branca: 11.45 vermelha; 0.15 branca: 11.45 vermelha), condição que continuou pelo resto do experimento. Este tipo de esquema de iluminação representa um modelo de arrastamento discreto ou não-paramétrico, onde um pulso de luz de poucos minutos, apresentado aproximadamente a cada 12 horas, é suficiente para o arrastamento dos ritmos endógenos (PITTENDRIGH, 1965). Como acontece em todo ciclo ambiental periódico capaz de sincronizar ritmos endógenos, o fotoperíodo esqueleto é considerado um *zeitgeber* (doador de tempo; ASCHOFF, 1960). Se a sincronização ao fotoperíodo esqueleto é adequada, o início da atividade do animal deve acontecer perto do ZT12 (*zeitgeber* time 12). O *Zeitgeber* 00 é representado pelo início do primeiro pulso de luz branca.



**Figura 6: Fotoperíodo esquelético: Introdução gradual: Caracterizado por iluminação tênue contínua (Luz Vermelha), 01 pulso de luz branca matutino (ZT 00) e 01 pulso de luz branca vespertino (ZT 12). ZT 02 e ZT 14 indicam o início do treino ou do teste dos grupos experimentais.**

### 3.1.4. Caixas Experimentais para Habituação e Condicionamento

As sessões de habituação tanto no Experimento I quanto no Experimento II foram realizadas numa câmara de observação (50 x 50 x 50 cm.), com paredes brancas e porta lateral, o lado frontal foi construído com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. A iluminação era feita com lâmpadas fluorescentes brancas de 9 W, localizadas nas paredes laterais (Figura 7A).

As sessões experimentais de condicionamento tanto ao contexto quanto ao som foram realizadas numa câmara de observação (30 x 40 x 40 cm.), com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. A iluminação era feita com lâmpadas vermelhas de 15 W, localizadas nas paredes laterais (Figura 7B). Os choques eram aplicados através dos eletrodos a partir de uma fonte (FORINGER, USA), controlados por marcadores de tempo eletromecânicos.

Todas as sessões foram gravadas digitalmente com o auxílio do software (WinVDR pro versão 3.7.0). Os materiais e reagentes usados na perfusão e Imunoistoquímica serão relacionados oportunamente durante a descrição dos procedimentos específicos.

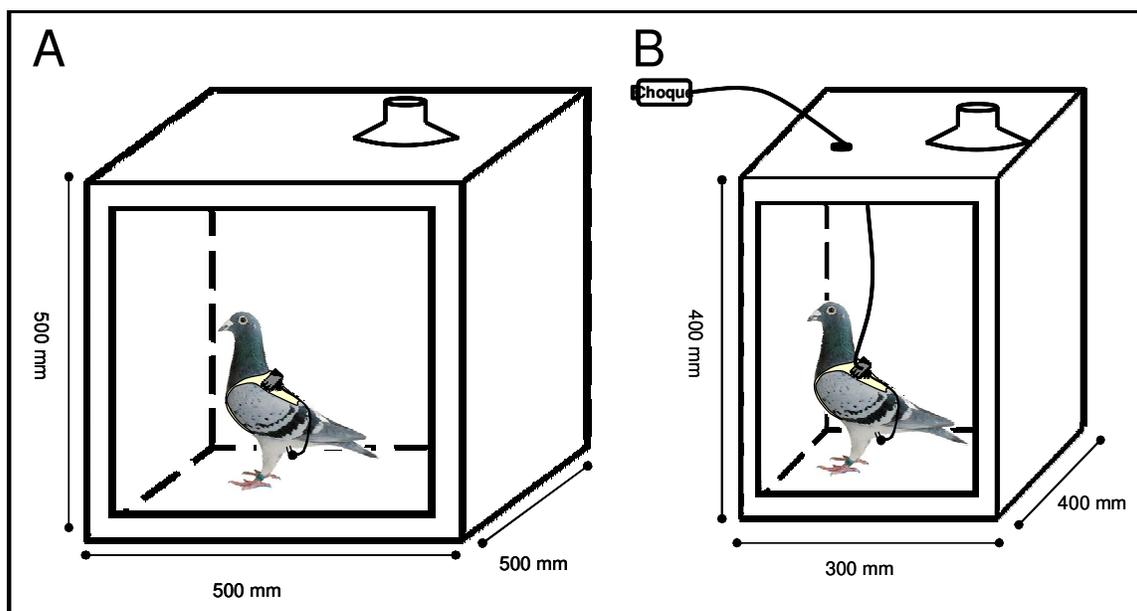


Figura 7: Situação experimental: Em “A”, caixa de habituação (medidas 50X50X50) onde os animais eram colocados por 4 dias durante 40 min. (1) Auto falante onde eram emitidos os estímulos sonoros no teste ao som. Em “B”, caixa experimental de condicionamento (medidas 30X40X40) onde os animais eram colocados e então eram apresentados os estímulos referentes a cada grupo experimental, (1) botão de acionamento do choque elétrico, 100mA , 35 ms e (2) auto falante onde eram emitidos os estímulos sonoros.

Os animais foram aleatoriamente atribuídos a grupos cujos testes foram realizados no início da manhã (Grupo Matutino ZT02) e a grupos cujos testes foram realizados no início da noite (Grupo Vespertino ZT14).

**1. Grupo Experimental Condicionamento Contextual – (EC) ZT 02 n = 10 e ZT 14 n = 10:** Os animais receberam 03 choques-elétricos durante a permanência por

20 minutos na câmara experimental (contexto); (pareamento contexto-choque) e 24h depois foram testados por meio da reexposição ao contexto.

**2. Grupo Controle-Contexto (CC)** ZT 02 n = 10 e ZT 14 n = 10: Os animais foram expostos ao contexto durante duas sessões de 20 min., sem apresentação de estímulos.

**3. Grupo Controle-Manipulação (CM)** ZT 02 n = 7 e ZT 14 n = 7: Os animais foram submetidos ao transporte até o laboratório, pesagem e retorno ao biotério durante 6 dias.

### **3.1.5. Procedimentos Experimentais**

#### **3.1.5.1. Adaptação às Condições de Biotério**

Após chegarem ao biotério, os pombos passaram por um tratamento profilático de uma semana. A partir daí, foram colocados em gaiolas individuais por um período mínimo de quinze dias antes do experimento.

#### **3.1.5.2. Habituação ao Contexto do Laboratório**

Antes da sessão de condicionamento, os pombos foram submetidos a um procedimento de habituação a uma câmara experimental diferente daquela utilizada para o treino. Foram realizadas sessões diárias de 40 minutos, em um contexto diferente ao dia do treino, durante quatro dias no mesmo horário previsto para os testes comportamentais. Nesses dias, os animais do grupo CM foram apenas retirados da gaiola-viveiro e pesados diariamente. Esse procedimento visa controlar a interferência de comportamentos relacionados com a novidade da

manipulação pelo experimentador durante o treino e teste.

### **3.1.5.3. Treino em Condicionamento Contextual**

No quinto dia, uma sessão experimental com três apresentações de choque (10mA, 35 ms). Os estímulos foram apresentados durante a sessão de 20 min., respectivamente aos 5, 10 e 15 min. Os animais controles tiveram uma sessão com exposição à câmara experimental e nenhuma apresentação de estímulo. Os comportamentos dos pombos foram filmados para posterior transcrição. Os animais do grupo CM eram retirados da gaiola-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério.

### **3.1.5.4. Teste ao Contexto de Condicionamento**

Os animais EC foram retirados da gaiola-viveiro e colocados diretamente no contexto onde ocorreram às apresentações do choque. Essa sessão tinha 20 min. de duração e era realizada 24h após o condicionamento. O comportamento do pombo foi filmado para posterior transcrição. Os animais do grupo CM eram retirados de suas gaiolas-viveiro, transportados até o laboratório, pesados e retornados ao biotério.

### **3.1.5.5. Perfusão**

Os animais foram perfundidos 01h20min após o início da sessão de teste ao contexto ou ao som. No final desse período os animais eram transportados ao laboratório onde eram então anestesiados com cetamina 20 mg/Kg e Xilasina, 10 mg/Kg, e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl 0,9%) para a remoção do sangue presente no cérebro, e posteriormente com solução tamponada de paraformaldeído a 4%, para fixação do tecido nervoso. Finalizado esse procedimento, o encéfalo dos animais era retirado e mantido de 4-6 horas na solução de paraformaldeído para pós-fixação. Em seguida os encéfalos eram transferidos para uma solução crio - protetora de sacarose a 30% e mantidos em uma temperatura média de 4°C por um período de 48 horas. Após este período de crioproteção, os cérebros foram congelados e armazenados em freezer -80°C para posterior processamento imunohistoquímico para análise de células Zenk-positivas.

### **3.1.5.6. Imunoistoquímica para Marcação de Células Zenk-positivas**

Os cortes de tecido encefálico com 30µm de espessura obtidos por micrótomo deslizante por congelamento (LEITZ 1208), após perfusão e congelamento do encéfalo dos animais, foram lavados em PB 0,1 M por três vezes, cada lavagem com 10 minutos de duração. Logo após, os cortes eram incubados com anticorpo primário policlonal (Egr-1 (c-19): Sc-189; Santa Cruz Biotechnology) em solução de triton X-100 0,3% em PB 0,1 M (TXPB) contendo 2% de soro de cabra, onde permaneceram durante 18 horas, após este período,

eram submetidos a três lavagens de 10 minutos em PB 0,1M e incubados com anticorpo secundário anti cabra biotinilado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) em TXPB, durante 120 minutos, em rotor, à temperatura ambiente. Novamente passaram por três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M e, a seguir, incubados no complexo ABC (avidina-biotina-peroxidase) em TXPB contendo cloreto de sódio, durante 120 minutos, em rotor, à temperatura ambiente. Nova série de três lavagens de 10 minutos em PB 0,1 M antecedeu a colocação em solução de diaminobenzidina (DAB) em PB 0,1 M durante 15 a 20 minutos, onde eram acrescentados 0,2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%, os cortes ficavam nesta solução de 2 a 6 minutos. Novamente, eram realizadas três lavagens em PB 0,1 M por 10 minutos cada uma e os cortes eram então montados em lâminas para microscopia silanizadas e gelatinizadas, os cortes eram então desidratados em série crescente de álcoois e clareador (Hemo-De) e, finalmente as lâminas eram cobertas com a lamínula.

A análise dos núcleos Zenk-positivos foi feita através de microscopia de campo claro, e na contagem dos núcleos dos neurônios marcados nas áreas definidas do hipocampo (HpD, HpV; HpVL; HpVM), que foi realizada em 6 cortes de hipocampo de cada animal, utilizou-se o programa ImageJ (NIH-USA). O HpD tem limite inferior, traçado a partir de uma linha virtual que une a borda do ventrículo lateral e a linha medial do hipocampo, e limite superior, traçado a partir de uma linha virtual que une a borda da curvatura do ventrículo lateral à superfície dorsal do telencéfalo. O teto da região ventral corresponde à linha-limite inferior do HpD, que dividida ao meio, dá origem a uma linha mediana que termina no centro do ângulo da região em V. Essa linha bissetriz divide o hipocampo ventral em

região medial, com limite na linha mediana do hipocampo e a região lateral, que margeia o ventrículo lateral (BRITO *et al.*, 2006; SPERANDÉO, 2006). A contagem das células marcadas seguiu o critério de delimitação virtual das regiões dorsal e ventral. Em cada região as células Zenk-positivas foram aferidas por contagem unitária. Foram computadas células com marcação nuclear nítida com coloração de tonalidade amendoada até o marrom escuro (Figura 8). A contagem foi discutida e revista por observadores-controle (duplo cego), para fins de controle de validade dos dados. A área de cada região demarcada foi avaliada, utilizando o programa SigmaScan Pro Image Analysis Versão 5.0.0 (SPSS INC.). Alguns dos resultados foram expressos em densidade por milímetro quadrado ( $\text{mm}^2$ ), que foram obtidos considerando o número total de núcleos marcados multiplicados por  $10^6$  e divididos pelo valor da área delimitada para contagem dos núcleos (HpD, HpVL, HpVM ou HpVL) em  $\mu\text{m}^2$ , sendo obtida assim, a densidade de núcleos marcados Zenk-positivos por  $\text{mm}^2$  (BRITO, 2000).

A fórmula correspondente segue abaixo:

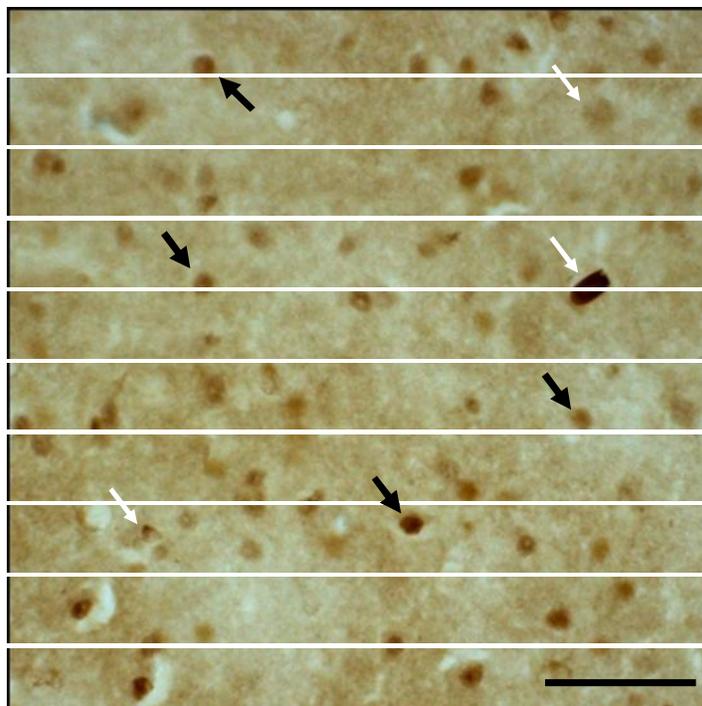
$$D = (n \cdot 10^6) / A$$

Onde:

“D” corresponde ao numero de núcleos marcados por  $\text{mm}^2$ ;

“n” corresponde ao número total de núcleos marcados em determinada região;

“A” corresponde a área delimitada para a contagem de núcleos em  $\mu\text{m}^2$ .



**Figura 8:** Imagem digitalizada de uma região do hipocampo de pombos onde é demonstrada marcação de células Zenk-positivas utilizada na contagem. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ . Setas pretas indicam alguns tipos de marcação considerados para contagem; setas brancas ilustram elementos não considerados para contagem.

### 3.1.5.7. Análise Comportamental

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

**Movimentos isolados:** nesta categoria foram incluídos todos os comportamentos que resultam em mudanças de localização espacial e/ou extensão de partes do corpo do animal;

**Comportamentos pré-exploratórios:** constituem reações que foram geralmente observadas antecedendo o explorar;

**Exploração:** movimentos relacionados à orientação para a investigação de partes ou do ambiente como um todo;

**Locomoção:** deslocamento no espaço, usando como referencial um ponto qualquer que não ele mesmo;

**Manutenção:** comportamentos relacionados com ajustes corporais e vegetativos (bocejar, deglutir, piscar) e de auto-estimulação como coçar a cabeça e limpar;

**Parado (imobilidade relaxada):** Ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte deste: o animal interrompe o movimento em curso ou fica sem se mover, em pé, geralmente no centro da câmara experimental e sem apoio peitoral, com o pescoço encolhido ou em pequena extensão;

**Congelamento comportamental – (congelamento/imobilidade tensa- *freezing-FRZ*):** Ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte deste; o animal fica imóvel, agachado ou encolhido com alargamento da distância entre os pés, geralmente em um canto da câmara experimental, com o corpo inclinado para frente e apoio peitoral no assoalho ou na parede; respiração ofegante; olhos totalmente abertos; asas e cauda apresentam desalinhamento; o pescoço apresenta extensão restrita e a cabeça fica imóvel e direcionada para um único ponto no ambiente.

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

### **3.1.5.6. Análise Estatística**

Os dados comportamentais de duração total, duração média e ocorrência média foram submetidos à análise de variância ANOVA tendo como fatores grupo (EC ZT02 e EC ZT14; CC ZT02 e CC ZT14) e sessão (treino e teste). O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

Os registros comportamentais em blocos de 30 seg. foram analisados com o teste ANOVA, considerando grupo e sessão como fatores e blocos como medidas repetidas. O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

Nas comparações estatísticas entre o responder final na sessão de treino e o responder inicial na sessão de teste usou-se ANOVA de duas vias, com ocorrência de congelamento como variável dependente. Os fatores foram: grupo agrupado com horário (Condicionado ZT02; Condicionado ZT14) e bloco (bloco final do treino e bloco inicial do teste). O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

Nas comparações estatísticas entre a marcação de células Zenk-positivas usou-se ANOVA de duas vias tendo como fatores grupo agrupado com horário e áreas do hipocampo. O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

### **3.2. RESULTADOS**

### **3.2.1. Análise dos Comportamentos durante o treino de condicionamento e no teste ao contexto realizado nos horários ZT02 e ZT14.**

A Figura 9 mostra as distribuições de ocorrência percentual entre as diferentes categorias comportamentais – congelamento, locomoção, exploração, parado, manutenção, pré-exploratório e movimentos isolados - nos grupos EC e CC, nos horários ZT02 e ZT14. Ocorrem relações inversas entre a maior ocorrência de congelamento para os animais dos grupos EC e de exploração para os animais dos grupos CC, nos dois horários analisados. A análise com ANOVA indicou diferenças significativas entre os grupos para congelamento ( $F_{3,32} = 114,47$ ;  $p < 0,0001$ ), exploração ( $F_{3,32} = 83,65$ ;  $p < 0,0001$ ), parado ( $F_{3,32} = 17,65$ ;  $p < 0,001$ ), manutenção ( $F_{3,32} = 3,63$ ;  $p < 0,05$ ) e pré-exploratório ( $F_{3,32} = 5,30$ ;  $p < 0,05$ ). Houve diferença significativa entre sessões apenas para a categoria movimentos isolados ( $F_{1,32} = 9,89$ ;  $p < 0,001$ ), porém foram encontradas diferenças entre sessões com valores marginalmente significantes para as categorias de congelamento ( $F_{1,32} = 3,68$ ;  $p = 0,06$ ), exploração ( $F_{1,32} = 3,48$ ;  $p = 0,07$ ) e pré-exploratório ( $F_{1,32} = 3,37$ ;  $p = 0,07$ ). As análises com múltiplas comparações realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a ocorrência de congelamento e de exploração diferiu significativamente entre os grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,05$ ). Foram observadas diferenças significativas de horário na ocorrência de pré-exploratório ( $p < 0,05$ ) entre os grupos EC ZT02 e EC ZT14 na

sessão de treino e na ocorrência de exploração nas sessões dos grupos CC ZT02 e CC ZT14 ( $p < 0,05$ ).

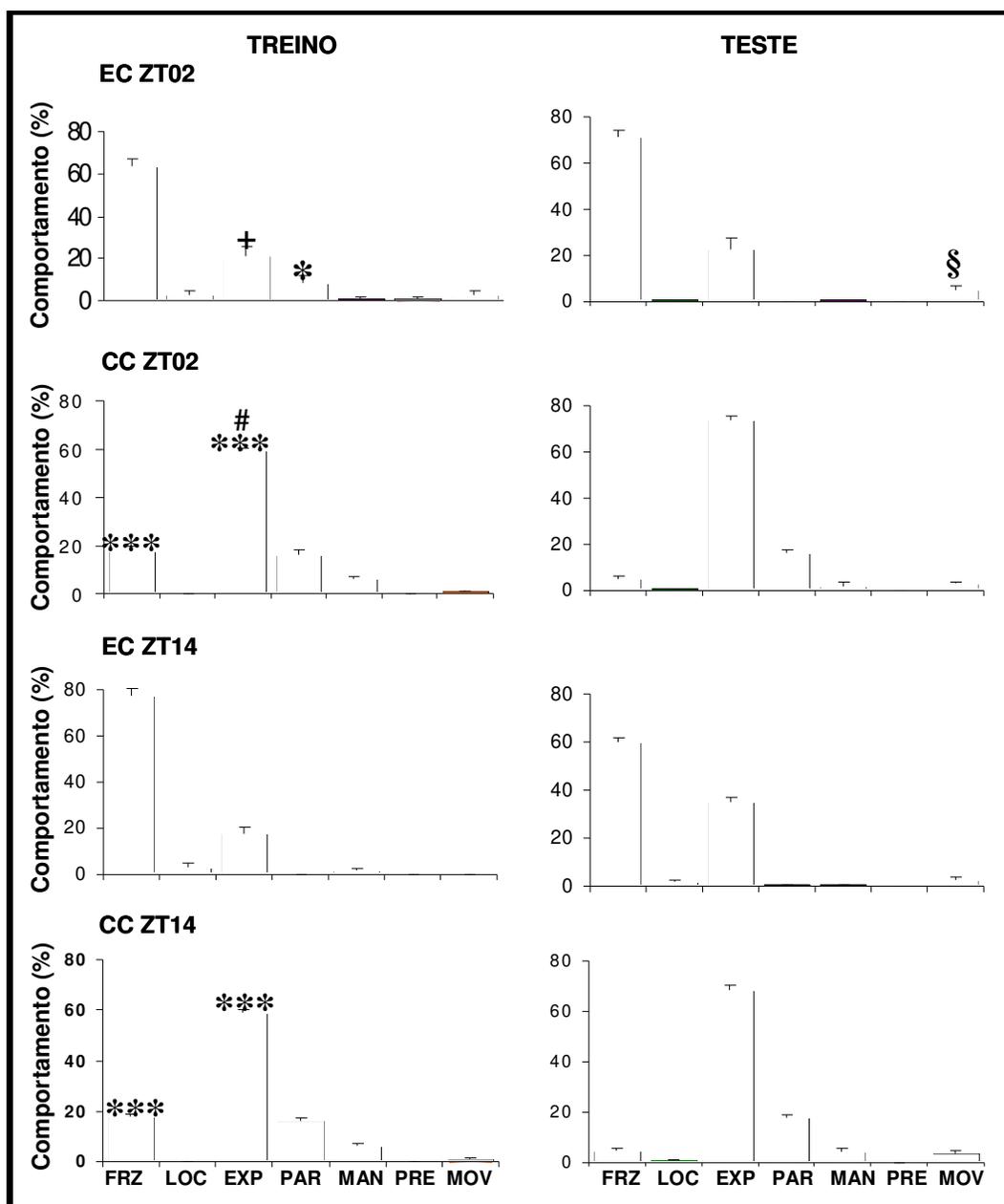


Figura 9: Porcentagem das categorias comportamentais durante as sessões de treino e teste do condicionamento ao contexto, para os animais dos Grupos Condicionados (EC) ZT02 e ZT14 e Grupos Controles (CC) ZT02 e ZT14. Categorias comportamentais: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados. \*\*\* Diferença significativa em comparação aos grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,0001$ ); # diferença significativa em comparação ao grupo CC ZT14 ( $p < 0,05$ ); + diferença significativa em comparação ao grupo EC ZT14, sessões de treino e de teste ( $p < 0,05$ ); § diferença significativa em comparação ao grupo EC ZT14 e CC ZT14, sessão de treino ( $p < 0,05$ ).

A Figura 10 mostra dados referentes à duração total (escala logarítmica) das diferentes categorias comportamentais – congelamento, locomoção, exploração, parado, manutenção, pré-exploratório e movimentos isolados - nos grupos EC e CC, nos horários ZT02 e ZT14. Os grupos EC apresentaram maior duração de congelamento tanto no treino quanto no teste em comparação com os grupos CC, nos dois horários. A relação inversa é observada para os comportamentos de exploração, com maior duração para os animais dos grupos CC ZT02 e CC ZT14. A análise estatística com ANOVA indicou diferença significativa entre os grupos na duração dos comportamentos de congelamento ( $F_{3,32} = 28,16$   $p < 0,0001$ ), locomoção ( $F_{3,32} = 4,89$   $p < 0,01$ ), exploração ( $F_{3,32} = 18,66$   $p < 0,0001$ ), manutenção ( $F_{3,32} = 6,32$   $p < 0,01$ ) e pré-exploratório ( $F_{3,32} = 7,61$   $p < 0,001$ ); para o comportamento parado encontrou-se valor de diferença entre grupos marginalmente significativa ( $F_{3,32} = 2,58$   $p = 0,07$ ). Diferenças significativas na duração dos comportamentos entre as sessões foram observadas para locomoção ( $F_{1,32} = 11,53$   $p < 0,01$ ), manutenção ( $F_{1,32} = 5,98$   $p < 0,01$ ) e movimentos isolados ( $F_{1,32} = 13,94$   $p < 0,001$ ), sendo que o comportamento de exploração mostrou diferença com valor marginalmente significativa ( $F_{1,32} = 3,94$   $p = 0,056$ ). Interações significativas entre grupo e sessão foram observadas para locomoção ( $F_{3,3} = 5,62$   $p < 0,01$ ) e manutenção ( $F_{3,3} = 4,76$   $p < 0,01$ ). As múltiplas comparações *post hoc* com o teste Tukey-Kramer indicaram diferenças de horário na duração de locomoção e pré-exploratório entre os grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,05$ ) e diferenças entre sessões de treino e teste para os grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,05$ ). A duração do comportamento congelamento dos grupos EC ZT02 e EC ZT14 foi diferente dos grupos CC ZT02 e CC ZT14 ( $p < 0,05$ ). Nenhuma

diferença significativa na duração do comportamento parado foi observada em relação aos grupos, horários ou sessões ( $p > 0,05$ ).

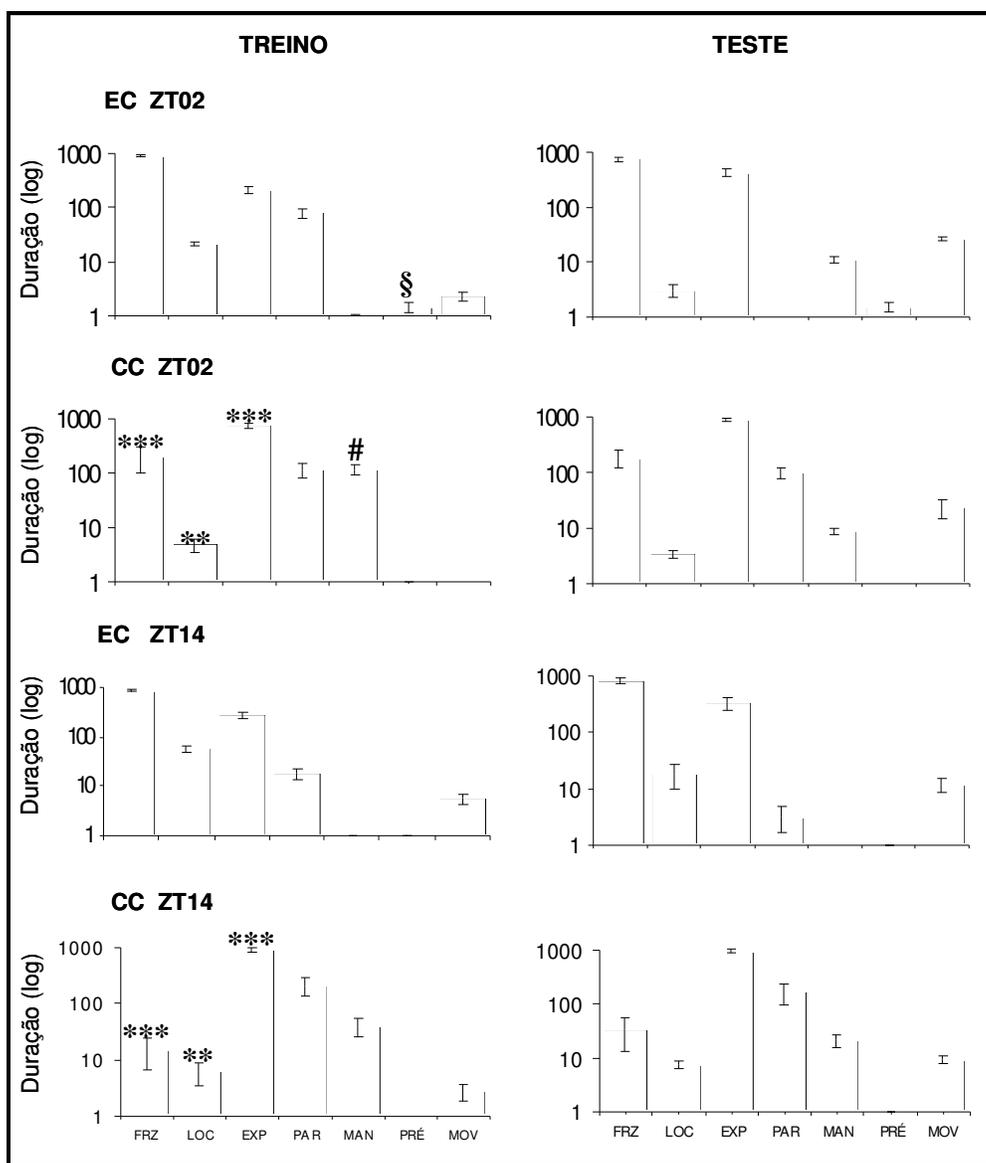
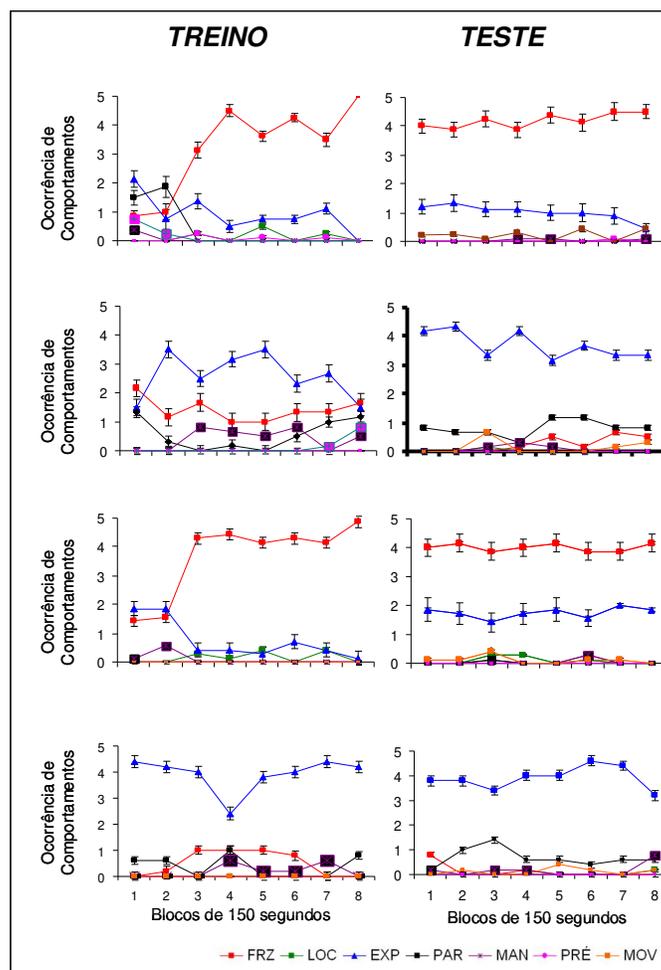


Figura 10: Duração total do grupo em escala Logaritmica das categorias comportamentais durante a sessão de treino e teste do condicionamento ao contexto para os animais dos Grupos Condicionado (EC) ZT02 e ZT14 e Grupos Controle (CC) ZT02 e ZT14. Categorias comportamentais: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados. \*\*\* diferença significativa em comparação aos grupos EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,001$ ); \*\* diferença significativa em comparação ao grupo EC ZT14 ( $p < 0,01$ ); + diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ); # diferença significativa em comparação ao EC ZT02 e EC ZT14 ( $p < 0,01$ ); \$ diferença significativa em comparação ao EC ZT14, CC ZT02 e CC ZT14; = diferença significativa em comparação ao teste do EC ZT02, e ao treino e teste dos grupos CC ZT02 e CC ZT14.

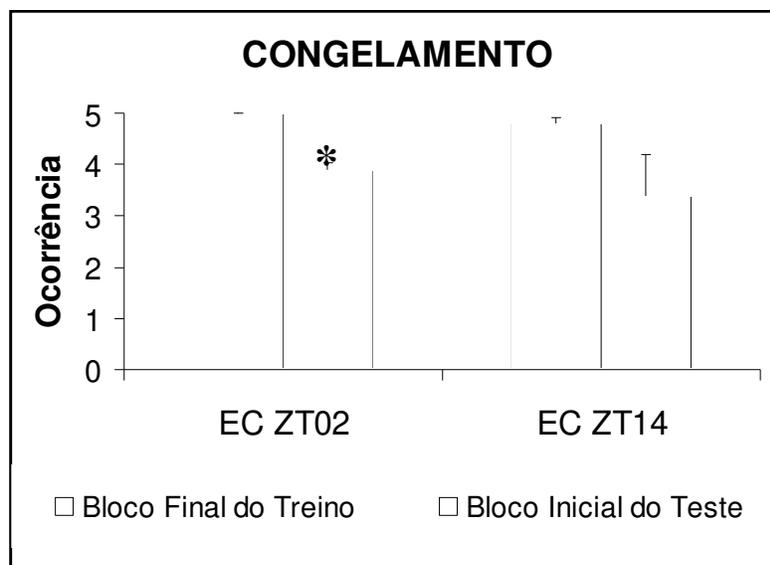
Para analisar a distribuição dos diferentes comportamentos ao longo das sessões de treino e de teste, foram obtidos registros de comportamento a cada 30 seg., por amostragem de tempo, os quais foram agrupados em blocos de 5 intervalos. Os resultados são apresentados em curvas de cada categoria comportamental em função de 8 blocos de registros, respectivamente nas sessões de treino e teste realizados durante a manhã (ZT02) e a noite subjetivas (ZT14). Os animais dos Grupos EC ZT02 e ZT14 no treino, após a apresentação do primeiro choque-elétrico tiveram um aumento de congelamento, aumento esse que se manteve ao longo da sessão. No teste, a re-exposição ao contexto do treino resultou em alta ocorrência de congelamento em ambos os grupos EC ZT02 e ZT14. Observa-se, contudo, que o grupo ZT14 também apresenta ocorrência de comportamentos exploratórios. Nos grupos CC é evidenciada a ocorrência de exploração ao longo das duas sessões matutinas e vespertinas. A análise estatística com ANOVA para congelamento indicou diferença significativa entre os grupos ( $F_{3,28} = 24,17$ ;  $p < 0,0001$ ), entre sessão ( $F_{1,28} = 2,04$ ;  $p < 0,5$ ) e entre os blocos ( $F_{7,28} = 18,68$ ;  $p < 0,0001$ ). Houve interação significativa entre grupos x blocos ( $F_{3,21} = 5,50$ ;  $p < 0,0001$ ), sessão X blocos ( $F_{1,7} = 16,58$ ;  $p < 0,0001$ ) e, ainda, grupos x sessão x blocos ( $F_{3,196} = 4,93$ ;  $p < 0,0001$ ). Análises de comparações múltiplas com o teste Tukey-Kramer indicaram diferenças significativas entre os dois primeiros blocos e os demais, tanto para o grupo EC ZT02 como para o ZT14 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os 2 primeiros blocos na sessão de treino ( $p > 0,05$ ), porém o bloco inicial do treino diferiu significativamente do bloco inicial do teste ( $p < 0,05$ ) (Figura 11). A análise estatística para a categoria de exploração indicou diferença significativa entre os

grupos ( $F_{3,28} = 15,49$ ;  $p < 0,0001$ ), e entre os blocos ( $F_{7,28} = 6,48$ ;  $p < 0,0001$ ). Houve interação significativa entre grupos x blocos ( $F_{3,21} = 1,77$ ;  $p < 0,01$ ), sessão X blocos ( $F_{1,7} = 2,17$ ;  $p < 0,01$ ) e, ainda, grupos x sessão x blocos ( $F_{3,196} = 2,14$ ;  $p < 0,01$ ). Análises de comparações múltiplas com o teste Tukey-Kramer indicaram diferenças significativas entre os grupos CC ZT02 e ZT14 e os grupos EC ZT02 e ZT14 ( $p < 0,05$ ) (Figura 11).



**Figura 11: Ocorrência das categorias comportamentais em resposta ao contexto a cada 150 segundos, para o Grupo Condicionado (EC) ZT02 e ZT14 e Grupo Controle (CC) ZT02 e ZT14. Cada ponto representa a ocorrência de cada comportamento em cinco blocos de registros, mais EPM. FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados.**

A Figura 12 permite a comparação direta da ocorrência de congelamento no último bloco (150 s) da sessão de treino e o primeiro bloco da sessão de teste, para os grupos EC nos horários ZT02 e ZT14. A análise estatística com ANOVA para comparação do bloco final e inicial em cada um dos horários indicou diferença significativa entre o bloco inicial do teste e o bloco final do treino para o grupo EC ZT02 ( $F_{1,16} = 9,76$ ;  $p < 0,01$ ), mas não para o EC ZT 14 ( $F_{1,16} = 3,33$ ;  $p > 0,05$ ).



**Figura 12: Comparação do número médio de registros de congelamento verificado no bloco final da sessão de treino (150 segundos) e o bloco inicial da sessão de teste (150 segundos), para os Grupos Condicionados (EC) ZT02 e ZT14. \* diferença significativa em comparação ao treino ( $p < 0,05$ ).**

### **3.2.2. Análise da distribuição dos núcleos Zenk-positivos**

As Figuras 13 e 14 apresentam imagens digitalizadas de secções frontais, unilaterais, das regiões anteriores do hipocampo (A 7.00 e A 8.00) dos animais dos grupos EC ZT02 e ZT14, CC ZT02 e ZT14 e Manipulação (CM) ZT02 e ZT14. Esses cortes hipocampais foram submetidos à Imunoistoquímica para a marcação de células Zenk-positivas, onde se têm marcação com característica marcação nuclear. Nestas imagens é possível visualizar as regiões hipocampais; Hipocampo Dorsal - HpD (Figura 13); hipocampo Ventro-Medial – HpVM e Hipocampo Ventro-Lateral – HpVL (Figura 14). Observa-se que a distribuição da marcação varia entre os grupos, ilustrando as diferenças quantitativas que serão descritas a seguir.

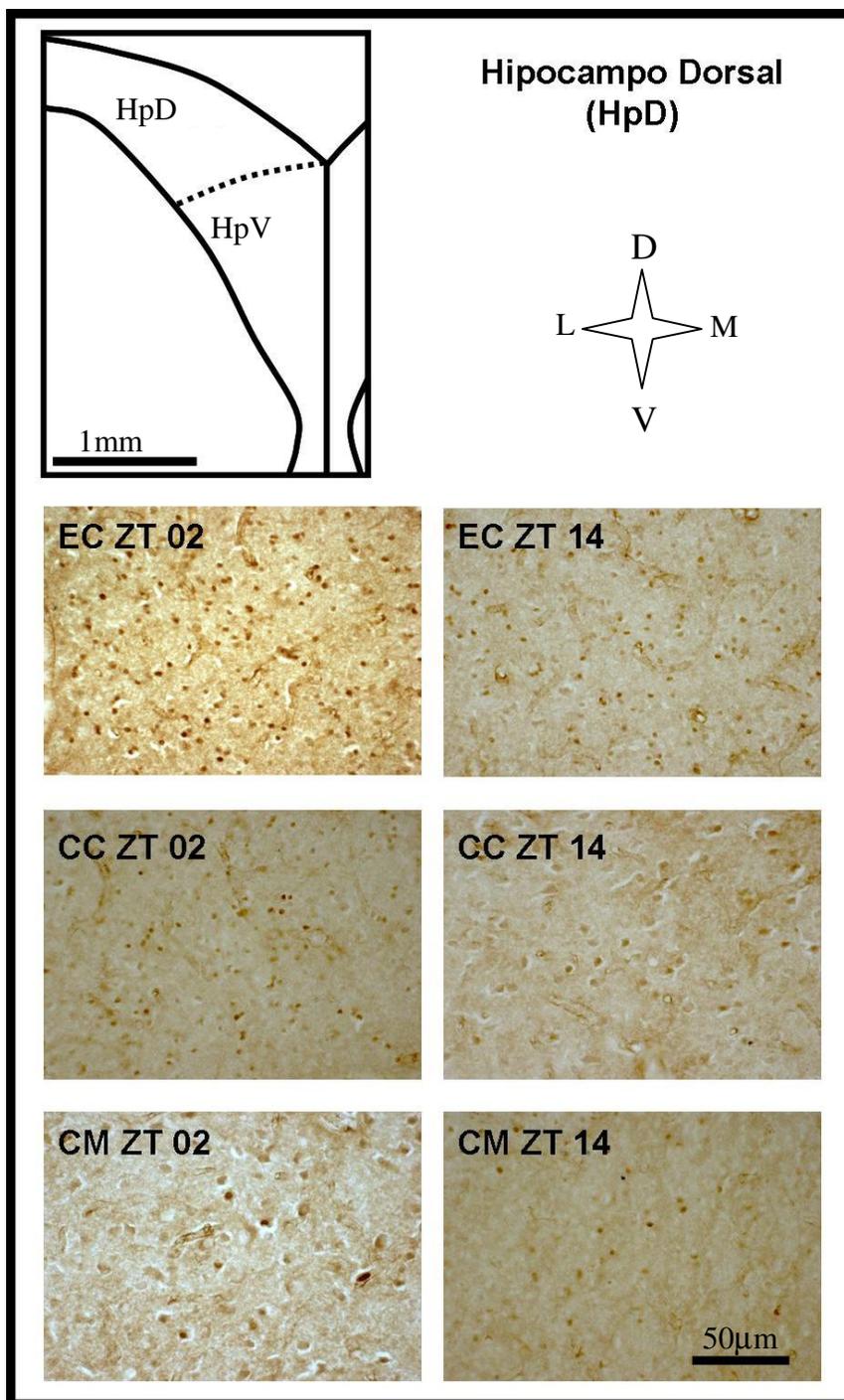


Figura 13: No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpD, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Experimental Condicionado (EC ZT02 e ZT14), Grupos Controle (CC ZT02 e ZT14) e Grupos Manipulação (CM ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50 µm.

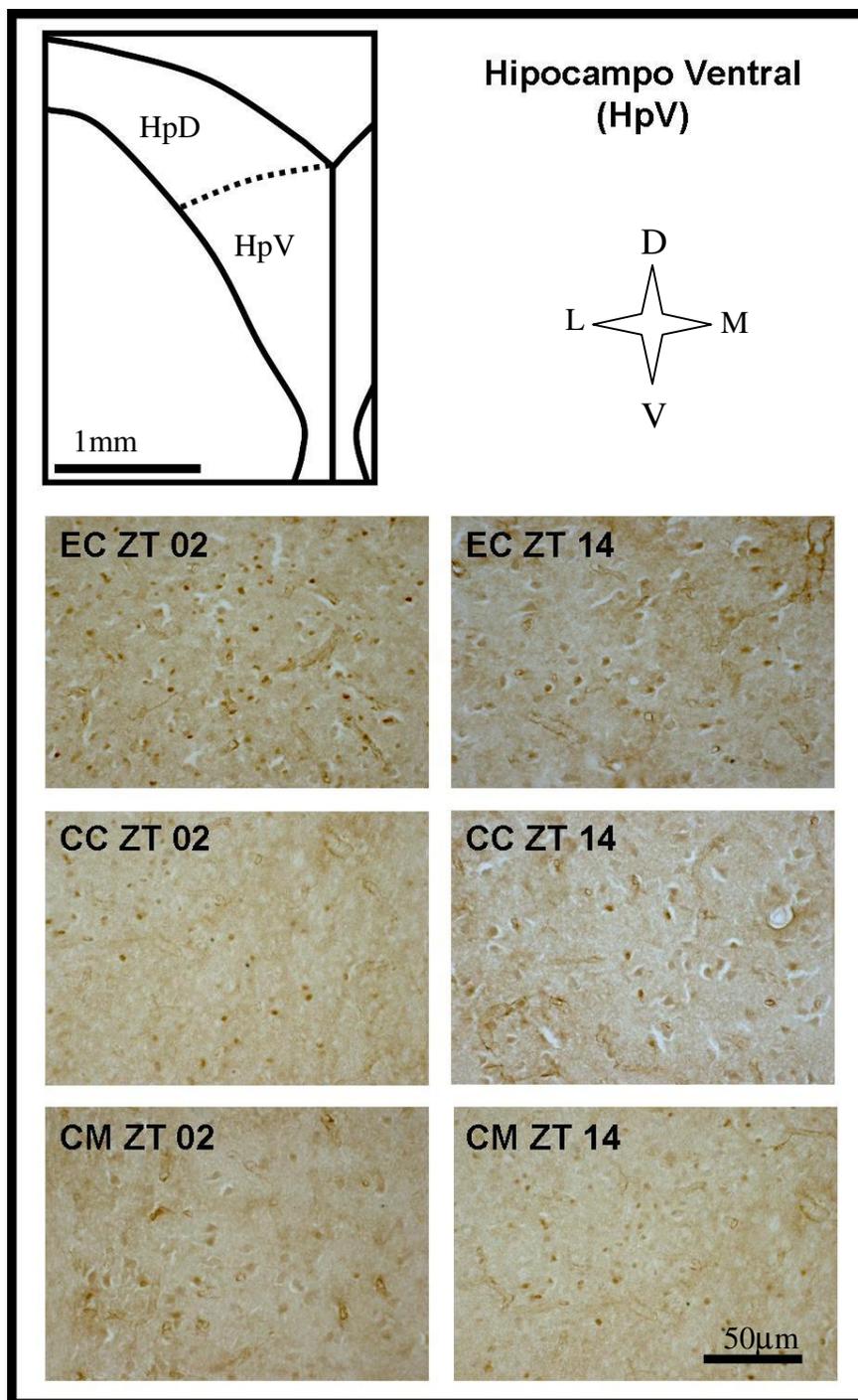
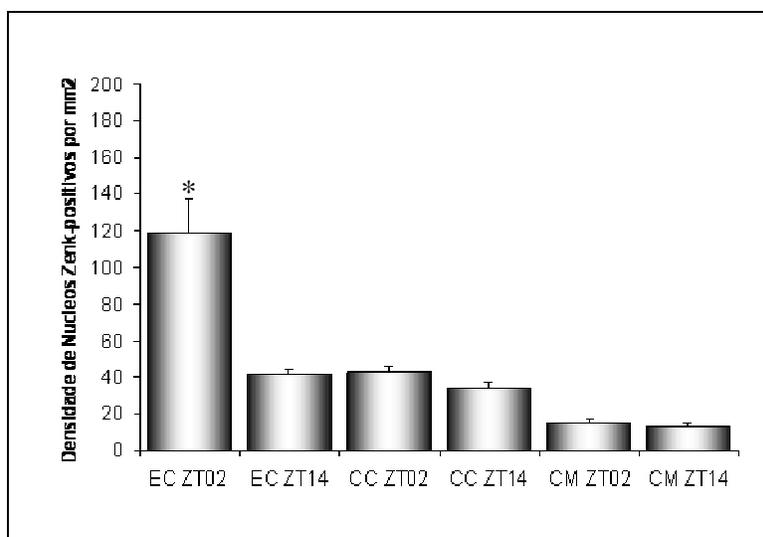


Figura 14: No esquema, Representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo de pombos dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpV, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Experimental Condicionado (EC ZT02 e ZT14), Grupos Controle (CC ZT02 e ZT14) e Grupos Manipulação (CM ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50 µm.

A Figura 15 mostra a comparação da densidade/mm<sup>2</sup> de núcleos Zenk-positivos encontrados no hipocampo total de pombos (HpD + HpV), dos grupos EC ZT02 e ZT14, CC ZT02 e ZT14 e CM ZT02 e ZT14, avaliados após o teste do condicionamento ao contexto. Observa-se uma maior marcação de núcleos Zenk-positivos no hipocampo dos animais dos Grupos EC nos horários ZT02. A análise estatística com ANOVA indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{(5,24)} = 23,92$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey - Kramer indicou diferença significativa entre EC ZT02 com os demais grupos ( $p < 0,05$ ), demonstrando diferença de horário com EC ZT14.



**Figura 15: Densidade Média de núcleos marcados Zenk-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao condicionamento ao contexto; EC = Grupo Experimental; CC = Grupo Controle e CM = Grupo Manipulação. \* = diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ )**

A Figura 16 mostra a comparação da densidade média de núcleos Zenk-positivos encontrados no hipocampo de pombos dos diferentes grupos, avaliados após o teste do condicionamento ao contexto. Em (A): valores de densidade

média para HpD e HpV para cada um dos grupos; (B): valores de densidade média para subdivisões do hipocampo ventral - HpVL e HpVM para cada um dos grupos. A análise com ANOVA indicou que a densidade de marcação de núcleos Zenk- positivos em HpD e HpV teve diferença significativa entre grupos ( $F_{5,24}=23,92$ ;  $p<0,0001$ ), entre as áreas ( $F_{1,24}=10,48$ ;  $p<0,05$ ), e uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{5,5}=4,89$ ;  $p<0,05$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação Zenk-positiva em HpV do grupo EC ZT02 foi significativamente diferente de HpD para o mesmo grupo ( $p<0,05$ ), além de ser diferente de HpD e HpV dos demais grupos - CC ZT02, ZT14, CM ZT02, ZT14 e EC ZT14, indicando uma diferença de horário ( $p<0,05$ ) (Figura 16 A).

A análise com ANOVA indicou que a densidade de marcação de núcleos Zenk- positivos em HpVL e HpVM teve diferença significativa entre grupos ( $F_{5,24}=18,20$ ;  $p<0,001$ ) e uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{5,5}=2,66$ ;  $p<0,05$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação Zenk-positiva em HpVM do grupo EC ZT02 foi significativamente diferente dos demais grupos - CC ZT02, ZT14, CM ZT02, ZT14 e EC ZT14, indicando uma diferença de horário ( $p<0,05$ ) não houve diferença significativa entre o HpVM e o HpVL do grupo EC ZT02 ( $p>0,05$ ) (Figura 16 B),

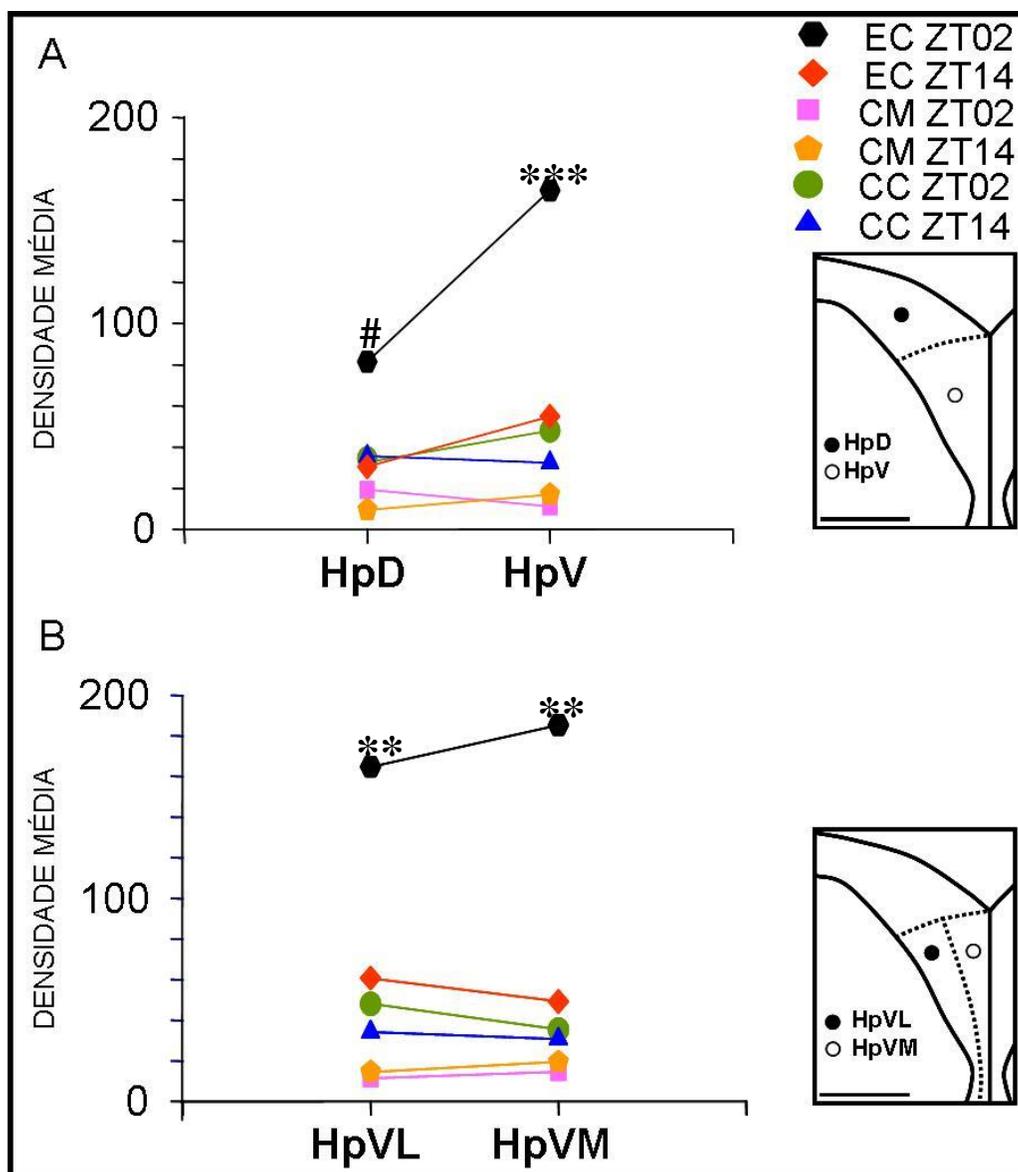


Figura 16: Comparação da densidade média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo de pombos, avaliado após o teste do condicionamento ao contexto. Em (A): as duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) e (B): entre as subdivisões do Hipocampo Ventral (HpVM - Hipocampo Ventro Medial e HpVL - Hipocampo Ventro Lateral) de animais dos grupos condicionado (EC)ZT 02 e ZT14, controle (CC) ZT02 e ZT14 e Manipulação (CM) ZT02 e ZT14. \*\*\* diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ); # diferença em relação HpD e HpV dos grupos CM ZT02 e CM ZT14 ( $p < 0,05$ ); \*\* diferença significativa em comparação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Barra de escala = 1mm.

### **3.3. DISCUSSÃO**

O presente estudo permitiu analisar as relações existentes entre os padrões de comportamento resultantes do condicionamento ao contexto, cujo treino e teste foram realizados em 2 diferentes horários (ZT02 e ZT14). Estes horários foram escolhidos com base em trabalhos anteriores de VALENTINUZZI (2001) e SIQUEIRA (2006). Os dados indicaram que o condicionamento contextual ocorreu tanto nas sessões matutinas quanto nas noturnas. Contudo, a ocorrência de congelamento no início da sessão de teste do grupo EC ZT02 foi significativamente menor em relação ao final do treino, diferentemente do que foi observado para o grupo EC ZT14. Esses dados são sugestivos de diferenças na expressão comportamental ao contexto aversivo condicionado, nos testes matutinos e vespertinos.

O condicionamento clássico aversivo provê uma associação entre um estímulo condicionado, como um som, e um estímulo incondicionado, como um choque elétrico. A partir do pareamento desses estímulos, o primeiro adquire capacidade de eliciar respostas incondicionadas. No condicionamento ao contexto, o ambiente pode ser associado com um choque elétrico, passando a eliciar respostas aversivas (REIS, *et al.*, 1997).

Os resultados deste estudo indicam que os animais dos grupos expostos a um contexto aversivo no treino, tiveram aumento da duração de congelamento no teste em comparação aos grupos controles. Na sessão de teste ao contexto, os animais foram re-expostos ao ambiente do treino, ou seja, retornaram ao ambiente onde receberam o choque elétrico e, portanto este poderia ter propriedades aversivas condicionadas. O teste avaliou a recuperação e evocação das

informações aversivas quando os animais foram re-expostos ao contexto 24 horas após o treino. É interessante salientar que em todos os grupos, ocorreu variabilidade de comportamentos, que nos grupos condicionados, por exemplo, causam a fragmentação do comportamento de congelamento, ocasionando a diminuição do tempo médio da duração de congelamento. Entre os comportamentos exibidos destacam-se a exploração, com características de exploração lenta e cautelosa, e de movimentos isolados.

Foi possível constatar que os animais dos grupos ZT02 e ZT14 submetidos à sessão de treino para o condicionamento ao contexto tiveram aumento da ocorrência de congelamento após a apresentação do primeiro choque elétrico; aumento que se manteve durante toda a sessão de treino. Quando os animais foram analisados no teste ao contexto, nota-se que o comportamento de congelamento ocorreu desde o início e se manteve ao longo de toda a sessão, caracterizando o condicionamento clássico ao contexto e evidenciando que a associação do choque ao contexto resultou em alterações comportamentais nos animais expostos a um ambiente aversivo. Esse padrão de comportamento caracterizado durante a re-exposição ao contexto de condicionamento seria indicativo da memória contextual aversiva. Portanto, o contexto adquiriu propriedades aversivas condicionadas e foi capaz de eliciar as respostas de medo condicionado nos animais analisados. Os dados aqui expostos estão em acordo com aqueles apresentados por Brito, Britto & Ferrari (2006) e Sperandéo (2005) que notaram aumento de congelamento de pombos expostos ao treino em condicionamento clássico aversivo.

Como foi dito os animais dos grupos condicionados ZT02 e ZT14, no treino apresentaram um predomínio no comportamento de congelamento após a apresentação do primeiro choque elétrico (5 minutos). Pombos reagem ao choque com respostas incondicionadas, tais como, um sobressalto robusto, pular, correr, voar e vocalizar. Caracteristicamente após tais respostas incondicionadas o animal apresenta a exploração, que pode preceder a respostas de imobilidade tensa, caracterizando o congelamento (BRITO *et al.*, 2006). A ocorrência de comportamentos exploratórios ou de congelamento pode ser considerada uma expressão comportamental de medo condicionado a um contexto potencialmente perigoso.

Deve-se considerar que todos os animais, incluindo os humanos, reagem com estratégias comportamentais e emocionais específicas a diferentes tipos de situações aversivas ou estressantes. Estas podem envolver enfrentamento, luta ou fuga, que caracterizam possibilidade de controle ativo da situação, se as situações envolverem estímulos controláveis por meio de fuga ou esquiva. Por outro lado, em situações de incontrolabilidade, onde não há possibilidade de respostas de fuga ou esquiva, existe uma elevada probabilidade de ocorrência de inibição comportamental como, por exemplo, a imobilidade, diminuição de respostas ao ambiente e quietude (KEAY E BANDLER , 2002). Como as situações de estresse e de estimulação aversiva podem envolver eventos nociceptivos e percepção de dor, existem análises que relacionam a percepção de diferentes classes de estímulos aversivos e de diferentes estímulos dolorosos. Como afirmam KEAY E BANDLER (2002) a dor cutânea desencadeia reações emocionais ativas relacionadas com luta e fuga, enquanto que a dor profunda desencadeia uma

reação de quietude e diminuição de vigilância, características de inibição comportamental. Na condição usada no presente estudo, em que os choques envolviam nocicepção e eram apresentados independentemente do comportamento, ou seja, o estímulo aversivo incondicionado era incontrolável, essas características do procedimento favoreceriam a ocorrência de congelamento na sessão de treino onde as duas condições estavam associadas. Isso justifica a ocorrência de elevado nível de congelamento observado no último bloco de registro comportamental dessa sessão. Como no teste apenas os estímulos condicionados do contexto estavam presentes o nível de congelamento no primeiro bloco mostrou valores médios em torno de 70% e de 60%, respectivamente para o grupo condicionado ZT02 e ZT14, evidenciando a aversividade do contexto de treino. Além disso, a análise feita comparando-se o bloco final do treino com o bloco inicial do teste mostra que apenas o ECZT02 mostrou uma queda mantêm a ocorrência de congelamento elevada no início do teste, e que nos grupos controles, observa-se aumento da exploração, demonstrando que os animais são capazes de recuperar as memórias do contexto, seja aversivo ou não.

Os animais dos grupos controle ZT02 e ZT14 apresentaram uma maior ocorrência no comportamento exploratório, tanto no treino quanto no teste, demonstrando que a mera exposição do animal ao contexto não resulta em aumento gradual das respostas de defesa ou de fuga. Quando se comparou a ocorrência de exploração no último bloco do treino e no primeiro bloco do teste nos grupos controles, foi observado significativo aumento de exploração no início

do teste. Este dado é interessante por evidenciar a recuperação da resposta exploratória que passara por habituação na primeira sessão e, assim, concorda com os dados da literatura sobre habituação (VALENTINUZZI, 1997; VALENTINUZZI et al., 1999; SOUZA, 1999).

Apesar da diferença encontrada nos comportamentos entre os grupos condicionados e controles, não se observa diferença significativa entre os grupos condicionados em função do horário das sessões. Estes dados discordam dos resultados obtidos por SIQUEIRA (2006), que analisando o condicionamento clássico som-choque em pombos, encontrou variação na ocorrência das categorias comportamentais e na magnitude da resposta ao som em diferentes horários do dia. VALENTINUZZI (1999) analisando respostas locomotoras de ratos mantidos sob fotoperíodo-esqueleto, e testados em diferentes horários do dia, fase clara (08:00, 12:00 e 16:00) e fase escura (20:00, 24:00 e 04:00) em campo aberto, observou que os animais tiveram variação nos comportamentos dependendo do horário do teste. VALENTINUZZI *et al.*, (2001), estudando o condicionamento clássico aversivo durante a fase de atividade e de repouso de camundongos submetidos ao fotoperíodo esqueleto, em dois diferentes horários do dia, com teste em 5 dias sucessivos, observaram uma diferença significativa entre os grupos da manhã e da noite subjetiva na expressão e extinção do medo condicionado ao contexto.

Em relação à marcação Imunoistoquímica, os dados do presente estudo indicaram que animais que receberam choques-elétricos no contexto mostraram aumento na expressão de Zenk nas diferentes áreas do hipocampo, HpD e HpV.

Esta variação indica a participação do hipocampo no condicionamento ao contexto aversivo. Além disso, a variação na densidade de marcação observada entre os grupos EC, CC e CM, e em relação ao horário do treino/teste demonstra mais ativação hipocampal em animais treinados e testados em ZT02. É interessante lembrar que a ocorrência de congelamento no início do teste dos animais EC ZT02 foi superior à dos EC ZT14, indicando melhor evocação de memória contextual aversiva no horário ZT02. A formação hipocampal é conhecida como sendo uma região crucial para o processamento de vários tipos de memórias em mamíferos (TELER & DISCENNA, 1985; MAREN *et al.*, 1997; ANTONIADIS & MCDONALD, 2000; WATANABE, 2001) e, do mesmo modo, o hipocampo de aves está relacionado diretamente com vários tipos de memória e de aprendizagem (BINGMAN *et al.*, 1989; COLOMBO *et al.*, 1997), como aprendizagem espacial e o condicionamento clássico aversivo (REIS *et al.*, 1999).

Uma vez que o aumento da expressão de Zenk nas diferentes regiões hipocampais significa maior atividade neural nesta região, uma variação dessa atividade seria representada por maior ou menor marcação Imunoistoquímica de núcleos neuronais. Neste estudo, onde animais treinados com choques elétricos mostraram aumento de marcação Imunoistoquímica para a proteína Zenk no hipocampo, considera-se que houve maior transmissão de atividade neural induzida pela experiência de re-exposição ao contexto na área HpV nos animais treinados e testados em ZT02 que receberam choques elétricos e evidenciaram condicionamento. Isso relaciona-se com a ativação de circuitos hipocampais envolvidos na memória aversiva. A área HpV mostra maior densidade de núcleos Zenk-positivos, e este fato indica a importância funcional de HpV para a evocação

da memória contextual aversiva. Estudos com injeção de marcadores retrógrados e anterógrados no hipocampo de pombos, demonstraram a conectividade do HpV com as demais áreas hipocampais, sendo um dos componentes do circuito trisináptico (KAHN, *et al.*, 2003).

A média de núcleos Zenk-positivos no hipocampo de pombos após o teste ao contexto, para a avaliação do valor aversivo condicionado que o contexto adquiriu pelo condicionamento choque-contexto, foi primeiramente comparada entre as regiões HpD e HpV dos animais. Foi observada diferença significativa na marcação de núcleos Zenk-positivos no HpV em relação ao HpD dos animais que receberam choque-elétricos em ZT02.

Posteriormente, as comparações foram feitas considerando as subdivisões do HpV, respectivamente a região HpVL e HpVM. A região HpV corresponde à região que abrange as camadas celulares em forma de V (KREBS *et al.*, 1991, ROSINHA, *et al.*, 2009) e é essencialmente a região definida como hipocampo por KARTEN E HODOS (1967). Na região HpVM, foi observado uma diferença significativa na marcação de núcleos Zenk-positivos em comparação com HpVL. O teste ao contexto demonstrou que animais do grupo EC ZT02 tiveram aumento de marcação de células Zenk-positivos em relação aos demais grupos. Este resultado comprova a relação entre o aumento de células Zenk-positivas marcadas no hipocampo com o condicionamento aversivo ao contexto, uma vez que os animais que receberam choques-elétricos tiveram aumento de marcação de células Zenk-positivas no hipocampo em relação aos demais grupos.

A região HpVM, como já foi dito, recebe projeções da região HpD e envia projeções para as regiões HpVL ipsilateral e com HpVM contralateral, o que faz

desta área uma região intermediária entre as aferências e eferências hipocampais (HOUGH, PANG & BINGMAN, 2002).

Os resultados deste experimento sobre a marcação da proteína Zenk no hipocampo de pombos servem como evidências da ativação de circuitos hipocampais que processam as informações via HpD (aferências hipocampais) com os circuitos de integração via conexões com a região HpV, mais precisamente HpVM.

**4. EXPERIMENTO II**

## **4.1. MATERIAL E METODOS**

#### **4.1.1. Sujeitos**

Foram utilizados 54 pombos, os quais foram aleatoriamente atribuídos a grupos cujos testes foram realizados no início da manhã (Grupo Matutino ZT02) e a grupos cujos testes foram realizados no início da noite (Grupo Vespertino ZT14). Os cuidados e a manutenção dos animais no biotério ocorreram conforme descrito no Experimento I. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB – UNICAMP em 27 de fevereiro de 2007, Protocolo nº1195-1, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram atribuídos aleatoriamente aos seguintes grupos:

**1. Grupo Experimental Condicionamento Som - Choque (EP) ZT02 n = 9 e ZT14 n = 9:** expostos a 3 associações de estímulos sonoros e choque elétrico.

**2. Grupo Experimental Som - Choque Não Pareado (NP) ZT 02 n = 9 e ZT 14 n = 9:** expostos a 3 estímulos sonoros e a 3 choques elétricos (10mA, 35 ms) – sem que ocorresse o pareamento Som-choque.

**3. Grupo Controle Som (GS) ZT02 n = 9 e ZT14 n =9:** expostos a 3 estímulos sonoros de 10 segundos de duração cada durante uma sessão de 20 min.

A Figura 17 mostra esquema do planejamento experimental utilizado neste experimento.

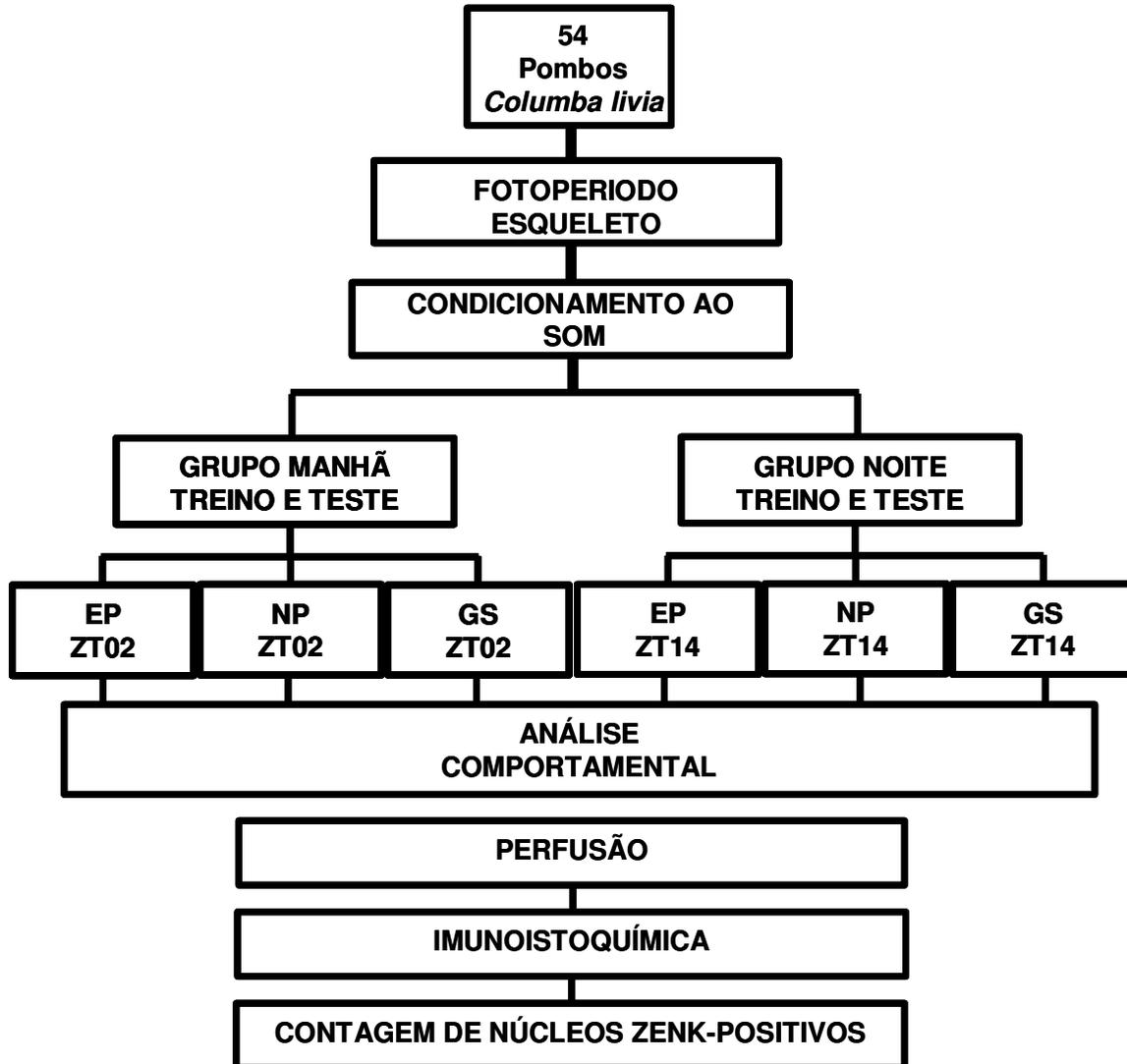


Figura 17: Organograma representativo do planejamento experimental referente ao Experimento II. 54 pombos machos adultos, sobre fotoperíodo esqueleto, foram submetidos ao condicionamento ao contexto, divididos em 2 horários ZT02 e ZT14 e subdivididos em EP = Grupo som-choque Pareado; NP = Grupo som-choque Não pareado e GS = Grupo Som.

#### 4.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste experimento são os mesmos descritos para o Experimento I (Página 33)

### **4.1.3. Procedimentos Experimentais**

#### **4.1.3.1. Adaptação às Condições de Biotério**

Após chegarem ao biotério, os pombos passaram por um tratamento profilático de uma semana. A partir daí, foram colocados em gaiolas individuais por um período mínimo de quinze dias antes do experimento.

#### **4.1.3.2. Habituação ao Contexto do Laboratório**

Antes da sessão de condicionamento, tal como no Experimento I os pombos foram submetidos à um procedimento de habituação a uma câmara experimental diferente daquela utilizada para o treino. Foram realizadas sessões diárias de 40 minutos, em um contexto diferente ao dia do treino, durante quatro dias no mesmo horário previsto para os testes comportamentais. Esse procedimento visa controlar a interferência de comportamentos relacionados com a novidade do ambiente experimental durante o treino e durante o teste ao som.

#### **4.1.3.3. Treino em Condicionamento Som – Choque**

No quinto dia, uma sessão na câmara experimental, os animais foram expostos a 3 estímulos sonoros de 10 segundos de duração cada (1000Hz, 83dB) seguidos por um choque elétrico (10mA, 35 ms) apresentado 5 segundos após o término do som (condicionamento de traço). Os estímulos foram apresentados durante a sessão de 20 min, respectivamente aos 4 min e 45 segundos; 9 min e 45 s. e 14 min e 45 s. (SOM) e 5, 10 e 15 min (choque elétrico) para animais do grupo EP. Os animais GS tiveram uma sessão com exposição à câmara experimental e apresentação de som respectivamente aos 4 min e 45 segundos.;

9 min e 45 seg e 14 min e 45 seg . Os animais NP tiveram uma sessão com exposição à câmara experimental e os estímulos foram apresentados, respectivamente, aos 4, 13 e 14 min (SOM) e 3, 6 e 11 min (Choque elétrico). Os comportamentos dos pombos foram filmados para posterior transcrição.

#### **4.1.3.4. Teste ao Condicionamento do Som**

Os animais dos grupos EP, NP e GS foram retirados das gaiolas-viveiro e colocados diretamente na câmara onde ocorreu a habituação prévia. Essa sessão tinha 20 min. de duração e foi realizada 24h após o condicionamento. Consistiu na apresentação de sons (10 s de duração ) aos 4, 13 e 14 min. O comportamento foi filmado para posterior transcrição.

#### **4.1.3.5. Análise Comportamental**

Para a análise comportamental, procedeu-se como descrito no Experimento I. As gravações das sessões experimentais de todos os grupos foram transcritas com a utilização do software Etholog 2.2.5 (OTTONI, 1999), com registros comportamentais a cada 30 segundos e também foi registrada toda mudança de comportamento. A descrição dos comportamentos analisados neste trabalho foi baseada na descrição contida no catálogo de comportamentos de pombos, assim como descrito no Experimento I (Reis *et al.*, 1999).

Neste experimento foi também analisada uma outra categoria comportamental **Exploração Cautelosa** caracterizada por: animal agachado ou encolhido com alargamento da distância entre os pés, geralmente em um canto da câmara experimental, com o corpo inclinado para frente e apoio peitoral na parede; asas e

cauda apresentam desalinhamento e orientação; ocorrem episódios de movimentos do pescoço e cabeça alternando extensão seguida por encolhimento do pescoço e retorno à condição anterior. Durante a extensão do pescoço ocorre semi-rotação ou oscilação da cabeça.

#### **4.1.3.6. Análise Estatística**

Os dados comportamentais de duração total, duração média e ocorrência média foram submetidos à análise de variância ANOVA tendo como fatores grupo (EPZT02 e EPZT14; GS ZT02 e GS ZT14, NP ZT02 e NP ZT14) e sessão (treino e teste). O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

Os registros comportamentais agrupados em 05 blocos de 30 seg, durante as sessões de treino e de teste, foram analisados com o teste ANOVA, considerando grupo e sessão como fatores e blocos como medidas repetidas. O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

Nas comparações estatísticas entre a marcação de células Zenk-positivas usou-se ANOVA de duas vias tendo como fatores grupo agrupado com horário e áreas do hipocampo. O teste Tukey-Kramer foi utilizado para múltiplas comparações *post hoc*.

## **4.2. RESULTADOS**

#### **4.2.1. Análise dos Comportamentos durante o treino de condicionamento e no teste ao som realizado nos horários ZT02 e ZT14.**

A Figura 18 mostra as distribuições de ocorrência percentual entre as diferentes categorias comportamentais nos grupos Som-Choque Pareados (EP), Som-Choque não Pareados (NP) e Som (GS) nos dois horários analisados (ZT02, ZT14). Durante o treino, observam-se diferenças no padrão de comportamento dos grupos, com maior porcentagem de congelamento para EP, de exploração cautelosa para os grupos NP e de exploração para o GS, nos dois horários. No teste, tanto o grupo NP quanto o EP expressaram mais exploração cautelosa que o grupo GS. A análise com ANOVA indicou diferenças significativas entre os grupos para congelamento ( $F_{5,48} = 19,77$ ;  $p < 0,0001$ ), exploração ( $F_{5,48} = 2,81$ ;  $p < 0,01$ ), exploração cautelosa ( $F_{5,48} = 17,32$ ;  $p < 0,0001$ ), locomoção ( $F_{5,48} = 2,44$ ;  $p < 0,05$ ) e parado ( $F_{5,48} = 0,05$ ;  $p < 0,05$ ). Houve diferença significativa entre sessões para as categorias congelamento ( $F_{1,48} = 30,20$ ;  $p < 0,0001$ ), exploração cautelosa ( $F_{1,48} = 137,38$ ;  $p < 0,00001$ ) e manutenção ( $F_{1,48} = 4,15$ ;  $p < 0,05$ ). As análises com múltiplas comparações realizadas com o teste Tukey-Kramer indicaram que a ocorrência de congelamento no grupo EP ZT02 foi diferente do EP ZT14 e dos grupos GS ZT02 e GS ZT14 ( $p < 0,05$ ). A categoria de exploração diferiu significativamente entre os grupos GS ZT02 e NP ZT14 ( $p < 0,05$ ). Foram observadas diferenças significativas entre as sessões de treino e de teste dos grupos EP ZT02, EP ZT14, GS ZT02 e GS ZT14 e NP ZT02 ( $p < 0,05$ ), mas não do grupo NP ZT14 ( $p > 0,05$ ). Também houve diferenças significativas entre sessões

na categoria exploração cautelosa para os grupos EPZT02 e ZT14, GS ZT02 e ZT14 e NP ZT14 ( $p < 0,05$ ).

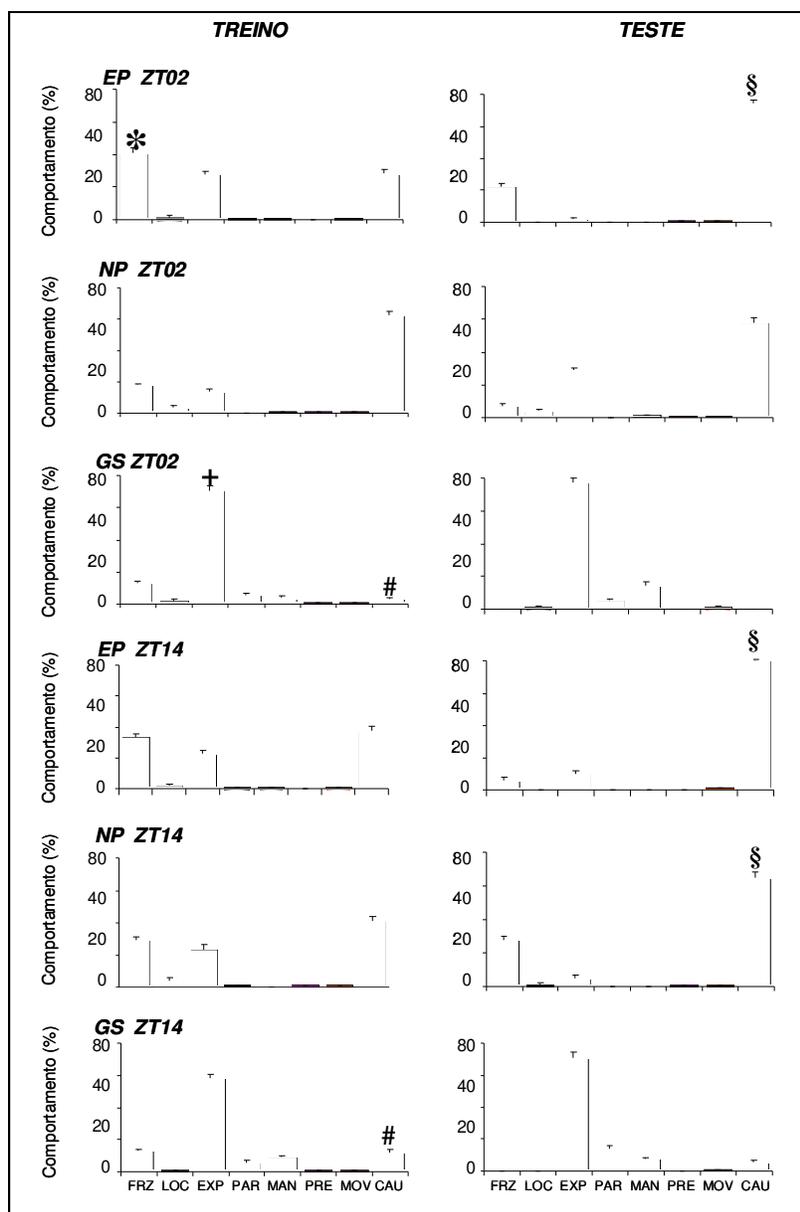


Figura 18: Porcentagem das categorias comportamentais observadas durante a sessão de treino e teste do condicionamento Som-Choque para os animais dos Grupos Som-Choque Pareado (EP) ZT 02 e ZT 14, Som-Choque Não Pareado (NP) ZT02 e ZT 14 e Som (GS) ZT02 e ZT 14: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios, MOV = Movimentos Isolados e CAU = Exploração Cautelosa. \*  $p < 0,05$  em relação ao GS; +  $p < 0,05$  em relação ao EP e NP; #  $p < 0,05$  em relação aos grupos EP e NP; §  $p < 0,05$  em relação ao treino.

A Figura 19 apresenta dados referentes à duração total (escala logarítmica) dos comportamentos agrupados nas diferentes categorias comportamentais durante as sessões de treino de condicionamento e de teste ao som, realizadas no início da manhã (ZT02) e no início da noite (ZT14). Os diferentes grupos apresentaram diferenças na duração entre as categorias comportamentais, ou seja, de exploração, locomoção, manutenção, movimentos isolados, parado, congelamento, exploração cautelosa. A análise estatística com ANOVA indicou diferença significativa entre os grupos na duração dos comportamentos exploração cautelosa ( $F_{5,48} = 18,14$   $p < 0,0001$ ), exploração ( $F_{5,48} = 11,74$   $p < 0,0001$ ), parado ( $F_{5,48} = 3,06$   $p < 0,05$ ), locomoção ( $F_{5,48} = 5,05$   $p < 0,001$ ) e pré-exploratório ( $F_{5,48} = 3,44$   $p < 0,01$ ); para o comportamento congelamento encontrou-se valor de diferença entre grupos marginalmente significativo ( $F_{5,48} = 2,23$   $p = 0,07$ ). Diferenças significativas na duração dos comportamentos entre as sessões foram observadas para congelamento ( $F_{1,48} = 14,63$   $p < 0,001$ ), exploração cautelosa ( $F_{1,48} = 14,91$   $p < 0,0001$ ), locomoção ( $F_{1,48} = 6,64$   $p < 0,05$ ) e pré-exploratório ( $F_{1,48} = 4,10$   $p < 0,05$ ). Interações significativas entre grupo e sessão foram observadas para exploração cautelosa ( $F_{5,5} = 5,23$   $p < 0,001$ ), exploração ( $F_{5,5} = 7,65$   $p < 0,0001$ ) e pré-exploratório ( $F_{5,5} = 3,81$   $p < 0,01$ ). As múltiplas comparações *post hoc* com o teste Tukey-Kramer indicaram que a ocorrência de congelamento no treino dos grupos GSZT02 e GSZT14 foi significativamente diferente do teste ( $p < 0,05$ ). A duração de locomoção foi significativamente diferente entre os grupos EP ZT02 e EP ZT14 nas sessões de teste ( $p < 0,05$ ). A duração do comportamento locomoção do grupo EP ZT02 foi diferente também da sessão de treino do NP ZT02, GS ZT02 e GS ZT14 ( $p < 0,05$ )

como também das sessões de teste dos grupos NP e GS nos dois horários ( $p < 0,05$ ). A duração da exploração cautelosa no grupo EP ZT02 foi diferente dos grupos GS ZT02 e GS ZT14 nas sessões de treino e teste ( $p < 0,05$ ); Houve diferença entre a sessão de treino e de teste do NP ZT14 ( $p < 0,05$ ). Os grupos GS tiveram duração de exploração significativamente diferentes dos grupos EP e NP nos dois horários. Nenhuma diferença significativa na duração do comportamento movimentos isolados e manutenção foi indicada em relação aos grupos, horários ou sessões ( $p > 0,05$ ).

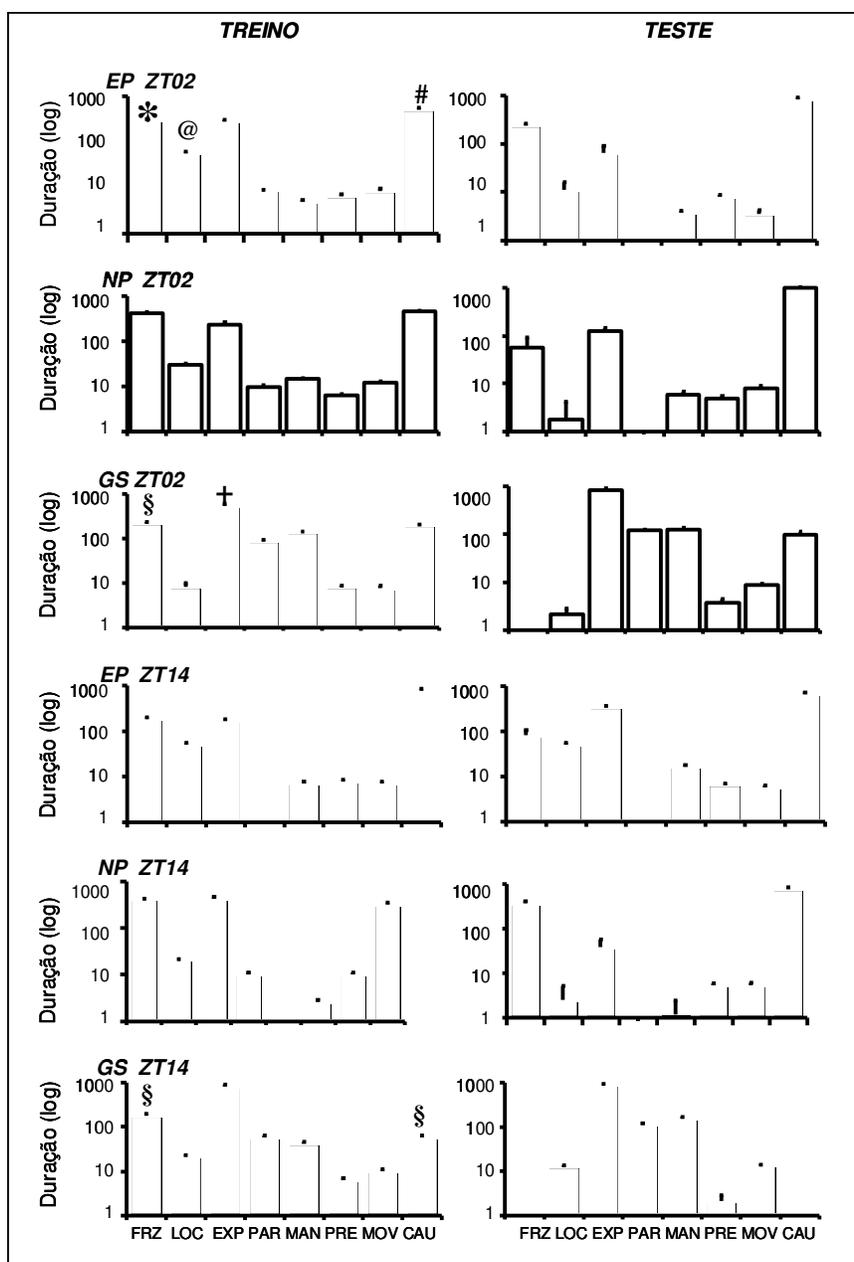


Figura 19: Duração total em escala logarítmica das categorias comportamentais durante a sessão de treino e teste do condicionamento ao som para os animais dos Grupos Som-Choque Pareado (EP) ZT 02 e ZT14, Som-Choque Não Pareado (NP) ZT 02 e ZT14 e Som (GS) ZT 02 e ZT14. Categorias comportamentais: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados, CAU = Exploração Cautelosa. #  $p < 0,05$ , diferença de CAU significativa entre os demais grupos; (\*) diferença de FRZ significativa entre os demais grupos; (+) diferença de EXP significativa entre os demais grupos.

Para analisar a distribuição dos diferentes comportamentos ao longo das sessões de treino e de teste, são apresentadas curvas de cada categoria comportamental em função de blocos de 5 intervalos de registros (150s), nos dois horários. Os animais dos Grupos EP ZT02 e ZT14 no treino, após a apresentação do primeiro pareamento som-choque, tiveram um aumento de congelamento. No teste de re-exposição ao som apenas o grupo EP ZT14 apresentou manutenção de congelamento ao longo da sessão, embora em valores relativamente baixos. Os grupos EP expressaram mais exploração cautelosa e exploração, durante as sessões de treino e teste nos dois horários. Os maiores valores de ocorrência de exploração cautelosa são observados nas sessões de teste dos grupos NP ZT02 e NP ZT14. A análise estatística com ANOVA indicou diferença significativa entre os grupos para congelamento ( $F_{5,42} = 5,08$ ;  $p < 0,001$ ); exploração ( $F_{5,42} = 14,26$ ;  $p < 0,0001$ ) e para exploração cautelosa ( $F_{5,42} = 26,31$ ;  $p < 0,0001$ ). Houve diferenças estatísticas significantes entre as sessões para congelamento ( $F_{1,42} = 22,12$ ;  $p < 0,0001$ ) e exploração cautelosa ( $F_{1,42} = 13,12$ ;  $p < 0,0001$ ). Diferenças significativas entre os blocos de registros comportamentais foram indicadas para congelamento ( $F_{5,7} = 2,04$ ;  $p < 0,001$ ); exploração ( $F_{5,7} = 7,07$ ;  $p < 0,0001$ ) e exploração cautelosa ( $F_{5,7} = 4,00$ ;  $p < 0,001$ ). Houve interação significativa entre grupos x sessão x blocos para congelamento ( $F_{5,35,245} = 11,27$ ;  $p < 0,0001$ ); exploração ( $F_{5,35,245} = 3,21$ ;  $p < 0,0001$ ) e exploração cautelosa ( $F_{5,35,245} = 3,09$ ;  $p < 0,0001$ ). Análises de comparações múltiplas com o teste Tukey-Kramer para congelamento indicaram diferenças significativas entre os dois primeiros e os demais blocos da sessão de treino, tanto para o grupo EP ZT02 como para o EP ZT14 ( $p < 0,05$ ) (Figura 20).

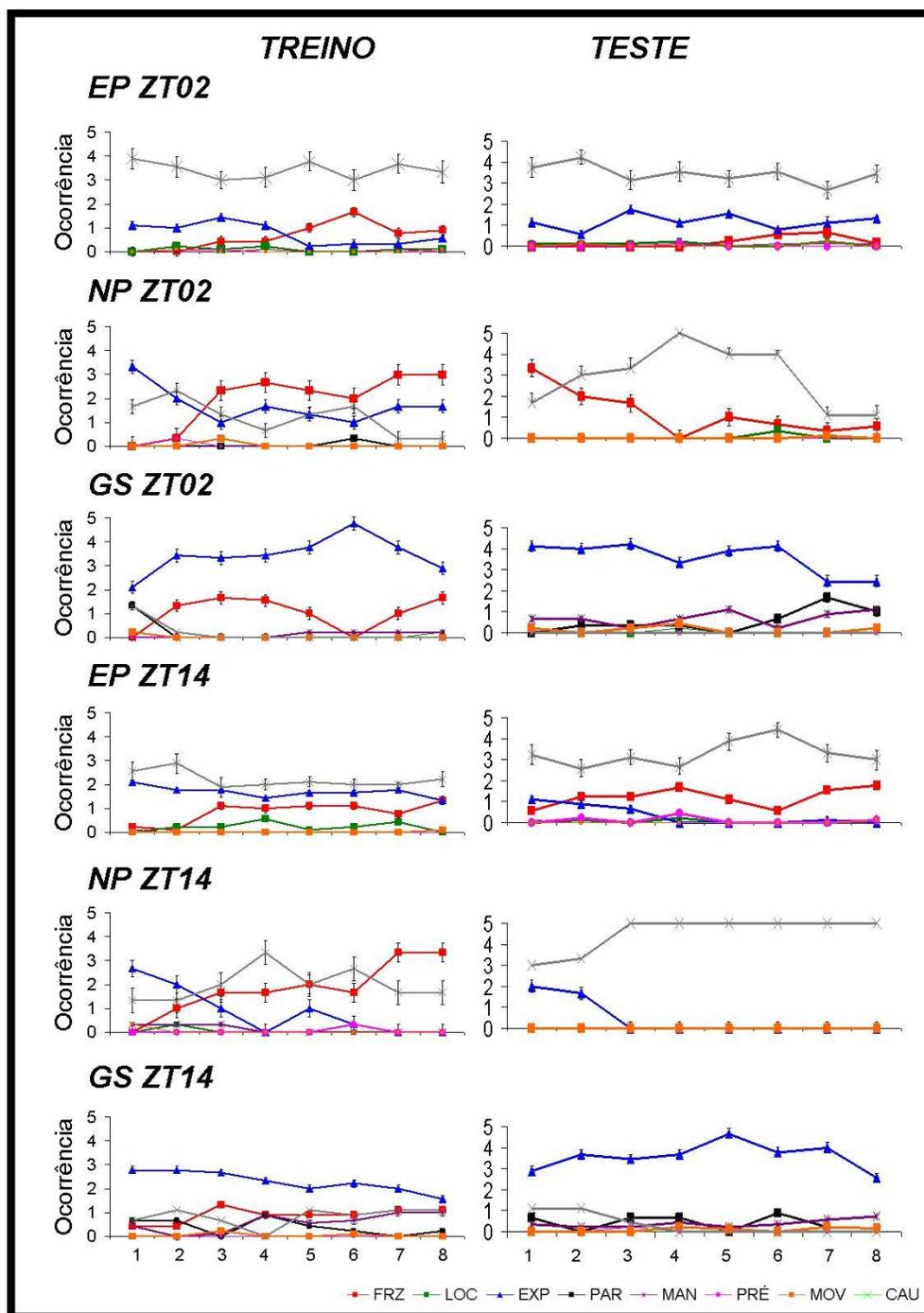


Figura 20: Ocorrência das categorias comportamentais em resposta ao condicionamento ao som a cada 150 segundos, para os animais Grupos Som-Choque Pareado (EP) ZT 02 e ZT14, Som-Choque Não Pareado (NP) ZT 02 e ZT14e Som (GS) ZT 02. Cada ponto representa a ocorrência de cada comportamento em cinco blocos de registros, mais EPM. A legenda da figura indica as categorias comportamentais correspondentes: FRZ = Congelamento, LOC = Locomoção, EXP = Explorar, PAR = Parado, MAN = Manutenção, PRÉ = Pré-Exploratórios e MOV = Movimentos Isolados.

#### **4.2.2. Análise da distribuição dos núcleos Zenk-positivos**

As Figuras 21 e 22 apresentam imagens digitalizadas de secções frontais, unilaterais, das regiões anteriores do hipocampo (A 7.00 e A 8.00) dos animais dos grupos EP ZT 02 e ZT14, NP ZT02 e ZT14 e GS ZT02 e ZT14. Esses cortes hipocampais foram submetidos à Imunoistoquímica para a marcação de células Zenk-positivas. Essas células têm marcação com característica marcação nuclear identificada em tons de marrom escuro. Nestas imagens é possível visualizar, as regiões hipocampais; Hipocampo Dorsal - HpD (Figura 21); Hipocampo Ventro-Medial – HpVM e Hipocampo Ventro-Lateral – HpVL (Figura 22). Tal como no Experimento II, a análise considerou a divisão do hipocampo em HpD e HpV, e este subdividido em HpVM e HpVL.

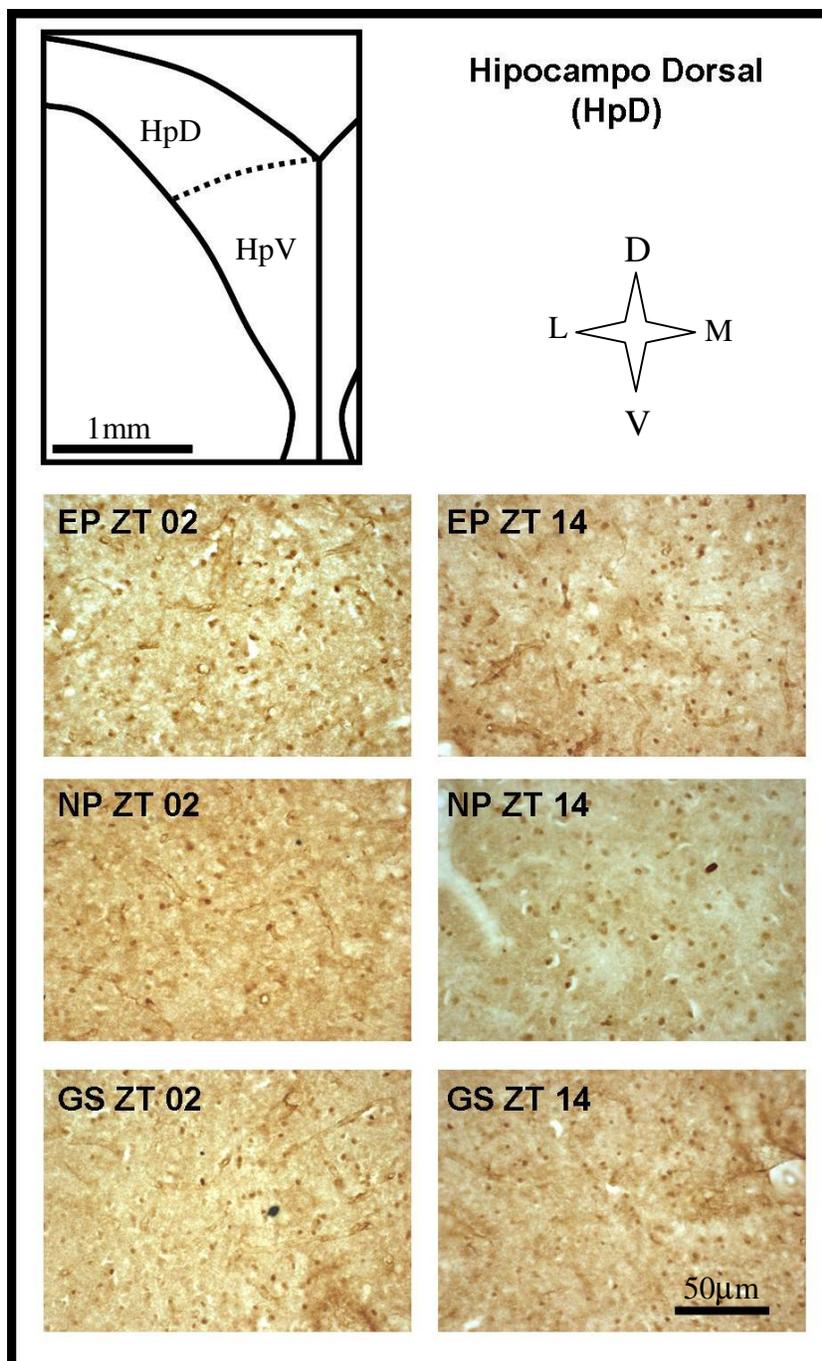


Figura 21: No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpD, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Som-Choque Pareados (EP ZT02 e ZT14), Grupos Som-Choque Não Pareados (NP ZT02 e ZT14) e Grupos Som (GS ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50 µm.

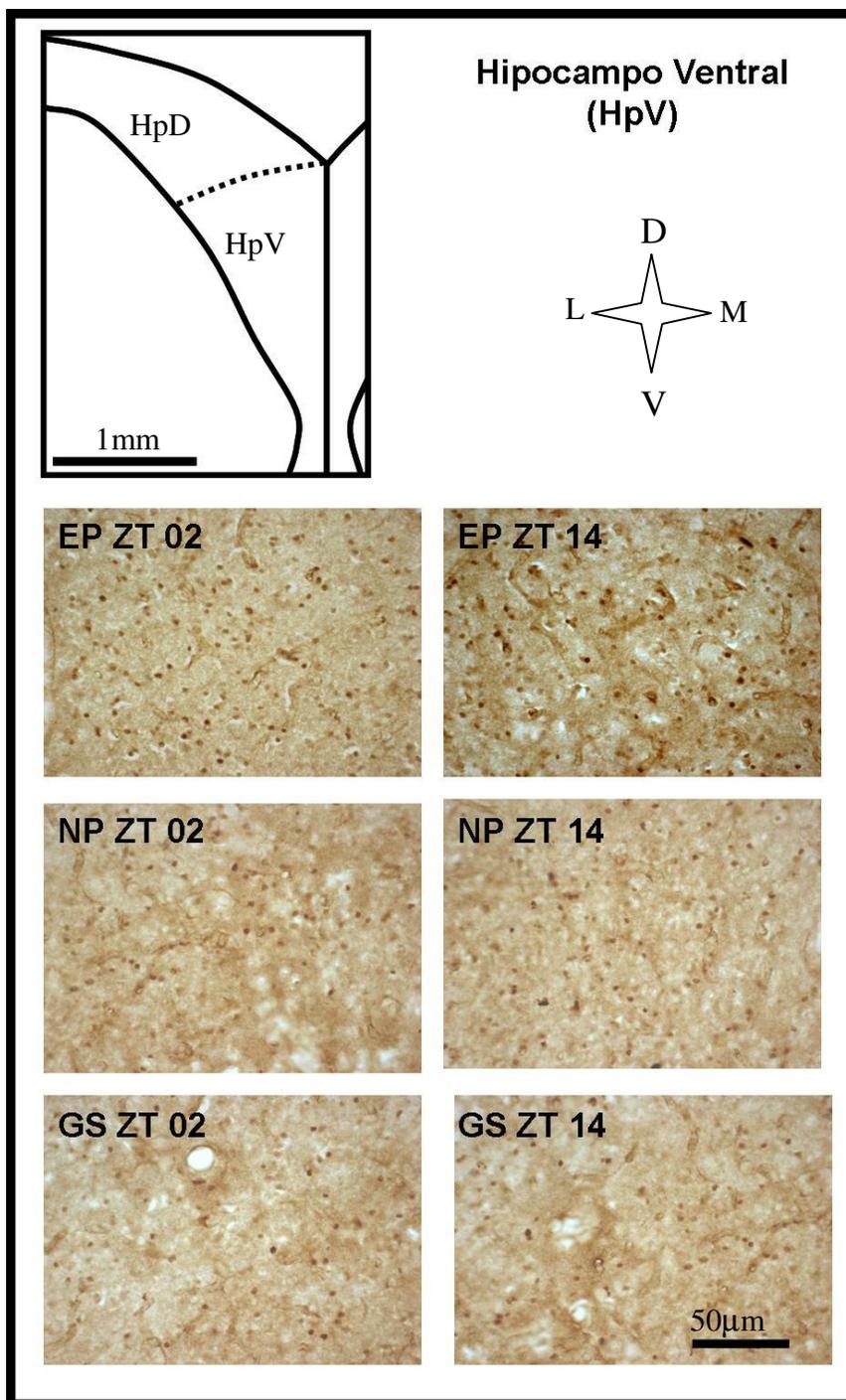
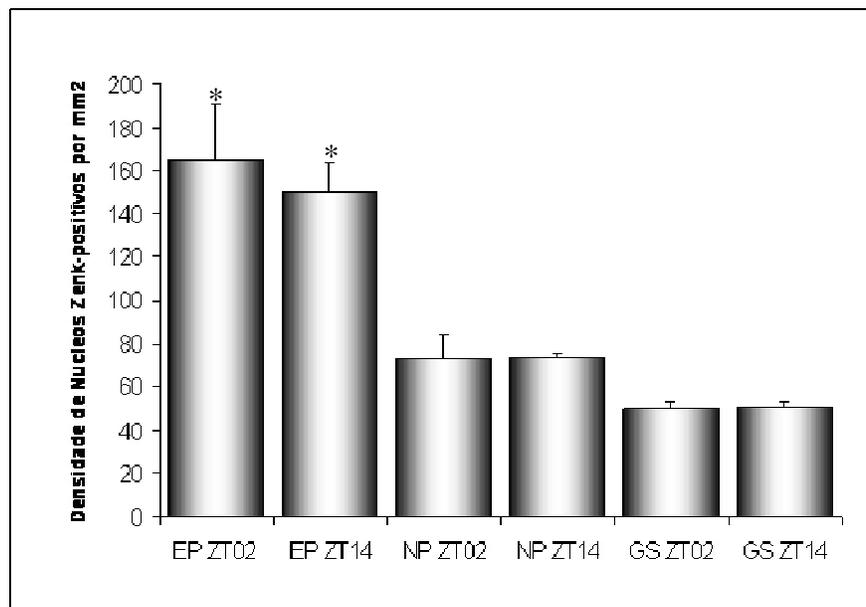


Figura 22: No esquema, representação de uma secção coronal do encéfalo de pombos da região do hipocampo dividido em Hipocampo Dorsal e Ventral (HpD e HpV). V = Ventrículo. Barra de escala = 1mm. As Fotomicrografias são de secções frontais, de uma região do HpV, mostrando o padrão de marcação de núcleos ZENK-positivos para os Grupos Som-Choque Pareados (EP ZT02 e ZT14), Grupos Som-Choque Não Pareados (NP ZT02 e ZT14) e Grupos Som (GS ZT02 e ZT14). Ampliação 400 X. Barra de escala = 50 µm.

A Figura 23 mostra a comparação da densidade/mm<sup>2</sup> de núcleos Zenk-positivos encontrados no hipocampo total de pombos (HpD + HpV), dos grupos EP ZT02 e ZT14, NP ZT02 e ZT14 e GS ZT02 e ZT14, avaliados após o teste do condicionamento ao som. Observa-se uma maior marcação de núcleos Zenk-positivos no hipocampo dos animais dos Grupos EP nos horários ZT02 e ZT14. A análise estatística com ANOVA indicou diferença significativa entre grupos ( $F_{(5,24)} = 198,18$ ;  $p < 0,0001$ ). O teste Tukey - Kramer indicou diferença significativa entre EP ZT02 com os demais grupos ( $p < 0,05$ ), demonstrando diferença de horário com EC ZT14.



**Figura 23: Densidade Média de núcleos marcados Zenk-positivos no hipocampo total (HpD + HpV) de pombos submetidos ao condicionamento som-choque; EP = Grupo experimental Som-Choque Pareados; NP = Grupo Som-Choque Não Pareados e GS = Grupo Som. P < 0,05. \* diferença significativa com os grupos NP ZT02, NP ZT14, GS ZT02 e GS ZT14.**

A Figura 24 mostra a comparação da densidade média de núcleos Zenk-positivos encontrados no hipocampo de pombos dos diferentes grupos, avaliados

após o teste do condicionamento ao contexto. Em (A): valores de densidade média para HpD e HpV para cada um dos grupos; (B): valores de densidade média para subdivisões do hipocampo ventral - HpVL e HpVM para cada um dos grupos. A análise com ANOVA indicou que a densidade de marcação de núcleos Zenk-positivos em HpD e HpV teve diferença significativa entre grupos ( $F_{5,24}=14,16$ ;  $p<0,0001$ ), entre as áreas ( $F_{1,24}=92,10$ ;  $p<0,0001$ ), e uma interação significativa entre grupo x área ( $F_{5,5}=7,50$ ;  $p<0,001$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação Zenk-positiva em HpD do grupo EP ZT02 foi significativamente diferente das áreas HPD e HPV de todos os outros grupos ( $p<0,05$ ), com exceção da área HpV do EP ZT14 ( $p>0,05$ ) (Figura 24 A).

A análise com ANOVA indicou que a densidade de marcação de núcleos Zenk-positivos em HpVL e HpVM teve diferenças significativas entre grupos ( $F_{5,24}=8,11$ ;  $p<0,0001$ ) e área ( $F_{1,24}=5,99$   $p<0,005$ ). O teste Tukey-Kramer indicou que a marcação Zenk-positiva em HpVM do grupo EP ZT02 foi significativamente diferente dos grupos GS nos dois horários ( $p<0,05$ ). A marcação na área HpVL do EP ZT02 diferiu significativamente dos grupos GS e NP nos dois horários ( $p<0,05$ ). Não houve diferença significativa entre o HpVM e o HpVL nos grupos EP ZT02 EP ZT14, nem no NP ZT02 e NP ZT14 ( $p>0,05$ ) (Figura 24 B),

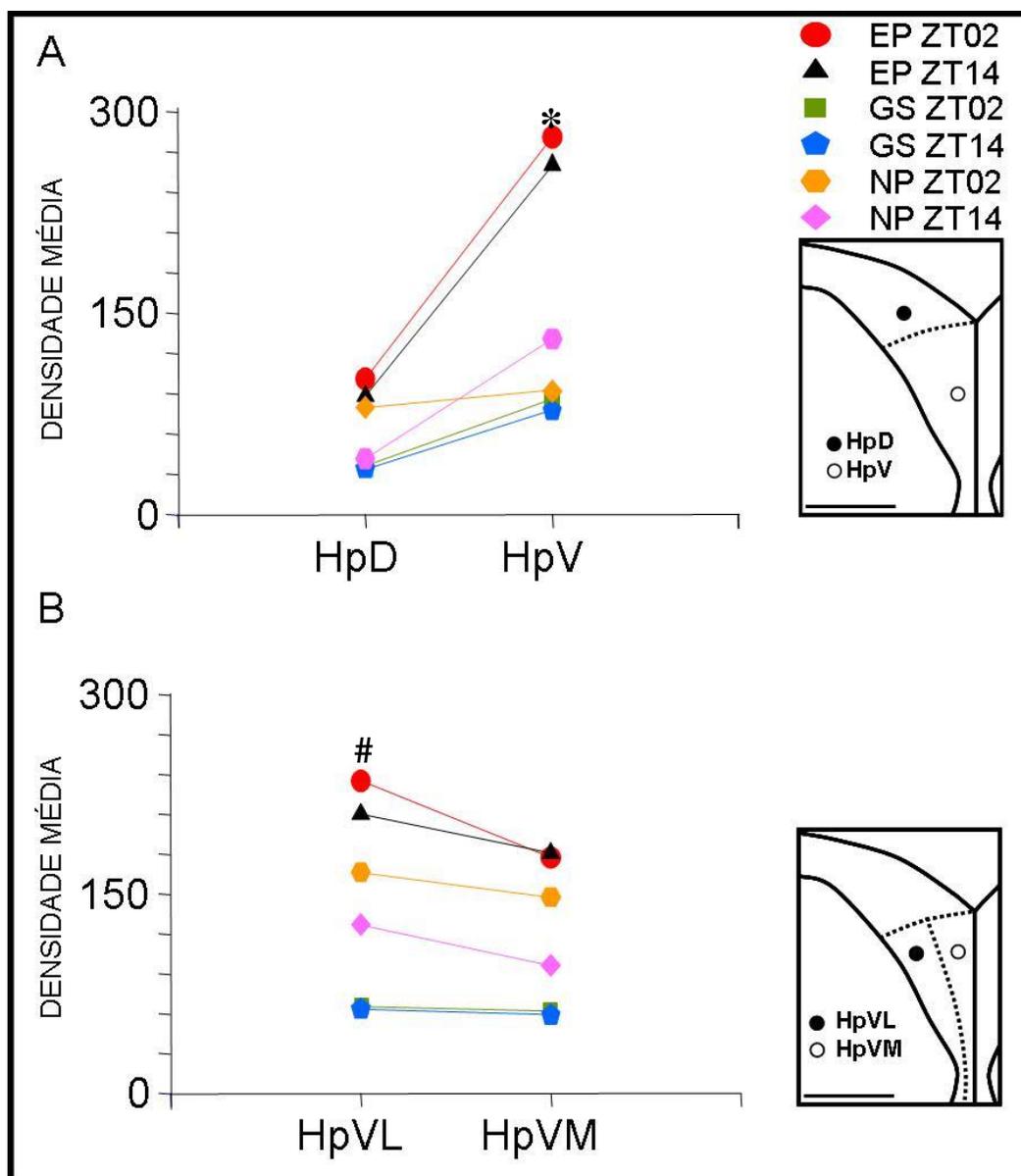


Figura 24: Comparação da densidade média em  $\text{mm}^2$  de núcleos Zenk positivos em (A): as duas divisões do hipocampo (HpD - Hipocampo Dorsal, HpV - Hipocampo Ventral) e (B): entre as subdivisões do Hipocampo Ventral (HpVM - Hipocampo Ventro Medial e HpVL - Hipocampo Ventro Lateral) de animais os Grupos Som-Choque Pareados (EP) ZT 02 e ZT 14, Grupos Som-Choque Não Pareados (NP) ZT 02 e ZT 14 e Grupos Som (GS) ZT 02 e ZT 14. \* significativamente diferente dos outros grupos ( $p < 0,05$ ), com exceção da área HpV do EP ZT14 ( $p > 0,05$ ); # significativamente diferente dos grupos GS ( $p < 0,05$ ).

### **4.3. DISCUSSÃO**

O presente estudo permitiu analisar as relações entre os padrões de comportamento no treino de condicionamento som-choque e no teste ao som condicionado, realizados em dois diferentes horários (ZT02 e ZT14). Os dados indicaram que houve variações de comportamento entre os grupos EP, NP e GS ZT02 e ZT14, com ocorrência elevada tanto de congelamento como de exploração cautelosa em animais que receberam som – choque pareados ou não, e de exploração em animais que apenas receberam o som. Os animais dos grupos EP e NP, apesar de algumas diferenças comportamentais, mantêm características semelhantes, particularmente considerando-se a média de ocorrência de congelamento e exploração cautelosa nos dois horários analisados. Além dos resultados comportamentais foram também realizadas análises da expressão hipocampal da proteína Zenk, após o teste do som condicionado. Esses dados forneceram evidências sobre a atividade neural no hipocampo durante a recuperação da memória aversiva do som.

Foi possível constatar que durante a sessão de treino para o condicionamento aversivo ao som os animais dos grupos EPZT02 e ZT14 tiveram aumento da ocorrência de congelamento após a apresentação do primeiro pareamento som-choque elétrico. Entretanto, durante o teste ao som, houve aumento da ocorrência de exploração cautelosa nos animais dos grupos EP e NP que receberam som e choque, pareados ou não. Os animais dos grupos GS ZT02 e ZT14 apresentaram uma maior ocorrência no comportamento exploratório, tanto no treino quanto no teste, demonstrando que apenas a exposição do animal ao contexto de habituação não elicia respostas de defesa ou de fuga.

Como já foi destacado, quando os animais foram analisados no teste ao som, nota-se que o comportamento de congelamento ocorreu, porém numa menor frequência, diferentemente do observado no teste do condicionamento ao contexto (Experimento 1) onde os animais expressaram o congelamento durante toda a sessão, caracterizando o valor condicionado do contexto.

No teste ao som, os animais que receberam no treino a associação do som e do choque elétrico foram recolocados num contexto ao qual foram previamente habituados em quatro sessões antes do condicionamento. O objetivo desta habituação prévia foi justamente controlar a possibilidade de que, durante o teste ao som, houvesse interferência de estímulos novos de um ambiente desconhecido. Assim, a exposição a esse ambiente sem apresentação prévia de qualquer estímulo impediria que os animais o associassem com perigo. Deve ser lembrado que na sessão de teste ao som, os animais foram re-expostos ao ambiente da habituação, ou seja, retornaram ao ambiente que não fora associado a estímulos aversivos e que, portanto, não seria responsável por respostas aversivas apresentadas pelos animais.

Quando o som foi apresentado nesse contexto, deve ter ocorrido a evocação da memória de sua associação com o choque, resultando numa sinalização de perigo potencial. Essa condição motivou comportamentos de avaliação da potencialidade de risco desse ambiente, justificando assim, a predominância de exploração cautelosa sobre a ocorrência de outras categorias comportamentais. O som apresentou um valor de estímulo aversivo condicionado que foi mais eficiente para eliciar a resposta de exploração cautelosa, enquanto que o contexto foi mais eficaz no controle da resposta de congelamento ao

contexto aversivo. Os grupos EP expressaram mais congelamento nas sessões de treino e de teste conduzidas pela manhã em comparação com as sessões noturnas. Esse dado pode ser considerado indicativo de uma variação temporal na expressão desse comportamento. Do mesmo modo, quando se avalia o tempo total de exploração cautelosa nos grupos GS nota-se uma variação que pode ser decorrente do horário.

Esses dados sugerem que, diferentemente do contexto aversivo, a exposição ao som condicionado resulta em um padrão de comportamento de defesa caracterizado pela avaliação de risco, conforme discutimos abaixo.

SHUHAMA *et al.*, (2006) discutem a classificação proposta por BLANCHARD e BLANCHARD (1988) para a análise do repertório de comportamentos de defesa. São identificadas três diferentes categorias de estratégias de defesa, desencadeadas por situações de perigo predatório potencial, distal ou proximal. A primeira é caracterizada pela exploração cautelosa do ambiente para avaliação de risco, onde o perigo não está mais presente, no entanto havia ocorrido previamente, ou ainda quando o ambiente é novo. O segundo nível de defesa animal consiste na inibição de comportamentos não relacionados com a defesa, como por exemplo, comportamentos alimentares, locomoção e interação social, ou na total imobilidade ou congelamento. E finalmente, o terceiro nível de defesa é caracterizado pela fuga ou ataque e em espécies sociais ocorre também a submissão de um indivíduo a outro, geralmente relacionados por disputas de território, fêmeas ou mesmo ranking social. (BLANCHARD, *et al.*, 1988). O congelamento ocorre quando há percepção do perigo real pelo animal, como por exemplo, um predador próximo ou ainda um

som que precede um choque elétrico; os músculos contraem-se em uma postura imóvel. Já a exploração cautelosa ocorre quando o animal faz o reconhecimento do ambiente e assim a avaliação de risco. Considerando esses diferentes níveis de defesa, pode ser possível interpretar que o padrão comportamental exibidos durante o teste ao som pelos animais que receberam choques elétricos, associados ou não ao som, poderia ser indicativo de um alto índice de exploração cautelosa. Ou seja, a apresentação do som evoca a memória da situação vivenciada no treino onde o som tinha relação com o choque e, deste modo, após o som o animal exibe uma avaliação do risco de novamente ocorrer o choque. Essa avaliação ocorre com um padrão característico de exploração associado a uma postura tensa, por nós definido como exploração cautelosa.

A avaliação da distribuição da imunorreação de núcleos Zenk-positivos no hipocampo de pombos após o teste de avaliação do valor aversivo condicionado que o som adquiriu pelo condicionamento demonstrou que animais tanto do grupo EP quanto do grupo NP tiveram aumento de marcação de células Zenk-positivos. Primeiramente, comparando-se as regiões HpD e HpV do hipocampo, foi observada maior marcação de núcleos Zenk-positivos no HpV do que no HpD dos animais que receberam som-choque pareados ou não pareados (EP e NP), com exceção do grupo EP ZT14. Estes dados, assim, não comprovariam uma relação entre o aumento de células Zenk-positivas marcadas no hipocampo com o condicionamento aversivo ao som, uma vez que os animais treinados com os estímulos som-choque não pareados tiveram aumento de marcação de células Zenk-positivas no hipocampo similar aos animais que receberam os estímulos som-choque pareados. Contudo, é possível considerar que a apresentação dos

estímulos durante o treino dos grupos NP teria estabelecido alguma relação entre eles, o que justificaria o aumento observado. Esse raciocínio é justificado pelo fato de que os animais dos grupos GS, que receberam apenas som no dia do treino, tiveram menor aumento no número de células Zenk-positivas, fundamentando a suposição de que o aumento de imunomarcação não estaria relacionado diretamente com o som. A apresentação de estímulos em um ambiente neutro, no caso a caixa de habituação, induziu a expressão de Zenk, porém os animais, que no dia do treino, receberam estímulos aversivos tiveram uma potencialização na expressão de Zenk.

Posteriormente, as comparações foram feitas considerando as subdivisões do HpV, respectivamente a região HpVL e HpVM. A região HpV corresponde à região que abrange as camadas celulares em forma de V (KREBS *et al.*, 1991, ROSINHA, *et al.*, 2009) e é essencialmente a região definida como hipocampo por KARTEN E HODOS (1967). Na região HpVL, que tem seu limite lateral margeando medialmente o ventrículo lateral, foi observado uma diferença significativa na marcação de núcleos Zenk-positivos em comparação com HpVM.

O hipocampo de aves recebe projeções do tálamo, hipotálamo, *locus coeruleus*, núcleo septal, núcleos da rafe e hipocampo contralateral e projetam-se para o núcleo septal, córtex pré-frontal, banda diagonal e hipotálamo (CASINI *et al.*, 1986; BINGMAN *et al.*, 1994). O hipocampo de aves não recebe projeções diretas da divisão da amígdala palial posterior (Homólogo a amígdala nos mamíferos), mas sim indiretamente através da região parahipocampal, que por sua vez possui conexões recíprocas com o hipocampo. As aferências hipocampais para a amígdala palial posterior se dão de forma indireta através da área septal

contralateral, que também conecta o hipocampo ao hipotálamo lateral, tálamo dorsomedial e formação reticular cinzenta (KRAYNIAK & SIEGAL, 1978; CASINI *et al.*, 1986). A área septal, o núcleo *taenia* e a amígdala palial posterior podem ser considerados como áreas retransmissoras dos impulsos do hipocampo e da área parahipocampal para o hipotálamo, sendo parte do sistema efector responsável pela expressão do comportamento condicionado (BINGMAN, *et al.*, 1994).

HOUGH, *et al.*, 2002 consideraram a subdivisão da região HpDL em Dorsal (DLd) e Ventral (DLv) e analisaram a conectividade intrahipocampal em pombos submetidos a estímulos elétricos monofásicos de 250  $\mu$ sec e pulso de 200 – 600  $\mu$ A, aplicados nas áreas hipocampais. Relataram que a estimulação da área DLd resulta em propagação do impulso elétrico para as regiões HpDM, HpVM e HpVL, propondo assim que a região DLd é uma região de entrada de estímulos para o hipocampo. Da mesma forma, quando se estimula a região HpVL o campo de alcance do impulso elétrico atinge a região DLv, que foi proposta como uma via de saída de impulsos do hipocampo para as áreas parahipocampais.

KHAN, *et al.*, 2003, com a utilização de marcadores retrógrados, confirmaram o proposto por HOUGH, *et al.*, (2002), ou seja, que a região do HpD é uma região de entrada de estímulos para o hipocampo e suas projeções seguem para a área do HpV. Além disso, com a aplicação de marcadores retrógrados injetados em HpVL foram encontradas populações de células marcadas ipsilateralmente em toda a região HpDL o que demonstra a participação de HpVL como via de saída hipocampal, enviando informações para a área dorsolateral da formação hipocampal. Tais observações relacionam-se com nossos resultados e explicariam a alta concentração de células Zenk-positivas encontradas nesta

região nos pombos. Essas evidências justificariam também a grande marcação de células Zenk-positivas encontradas na região HpVL, considerando-a como uma região de saída de estímulos hipocampais (KAHN, *et al.*, 2003).

Diferentemente do que foi observado no Experimento I, neste experimento não houve diferenças significativas na densidade de marcação de Zenk entre HpVM e HpVL. Uma explicação para o aumento de marcação de células Zenk-positivas na região HpVL, durante o teste ao som, seria que esta região estaria retransmitindo a informação decorrente do treino em aprendizagem de associações som-choque para outras áreas do cérebro como por exemplo, a área parahipocampal, chegando até a amígdala palial posterior, que está tanto envolvida no condicionamento contextual quanto no condicionamento ao som (PHILLIPS & LEDOUX, 1992). Além disso, muitas teorias sugerem que o hipocampo não está envolvido na informação de associações entre CS e US, mas tem um papel na indexação dessas associações com o contexto em que ocorreram (HIRSH, 1974 *apud* MAREN, 2008). Fato este comprovado por KIM & FANSELOW, (1992), PHILLIPS & LEDOUX, (1992) com experimentos que utilizaram lesões no hipocampo onde foram observadas alterações comportamentais no condicionamento ao contexto, mas não no condicionamento ao som, demonstrando que o hipocampo tem um papel seletivo no medo a estímulos contextuais. Já a amígdala está envolvida na formação da associação entre o estímulo incondicionado aversivo e diversos tipos de estímulos condicionados assim como na resposta de medo som-dependente (MAREN & FANSELOW, 1996) .

De acordo com os experimentos realizados por Atoji, Saito & Wild (2006), tanto a região da amígdala palial posterior quanto a região do núcleo do leito da estria terminal recebem e enviam projeções da região HpDM. Como a subdivisão dorsomedial também se projeta para o córtex piriforme (BINGMAN *et al.*, 1994), esta subdivisão possivelmente funciona como a principal via de saída do hipocampo para amígdala palial posterior, do núcleo do leito da estria terminal e córtex piriforme no sistema límbico em pombos. É interessante lembrar que a região do núcleo do leito da estria terminal tem função determinante no controle da ansiedade (ATOJI, *et al.*, 2006).

Um possível experimento que poderia esclarecer e assim confirmar a hipótese levantada acima seria a análise da marcação das células Zenk-positivas no hipocampo e nas áreas correspondentes a amígdala e ao núcleo do leito da estria terminal nos pombos, juntamente com a utilização de marcadores retrógrados e anterógrados em animais submetidos ao condicionamento clássico aversivo utilizando a associação som-choque. O possível aumento de núcleos Zenk-positivos nessas áreas, juntamente com os resultados obtidos com o uso de marcadores retrógrados e anterógrados, poderiam elucidar a circuitaria envolvida nesse tipo de aprendizagem.

## **5. CONCLUSÕES**

O presente trabalho contribui para a análise do condicionamento clássico aversivo em pombos, na seqüência dos estudos desenvolvidos em nosso laboratório, acrescentando informações sobre os fundamentos comportamentais, celulares e moleculares dos processos de aprendizagem e memória de eventos aversivos.

Os dados obtidos confirmam a participação de expressão de *zenk*, um gene de expressão imediata, nos processos celulares e moleculares do hipocampo durante a evocação da memória aversiva em pombos.

Comparando-se o Experimento I com o Experimento II, observa-se a expressão de diferentes padrões comportamentais ao contexto aversivo condicionado e ao som aversivo condicionado. Além disso, em relação à marcação de células Zenk-positivas, é possível notar que diferentes circuitos neurais estão envolvidos na aquisição do condicionamento ao contexto e no condicionamento ao som, tendo em vista a diferença encontrada na marcação das áreas HpVM e HpVL, respectivamente no condicionamento ao contexto e no condicionamento ao som.

A existência de variações dia – noite na ocorrência de condicionamento ao contexto e na expressão de Zenk no hipocampo sugere uma modulação do sistema temporizador circadiano sobre esses processos.

## **6. REFERÊNCIAS**

- ALBRECHT U.; EICHELE, G.; The mammalian circadian clock. *Curr Opin Genet Dev.* 13(3):271-7, 2003
- ANTONIADIS A. E. AND MCDONALD J. R. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav Brain Res* 108:1-19, 2000
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposium. Quant Biol.* 25:11-28, 1960.
- ATOJI, Y.; SAITO, S.; WILD, J.M. Fiber connections of the compact division of the posterior pallial amygdala and lateral part of the bed nucleus of the stria terminalis in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol* 499:161-182.; 2006
- ATOJI Y, WILD JM. Afferent and efferent connections of the dorsolateral corticoid area and a comparison with connections of the temporo-parieto-occipital area in the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 485(2):165-82, 2005.
- ATOJI Y, WILD JM, YAMAMOTO Y, SUZUKI Y. Intratelencephalic connections of the hippocampus in pigeons (*Columba livia*). *J Comp Neurol*; 447(2): 177-99. 2002
- KEAY KA, BANDLER R.; Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. *Expe Physiol.*; 87(2):275-9.;2002.
- BAST, T.; ZHANG, W. N.; FELDON, J. Hippocampus and classical fear conditioning. *Hippocampus*, 11: 828-831, 2001.

- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.E.; PARADISO, M.A. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Artmed Editora, 2a. Edição, 2002
- BECKMANN A. M., WILCE P. A. EGR transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int.*; 31(4):477-510; 517-6, 1997
- BERTOGLIO, L. J. & CAROBREZ, A. P. Behavioral profile of rats submitted to session 1-session 2 in the elevated plus-maze during diurnal/nocturnal phases and under different illumination conditions. *Behav Brain Res*, 132 (2): 135-143, 2000.
- BINGMAN VP, CASINI G, NOCJAR C, JONES TJ. Connections of the piriform cortex in homing pigeons (*Columba livia*) studied with fast blue and WGA-HRP. *Brain Behav Evol.* 43(4-5):206-18, 1994.
- BINKLEY, S.; RIEBMAN, J. B.; REILLY, K. B. The pineal gland: a biological clock in vitro. *Science*. 202: 1198-1201, 1978.
- BINKLEY, S. A. Pineal biochemistry: comparative aspects and circadian rhythms. In RJ Reiter (Ed.), *The pineal gland*, vol 1, CRC, Boca Raton, 155-172, 1981.
- BLANCHARD D.C.; BLANCHARD R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev.Psychol* 39: 43-68; 1988
- BOAKES, The impact of Pavlov on the psychology of learning in English-speaking countries. *Span J Psychol.* 6(2):93-8. 2003
- BUTLER, A.B.; HODOS, W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: evolution*

and adaptation. Wiley-Liss, NY, USA, 1996.

BRANDSTÄTTER R, ABRAHAM U. Hypothalamic circadian organization in birds. I. Anatomy, functional morphology, and terminology of the suprachiasmatic region. *Chronobiol Int.*; 20(4): 637-55, 2003.

BRITO, I. Análise da expressão de produto do proto-oncogene Zif/268 no hipocampo de pombos após o treino em condicionamento clássico aversivo. 29f. (dissertação de Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

BRITO, I. BRITTO, L. R. G., FERRARI, E. A. M. Analysis of Zif268 expression in the hippocampus of the pigeon after training in classical sound-shock conditioning. *Behav Neurosc*; 120(2): 353-61, 2006.

BROWN, J. S.; KALISCH, H.; FARBER, I. E. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus, *J Exp Psychol.* 41: 317-328, 1951.

CANTWELL, E. L.; CASSONE, V. M. Daily and circadian fluctuation in 2-deoxy[<sup>14</sup>C]-glucose uptake in circadian and visual system structures of the chick brain: Effects of exogenous melatonin. *Brain Res. Bull.* 575. 603-612, 2002.

CASINI G, BINGMAN VP, BAGNOLI P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and 3H-proline. *J Comp Neurol.* 22; 245 (4): 454-70, 1986.

- CASSONE V. M. Circadian variation of [14C]2-deoxyglucose uptake within the suprachiasmatic nucleus of the house sparrow, *Passer domesticus*. *Brain Res.* 30; 459(1):178-82, 1988
- CASSONE V. M., MENAKER M. Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? *J Exp Zool.*; 232(3):539-49. 1984.
- CASSONE, V. M. & BROOKS, D. S. Sites of melatonin action in sparrow brain. *J Exp Zool.* 260: 309-311, 1991.
- CASSONE, V. M.; BROOKS, D. S.; KELM, T. A. Comparative Distribution of 2[125I] Iodomelatonin Binding in the Brains of Diurnal Birds: Outgroup Analysis with Turtles. *Brain Behav. Evol.*, 45, 241-256, 1995.
- CASSONE, V. M. & MOORE, R. Y. Retino-hypothalamic projections and suprachiasmatic nucleus of the house sparrow, *Passer domesticus*. *J. Comp. Neurol.* 171-182, 1987.
- CHAUDHURY, D. & COLWELL, C. S. (2002). Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behav Brain Res.* 133 (1): 95-108, 2002.
- CHRISTY B, NATHANS D. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 86(22): 8737-41. 1989.
- CLAYTON, D. F. The genomic action potential. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 185-216, 2000.

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

CORREIA-PINTO, J. B.; OJOPI, E. B.; RIBEIRO, S.; NICOLELIS, M. A.; SAMESHIMA, K. Consolidação de memória: expressão gênica após exposição a um ambiente enriquecido. *Revista de Psiquiatria Clínica* 34, 2007.

CROSBY, E. L.; SHOWERS, M. J. L. Comparative anatomy of the preoptic and hypothalamic areas. In Haymaker, E. Andersen and W.J.H Nauta (Eds), *The hypothalamus*, 61-135, 1969.

DAVIS, M. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety Annual Review of Neuroscience. 15: 353-375, 1992.

DONG Y. N., GOGUEN D., ROBERTSON H. A., RUSAK B. Anatomical and temporal differences in the regulation of ZIF268 (NGFI-A) protein in the hamster and mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 111:567-574,2002

DUBBELDAM JL. *Birds*. In: Nieuwenhuys R, ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors: The central nervous system of vertebrates. Berlin:Springer. 1525-1636, 1998.

- EBIHARA, S.; KAWAMURA, H. The role of the pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of circadian locomotor rhythms in the Java sparrow, *Padda oryzivora*. *J. Comp. Physiol. A*, 141, p. 207-214, 1981
- FANSELOW, M. S. & BOLLES, R. C. Naloxone and shock elicited congelamento in the rat. *J Comp Physiol Psych* 93: 736- 44, 1979.
- FANSELOW, M. Contextual fear, gestalt memories and the hippocampus *Behl Brain Res*, 110:73-81, 1999.
- FENDT, M.; FANSELOW, M. S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci. Biobehav. Reviews.*, 23, 743-760, 1999.
- FERRARI, E. A. M., FALEIROS, L., CERUTTI, S. M., AND OLIVEIRA, A.M. The functional value of sound and exploratory behaviour in detelencephalated pigeons. *Behav. Brain Res*. 101, 93-103, 1999.
- FLORA FILHO, R, ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.* 46.3. 2000.
- GOLOMBEK D. A., AGOSTINO P. V., PLANO S. A., FERREYRA G. A. Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem Int.* 45(6):929-36. 2004.
- GWINNER E. Photoperiod as a modifying and limiting factor in the expression of avian circannual rhythms. *J Biol Rhythms*; 4(2):237-50. 1989.

- GWINNER, E.; HAU, M.; HEIGL, S. Melatonin: generation and modulation of avian circadian rhythms. *Brain Res. Bull.* 44: 439-444, 1997.
- HALL, J.; THOMAS K. L.; EVERITT, B. J. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdale during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J. Neurosci.* 2186-2193. 2001.
- HALLBERG, F. Chronobiology: professional wallflower or paradigm of biomedical though and pratice? In PAULY, J. E. & SCHEVING, L. E. (eds) *Advances in Chronobiology* 1-26, 1985.
- HAMM, H. E.; MENAKER, M. Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 4998-5002, 1980.
- HENDELMAN. W.J.; Atlas of Functional Neuroanatomy; 2<sup>nd</sup> Taylor & Francis Group; Boca Raton, FL; 2006.
- HERDEGEN, T., LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Brain Res.* 28, 370–490,1998.
- HERRERA DG, ROBERTSON HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol.* 50(2-3):83-107. 1996.

- HITCHOCK, J. M. & DAVIS M. The efferent pathway of the amygdala involved in conditioned fear as measured with the fear-potentiated startle paradigm, *Beh Neurosci*, 105: 826-842, 1991.
- HOUGH GE 2ND, PANG KC, BINGMAN VP. Intrahippocampal connections in the pigeon (*Columba livia*) as revealed by stimulation evoked field potentials. *J Comp Neurol*; 452(3):297-309, 2002.
- INOUE M, HASHIMOTO Y, KUDO Y, MIYAKAWA H. Dendritic attenuation of synaptic potentials in the CA1 region of rat hippocampal slices detected with an optical method. *Eur J Neurosci*; 13(9): 1711-21 .2001
- INOUE S. T., KAWAMURA H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci* .76(11):5962-6, 1979.
- JOCA S. L. R. ; PADOVAN,C. M.; GUIMARÃES F. S.; Estresse, depressão e hipocampo *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25. 2003.
- JOHNSON, D. A. M.; BAKER, J. D.; AZORLOSA, J. L. Acquisition. Extinction and reinstatement of Pavlovian fear conditioning: the roles of the NMDA receptor and nitric oxide. *Brain. Res.*; 857, 66-70, 2000.
- JONES M. W., ERRINGTON M. L., FRENCH P. J., FINE A., BLISS T. V., GAREL S., CHARNAY P., BOZON B., LAROCHE S., DAVIS S. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neurosci.* 4: 289–296, 2001.

- KACZMAREK L, CHAUDHURI A. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Brain Res Rev.* 23(3):237-56. 1997.
- KANDEL; E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, D.M. *Principles of Neural Science*, NY McGraw-Hill, 2000.
- KAHN, M.C.; HOUGH, I.I., G.E.; EYCK G.R.T.; BINGMAN V.P. Internal connectivity of the homing pigeons (*Columba Livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. *J. Comp.Neurol*, 459:127-141, 2003.
- KARTEN, H. J.; HODOS, W. *A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (Columba livia)* The Johns Hophins Press, Baltimore, Maryland, 1967.
- KIM, J. J. FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograda amnesia of fear. *Science*, 256, 675-677, 1992.
- KNAPSKA, E.; KACZMAREK, L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog in Neurobiol* 74: 183–211, 2004.
- KOCH M. The neurobiology of startle. *Pro in Neurobiol*, 59: 107-128, 1999.
- KRAYNIAK, P.F.; SIEGAL, A. Efferent connections of the hippocampus and adjacent regions in the pigeons. *Brain Behav Evol.* 15:372-388, 1978.

- 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.*, 407, 37-43. 1991.
- KRUPA D. J., THOMPSON J. K., THOMPSON R. F. Localization of a memory trace in the mammalian brain. *Science*. 14; 260(5110):989-91, 1993.
- LANAHAN, A.; WORLEY, P. Immediate- early genes and synaptic function. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 70 37-43, 1998.
- LAVOND, D. G.; KIM, J. J.; THOMPSON, J. K. Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *An Rev Psychol*. 44: 317-342, 1993.
- LEDOUX, J. E. Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol* 2(2):191-7. 1992
- LEDOUX, J. E. Emotions circuits in the brain N. *An Rev of Neuroscience*. 23, 155-184, 2000.
- LEE, J. L., B. J. EVERITT, AND K. L. THOMAS. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839-843, 2004.
- LEISING K. J., SAWA K. , BLAISDELL A. P. Temporal integration in Pavlovian appetitive conditioning in rats. *Learn Behav.*;35(1):11-8, 2007.
- LIN J. T., KORNHAUSER J. M., SINGH N. P., MAYO K. E., TAKAHASHI J. S. Visual sensitivities of nur77 (NGFI-B) and zif268 (NGFI-A) induction in the

suprachiasmatic nucleus are dissociated from c-fos induction and behavioral phase-shifting responses. *Brain Res Mol Brain Res.* 46:303-10, 1997.

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

MARCHAND, A. R., LUCK, D., DISCALA, G. Evaluation of an improved automated analysis of congelamento behaviour in rats and its use in trace fear conditioning. *J Neuros Meth* 126: 145-153, 2003.

MAREN S. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci.* 28(8):1661-6. 2008.

MAREN S. Is there savings for pavlovian fear conditioning after neurotoxic basolateral amygdala lesions in rats? *Neurobiol Learn Mem.*;76(3):268-83. 2001

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

MARQUES, N. Ritmos Biológicos e Comportamento; *Anais de Etologia* (24) 11:24, 1987.

MARQUES, N. & MENNA-BARRETO, L. Cronobiologia: Princípios e Aplicações. Ed. Fiocruz: 321, 1988.

- MELLO C. V. Identification and analysis of vocal communication pathways in birds through inducible gene expression. *Ann Acad Bras Cienc.*;76(2):243-6. 2004
- MCCORMICK, D. A.; CLARK, G. A., LAVOND, D. G.; THOMPSON, R. R. Initial localization of the memory trace for a basic form of learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 3: 293-299, 1982.
- MISERENDINO, M. J. D.; SANANES, C. B. MELIA, K. R.; DAVIS, M. Bloking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature*, 345, 716-718. 1990
- MOORE, R. Y. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 42: 2783-2789, 1983.
- MOORE, R. Y.; MARCHAND, E. R.; RILEY, J. N. Suprachiasmatic nucleus afferents in the rat: an HRP-retrograde transport study. *Neurosc Abstract.* 5: 232, 1979.
- MORGAN, J. L.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L. CURRAN, T. Mapping expression patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237, 192-7, 1987.
- NADER K., SCHAFE G. E., LE DOUX J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature.* 17;406: 722-6, 2000.

NIKOLAEV E., KAMINSKA B., TISCHMEYER W., MATTHIES H., KACZMAREK L.

Induction of expression of genes encoding transcription factors in the rat brain elicited by behavioral training. *Brain Res Bull.* 28(3): 479-84, 1992.

NORGREN, R. B. Neural basis of circadian rhythms *Bird Behav*, 8: 57-66, 1990.

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

PARNAVELAS JG. The origin and migration of cortical neurons: new vistas. *Trends Neurosci.* 23(3):126-31, 2000.

PETERSOHN D, THIEL G Role of zinc-finger proteins Sp1 and zif268/egr-1 in transcriptional regulation of the human synaptobrevin II gene. *Eur J Biochem.* 1; 239: 827-34, 1996.

PHILLIPS RG, LEDOUX JL. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 106:274–285.1992

PILZ P. K, SCHNITZLER H. U. Habituation and sensitization of the acoustic startle response in rats: amplitude, threshold, and latency measures. *Neurobiol Learn Mem.*; 66(1): 67-79, 1996.

PITTENDRIGH, C. S. In: Aschoff, J (Ed.), Handbook of behavioral neurobiology: Biological rhythms, circadian system: Entrainment. Plenum Press, New York, 95-124, 1981.

- PITTENDRIGH, C. S. On the mechanism of entrainment of circadian rhythms by light cycles. In *Circadian Clocks*, Amsterdam: North Holland.1965.
- PLAPPERT, C.F., PILZ, P.K.D., AND SHNITZLER, H.U. “Interaction between acoustic and electricsensitization of the acoustic startle response in rats.” *Behav. Brain Res.* 103 (2): 195-201, 1999.
- RABINAK CA, MAREN S. Associative structure of fear memory after basolateral amygdala lesions in rats. *Behav Neurosci.*122(6):1284-94. 2008
- RIBEIRO, S.; Dream, memory and Freud’s reconciliation with the brain; *Brás. Psiquiatr.* (Supl II): 59-63,2003
- REIS, F., SCHENKA, A. A., MELO, L. L. & FERRARI, E. A. M. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia* ). *Braz J Med Biol Res*, 32: 1127-31, 1999.
- ROSINHA MU, FERRARI EA, TOLEDO CA. Immunohistochemical distribution of AMPA-type label in the pigeon (*C. livia*) hippocampus *Neuroscience.* 159(2):438-50. 2009.
- ROSINHA, M. U. Distribuição de Neuromarcadores na Formação Hipocampal de Aves, Universidade Estadual de Campinas, Tese de mestrado, 2003.
- RUSAK, B. Vertebrate behavior rhythms, In: J. Aschoff *Handbook of behavioral neurobiology – Biological Rhythms*, New York, Plenum Press, 183-213, 1981.

- RUSAK B, ZUCKER I.; Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* 59(3):449-526, 1979.
- SACCHETTI, B.; LORENZINI, C. A.; BALDI, E.; BUCHERELLI, C; ROBERTO, M.; TASSONI, G.; BRUNELLI, M. Time-dependent inhibition of hippocampal LTP in vitro following contextual fear conditioning in the rat. *Euro J of Neurosci.* 15:143-50, 2002.
- SANDBAK, T.; RIMOL, L. M.; JELLESTAD, L. K.; MURISON, R. Relating acoustic startle reactivity and plasticity to alcohol consumption in male wistar rats. *Psysiol and Beh.* 68: 723-733, 2000.
- SANTINI, E.; MULLER, R. U.; QUIRK G. J. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J of Neurosc.* 21: 9009-9017, 2001.
- SCHAFE G. E., NADER K., BLAIR H. T., LEDOUX J. E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.*; 24:540-6, 2001.
- SHERRY DF, JACOBS LF, DAULIN SJ. Spatial memory and adaptive specialization of the hippocampus. *Trends Neurosci* 15:298–303, 1992.
- SHUHAMA, R.; DEL-BEN. C. M.; LOUREIRO, S. R.; GRAEFF F. G.; Animal defense strategies and anxiety disorders; *Anais da Academia Brasileira de Ciências*; 79(1): 97-109; 2007.

- SILVA, M. I. Distribuição de células imunorreativas para a sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) no hipocampo de pombos (*Columba livia*) após aprendizagem de escolha alimentar. Dissertação de mestrado, 2007
- SIMPSON, S. M.; FOLLET, B. K. Pineal and hypothalamic pacemakers: their role in regulating circadian rhythmicity in *Japanese quail*. *J. Comp. Physiol.* 144,. 381-389, 1981.
- SIQUEIRA, L. O; VIEIRA, A. S.; FERRARI, E. A. M. Time-of-Day Variation in the Sensitization of the Acoustic Response in Pigeons. *Biol Rhythm Res* 2004.
- SPERANDÉO, M. L.A. Evocação da memória aversiva: Participação do receptor NMDA e análise da ativação de ZENK no hipocampo de pombos. Tese de Mestrado pela Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- SOUZA, C. M. Z.; Organização temporal de processos de aprendizagem : variação de concentrações plasmáticas de melatonina e corticosterona, atividade geral e habituação a som, em pombos sob condições de claro-escuro e de claro constante; Tese de Mestrado pela Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- TAKAHASHI, J. S. Finding new clock components: past and future. *J Biol Rhythms.* 19(5):339-47. 2004
- TAKAHASHI, J; MENAKER, M. Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *Neurosci.*, 2, 815-828, 1982.

- THIEL G Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. *Brain Pathol.*; 3(1):87-95, 1995.
- TUREK, F. W. Circadian Rhythms. *Recent Progress Hor Res*, 49: 43-89, 1994.
- VALENTINUZZI VS, FERRARI EA. Habituation to sound during morning and night sessions in pigeons (*Columba livia*). *Physiol Behav.*; 62(6):1203-9, 1997.
- VALENTINUZZI, V. S.; BUXTON, O. M.; CHANG, A.; SCARBROUGH, K.; FERRARI, E. A. M.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Locomotor response to an open field during C57BL/6J active and inactive phases. Differences depended on conditions of illumination. *Physiol & Behav.* 69: 269-275, 2000.
- VALENTINUZZI, V. S.; KOLKER, D. E.; VITATERNA, M. H.; FERRARI, E. A. M. Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. *An Learn & Beha.* 29 (2): 133-142, 2001.
- VIVIEN-ROELS B, PÉVET P, CLAUSTRAT B. Pineal and circulating melatonin rhythms in the box turtle, *Terrapene carolina triunguis*: effect of photoperiod, light pulse, and environmental temperature. *Gen Comp Endocrinol.* 69(2):163-73. 1988
- VON SCHANTZ M, PROVENCIO I, FOSTER RG. Recent developments in circadian photoreception: more than meets the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(7):1605-7. 2000.
- WISDEN W, ERRINGTON ML, WILLIAMS S, DUNNETT SB, WATERS C, HITCHCOCK D, EVAN G, BLISS TV, HUNT SP. Differential expression of

immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 4: 603–614, 1990.

WORLEY PF, CHRISTY BA, NAKABEPPU Y, BHAT RV, COLE AJ, BARABAN JM. Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci.*15;88(12):5106-10, 1991.

YOSHIMURA T., YASUO S., SUZUKI Y., MAKINO E, YOKOTA Y., EBIHARA S. Identification of the suprachiasmatic nucleus in birds *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 280: 185-189, 2001.

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 antagonistMK-801 into the ventral hippocampus. *Behav Brain Res* 126:159–174. 2001.

## **7. ANEXOS**

