

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

IVANA BRITO

**Análise da Expressão do Produto do Proto-oncogene *zif/268* no
Hipocampo de Pombos após o Treino em Condicionamento Clássico
Aversivo.**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <i>IVANA BRITO</i> e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof^a Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari.

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	Bc
Nº CHAMADA	UNICAMP
	B777a
V	EX
TOMBO BC/	53874
PROC.	124103
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/05/03
Nº CPD	

CM00184065-5

BIB ID 290960

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

B777a **Brito, Ivana**
 Análise da expressão do produto do proto-oncogene *Zif/268* no
 hipocampo de pombos após o treino em condicionamento clássico
 aversivo/Ivana Brito. --
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

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

1. Hipocampo. 2. Condicionamento clássico. 3. Pombos.
 I. Ferrari, Elenice Aparecida de Moraes. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

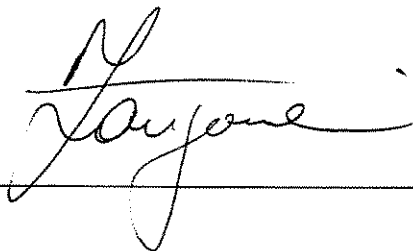
Data da Defesa: 20/03/2002

Banca Examinadora

Prof^a Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



Prof. Dr. Francesco Langone



Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti Britto



Prof^a. Dra Liana Lins Melo



200317368

**À minha valiosa, especial e essencial família,
Pai, Mãe, Henrique e Hernando,
por todo o amor, a tolerância, o incentivo,
a torcida e o reconfortante carinho recebidos
durante toda a minha vida.
Dedico**

Agradecimentos

À Prof^a Dra. Elenice A de Moraes Ferrari pela confiança e respeito que marcaram sua orientação. E pelo carinho e serenidade com que me conduziu para novos rumos.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone por dividir comigo seus conhecimentos e me atribuir funções construtivas.

Ao Prof. Dr Luiz Roberto Giorgetti Britto pela paciência e tranquilidade com que me ensinou e ajudou a qualquer hora, como também por fornecer condições para a realização das análises imuno-histoquímicas em seu laboratório.

À Zefa, Cida, Ivo, Andréia, Alexandra, Funcionários do Departamento, pelo dia-dia amigável.

Aos colegas de pós-graduação Binho e Fabrício pelos auxílios e principalmente pelos ótimos momentos de convivência, como também à Cláudia e Cris pelos incentivos e pelas longas conversas de planos futuros.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Dr Britto pela carinhosa acolhida e, em especial, ao Adilson pelo grande auxílio técnico.

Ao Washington pelas orientações e ajudas técnicas nas horas de sufoco.

A todos do meu laboratório, com grande carinho, mas em especial a meus grandes amigos, desde o início, Luís e Marízia, por todo o companheirismo, as conversas, as confraternizações, as brigas e as reconciliações. E também à caçula Ana Paula. Acho que nós nos melhoramos.

Aos meus sobrinhos Bruna, Henrique e Pedro por tornarem alguns fins de semana coloridos.

À Cristina e ao meu irmão Hernando pela torcida firme e forte.

Ao meu saudoso irmão Henrique pelas boas e gostosas lembranças que me fizeram e fazem companhia nos momentos de saudades da família.

Aos meus pais, por participarem sempre de forma positiva na minha vida. Eu sou o que vocês me proporcionaram ser; feliz. Eu os amo. Obrigada.

Aos animais que foram sacrificados em nome da “ciência”, sem os quais este trabalho não teria acontecido.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Sumário

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	01
O condicionamento clássico aversivo e o hipocampo.....	01
A caracterização do sistema hipocampal em aves.....	03
As relações entre o hipocampo e os processos de sinalização intra-celulares.....	05
A caracterização do papel dos genes se expressão imediata (IEG) na aprendizagem e memória.....	07
2. Objetivos.....	10
3. Materiais e Métodos.....	11
4. Resultados.....	17
5. Discussão.....	22
6. Referências Bibliográficas.....	30
7. Apêndice.....	36

Resumo:

O presente estudo pretendeu analisar os mecanismos neurais envolvidos na aquisição de condicionamento clássico aversivo, em pombos, através do estudo da expressão do produto do proto-oncogene *zif/268*, no hipocampo, após a sessão de treino. Os animais foram submetidos a três associações som (1000-Hz, 83 dB, 1s) choque (10 mA, 1s), durante os 20 minutos da sessão. Os animais controles foram expostos apenas ao choque, contexto, som ou manipulação. Análises comportamentais revelaram um aumento do *freezing* durante a sessão de treino dos grupos som-choque e choque. Análises imunohistoquímica foram realizadas uma hora após o treino. Essas análises revelaram uma maior expressão de *zif/268* no hipocampo de ambos os grupos, experimental e choque, em comparação com os grupos controle som, contexto e manipulação. A expressão do *zif/268* no hipocampo indicou uma ativação diferencial das regiões hipocámpais para cada grupo: o hipocampo medial para o grupo som-choque, e o hipocampo dorsal para o grupo choque. Os dados são interpretados como evidência da participação do hipocampo no condicionamento clássico aversivo.

Abstract:

The present study intended to analyze the neural mechanisms underlying the acquisition of aversive classical conditioning in pigeons by studying the expression of the product of the immediate early gene *zif/268* in the hippocampus after the training session. Pigeons were submitted to three sound (1000-Hz, 83 dB, 1s) and shock (10 mA, 1s) associations during one 20 min session. Control pigeons were exposed only to the shock context, sound or manipulation. Behavioural analysis revealed increased freezing during the training session in the sound-shock and shock groups. The immunohistochemical analysis began one hour after training. Analysis revealed enhanced expression of *zif/268* in the hippocampus both for the experimental and the shock-control groups in comparison to sound, context and manipulation-control pigeons. The expression of *zif/268* in the hippocampus indicated a differential activation of hippocampal regions in each of these groups: medial hippocampus for the sound-shock group and dorsal hippocampus for the shock groups. The data are interpreted as evidences of the hippocampal participation in the classical aversive conditioning.

1. Introdução

Dentre as características dos animais, a capacidade de aprender é notável e essencial para a vida e adaptação ao ambiente. A aprendizagem é um processo de aquisição do conhecimento sobre os eventos do mundo (Morris *et al*, 1988), decorrentes da experiência individual, ou seja, da interação do organismo com o ambiente externo (Staddon, 1983). Esse é um processo importante pelo qual o ambiente altera o comportamento, e o comportamento altera o ambiente (Berlucchi & Buchtel, 1976; Catania, 1999; Pia, 1985). A potencialidade para a aprendizagem é encontrada em todo o reino animal e sua complexidade tem sido correlacionada com a complexidade do sistema nervoso do organismo (MacPhail, 1982; Carlson, 2000). Existem várias classes de aprendizagem, dentre elas, a aprendizagem associativa. Esta é responsável pela modificação do comportamento respondente, através do controle de contingências estímulo-estímulo, processo denominado de condicionamento clássico (Catania, 1999).

O condicionamento clássico aversivo e o hipocampo

O condicionamento clássico, também denominado Pavloviano ou respondente, é um tópico que tem dominado a psicologia da aprendizagem. Refere-se a uma classe de aprendizagem que envolve relações de controle de estímulo nas quais um estímulo sinaliza a apresentação de outro (Catania, 1999). No condicionamento clássico aversivo, ocorre a associação de um estímulo incondicionado aversivo (US) com um estímulo neutro para a resposta analisada, resultando no estabelecimento de novas relações estímulo-resposta. Ou seja, o estímulo inicialmente neutro adquire a capacidade de eliciar as respostas incondicionadas ao primeiro estímulo. Assim, esse estímulo condicionado (CS) passa a eliciar respostas condicionadas. A possibilidade de estabelecimento e análise desse tipo de controle de estímulos tem contribuído para que os neurocientistas investiguem e gerem conhecimento sobre as bases neurais da aprendizagem e memória.

O conhecimento sobre as bases e mecanismos neurais dos processos de aprendizagem e memória desenvolveu-se muito por meio de modelos animais e de

diferentes tipos de situações de aprendizagem. Consideráveis progressos foram obtidos graças à investigação do condicionamento aversivo (Bingman *et al.*, 1989; Antoniadis & McDonald, 2000; Maren & Holt, 2000; Schafe *et al.*, 2001). A partir dos trabalhos iniciais de LeDoux (1990) a amígdala tem sido enfatizada como uma estrutura neural que participa da memória aversiva. Posteriormente o hipocampo também passou a receber atenção cada vez mais intensa quanto ao seu envolvimento nesse processo de aprendizagem e memória (Teyler & Discenna, 1985; Selden *et al.*, 1991; Kim & Fanselow, 1992; Izquierdo & Medina, 1993; Phillips & Ledoux, 1994; Maren *et al.*, 1997). Assim, a consideração de que o hipocampo é importante para o condicionamento de medo é mais recente em relação à ênfase atribuída à amígdala. Além disso, a amígdala e o hipocampo também possuem papéis importantes na organização e no controle de diversas respostas motoras e vegetativas envolvidas no condicionamento aversivo, como por exemplo a locomoção, o *freezing* e as vocalizações ultrassônicas (Teyler & Discenna, 1985; Antoniadis & McDonald, 2000).

O trabalho de Kim & Fanselow (1992) pode ser considerado um dos pioneiros na análise do papel do hipocampo na consolidação de memória emocional aversiva em ratos. Esses autores usaram o pareamento som-choque em ratos submetidos a lesões hipocampais 1, 7, 17 ou 28 dias após o treino. Os animais com lesão 1 dia pós-treino tiveram menor intensidade de *freezing* quando reexpostos ao contexto. Quando testados em outro contexto com reapresentação do som, todos os grupos apresentaram *freezing*. Esses dados mostraram o papel dinâmico do hipocampo na formação de memórias e indicaram um processamento diferente para o armazenamento das informações aversivas, relativas ao pareamento dos estímulos num contexto, e ao som, quando apresentado em outro contexto.

Recentemente, a ênfase dada aos estudos sobre a influência de como o contexto ambiental influencia o aprendizado e a memória cresceu paralelamente ao grande número de investigações sobre as funções do hipocampo na memória contextual (Holt *et al.*, 1999; Reis *et al.*, 1999; Maren *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2001). As pesquisas desenvolvidas indicam a importância dessa análise para o entendimento da complexidade das relações entre os estímulos ambientais, o sistema nervoso e o comportamento. O impacto da informação contextual sobre o comportamento humano, também já é bem conhecida (Tulving & Thomson, 1973; Penick & Solomon, 1991; Howard, 1992). Essa informação é

dada por um estímulo multimodal, caracterizando o contexto como uma configuração de estímulos (Maren *et al.*, 1997). O condicionamento de um contexto ambiental implica na aquisição e na retenção do valor funcional (positivo ou negativo) de uma situação ou contexto que foi associado a eventos positivos ou negativos (Antoniadis & McDonald, 2000).

Em nosso laboratório Reis *et al.* (1999) relatam que lesões hipocampais, 24 horas após o condicionamento clássico aversivo em pombos, resultaram em menor porcentagem de ocorrência de *freezing* ao contexto. Como o condicionamento ao som foi mantido após a lesão, esse estudo replica os dados de Kim & Fanselow (1992) e enfatiza o papel do hipocampo na modulação da memória emocional aversiva em pombos.

A caracterização do sistema hipocampal em aves

De acordo com Eichenbaum, Otto & Cohen (1992) há necessidade de estudos que investiguem de uma forma integrada, com humanos e outros animais, algumas questões centrais para o entendimento das funções básicas do hipocampo. Entre estas temos as questões relativas ao tipo de memória que tem o sistema hipocampal como essencial, às possíveis variações dos tipos de memória em diferentes espécies animais, ao papel do hipocampo no armazenamento de informações e às regras e mecanismos envolvidos nesse armazenamento. As mesmas considerações podem ser estendidas aos sistemas hipocampais de aves e, em particular, do pombo.

Do mesmo modo que as investigações do hipocampo em mamíferos, os estudos em aves também têm abordado questões relacionadas com os processos de aprendizagem e memória, especialmente aquelas envolvendo relações contextuais e espaciais. Os resultados gerais sugerem uma similaridade funcional entre o hipocampo de aves e de mamíferos, em diversos tipos de aprendizagem (Bingman *et al.*, 1989; Reis *et al.*, 1999; Colombo & Broadbent, 2000; Watanabe, 2001). Lesões hipocampais em pombos e em ratos confirmam essa idéia. Animais lesados apresentam prejuízo no processo de aquisição e retenção de informação espacial, como também no processamento da informação contextual. Outro dado que reforça uma possível similaridade, é a evidência de que, após a lesão da região

mamíferos. A continuação dorsal deste tracto, isto é, o tracto de fibras dorsais, pode conter aferências e eferências para outras regiões cerebrais. Nas células adjacentes às células piramidais da região hipocampal de pombos, também foi evidenciado a presença de colecistocinina, semelhante ao que ocorre na região do Corno de Amon e camada de células granulares do giro denteado nos mamíferos. Apesar de várias similaridades, ainda não foi evidenciado no hipocampo de pombos, uma região equivalente às fibras musgosas do hipocampo de mamíferos (Erichsen *et al.*, 1991).

As relações entre o hipocampo, a LTP e os processos de sinalização intracelulares

O entendimento dos mecanismos neurais mediados pelo hipocampo está estreitamente relacionado com a descrição de um processo neural que constituiu um dos pilares que sustentam a investigação dos processos neurais da memória: a potenciação sináptica a longo-prazo, referida como LTP (do inglês *long-term potentiation*). A LTP é descrita como um reforçamento da eficácia sináptica, evidenciada através do aumento persistente, durando de horas a dias, da amplitude dos potenciais pós-sinápticos após a estimulação tetânica pré-sináptica. Bliss e Lomo foram os primeiros a descreverem esse fenômeno em 1973, nas aferências das vias perfurantes do giro denteado no hipocampo de ratos. Posteriormente, demonstrou-se que o mecanismo de LTP no hipocampo possui duas fases: a fase transitória imediata, com duração de 1 à 3 horas, e a fase de consolidação tardia, com duração de no mínimo 24 horas (Kandel 2000).

A fase imediata da LTP é diferente para as células que fazem sinapse com as fibras musgosas e com as fibras de Schaffer no hipocampo. Nas fibras musgosas ocorre a ativação de receptores NMDA e AMPA através da liberação de glutamato. Os receptores NMDA parecem ter pouca participação na LTP na via das fibras musgosas, pois sua inativação não afeta a LTP. Da mesma forma, o bloqueio do influxo de Ca^{++} nas células piramidais pós-sinápticas da região CA3 parece não afetá-la. A LTP na via das fibras musgosas parece

hipocampal de aves e mamíferos, não ocorrem prejuízos em tarefas puramente visuais ou na aquisição de respostas de auto-modelagem (Colombo & Broadbent, 2000).

Apesar da homologia filogenética entre o hipocampo de aves e de mamíferos, uma vez que ambos derivam do córtex dorsomedial de um mesmo ancestral de linhagem amniota (Campbell & Hodos, 1970; Shimizu & Bowers, 1999), pode-se considerar, com base em estudos anatômicos, que a região hipocampal de mamíferos e aves mantêm uma organização com características pouco similares. Dentre elas destaca-se a presença de diferentes tipos celulares e uma estreita proximidade ao ventrículo lateral (Karten & Hodos, 1967; Bingman, Bagnoli, Ioalè & Casini, 1989; Szély, 1999). Ao mesmo tempo, as regiões hipocampais de aves e de mamíferos são bastante similares com relação ao padrão de vias aferentes e eferentes, uma vez que ambas regiões recebem projeções do hipocampo contralateral, tálamo, hipotálamo, *locus ceruleus* e núcleos da rafe; também, ambos projetam-se para o núcleo septal, banda diagonal e hipotálamo (Benowitz & Karten, 1976; Krainiak & Siegal, 1978; Casini *et al.*, 1986; Shimizu & Karten, 1990; Bingman *et al.*, 1994; Bouille *et al.*, 1997). Apesar dessas similaridades, existem algumas peculiaridades a cada classe e espécies. Ao contrário do que ocorre nos mamíferos, as projeções da região hipocampal de aves para o arquiestriado, correspondente a amígdala dos mamíferos, se dá de forma indireta, através da área septal contralateral, que também conecta o hipocampo ao hipotálamo lateral. Da mesma forma, o hipocampo de aves não recebe projeções diretas do arquiestriado, mas sim indiretamente através de projeções do arquiestriado dirigidas ao parahipocampo, que por sua vez possui conexões recíprocas com o hipocampo.

Com respeito à neuroquímica, neuromediadores similares têm sido encontrados no hipocampo de aves e de mamíferos (Erichsen *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 1991). Nos estudos supra citados foram identificados diversos tipos de neuromediadores nas subregiões hipocampais de pombos. O mapeamento da localização dos mesmos sugeriu uma divisão hipocampal em seis áreas, distribuídas entre os níveis A3.75, e A9.00 do atlas de Karten e Hodos (Erichsen *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 1991). Esses resultados sugerem que paralelos podem ser traçados com algumas áreas da região hipocampal de mamíferos. O tracto de fibras mediais parece conter aferências catecolaminérgicas, serotoninérgicas e colinérgicas para a região hipocampal, assemelhando-se ao *alveus* (substância branca que reveste a superfície ventricular do hipocampo, e que é contínua à fimbria) do hipocampo de

neurônio pré-sináptico. Essa maior ativação do neurônio pré-sináptico resulta na potenciação da atividade do neurônio pós-sináptico (Kandel, 2000).

Os axônios das células piramidais da região CA3 do hipocampo de ratos, fibras de Schaffer, medeiam as conexões com a região CA1. Essas sinapses utilizam o glutamato como neurotransmissor, porém a LTP na camada CA1 do hipocampo de mamíferos requer a ativação de receptores NMDA além dos receptores AMPA. Quando o glutamato se liga ao receptor AMPA, a membrana é despolarizada e ocorre o deslocamento do íon Mg^{++} do canal do receptor NMDA, no qual o glutamato se acoplou previamente. Apenas quando o Mg^{++} é deslocado ocorre o influxo de Na^{+} e de Ca^{++} . A elevação da concentração de Ca^{++} aumenta a transmissão sináptica porque ativa as proteínas quinase serina-treonina dependente de Ca^{++} , a proteína quinase dependente de Ca^{++} /calmodulina (CAMKII), a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase A (PKA) e a proteína tirosina quinase-fyn (Kandel, 2000).

A ativação dessas vias bioquímicas na fase inicial da LTP resulta na atividade de enzimas que controlam a expressão de mensageiros retrógrados, como por exemplo o óxido nítrico (NO). Estes atuam sobre o terminal pré-sináptico, aumentando a liberação de neurotransmissores e, assim, levando à manutenção da LTP. Os segundos mensageiros também são responsáveis pela ativação da maquinaria da expressão de genes envolvidos na fase tardia da LTP, que requer a síntese de proteínas. Essas proteínas podem ser os fatores de transcrição, como também as proteínas envolvidas em alterações fenotípicas dos terminais sinápticos. Podemos, assim, evidenciar a importância da compreensão das relações entre os mecanismos envolvidos na LTP e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos processos de aprendizagem e memória.

A caracterização do papel dos genes de expressão imediata (IEG) na aprendizagem e memória

O sucesso dos estudos definindo vias neuroanatômicas, combinado com o conhecimento da LTP que ocorre na região hipocampal, tem apontado caminhos para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que medeiam a aquisição e a consolidação da memória aversiva (Blair HT *et al.*, 2001). A análise dos mecanismos de ativação de genes de expressão rápida (IEG) também pode contribuir para esse conhecimento (Roberts *et al.* 1996; Malkani & Rosen, 2000).

Existem duas classes de genes que respondem à estimulação sináptica e à atividade elétrica da membrana de células neuronais: os genes de estimulação rápida ou precoce, denominados IEG (do inglês *immediate early genes*), e os genes de estimulação tardia, cuja expressão é induzida ou reprimida mais lentamente, dependendo da expressão de alguns IEGs que codificam fatores de transcrição (Hanley, 1988; Sheng & Greenberg, 1990; Morgan & Curran, 1991).

Os IEGs codificam os fatores de transcrição de proteínas citoesqueléticas, de fatores de crescimento, de enzimas metabólicas e de proteínas envolvidas na transdução de sinais. As propriedades bioquímicas e biológicas dessas moléculas fornecem importante discernimento sobre os mecanismos celulares e moleculares que caracterizam os processos de aprendizagem e memória (Lanahan & Worley, 1998).

As alterações plásticas a longo prazo no sistema nervoso central, incluindo as que suportam a formação da memória, dependem de alterações funcionais duradouras nos neurônios que requerem uma reprogramação da expressão gênica. Os fatores de transcrição codificados por IEGs como *c-fos*, *c-jun*, *jun-B* e *zif/268* (também conhecido como *Krox-24*, *egr-1*, *TIS 8*, *NGFI-A* ou *zenk*) atuam como mensageiros relacionados à atividade neural a curto prazo, com alterações no nível de transcrição gênica (Sheng & Greenberg, 1990; Richardson *et al.*, 1991; Lanahan & Worley, 1998; Tischmeyer & Grimm, 1999; Kandel, 2000; Walton *et al.*, 1999; Whitney *et al.*, 2000).

Em situações comportamentais complexas, como o condicionamento clássico aversivo, ocorre a ativação neuronal polissináptica, indicando, então, a ação integrada de diferentes áreas cerebrais. A atividade desses neurônios ativados polissinapticamente pode

ser evidenciada pela marcação da expressão desses genes através da imunorreatividade às proteínas controladas por eles. Assim, a expressão de alguns IEGs, como por exemplo o *c-fos* e o *zif/268*, tem sido utilizado como indicadores de atividade celular. A análise imunohistoquímica da expressão de suas proteínas tem sido apontada como útil para o mapeamento, ao nível celular, das vias funcionais ativadas por uma variedade de condições fisiológicas, patológicas e comportamentais (Sheng & Greenberg, 1990; Campeau *et al.*, 1991; McCabe & Horn, 1994; Melo & Clayton, 1994; Campeau *et al.*, 1997).

O gene de expressão imediata *zif/268* codifica o fator de transcrição, ZIF/268, com alta expressão cerebral. Porém os genes alvos, regulados pelo ZIF268, ainda não foram identificados, apesar de ser conhecida a sequência específica de DNA (GCCGG/TGGGCG) com alta afinidade onde se liga ativando a expressão gênica (Christy & Nathans, 1989). Sua rápida indução foi observada em tecidos nervosos de mamíferos e aves, dada pela despolarização da membrana (Milbrandt, 1987; Saffen *et al.*, 1988; Cole *et al.*, 1989; Wisden *et al.*, 1990). Alguns estudos demonstraram que a indução de LTP no giro denteado do hipocampo de ratos está associada com uma rápida e robusta transcrição do IEG *zif/268*, codificando o fator de transcrição ZIF/268. O *zif/268* participa de mecanismos de plasticidade sináptica a curto prazo e de transição para a plasticidade a longo-prazo. Dessa forma, também é caracterizado como essencial para a expressão de memórias a longo-prazo (Richardson *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1996).

Uma sequência lógica das etapas envolvidas na formação e permanência do traço de memória, que mostra claramente a participação dos IEGs neste processo, pode ser analisada considerando o episódio de aprendizagem que desencadeia a ativação de circuitos sinápticos e, conseqüentemente, de receptores pós-sinápticos entre os quais os receptores NMDA e AMPA. As vias de segundos mensageiros intracelulares, ativadas pelos receptores NMDA, podem ser formadas por inositol-1,4,5-trifosfato (IP3), PYK2, proteína quinase dependente de cálcio (CAM), entre outros. Esses segundos mensageiros fosforilam fatores de transcrição, sendo o mais conhecido o CREB. Os fatores de transcrição fosforilados desencadeiam a expressão de IEGs das famílias Krox 24, Krox 20, entre outras. O IEG *zif/268* faz parte da família Krox 24, e seu produto, o fator de transcrição ZIF, ativa genes de expressão tardia, responsáveis pela expressão de proteínas formadoras de receptores, proteínas estruturais e sinapsinas, que provocam as alterações morfo-

funcionais nas sinapses, formando o traço de memória (Walton *et al.*, 1999). Sendo assim, os IEGs codificadores de fatores de transcrição servem como terceiros mensageiros nucleares, regulando a expressão de outros genes responsáveis pela resposta a longo-prazo dos neurônios aos estímulos externos (Richardson *et al.*, 1992)

Entretanto, o significado funcional da expressão do IEG *zif/268* ainda não está claro. Seria possível considerar que a ativação do proto-oncogene *zif/268* estaria envolvida com a fase inicial da cascata de eventos que levam a alterações celulares a longo-prazo e que sustentam os processos de memória e aprendizagem (Mello & Clayton, 1994). Além disso, entre os diversos genes que mostram respostas rápidas à estimulação celular, a indução do *zif/268* parece ser mais especificamente relacionada com modelos de ativação celular que levam a alterações neuronais (Cole *et al.*, 1989; Wisden *et al.*, 1990). A indução do *zif/268* no hipocampo parece estar especificamente acoplada com a ativação do receptor NMDA (Cole *et al.*, 1989).

2. Objetivos:

Nas considerações apresentadas anteriormente, ao longo dessa seção, procurou-se caracterizar a importância do hipocampo para os processos de aprendizagem e memória, tanto em mamíferos quanto em aves. Além disso, salientou-se a relação entre o hipocampo e o processo de LTP em mamíferos e, finalmente, as relações entre os processos de LTP e os mecanismos de sinalização intracelular. Com base nessas evidências experimentais apresentadas, considera-se interessante a investigação dos processos celulares e moleculares que ocorrem na região hipocampal de pombos durante a aprendizagem e a memorização. Assim, o presente trabalho investigou a expressão do *zif/268* no hipocampo de pombos, após o treino com associações som-choque, ou seja, no condicionamento clássico aversivo. A aprendizagem e memória dessa relação foram analisadas durante uma sessão de condicionamento som-choque. A expressão do produto do proto-oncogene *zif/268* foi avaliada, por imuno-histoquímica, procurando-se investigar a possível participação desse IEG nos processos de aquisição (curto-prazo) das informações envolvidas nesse treinamento.

3. Materiais e Métodos:

Sujeitos:

Foram utilizados pombos adultos, machos, da espécie *Columba livia*, adquiridos de um mesmo fornecedor. Esses animais foram mantidos em gaiolas-viveiro individuais com água à vontade, com ciclo claro-escuro de 12/12 h. A alimentação consistiu de uma mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração Anhangüera para pombos, areia e farinha de ostra. Após a chegada ao biotério os animais passaram por um período de 15 dias para medidas profiláticas. Os pombos foram aleatoriamente atribuídos a grupos experimentais e controles:

Grupo Experimental Treino (GE): 6 animais expostos ao pareamento dos estímulos som e choque, durante uma sessão de 20 minutos.

Grupo Controle Choque (GCh): 6 animais colocados na câmara experimental e expostos a 03 estímulos aversivos (choque), seguindo o mesmo esquema temporal do condicionamento.

Grupo Controle Contexto (GCC): 6 animais submetidos à exposição ao contexto, durante 20 min, sem apresentação de estímulos programados.

Grupo Controle Som (GCS): 6 animais colocados na câmara experimental e expostos a 03 estímulos sonoros, seguindo o mesmo esquema temporal do GE.

Grupo Controle Manipulação (GCM): 6 animais submetidos à manipulação semelhante à dos demais grupos, porém sem exposição à câmara experimental ou aos estímulos.

Equipamento:

As sessões experimentais de treino foram realizadas numa câmara de observação (30 x 30 x 40 cm), com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. Essa câmara possuía um alto-falante embutido no teto, ligado a um audio-estimulador, com variação de

freqüência entre 125 e 8000 Hz; e também possuíam entrada de energia com uma tomada macho. As aves receberam coletes de couro com tomadas e fios (tomadas fêmeas) conectadas a eletrodos púbicos. No processo de implante dos eletrodos os animais foram previamente anestesiados com éter, para a colocação dos eletrodos de fios de aço ortodôntico (0,5 mm de espessura, 10 cm de comprimento), inseridos ao ossos púbicos da ave. Os choques foram aplicados através desses eletrodos, a partir de uma fonte (Foringer, USA), controlada por marcadores de tempo eletromecânicos. A iluminação foi feita com lâmpadas vermelhas de 40W, localizadas nas paredes laterais. Todas as sessões foram registradas em fitas VHS por um sistema de filmagem em vídeo-tape (filmadora PanasonicCCD-TR377). Para a perfusão e a imuno-histoquímica foram usados os materiais descritos nas respectivas subseções.

Procedimento:

Foram realizadas as seguintes fases experimentais:

I. Adaptação às condições de biotério:

Durante um período mínimo de quinze dias, antes do experimento, os pombos permaneceram no biotério, com controle de ciclo claro-escuro, para adaptação a essas condições. Os animais de todos os grupos foram manipulados no mesmo horário que ocorreu o experimento, às 8:00 horas, nos cinco dias que o precederam.

II. Exposição aos estímulos:

Foi realizada uma sessão experimental em que os pombos experimentais GE foram colocados na câmara experimental por 20 min e receberam pulsos sonoros (1000-Hz, 83-dB, 1-s) associados com um choque (10 mA, 1-s). Os estímulos foram apresentados no minuto 5, 10 e 15. Os animais controle GCS foram expostos a 03 estímulos sonoros, na mesma sequência temporal usada para o grupo experimental, e os animais controles GCh foram expostos a 03 estímulos aversivos (choque), também seguindo a mesma sequência temporal. Já os animais-controle do grupo GCC foram expostos apenas ao contexto de

condicionamento na câmara experimental durante 20 minutos. Para o controle de fatores relativos à manipulação envolvida na situação experimental, os animais GCM foram retirados de suas gaiolas-viveiro e manipulados (transportados e pesados), sem exposição ao contexto e nem aos estímulos (som e choque). As sessões experimentais e a manipulação foram realizadas no período de 8:00 e 9:00 horas da manhã.

Os animais dos grupos GE, GCh, GCS, GCC e GCM foram perfundidos 1:00 horas após o término da sessão ou da manipulação (GCM).

III. Análise Comportamental:

As gravações em VHS das sessões experimentais dos animais GE, GCh, GCC e GCS foram transcritas com registros de comportamentos a cada 30 segundos. A descrição e a definição das categorias e itens comportamentais, contidas no catálogo de comportamento de pombos (Reis *et al*, 1999) foram discutidos com observadores experientes, para fins de controle da validade dos dados por meio de testes de acordo entre observadores. Os comportamentos foram registrados em acordo com as seguintes categorias:

- 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 (sobressalto, murchar, estremecer o corpo).
- Comportamentos exploratórios: movimentos relacionados à orientação para a investigação de partes ou do ambiente como um todo (esticar o pescoço, alerta, explorar, escanear, rotação da cabeça, fixar).
- Locomoção: deslocamento no espaço, usando como referencial um ponto qualquer que não ele mesmo (andar, circular, pisotear, esvoaçar, voar, pular).
- Manutenção: comportamentos relacionados com ajustes corporais e vegetativos (bocejar, estremecer a cabeça, deglutir, vomitar, piscar) e de autoestimulação como coçar e limpar.
- Postura de imobilidade relaxada ou parado (PAR): ausência de movimento observáveis do corpo ou de 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.

-Postura de imobilidade tensa ou *freezing* (PI): ausência de movimentos observáveis do corpo ou parte deste: o animal fica imóvel, agachado ou encolhido com alargamento da distância entre os pés, geralmente num canto da câmara experimental, com corpo inclinado para frente e apoio peitoral no assoalho ou parede: asas e caudas apresentam desalinhamento: o pescoço apresenta extensão restrita e a cabeça fica imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente.

IV. Perfusão:

Após o término dos procedimentos experimentais (1:00h) os animais foram novamente transportados ao laboratório onde foram anestesiados com Ketamina e Xylazina, e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl 0,9%) para a remoção do sangue presente no cérebro, e, a seguir, com solução tamponada de paraformaldeído a 4%, para a fixação do tecido nervoso. Findo este procedimento, os cérebros dos animais foram retirados do crânio e mantidos por 4 horas na solução de paraformaldeído, para pós-fixação. Em seguida, os cérebros foram 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. Findo o período de crioproteção, os cérebros foram congelados com gelo seco e seccionados a uma espessura de 30 µm em micrótomo deslizante de congelamento (Leitz 1208), no plano estereotáxico coronal (frontal). Os cortes de todas as estruturas cerebrais foram coletados em recipientes contendo tampão fosfato-PB (a mesma solução usada na perfusão e pós-fixação), e distribuídos em seis compartimentos iguais onde foram mantidos a 4 C°. Posteriormente foram submetidos ao processamento imuno-histoquímico.

V- Análise Imuno-histoquímica:

Após três lavagens de 10 minutos em PB os cortes foram incubados com o anticorpo primário Egr-1 (c-19), (Sc-189-Santa Cruz Biotechnology, USA) a uma concentração de 1:1000 em uma solução de triton X-100, diluído a 0,3% em PB (TXPB), contendo 2% de soro de cabra, onde permaneceram por 24 horas. Após esse período, foram submetidos a três lavagens em PB de 10 minutos cada. Posteriormente foram incubados,

durante 90 minutos, com o anticorpo secundário biotinilado (Jackson) em TXPB, permanecendo em rotação, à temperatura ambiente. Imediatamente após esse período de incubação, os cortes foram novamente submetidos a três lavagens em PB de 10 minutos cada. Em seguida foram incubados em uma solução contendo o complexo ABC (avidina-biotina-peroxidase), TXPB e cloreto de sódio, durante 90 minutos, permanecendo em rotação, à temperatura ambiente; e, novamente submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, em PB. Foram então colocados em solução de diaminobenzidina em PB, acrescentando-se 0,2 ml de H_2O_2 0,03% por um período entre 2 a 6 minutos, e novamente submetidos a três lavagens de 10 minutos cada, em PB. Subseqüentemente procedeu-se a montagem de lâminas e posterior desidratação dos cortes mediante a exposição a uma série crescente de álcoois (70%, 90%, 100%, 100%) com um período de 5 minutos em cada álcool, e ao clareador (Hemo-De).

A análise dos núcleos marcados foi feita através de microscopia de campo claro e contraste de interferência, sendo que na contagem dos núcleos dos neurônios marcados nas regiões definidas do hipocampo utilizou-se o programa Image (NIH-USA). A contagem foi realizada em três a cinco cortes de cada animal, correspondentes aos níveis A8.00 a A7.00 (Karten e Hodos, 1967), posteriormente se fez a média desses cortes, que foi considerada como o número de marcação de cada animal para a análise estatística. Os resultados são expressos em densidade, ou seja, os números correspondem à quantidade de núcleos marcadas em cada milímetro quadrado:

$$D = (n \cdot 1000000) / A (\mu m^2)$$

D = número de núcleos marcados por mm^2
n = número de núcleos marcados
A = área delimitada para a contagem de núcleos em μm^2

VII. Análise Estatística:

Para a estatística da análise comportamental foi realizada a ANOVA de duas vias, tendo como fatores os grupos e os intervalos de 5 minutos ao longo da sessão de treino; e, como variável dependente, o número registrado de *freezing*. As análises *post-hoc* foram realizadas com o Teste de Múltiplas Comparações de Tukey-Kramer.

Para a análise estatística da densidade dos núcleos marcados no hipocampo foi realizada a ANOVA de uma via, sendo os grupos a variável independente e a densidade da marcação, a variável dependente. Os dados das regiões hipocampais medial, lateral e dorsal foram analisados pela ANOVA de duas vias, considerando a densidade da marcação em cada região como variável dependente e grupo e a região hipocampal como fatores. O Teste de Múltiplas Comparações de Tukey-Kramer foi utilizado nas análises *post-hoc*.

4. Resultados

Efeitos do treino som-choque sobre a ocorrência da resposta de freezing

Os dados comportamentais são apresentados como a média, em intervalo de 5 minutos, da ocorrência da resposta de *freezing* (postura de imobilidade) durante a sessão de treino. Os dados evidenciam o aumento do *freezing*, a partir dos 5 minutos iniciais da sessão, para os grupos GE e GCh. A análise estatística confirmou essas diferenças com um efeito significativo de grupo ($F_{3,20}=24,75$; $p<0,0001$), dos blocos de intervalos temporais durante a sessão ($F_{3,9}=20,21$; $p<0,0001$) e uma interação significativa entre grupo e blocos de intervalos temporais ($F_{3,60}=8,57$; $p<0,001$). As análises de múltiplas comparações com o teste Tukey-Kramer indicaram diferenças significativas entre o primeiro bloco de 5 min, da sessão de treino em relação aos demais ($p<0,05$) e entre os grupos GE e GCh em relação aos controles GCS e GCC ($p<0,05$).

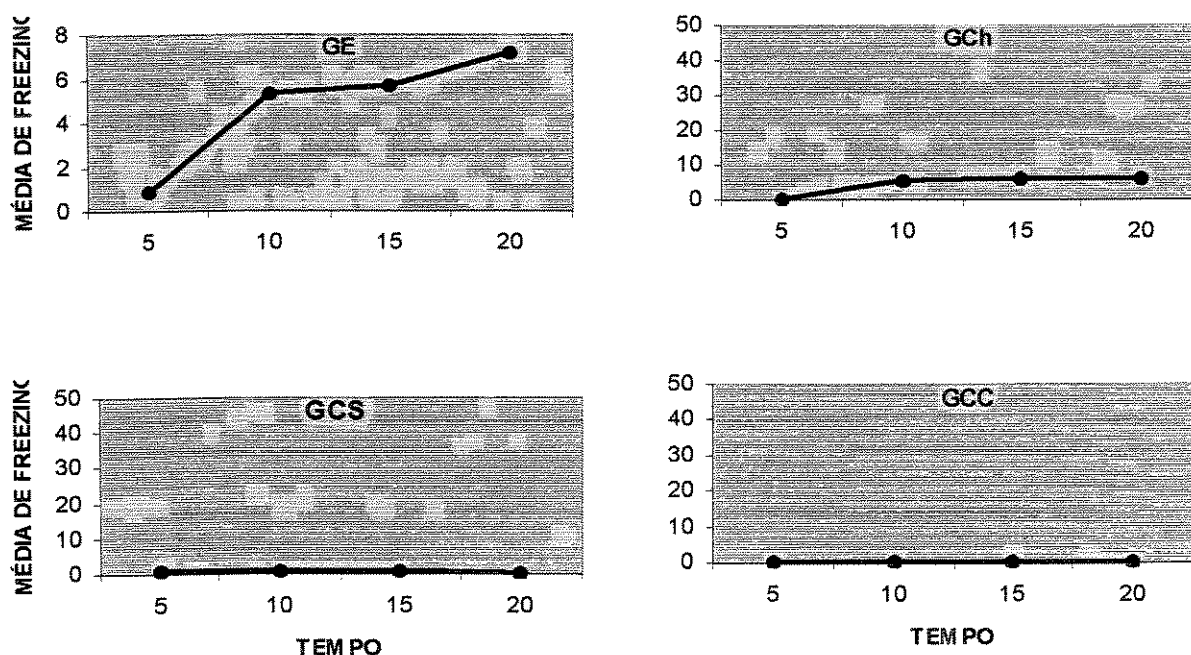


Figura 1: Média do registro da ocorrência de freezing durante a sessão de treino para o grupo experimental (GE), grupo choque (GCh), grupo controle ao contexto (GCC), grupo controle ao som (GCS).

Análise do número de células que expressaram o produto do proto-oncogene zif/268.

A média da densidade de núcleos marcados no hipocampo foi primeiramente comparada entre os grupos, sendo observada uma maior marcação no GE e GCh. Como também pode ser observado na Figura 1, o número de núcleos marcados no GCC e no GCM foi menor em relação ao GE e ao GCh, porém não em relação ao GCS. Estas diferenças foram confirmadas estatisticamente pela ANOVA ($F_{4,25}=11,119$; $p<0,05$). O Teste de Múltiplas Comparações de Tukey-Kramer indicou diferenças significativas entre o GE e os grupos GCM e GCC ($p<0,001$), como também entre o GCh e os grupos GCC e GCM ($p<0,05$).

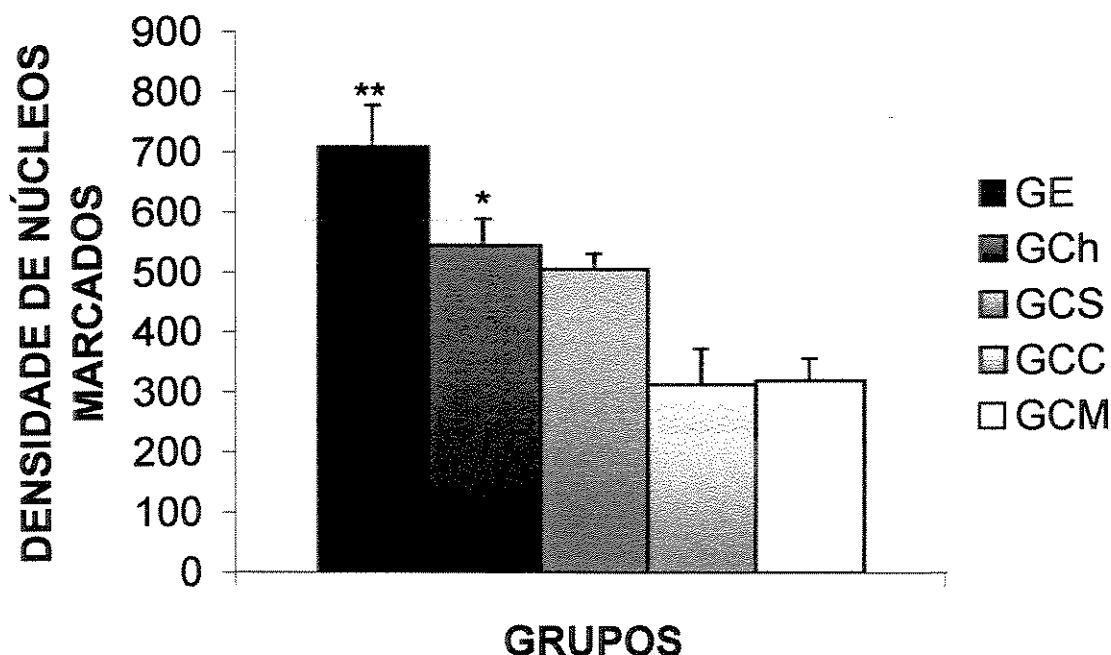


Figura 2: Média da densidade de núcleos marcados por mm^2 no hipocampo dos grupos GE, GCh, GCS, GCC e GCM. ** $p<0,001$ em relação aos grupos GCC e GCM; * $p<0,05$ em relação aos grupos GCC e GCM.

As análises das marcações da imunoreatividade dos núcleos das células em cada grupo, considerando as regiões hipocâmpais (HM, HL e HD), mostrou que houve marcação diferencial dos núcleos entre as regiões e entre os grupos. A análise estatística indicou um efeito de grupo ($F_{4,24}=10,30$; $p<0,0001$) e de região ($F_{2,24}=21,34$; $p<0,0001$). As análises *post hoc* indicaram diferenças entre grupos e regiões, representadas graficamente nas Figuras 3 e 5. O GE apresentou uma densidade de marcação significativamente maior na região medial do que de qualquer outro grupo ($p<0,05$). Na região dorsal encontrou-se densidade de marcação significativamente diferente no GE e no GCh em relação ao GCC e GCM ($<0,05$). O GCS também apresentou um número significativamente maior de células em relação ao GCM ($p<0,05$), porém não foi diferente quando comparado com os demais grupos ($p>0,05$).

Na região lateral, menor densidade de núcleos marcados foi observada para todos os grupos. Não se encontrou diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

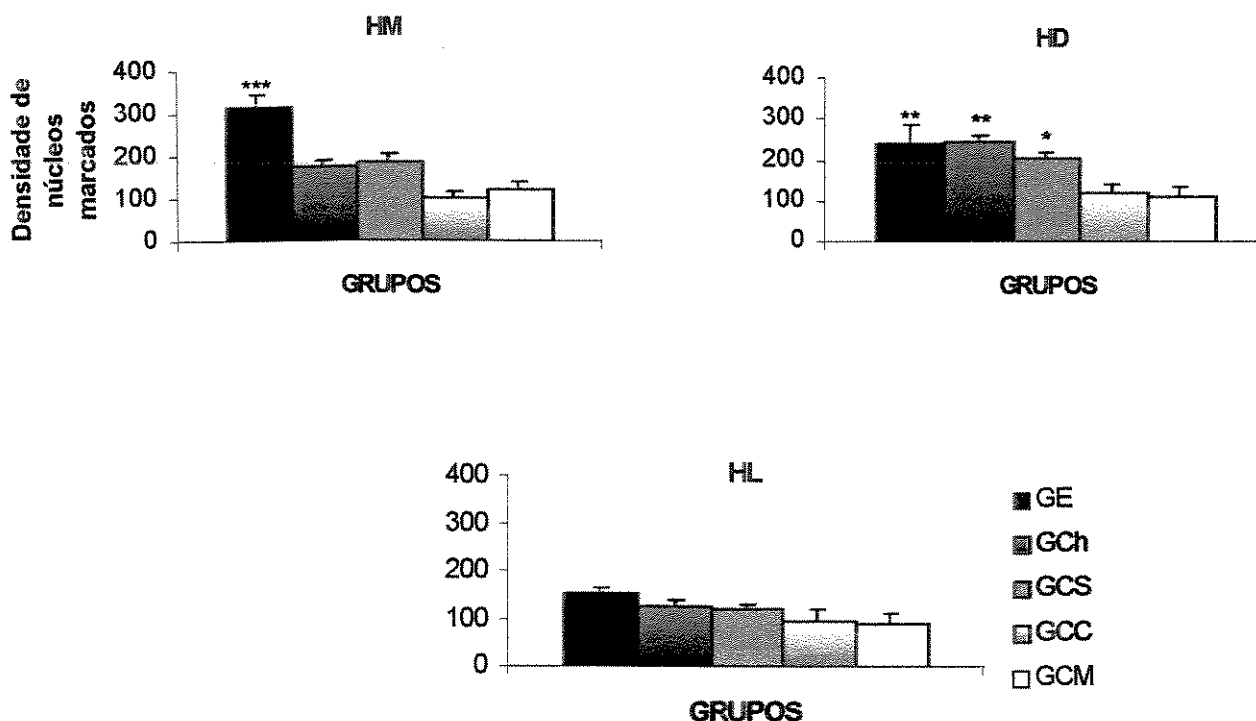


Figura 3: Análise da densidade por mm^2 da marcação da imunoreatividade dos núcleos das células em cada região hipocâmpal. HM: Hipocampo Medial; *** $p<0,05$ em relação aos demais grupos. HL: Hipocampo Lateral. HD: Hipocampo Dorsal; ** $p<0,05$ em relação ao GCC e ao GCM; * $p<0,05$ em relação ao GCM.

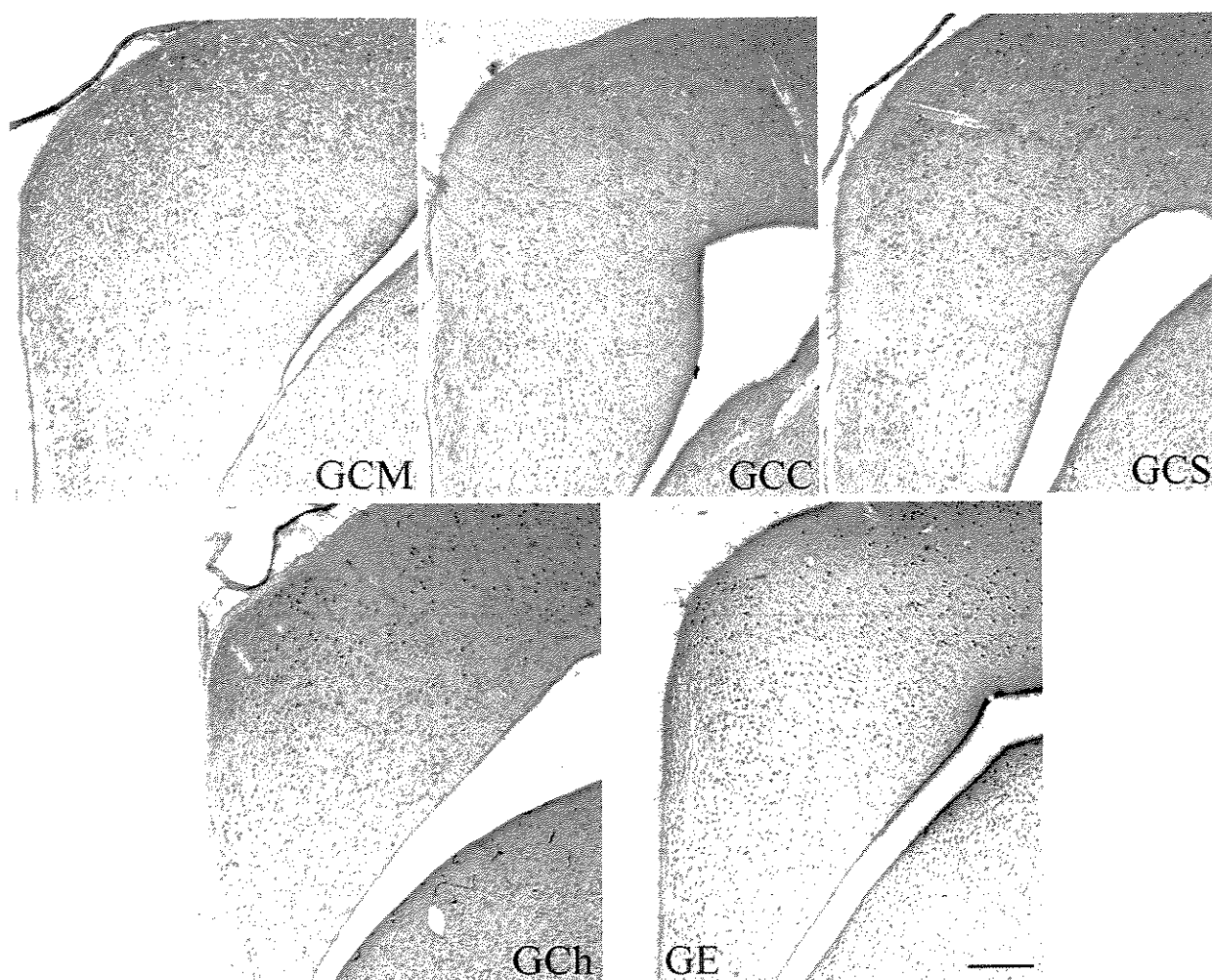


Figura 4: Fotomicrografia do hipocampo do grupo controle manipulação (GCM), grupo controle contexto (GCC), grupo controle som (GCS), grupo choque (GCh) grupo experimental (GE). A barra corresponde a 25 μ m.

A comparação da densidade de núcleos marcados em cada região e dentro de cada grupo (Figura 5), indica diferenças apenas para os grupos GE e GCh. No GE ocorreu uma densidade de marcação significativamente maior nas regiões medial em relação à região lateral ($p<0,05$). No GCh a região dorsal possui uma densidade de marcação significativamente maior do que na região lateral ($p<0,05$), porém não em relação à medial ($p>0,05$). Nos grupos controles GCC, GCS e GCM, não houve diferença significativa na marcação das respectivas regiões hipocampus (p>0,05).

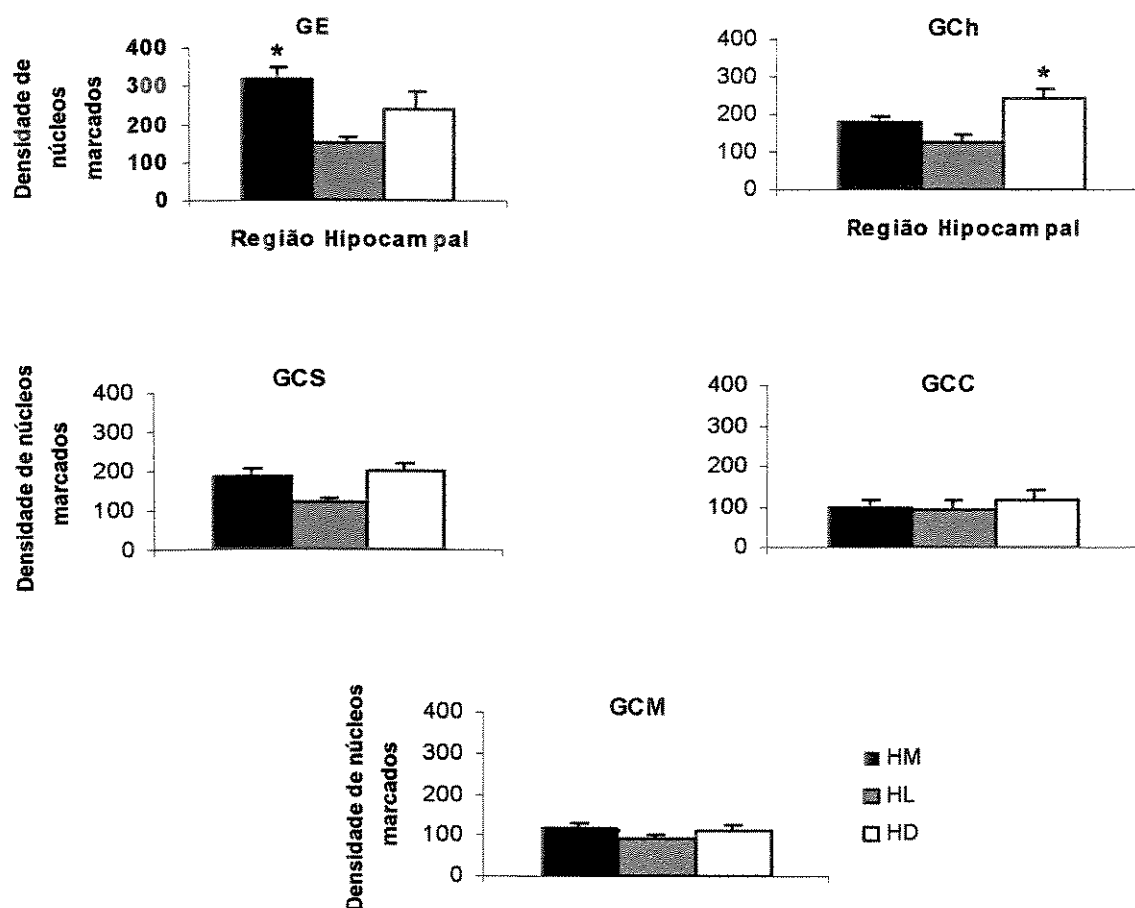


Figura 5: Análise da densidade por mm^2 da imunoreatividade dos núcleos das células do HM, HL e HD em cada grupo. GE: grupo experimental; * $p<0,05$ em relação ao HL. GCh: grupo choque; * $p<0,05$ em relação ao HL. GCS: grupo controle som. GCC: grupo controle contexto. GCM: grupo controle manipulação.

5. Discussão

Os dados do presente estudo indicaram que a expressão do IEG *zif/268* ocorreu no hipocampo de pombos após o condicionamento clássico aversivo. Durante a sessão de condicionamento, em que houve a exposição à associação som-choque ou a apresentações de estímulos discretos, observou-se diferenças significativas na ocorrência de *freezing* para os grupos GE e GCh. A aceleração positiva das curvas de *freezing* pode ser interpretada como evidência de que a associação do choque ao som (GE) e do choque ao contexto (GCh) resultou em mudanças comportamentais que seriam indicativas de aquisição do condicionamento de medo (Reis *et al.*, 1999;). A exposição posterior ao contexto ou a apresentações isoladas do som poderiam confirmar o valor condicionado desses estímulos.

Verificou-se uma expressão diferenciada do *zif/268* em regiões específicas do hipocampo. A observação, neste trabalho, de uma maior ativação do hipocampo no grupo que foi submetido ao condicionamento clássico aversivo, parece confirmar a participação do hipocampo neste tipo de aprendizagem. Esses resultados, em conjunto com os estudos que descrevem as aferências e as eferências hipocampais, bem como as localizações de neuromediadores, constituem uma contribuição para a discussão dos possíveis circuitos que medeiam os processos de aprendizagem e memória.

Na realidade, a formação hipocampal é conhecida como sendo crucial para o processamento de alguns tipos de memória em mamíferos (Teyler & Discenna, 1985; Maren *et al.*, 1997; Antoniadis & McDonald, 2000; Watanabe, 2001). Alguns estudos já confirmaram a participação do hipocampo de mamíferos, entre outras estruturas, no condicionamento clássico aversivo (Selden *et al.*, 1991; Phillips & LeDoux, 1994; Hall *et al.*, 2001). O hipocampo de aves também está estreitamente relacionado com vários tipos de memória e de aprendizagem (Bingman *et al.*, 1989; Good M, 1987; Colombo *et al.*, 1997) entre eles o condicionamento clássico aversivo (Reis *et al.*, 1999). Os dados do presente trabalho adicionam, assim, observações interessantes para essas discussões.

Em experimentos com o condicionamento clássico aversivo existem substanciais evidências de que o estímulo incondicionado (US) também se associa com o ambiente em

que ocorreu o treino (Maren *et al.*, 1997). Vários trabalhos confirmaram a participação do hipocampo mediando o condicionamento contextual aversivo (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1994; Reis *et al.*, 1999). Os resultados deste trabalho confirmam a idéia da participação do hipocampo no condicionamento ao contexto, uma vez que a marcação da imunorreatividade ao IEG *zif/268* no GCh foi significativamente maior em relação aos grupos controles GCM e GCC. Além disso, no presente estudo para os animais do GE houve o condicionamento som-choque num contexto específico. Como houve a expressão diferenciada nos dois grupos GE e GCh- pode-se relacionar esses dados com as proposições de que os organismos usariam uma estratégia diferente durante a aquisição do medo ao som e ao contexto. Como colocado anteriormente, uma estratégia de resposta a uma configuração de estímulos tem sido proposta na aquisição do medo ao contexto (Maren *et al.*, 1997). Em função dos dados apresentados, essas considerações, referentes a mamíferos, tornam-se também, relevantes no estudo do condicionamento pavloviano em aves (Reis *et al.*, 1999).

Apesar da evidente participação do hipocampo no condicionamento clássico aversivo, os estudos em ratos demonstram que as lesões hipocampais não interferem na aquisição deste condicionamento, mas sim na recuperação do mesmo (Maren & Holt, 2000). Contudo, não significa que, quando íntegro, ele não participe desse processo, idéia que é reforçada pelos resultados aqui apresentados. Ou seja, a expressão do *zif/268* observada uma hora após o condicionamento, nos grupos GE e GCh, podem ser consideradas como evidências de indução da expressão desse gene, e portanto de ativação neuronal, induzida por aprendizagem.

Uma vez que, um aumento na expressão do *zif/268* na região hipocampal, significa a uma maior ativação neural hipocampal, supõe-se uma maior transmissão dessa atividade neural, levando, conseqüentemente, à ativação de circuitos neurais durante esse processo. As eferências e as aferências hipocampais mostram suas relações com regiões envolvidas no processamento de informações referentes ao condicionamento (Krayniak & Siegel, 1978). Além disso, a característica aversiva desse modelo de condicionamento já destaca a sua relação com o sistema límbico. Quando se considera os circuitos neurais envolvidos nesse processo, é relatado que o hipocampo de aves não recebe projeções diretas do

arquiectriado (sistema homólogo a amígdala em mamíferos), mas sim indiretamente através de projeções do arquiectriado para a região parahipocampal, que por sua vez possui conexões recíprocas com o hipocampo. As aferências hipocámpais para o arquiectriado também 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). Essas conexões fazem parte de toda uma rede neural que estaria envolvida no condicionamento clássico aversivo, sendo que as estruturas presentes recebem e processam informações somatossensoriais. A área septal, o núcleo taenia e o arquiectriado podem ser considerados como áreas retransmissoras dos impulsos do hipocampo e da área parahipocampal para o hipotálamo, sendo este responsável indireto pela expressão do comportamento decorrente do condicionamento. Esse conjunto de informações, juntamente com os dados do presente trabalho, de uma expressão significativamente maior de *zif/268* após o condicionamento clássico aversivo, seria, assim, indicativo de ativação de circuitos neurais.

Esses dados também podem ser interpretados como evidências de plasticidade associada ao IEG *zif/268*, uma vez que o episódio de aprendizagem, nesse caso, o condicionamento clássico aversivo, leva a formação de traços de memória, o que muitas vezes depende da expressão desse gene (Lanahan & Worley, 1998; Walton *et al.*, 1999; Kandel, 2000). Durante o condicionamento clássico aversivo ocorre a ativação de receptores NMDA e de receptores de outros neuromoduladores, que por sua vez ativam sistemas de segundos mensageiros (IP3, PKC, CAM Kinases, etc.). Os segundos mensageiros fosforilam fatores de transcrição (CREB, SRF), que induzem a expressão de famílias de IEGs (Krox 24, Krox 20). Esses IEGs, dentre eles o *zif/268*, também participam como fatores de transcrição de outros genes, responsáveis pela expressão de proteínas formadoras de receptores, e proteínas estruturais, causando alterações no fenótipo sináptico, ou seja, a plasticidade sináptica (Lanahan & Worley, 1998; Walton *et al.*, 1999; Kandel, 2000). Neste caso, os resultados observados neste trabalho podem ser interessantes por levantarem questões a respeito de quais neuromoduladores, e mecanismos de sinalização intracelular estão envolvidos no condicionamento clássico aversivo em pombos. Essas questões permanecem abertas para investigação.

Os resultados apresentados mostram, também, que a marcação da expressão do *zif/268* não foi homogênea no hipocampo. Esses dados podem estar relacionados ao fato de que tal como o hipocampo de mamíferos, o hipocampo de aves não pode ser estudado como uma estrutura única, que funciona homogeneamente, uma vez que possui diferenças intrínsecas em sua organização histológica e na organização topográfica de suas projeções. O fato do hipocampo de aves ser ativado de forma diferente quando o animal é exposto a situações também diferentes sugere que ele seja uma estrutura funcionalmente compartimentalizada. Essa idéia pode ser fundamentada em três fatores principais. O primeiro refere-se às conexões hipocampais e aos tipos celulares localizados em cada região, e às respectivas conexões intrínsecas e extrínsecas envolvidas no condicionamento. Dessa forma poderíamos melhor explicar a maior ou menor ativação das subregiões hipocampais. Porém, ainda não se têm essas informações, adiando conclusões a respeito e ao mesmo tempo estimulando futuros estudos.

Nesse trabalho considerou-se uma subdivisão arbitrária do hipocampo, onde três subregiões podem ser encontradas: região medial, região lateral, e região dorsal. A região medial é caracterizada pela porção medial de um conjunto de células organizadas em forma de V, que é fortemente corada com Nissl (Krebs *et al.*, 1991) e é essencialmente a região definida como hipocampo por Karten e Hodos (1967). A porção lateral desse conjunto de células em V faz parte da região lateral, que tem seu limite lateral margeando medialmente o ventrículo lateral. Já a região dorsal encontra-se dorsalmente às células em V, e medialmente ao ventrículo lateral. Os resultados identificaram uma maior marcação na região medial do hipocampo para o GE, e na região dorsal do hipocampo para o GCh. Não foram encontradas diferenças entre as subregiões hipocampais para os grupos GCM, GCC, e GCS. Provavelmente isso se dá pelo fato de apenas os grupos GE e GCh terem passado pelo processo de aprendizagem relacionados ao condicionamento clássico aversivo. Novamente esses dados evidenciam a indução da expressão do IEG *zif/268* pela aprendizagem.

Apesar desses dois grupos possuírem diferenças em suas marcações, essas não foram semelhantes, uma vez que no grupo GE a região com um número maior de núcleos marcados foi a medial, enquanto que no GCh foi a região dorsal. Esses resultados sugerem que, provavelmente, quando diferentes estímulos estão envolvidos no condicionamento, a

circuitaria envolvida seria diferente, estabelecendo conexões com regiões específicas do hipocampo, de acordo com os estímulos, e os processamentos envolvidos.

Como foi dito anteriormente, estratégias diferentes são utilizadas pelo organismo na aquisição do condicionamento clássico aversivo, levando em consideração a característica do estímulo envolvido. O estímulo pode ser polimodal, exigindo uma estratégia de configuração, ou unimodal, exigindo uma estratégia simples, tendo como exemplos de estímulos o contexto e o som, respectivamente (Maren *et al.*, 1997; Maren & Holt, 2000). Desta forma, circuitos diferentes podem ser ativados em cada caso. Provavelmente essas considerações possam ser estendidas ao condicionamento clássico aversivo em aves, com base nos dados dos animais do grupo GE e GCh. Assim, pode-se relacionar, mais uma vez, o fato de diferentes estímulos, e, possivelmente, diferentes estratégias de aquisição do medo condicionado, levarem à ativação de circuitos específicos. Conseqüentemente, ocorreriam também conexões de regiões específicas do hipocampo, com estruturas associadas a cada circuito. O resultado seria a ativação hipocampal intrínseca diferenciada, constatada neste trabalho pela marcação do IEG *zif/268*.

Um outro fator importante é observar quais tipos celulares estão sendo ativados, para estabelecer as relações entre o tipo celular e as possíveis funções. Neste estudo verificou-se que uma grande marcação ocorreu na região onde se encontram as células piramidais, ou seja, a região em V. Porém, não se pode afirmar que fossem apenas, ou, na sua maioria, células piramidais marcadas, uma vez que outros tipos de células também são encontradas nesta região, como por exemplo células em cesto. Considerando-se a hipótese de serem células piramidais marcadas, podemos tecer comparações com os mamíferos no que diz respeito à participação das células piramidais no processo de aprendizagem e memória. Existe uma extensa literatura mostrando a participação das células piramidais de mamíferos na potenciação a longo prazo (LTP). É possível que no condicionamento clássico aversivo em pombos ocorram processos similares, ou seja, que as células piramidais também participem de processos de LTP hipocampal em pombos. Na realidade, estudos comprovaram que as sinapses na região hipocampal de aves também desencadeiam o processo de LTP (Margrie *et al.*, 1998).

A expressão do *zif/268* tem sido estreitamente correlacionada com a indução de LTP hipocampal em mamíferos (Cole *et al.*, 1989; Wisden *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 2001;),

considerada como sinal de uma forma de plasticidade dependente da síntese de proteína (Bliss & Collingridge, 1993). As presentes observações da expressão do *zif/268* a pombos parecem colocar questões de interesse para a investigação de suas relações com a LTP hipocampal como um processo subjacente ao condicionamento clássico aversivo em pombos. O papel do IEG *zif/286* nesse processo ainda deve ser esclarecido. Na realidade, alguns estudos têm questionado que a potenciação a longo prazo na região hipocampal de aves dependa da ativação dos receptores NMDA (Wieraszko & Ball, 1991). Contudo, deve-se considerar que essas observações referem-se a estudos *in vitro* de uma região específica do hipocampo de galinhas. Desta forma, não é possível dizer qual o real papel desses receptores em processos de LTP em aves. Além disso, como o *zif/268* depende da ativação desse receptor, podemos supor que na potenciação a longo prazo na região hipocampal de pombos, decorrente do condicionamento clássico aversivo, ocorreria a participação do receptor NMDA. Em conclusão às comparações entre LTP na região hipocampal de aves e de mamíferos, juntamente com os resultados apresentados no presente estudo, coloca-se a importância de investigações sobre as formas de plasticidade sináptica envolvendo a aprendizagem na região hipocampal de aves.

É interessante, ainda, considerar os estudos (Krebs *et al.*, 1991), que indicaram uma forte marcação da imunorreatividade à decarboxilase ácido glutâmico (GAD), enzima catalizadora de glutamato em ácido gama-amino-butírico (GABA), em subregiões hipocampais. Os estudos da distribuição de neuromediadores, na região hipocampal, apontada como o terceiro fator a ser considerado, fornecem, ainda, subsídios para a idéia de compartimentalização funcional do hipocampo. Diversos tipos de neuromediadores foram encontrados nas subregiões hipocampais. Como já foi visto anteriormente, o mapeamento da localização desses neuromediadores sugeriu uma divisão hipocampal em seis áreas, distribuídas entre os níveis A3.75 e A9.00, (Erichsen *et al.*, 1991; Krebs *et al.*, 1991).

Relacionando a divisão citada acima, com a divisão considerada neste trabalho, podemos observar que a região aqui definida como hipocampo medial é rica em GAD. No hipocampo de mamíferos, o GAD está estreitamente relacionado com as conexões intrínsecas (Somogyi *et al.*, 1984), o que pode ocorrer de forma similar no hipocampo de aves. Além disso, a região medial do hipocampo de pombos possui uma pequena

concentração de serotonina na porção mais superior, como também aferências colinérgicas, serotonérgicas e catecolaminérgicas, providas pelo tracto medial. As fibras serotoninérgicas deste tracto ascendem para a região dorsal. Algumas fibras do tracto medial terminam na região medial do hipocampo. Isso tudo nos leva a algumas especulações. Podemos supor que durante o condicionamento aversivo ao som, a região medial seria ativada, por meio das aferências colinérgicas que penetram na região hipocampal via tracto medial. Essas aferências seriam projeções de outras estruturas que fazem parte dos circuitos envolvidos neste condicionamento. Provavelmente, dado que essa região é rica em GAD, um grande número de conexões intrínsecas mediadas por GABA, ocorre após a entrada de informações pelo tracto mesencefálico. Uma grande gama de informações provenientes de outras estruturas envolvidas no processamento de informações sensoriais, penetram no hipocampo através do tracto medial. Como parte dessas fibras terminam nessa região, ativam diversas células, possivelmente justificando assim a grande marcação encontrada aqui.

A região dorsal é caracterizada principalmente por uma grande quantidade de serotonina, igualmente distribuída em toda a região. Nesta região observam-se também terminações de fibras do tracto medial e a presença de GAD. O fato de fibras do tracto medial terminarem nesta região também as colocam em uma situação de conexão direta com as estruturas envolvidas no condicionamento. Provavelmente deve-se a isso a grande ativação do hipocampo dorsal durante o condicionamento clássico, principalmente ao contexto. Já o hipocampo lateral não possui conexão aferentes com outras estrutura, apenas conexões hipocampais intrínsecas. É possível, assim, que haja uma interação modulatória dessa região sobre as outras regiões hipocampais. Para uma análise mais precisa seria de grande importância uma dupla marcação, ou seja, a marcação do IEG *zif/268*, juntamente com a marcação dos neuromediadores, para determinar então que tipo de neuromediadores estão envolvidos nessa circuitaria hipocampal intrínseca. Esses dados juntamente com a verificação de quais tipos celulares estão sendo ativados provavelmente nos trariam conclusões importantes.

Certamente este estudo contribuiu com importantes considerações, e principalmente, estimulou novos questionamentos, na tentativa de melhores elucidação das

relações entre aprendizagem e memória aversiva em pombos, hipocampo, e eventos bioquímicos e moleculares.

6. Referência Bibliográfica

- Antoniadis EA, McDonald RJ. 2000. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav Brain Res.* 108(1):1-19.
- Antoniadis EA, McDonald RJ. 2000. Amygdala, hippocampus, and unconditioned fear. *Exp Brain Res.* 138(2):200-209.
- Benowitz LI, Karten HJ. 1976. The tractus infundibuli and other afferents to the parahippocampal region of the pigeon. *Brain Res.* 102:174-180.
- Berluchi G, Buchtel HA. 1976. Some trends in the neurological study learning. In: Handbook of Psychobiology, Gasaniga, M.S. & Bhakemore, C.: *Academic Press. New York*; cap. 16.
- Bingman VP, Bagnoli P, Ioalè P, Casini G. 1989. Behavioral and anatomical studies of the avian hippocampus. *Hippocampus.* 379-394.
- Bingman VP, Casini G, Nocjar C, Jones T. 1994. Connectons of the piriform cortex in homing pigeons (*Columba livia*) studied with fast blue and WGA-HRP. *Brain Behav Evol.* 43:206-218.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE. 2001. Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem.* 8(5):229-242.
- Bliss TVP, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate gyrus of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232:331-356.
- Bliss TVP, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361:31-39.
- Bouille C, Raymond J, Bayle JD. 1977. Retrograde transport of horseradish peroxidase from the nucleus posterior medialis hypothalami to the hippocampus and the medial septum in the pigeon. *Neuroscience.* 2:435-439.
- Campbell CBG, Hodos W. 1970. The concept of homology and the evolution of the nervous system. *Brain Behav Evol.* 3:353-367.
- Campeau S, Falls WA, Cullinan WE, Helmreich DL, Davis M, Watson SJ. 1997. Elicitation and reduction of fear: behavioral and neuroendocrine indices and brain induction of the immediate-early gene c-fos. *Neuroscience.* 78:1087-1104.

- Campeau S, Hayward MD, Hope BT, Rosen JB, Nestler EJ, Davis M. 1991. Induction of c-fos proto-oncogene in rat amigdala during inconditioned and comditined fear. *Brain Res.* 565:349-352.
- Casini G, Bingman VP, Bagnoli P. 1986. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and H-Proline. *J Comp Neurol.* 245:454-470.
- Carlson NR. 1998. in: Physiology of Behavior. Boston, London, Toronto, Sydney, Tokyo and Singapore: Allyn and Bacon.. 409-450.
- Catania AC. 1999. in: Aprendizagem: Comportamento, Linguagem e Cognição. P.Alegre: Artmed Editora.
- Christy B, Lau L, Nathans D. 1989. DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif 268. *Proc Acad Sci. USA* 86:8737-8741.
- Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF. 1989. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neuron by synaptic NMDA receptor activation. *Nature.* 340: 474-476.
- Colombo M, Brodbent N. 2000. Is the avian hippocampus a functional homologue of the mammalian hippocampus? *Neurosci Biobehav Rev.* 24: 45-484.
- Colombo M, Swain N, Harper D, Alsop B. 1997. The effects of hippocampal and area parahippocampalis lesions in pigeons. I. Delayed matching to sample. *Exp Psychol.* 50B:149-171.
- Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. 1992. The Hippocampus-What does it do? *Behav Neural Biol.* 57:2-36.
- Eichenbaum H. 1999. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav Brain Res.* 103(2):123-133.
- Erichisen JT, Bingman VP, Krebs JR. 1991. The distribution of neuropeptides in the dorsomedial telencephalonof the pigeon (*Columba livia*): a basis for regional subdivisions. *J Comp Neurol.* 314:478-492.
- Good M. 1987. The effects of hippocampal-area parahippocampalis lesions on discrimination learning in the pigeon. *Behav Brain Res.* 26:171-184.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci.* 21(6):2186-2193.

- Hanley MR. 1988. Proto-oncogenes in the nervous system. *Neuron*. 1:175-182.
- Holt W, Maren S. 1999. Muscimolinactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci*. 19(20):9054-9062.
- Howard E, Otto T. 1992. The hippocampus-What does it do? *Behav Neural Biol*. 57:2-36.
- Izquierdo I, Medina JH. 1993. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expresión. *Brazilian J Med Biol Res*. 26:573-589.
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S. 2001. A requirement for the immediate early gene ZIF268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neurosci*. 4(3):289-296.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. 2000. in: Principles of Neural Science. N.Y.: McGraw-Hill.
- Kandel ER. 2000. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*. 294(5544):1030.
- Karten HJ, Hodos W. 1967. A stereotaxic Atlas of the Brain of the Pigeon. *Baltimore: Johns Hopkins University Press*.
- Kim JJ, Fanselow MS 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256:675-677.
- Krayniak PF, Siegal A. 1978. Efferent connections of the hippocampus and adjacent regions in the pigeons. *Brain Behav Evol*. 15:372-388.
- Krayniak PF, Siegal A. 1978. Efferent connections of the septal area pigeon. *Brain Behav Evol*. 15:389-404.
- Krebs JR, Erichsen JT, Bingman VP. 1991. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol*. 314:467-477.
- Lanahan A, Worley P. 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiology Learn Mem*. 70:37-43.
- LeDouw JE, Ciachet P, Xagoraris A, Romanski LM. 1990. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci*. 10:1062-1069.
- Macphail E. 1982 Brain and intelligent in vertebrates. *Oxford: Oxford Claredon Press*; 1982.

- Malkani S and Rosen JB 2000 Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience*. 97:693-702.
- Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. 1997. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behav Brain Res*. 88:261-274.
- Maren S, Holt W. 2000. The hippocampus and contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. *Behav Brain Res*. 110:97-108
- Margrie TW, Rostas JAP, Sah P. 1998. Long-term potentiation of synaptic transmission in the avian hippocampus. *J Neurosci*. 18(4):1207-1216.
- McCabe JB, Horn G. 1994. Learning-related changes in Fos-like immunoreactivity in the chick forebrain after imprinting. *Proc Acad Sci* 91:11417-11421.
- Mello CV, Clayton DF. 1994. Song-induced Zenk gene expression in auditory pathways of songbird brain and its relation to the song control system. *Journal Neurosci*. 14(11): 6652-6666.
- Milbrandt J. 1987. A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science*. 238:797-799.
- Morgan JJ, Curran T. 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci*. 14:421-451.
- Morris RGM, Kandel ER, Squire LR. 1988. The neuroscience of learning and memory: cell neural circuits and behavior. *Trends Neurosci*. 11(4): 125-127.
- Penick S and Solomon PR. 1991. Hippocampus, context, and conditioning. *Behav Neurosci*. 105(5): 611-617.
- Phillips RG, LeDoux JE. 1994. Lesion of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. *Learn Mem*. 1:34-44.
- Pia HW. 1985. Plasticity of the central nervous system a neurosurgeon's experience of cerebral compensation and decompensation. *Acta Neuroch* 77: 81-102.
- Reis F, Schenka AA, Melo LL, Ferrari EAM. 1999. Role of the hippocampus in the contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons (*C. livia*). *Braz Med Biol Res*. 32:1127-1131.
- Richardson CL, Tate WP, Mason SE, Lawlor PA, Dragunow M, Abraham WC. 1991. Correlation between the induction of an immediate early gene, *zif/268*, and long-term potentiation in the dentate gyrus. *Brain Res*. 580:147-154.

- Roberts LA, Higgins MJ, O'Shaughnessy CT, Stone TW, Morris BJ. 1996. Changes in hippocampal gene expression associated with the induction of long-term potentiation. *Mol Brain Res.* 42:123-127.
- Saffen K, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K, Baraban JM. 1988. Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rats brain. *Proc Acad Sci. USA* 85:7795-7799.
- Schafe GE, Nader K, Blair J, LeDoux JE. 2001. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.* 24(9):540-546.
- Selden NRW, Everitt BJ, Jarrard LE, Robbins TW. 1991. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience.* 42(2):335-350.
- Sheng M, Greenberg ME. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 4:477-485.
- Shimizu T, Karten HJ. 1990. Immunohistochemical analysis of the visual wulst of the pigeon (*Columba livia*). *J Comp Neurol.* 300:346-369.
- Somogyi P, Hodson AJ, Smith AD, nunzi MG, Gorio A, Wu JY. 1984. Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystokinin-immunoreactive material. *J Neurosci.* 4:2590-2603.
- Staddon JER. 1983. Adaptive behavior and learning. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Székel AD. 1999. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. *Behav Brain Res.* 98:219-225.
- Teyler TJ, Discenna P. 1985. The role of hippocampus in memory: a hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev.* 9:377-389.
- Tischmeyer W, Grimm R. 1999. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol.* 55(4): 564-574.
- Tulving E, Thomson DM. 1973. Encoding specificity and retrieval processes in episodic memory. *Psychol Rev.* 80:352-373.
- Walton M, Henderson C, Mason-Parker S, Lawlor P, Abraham WC, Bilkey D, Dragunow M. 1999. Immediate early gene transcription and synaptic. *J Neurosci Res* 58:96-106.
- Watanabe S. 2001. Effects of hippocampus lesions on repeated acquisition of spatial discrimination in pigeons. *Behav Brain Res.* 120:59-66.

- Whitney O, Soderstrom K, Johson Frank. 2000. Post-transcriptional regulation of zenk expression associated with zebra finch vocal development. *Mol Brain Res.* 80:279-290.
- Wieraszko A, Ball GF. 1991. Long-term enhancement of synaptic responses in the songbird of the hippocampus. *Brain Res.* 538:102-106.
- Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TUP, Hunt SP. 1990. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron.* 4: 603-614.

Apêndice

Tabela 1: Densidade de núcleos marcados por mm^2 nas regiões hipocâmpais dos animais do grupo experimental GE

Regiões	Densidade de núcleos marcados por mm^2 /Animais					
	GE1	GE2	GE3	GE4	GE5	GE6
HM	379,161	236.602	333,374	380,870	210,588	352,430
HL	114,063	104,361	180,925	191,066	152,456	167,327
HD	133,533	176,568	421,137	304,083	198,021	210,230
Σ	626,757	517,531	935,436	876,019	561,065	729,987
Média	208,919	175,510	311,812	292,006	187,021	243,329
EP	86,172	38,616	70,888	55,683	17,838	56,506

Tabela 2: Densidade de núcleos marcados por mm^2 nas regiões hipocâmpais dos animais do grupo choque- GCh

Regiões	Densidade de núcleos marcados por mm^2 /Animais					
	GCh1	GCh2	GCh3	GCh4	GCh5	GCh6
HM	104,130	197,979	246,554	163,082	170,458	178,127
HL	88,633	102,043	57,968	205,994	157,825	137,273
HD	197,973	241,798	175,876	347,727	234,282	258,458
Σ	390,736	541,82	480,398	716,803	562,505	573,858
Média	130,245	180,606	160,132	238,934	187,501	191,286
EP	34,504	41,687	55,564	56,355	23,903	35,957

Tabela 3: Densidade de núcleos marcados por mm^2 nas regiões hipocâmpais dos animais do grupo controle ao som-GCS

Regiões	Densidade de núcleos marcados por mm^2 /Animais					
	GCS1	GCS2	GCS3	GCS4	GCS5	GCS6
HM	131.143	167.941	234.705	161.970	198.312	228.907
HL	88.698	137.826	74.054	125.892	127.221	153.295
HD	179.005	195.133	168.907	255.029	257.510	147.521
Σ	398.846	500.900	477.666	542.891	583.043	529.723
Média	132.948	166.966	159.222	180.963	194.347	176.574
EP	26.349	16.718	47.101	38.859	38.045	26.485

Tabela 4: Densidade de núcleos marcados por mm^2 nas regiões hipocâmpais dos animais do grupo controle ao contexto-GCC

Regiões	Densidade de núcleos marcados por mm^2 /Animais					
	GCC1	GCC2	GCC3	GCC4	GCC5	GCC6
HM	118.176	166.380	94.596	82.224	92.920	42.591
HL	54.489	211.429	68.548	104.784	81.022	45.327
HD	160.618	195.134	105.587	144.550	51.734	56.763
Σ	333.283	572.943	268.731	331.558	225.676	144.681
Média	111.094	190.981	89.577	110.519	75.225	48.227
EP	31.153	13.302	11.094	18.404	12.361	4.384

Tabela 5: Densidade de núcleos marcados por mm^2 nas regiões hipocâmpais dos animais do grupo controle manipulação-GCM

Regiões	Densidade de núcleos marcados por mm^2 /Animais					
	GCM1	GCM2	GCM3	GCM4	GCM5	GCM6
HM	152,079	125,538	117,956	78,420	151,285	94,639
HL	92,555	114,401	88,029	33,324	99,654	115,832
HD	95,232	170,740	112,127	32,969	118,009	125,707
Σ	339,866	410,679	318,112	144,713	368,948	336,178
Média	113,288	136,893	106,037	48,237	122,982	112,059
EP	19,607	17,401	9,253	15,244	15,264	9,257