

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MAGDA ALINE DENADAI

EFEITOS DO 7-NITROINDAZOLE, UM INIBIDOR DA SINTASE NEURONAL DO
ÓXIDO NITRICO (nNOS), SOBRE O CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL EM
POMBOS.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Magda Aline Denadai
e aprovada pela Comissão Julgadora.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Elenice", with a stylized flourish.

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

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

Campinas, 2008

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

D41e	Denadai, Magda Aline Efeitos do 7-nitroindazole, um inibidor da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) sobre o condicionamento contextual em pombos / Magda Aline Denadai. – Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientadora: Elenice Aparecida Moraes Ferrari. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Condicionamento clássico. 2. Hipocampo (Cérebro). 3. Óxido nítrico sintase. 4. 7-nitroindazole. 5. Congelamento. I. Ferrari, Elenice Aparecida Moraes, 1945-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (scs/ib)
-------------	---

Título em inglês: Effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on contextual fear memory in pigeons.

Palavras-chave em inglês: Classical conditioning; Hippocampus (Brain); Nitric oxide synthase; 7-nitroindazole; Freezing.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Elenice Aparecida Moraes Ferrari, Simone Aparecida Teixeira, Carlos Almicar Parada.

Data da defesa: 29/08/2008.

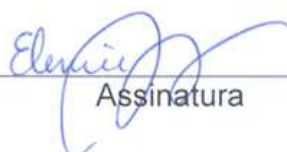
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 29 de agosto de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. ELENICE APARECIDA DE MORAES FERRARI

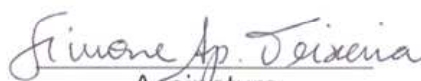
(Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. CARLOS AMÍLCAR PARADA


Assinatura

Profa. Dra. SIMONE APARECIDA TEIXEIRA


Assinatura

Prof. Dr. CLÁUDIO ANTONIO BARBOSA DE TOLEDO

Assinatura

Profa. Dra. DORA MARIA GRASSI-KASSISSE

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Prof^a Dr^a Elenice A. de Moraes Ferrari pelo carinho e dedicação que foram o cenário desta relação de aluno e professor orientador. Agradeço também pela oportunidade e pelos conhecimentos adquiridos ao longo desta jornada.

Ao prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscará que cedeu espaço no laboratório de Farmacologia no ICB-USP para que as análises referentes à atividade da NOS pudessem ser realizadas.

Gostaria de fazer um agradecimento, em especial, à prof^a. Dr.^a Simone Aparecida Teixeira, por sua simpatia, sua disposição e paciência em ensinar-me as técnicas referentes à análise da atividade da NOS, certamente sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao prof. Dr. Francesco Langone que gentilmente disponibilizou seu laboratório para que as análises de *Western blot* fossem realizadas.

Ao colega André S. Vieira pela paciência com que ensina a técnica de *Western Blot* aos aspirantes e pelas preciosas sugestões na interpretação dos dados.

A colega Adriana do Carmo Gentil Fornel, por ter me ensinado a manipular os animais, a trabalhar com a droga utilizada, e a perceber e interpretar os dados comportamentais.

Agradeço, em especial pela amizade dos colegas de laboratório: Elayne Vieira Dias, Fernando Canova, Francine Higashi, Grazieli Fraga, Peterson Bristotte e Sabrina Quintão Pereira pelos momentos de partilha, de descontração e de pesar por que passamos. Vocês estarão sempre em meu coração.

Quero agradecer de forma especial a Elayne que foi meu braço direito (e esquerdo) no laboratório, socorreu-me nos momentos mais difíceis em que necessitei estar ausente. Foram longas e preciosas as discussões para interpretar os dados dos trabalhos realizados, e, não menos importantes, nem menos longas, as conversas para entender e interpretar os fatos da vida. Certamente esta é uma amizade que nunca esquecerei. Você estará sempre em meu coração. Obrigada.

Agradeço também à minha família, que me proporcionou a oportunidade de viver e, por isso, desenvolver este trabalho. Agradeço, em especial, a minha sobrinha Lara Denadai Rentes, pelo olhar de inocência e carinho que me olha todos os dias. Te amo.

A todas as pessoas do departamento: alunos, professores e funcionários, pelo dia a dia amigável. Particularmente, ao Washington Luiz Gomes pelos ensinamentos técnicos e ajuda com os animais.

Aos animais, sem eles o trabalho seria impossível.

Lista de abreviaturas

AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metilixazole-4-ácido propiônico
ANOVA	Análise de variância
APH	Área parahipocampal
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
Ca ⁺⁺	Cálcio
CaMKII	Cálcio-calmodulina quinase II
CCK	Colecistoquinina
CO	Monóxido de Carbono
DNQX	6,7-Dinitro-Quinoxalina-2,3-Diona
EC	Estímulo Condicionado
EI	Estímulo Incondicionado
EXP	Exploração
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
eNOS	Isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico
FAD	Flavina Adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FRZ	Congelamento
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC	Grupo Controle
GLU	Glutamato
GM	Grupo Manipulação
GTP	Guanosina Trifosfato

GV	Grupo Veículo
G7-NI	Grupo 7-Nitroindazole
Hp	Hipocampo
HpD	Hipocampo Dorsal
HpV	Hipocampo Ventral
IEG	Gene de Expressão Imediata
iNOS	Isoforma induzível da sintase do óxido nítrico
LENK	Leucina Encefalina
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
L-NIO	Nitro-imino-ornitina
LOC	Locomoção
LPS	Lipopolissacarídeo
LTP	Potenciação a longo prazo
MAN	Manutenção
Mg ⁺⁺	Magnésio
MOV	Movimentos Gerais
Na ⁺⁺	Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NHA	N ^G -Hidroxi-L-arginina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
nNOS	Isoforma neuronal da sintase do óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y

PAR	Parado
PKA	Proteína quinase A
PRE	Pré exploratório
RC	Resposta Condicionada
RI	Resposta Incondicionada
sGC	Guanilato Ciclase Solúvel
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TTX	Tetrodotoxina
VIP	Neuropeptídeo Vasoativo
7-NI	7-nitroindazole

RESUMO

DENADAI, M. A. **Efeitos do 7-nitroindazole, inibidor da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS), sobre o condicionamento contextual em pombos.** 2008, 73 p.

O óxido nítrico (NO), um neurotransmissor não convencional, tem papel importante em processos neurobiológicos de comportamento e de memória. Sua síntese é mediada por três isoformas de sintase do óxido nítrico (NOS): a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e induzível (iNOS). Este trabalho analisou o efeito do 7-nitroindazole (7-NI), um inibidor seletivo da nNOS, no condicionamento clássico aversivo em pombos. Foram usados 4 grupos: tratados com 7-NI (grupo 7-nitroindazole; G7-NI, n=5), tratados com óleo de amendoim (grupo veículo; GV, n=5), controle/sem tratamento (grupo controle; GC, n=5) e grupo não tratado/não condicionado (grupo manipulação; GM, n=5). A administração i.p. de 7-NI (25 mg/kg), ou do óleo de amendoim foi feita imediatamente após o treinamento. O G7-NI, o GV e o GC receberam três associações som-choque (5°, 10° e 15° minutos) numa sessão de 20 min. O teste ao contexto foi realizado 24 horas depois. As sessões foram gravadas para posterior transcrição e análise comportamental. A ocorrência da resposta de congelamento durante o treino não diferiu entre os grupos ($p>0,05$), mas durante o teste foi menor para o G7-NI em comparação ao treino ($p<0,01$) e aos demais grupos no teste ($p<0,001$). A atividade da NOS dependente de Ca^{++} no hipocampo foi menor no G7-NI do que nos outros grupos ($p<0,01$). Análise por *Western blot* indicou aumento na expressão de nNOS no G7-NI ($p<0,05$). A administração sistêmica de 7-NI teve um efeito amnésico sobre a memória contextual aversiva, indicando que a atividade da NOS dependente de Ca^{++} é importante para os processos de condicionamento clássico aversivo em pombos.

Palavras-chave: condicionamento clássico, hipocampo (cérebro), óxido nítrico sintase, 7-NI, congelamento.

ABSTRACT

DENADAI, M. A. **Effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on contextual fear memory in pigeons.** 2008, 73 p.

Nitric oxide (NO) is an unusual neurotransmitter that plays an important role in neurobiological functions underlying behavior and memory. NO synthesis and release can be mediated by three isoforms of NO synthases (NOS): neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS). This study examined the effect of 7-nitroindazole (7-NI), a selective nNOS inhibitor, on contextual fear conditioning in pigeons. Four groups of pigeons were used: treated with 7-NI (7-NI; n=5), treated with peanut oil (Vehicle; n=5), non treated controls (Control; n=5) and non treated and no-trained controls (Non-trained; n=5). Treatment consisted in 7-NI (25 mg/kg; i.p.) or vehicle (peanut oil) administration, immediately after training. All the animals were trained in one 20 min session during which three tone-shock pairings (5th, 10th and 15th minutes) were presented. The test to the context was conducted 24h later. Behavioral categories were analyzed through the transcription of video-tapes of the sessions. The groups 7-NI, Vehicle and Control showed no significant differences in freezing during the conditioning session ($p>0.05$). During the test to the context the group 7-NI expressed significantly lower freezing as compared to Vehicle and Control ($p<0.05$). The 7-NI pigeons showed lower hippocampal activity of Ca^{++} dependent-NOS than Vehicle and Control groups ($p<0.01$). Western blot analysis indicated significant increase in nNOS expression ($p<0.05$). The systemic administration of 7-NI induced amnesic effects on contextual fear memory that evidence that Ca^{++} -dependent NOS activity is required for fear conditioning in pigeons.

Key words: Classical conditioning; Hippocampus (Brain); Nitric oxide synthase; 7-nitroindazole; Freezing.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Condicionamento clássico aversivo e o hipocampo	16
1.2. Hipocampo, transmissão glutamatérgica e a regulação de mecanismos sinápticos envolvidos em aprendizado e memória	22
1.3. Hipocampo, transmissão glutamatérgica e a síntese de NO	23
1.4. Participação do NO em processos de aprendizagem e memória	26
1.5. Caracterização anatômica do sistema hipocampal em aves	30
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivos gerais	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Sujeitos	34
3.2. Procedimentos	36
3.2.1. Droga	36
3.2.2. Adaptações às condições de biotério	36
3.2.3. Implante de eletrodos	36
3.2.4. Adaptação às condições de laboratório	37
3.2.5. Treino em condicionamento som-choque	37
3.2.6. Teste ao contexto de condicionamento	38

3.2.7.	Análise da atividade da NOS <i>ex-vivo</i>	38
3.2.8.	Análise semi-quantitativa da nNOS	40
3.3.	Análise comportamental	42
3.4.	Análise estatística dos dados	44
4.	RESULTADOS	45
4.1.	Efeitos do 7-NI sobre o comportamento dos pombos em situação de condicionamento clássico aversivo	45
4.2.	Efeitos da 7-NI na atividade da NOS dependente de Ca ⁺⁺ no hipocampo de pombos	51
4.3.	Avaliação da expressão protéica da nNOS no hipocampo	52
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8.	APÊNDICE	74

1. INTRODUÇÃO

A memória relaciona-se com os processos pelos quais um animal adquire, conserva e evoca informações. Essa capacidade é vital para a sobrevivência dos organismos em geral, pois é graças a ela que é possível registrar as experiências, codificá-las e armazená-las no sistema nervoso e usar as informações armazenadas para a interação e adaptação ao meio ambiente (DUNNING *et al.*, 2003; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

O processo de formação da memória resulta das interações com o ambiente físico, químico e social que um organismo experiencia ao longo de sua vida. Dessa forma, a memória está relacionada com mudanças comportamentais e também com alterações em nível celular e molecular que ocorrem no sistema nervoso.

Quanto ao tempo, a memória pode ser classificada em memória de curta duração que dura de segundos a minutos e não é dependente de síntese de proteínas e a memória de longa duração que persiste por horas, dias e até meses e é dependente da síntese de novas proteínas (KANDEL, 2001; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007).

As estimulações do ambiente são detectadas por receptores sensoriais, codificadas, transmitidas e processadas no sistema nervoso central (SNC), envolvendo mecanismos celulares e moleculares tais como, ativação de vias de sinalização intracelular, de proteínas quinases e de fatores de transcrição gênica.

Pode-se considerar que o aumento dos níveis de cálcio (Ca^{++}) intracelular é um fator determinante nesse processo (IZQUIERDO *et al.*, 1999; KANDEL *et al.*, 2000; SCHAFE *et al.*, 2001; LAMPRECHT e LEDOUX, 2004).

A sequência de eventos bioquímicos responsáveis pela formação de novas memórias, descrita como ocorrendo principalmente no hipocampo (Hp), tem sido demonstrada, discutida e relacionada ao processo de Potenciação de Longa Duração (LTP). A LTP envolve o glutamato (Glu) e seus receptores pós-sinápticos, especificamente os do tipo AMPA (alfa-amino-3-hidróxi-5-metilixazole-4-ácido propiônico) e os N-metil-D-aspartato (NMDA). Quando o estímulo produz frequências de potencial de ação relativamente fracas, apenas os receptores AMPA são ativados. Isso permite o influxo de sódio (Na^+) através desses canais.

Nessas condições os receptores NMDA não permitem influxo de íons porque permanecem bloqueados por íons magnésio (Mg^{++}). Níveis mais altos de despolarização da membrana pós-sináptica, obtidos por estímulo de alta frequência, promovem a expulsão do Mg^{++} liberando o canal, permitindo o influxo de cátions, principalmente de Ca^{++} que aciona vias de sinalização intracelular que provocam a inserção de receptores AMPA na membrana pós-sináptica resultando no aumento da sensibilidade desta ao Glu (MAREN e BAUDRY, 1995; JOHNSON *et al.*, 2000).

Como resultado, ocorre um fortalecimento da sinapse em questão, caracterizada pela manutenção da atividade sináptica durante um período prolongado. Esses mecanismos caracterizam a fase conhecida como LTP inicial que pode durar alguns minutos ou algumas horas. A partir daí, com repetidas séries de estimulação, o Ca^{++} ativa vias de sinalização intracelular, entre elas da

Proteína quinase A (PKA), que se transloca para o núcleo promovendo a expressão de genes que induzem alterações estruturais na célula, tal como o crescimento de terminais axonais e de espinhas dendríticas. Esses mecanismos caracterizam a fase tardia da LTP (LU *et al.* , 1999; KANDEL, 2001).

Esse processo de fortalecimento da atividade sináptica demonstra que o sistema nervoso tem capacidade de alterar sua função em resposta a influências ambientais que o atingem e é denominado neuroplasticidade. A plasticidade sináptica, um tipo de neuroplasticidade, é caracterizada pelas mudanças que ocorrem na sinapse em função de estimulação dessas vias por meio do aprendizado, sendo um mecanismo celular básico para o aprendizado e a memória (MAREN *et al.*, 1997; PANG e LU, 2004; LE ROUX *et al.*, 2008).

1.1. Condicionamento clássico aversivo e o hipocampo.

Um modo muito conhecido de estudar o aprendizado e a memória em laboratório é o condicionamento clássico, também denominado Pavloviano ou respondente, que se refere a uma classe de aprendizagem que envolve relações de controle de estímulo nas quais, um estímulo sinaliza a apresentação de outro (RESCORLA, 1969).

O estímulo incondicionado (EI) elicia respostas que ocorrem independentemente do aprendizado e são chamadas de respostas incondicionadas (KANDEL, 2001, WHITE e SALINAS, 2003). Se ocorrer uma associação entre o EI e outro estímulo qualquer, o condicionamento pode ser estabelecido e a partir desse momento o segundo estímulo passa a ser um

estímulo condicionado (EC). A partir de associações repetidas entre os dois estímulos, com um intervalo temporal ótimo, ou seja, o EC deve ocorrer imediatamente após a apresentação do EI, o EC passa a eliciar o comportamento relacionado ao EI, ou seja, a resposta condicionada (RC) (MAREN, 2001). Desse modo o EC parece se tornar um sinal de antecipação para o EI, dessa forma o animal adquire a capacidade de prever a apresentação de estímulos. Nessas situações o EI também é associado com o ambiente onde o condicionamento ocorre, comumente denominado como contexto de treinamento (LANDEIRA-FERNANDEZ, 1996; REIS *et al.*, 1999), ou seja, existe a associação entre o EI com o EC e o contexto no qual eles são apresentados.

Esse tipo de aprendizagem é importante para o animal, pois lhe fornece a capacidade de prever e antecipar eventos e de reagir de forma mais adequada frente aos estímulos. Isso é importante do ponto de vista evolutivo e adaptativo, uma vez que está associado à sobrevivência e, portanto, à preservação da espécie.

Por ser um tipo de aprendizado simples que elicia, no animal, respostas evidentes e de mensuração relativamente fácil, permitindo uma grande variável de manipulação e controle pelo experimentador, é um modelo bastante válido para os estudos de aprendizado e memória em laboratório (SANDERS *et al.*, 2003).

O condicionamento clássico aversivo também é chamado de condicionamento do medo, visto que os animais são submetidos a uma situação aversiva e expressam reações que fazem parte do repertório de defesa. Nestas condições, onde um choque elétrico é comumente utilizado como EI, observa-se que os animais respondem a esse EI com comportamentos incondicionados

característicos da espécie e que independe do aprendizado, chamada resposta incondicionada (RI). Quando outro estímulo, tal como um som, é associado ao EI ele se torna um estímulo condicionado (EC) e adquire a capacidade de eliciar respostas condicionadas (KANDEL, 2000; MAREN, 2001; MAREN e QUIRK, 2004; PEZZE e FELDON, 2004; KIM e JUNG, 2006), ou seja, passa a controlar os comportamentos que são eliciados pelo EI. Assim, quando há somente a apresentação do EC após o condicionamento são observadas respostas condicionadas comportamentais vegetativas (MAREN, 2001; KIM e JUNG, 2006) e endócrinas como congelamento, aumento dos batimentos cardíacos, alterações gastrointestinais, da pressão sanguínea, da temperatura corporal e aumento de sobressaltos (FENDT e FANSELOW, 1999; MAREN, 2001; SCHAFE *et al.*, 2001; MAREN e QUIRK, 2004; PEZZE e FELDON, 2004; KIM e JUNG, 2006). Nestas situações também ocorre uma associação entre o EI e o ambiente onde ele ocorre (MAREN, *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 1999; MAREN e HOLT, 2000).

A resposta mais comumente observada quando o animal é re-exposto ao ambiente do condicionamento, mesmo na ausência do som e do choque, é uma imobilidade somática total e tensa, chamada de resposta de congelamento (*freezing*). Em roedores como o rato e o camundongo a resposta de congelamento pode ser evidenciada pela ausência de qualquer movimento com exceção dos movimentos respiratórios (HALL *et al.*, 2001). Um pombo que mostra uma resposta de congelamento apresenta comportamentos como permanecer geralmente em um canto da caixa experimental, imóvel, com o corpo encolhido ou inclinado para frente apresentando apoio peitoral na parede ou piso da caixa, a base alargada, as asas em desnível com a cauda, extensão restrita do pescoço,

cabeça direcionada para um ponto fixo, olhos abertos e respiração ofegante (REIS *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2006).

Um dos primeiros trabalhos analisando o papel do hipocampo na consolidação da memória emocional aversiva em ratos foi desenvolvido por Kim & Fanselow (1992), que usaram o pareamento som e choque elétrico, e lesões no Hp 1, 7, 14, ou 28 dias após o treino. Os animais com lesão 1 dia pós-treino tiveram menor ocorrência de resposta de congelamento ou imobilidade tensa quando re-expostos ao ambiente em que receberam o choque (contexto). Quando testados em outro contexto com reapresentação do som, todos os animais dos diferentes grupos apresentaram congelamento.

A partir desse trabalho, muitos outros foram realizados para analisar o papel do contexto na aprendizagem e na memória, bem como a função do hipocampo na memória contextual (MAREN *et al.*, 1997; HOLT e MAREN, 1999; REIS *et al.*, 1999; MAREN e HOLT, 2000). Uma das funções do hipocampo seria montar uma representação contextual que poderia se tornar associada com um estímulo incondicionado, tal como um choque. Assim, os mecanismos de plasticidade e de memória do hipocampo seriam fundamentais no circuito neural do condicionamento aversivo (FANSELOW, 2000; IZQUIERDO e MEDINA, 1993; PHILLIPS e LEDOUX, 1994; MAREN *et al.*, 1997; PANG e LU, 2004).

Bast *et al.* (2001) analisaram se a atividade neuronal dentro do hipocampo ventral é necessária para a formação da memória contextual aversiva. Para isso eles infundiram bilateralmente no hipocampo ventral de ratos tetrodotoxina (TTX; 10ng) que bloqueia a atividade neuronal ou muscimol (1 µg) que age em sinapses inibitórias mediadas pelo ácido gama-aminobutírico (GABA). Os ratos receberam

infusão de TTX ou de muscimol e foram submetidos a sessão de condicionamento. Os animais que receberam TTX tiveram um prejuízo no medo condicionado tanto ao som quanto ao contexto e os animais que receberam o muscimol apresentaram prejuízo apenas no medo condicionado ao contexto. Os dados deste estudo indicam que a atividade de neurônios do hipocampo ventral é necessária para a formação da memória de medo e que os neurônios hipocámpais que expressam os receptores para o GABA são necessários para a formação da memória contextual aversiva.

Lehmann *et al.* (2007) analisaram os efeitos de danos parciais ou completos ao hipocampo, na retenção da resposta de medo condicionado ao contexto. Os ratos passaram por uma sessão de condicionamento clássico aversivo e, então, tiveram seus hipocampos parcialmente ou totalmente danificados 1 semana, 3 meses ou 6 meses depois por meio de lesão excitotóxica. No teste ao contexto, realizado 2 semanas após a cirurgia, os ratos controles (sem lesão), mostraram níveis elevados de congelamento, embora esses níveis diminuíssem significativamente nos intervalos mais longos. Os ratos com lesão hipocámpal total mostraram níveis muito baixos de congelamento, que foi diminuindo em função do intervalo de tempo da cirurgia. O dano parcial também provocou déficits na formação da memória, porém um pouco menor quando comparado aos animais totalmente lesados. Esse déficit foi diminuindo à medida que o intervalo de tempo da cirurgia se tornou maior. Dessa forma, a gravidade da amnésia retrógrada para o medo condicionado ao contexto está diretamente relacionada com a extensão do dano hipocámpal. Estes achados apóiam a idéia de que a formação

hipocampal tem papel essencial na formação da memória contextual aversiva de longa duração.

Reis *et al.* (1999) estudaram a função do hipocampo de pombos no condicionamento clássico com associações som-choque e relataram menor porcentagem de ocorrência de congelamento ao contexto em pombos que, 24 horas após o treino em condicionamento aversivo, sofreram lesões hipocampais. O condicionamento ao som foi mantido após a lesão, replicando assim os dados de Kim & Fanselow (1992) e enfatizando a importância do hipocampo na modulação da memória emocional aversiva em pombos.

Brito, Britto e Ferrari (2006) analisaram a expressão do produto do proto-oncogene *zenk* no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo. Para isso utilizou 4 grupos: som-choque; choque; contexto e som. O estudo comportamental revelou maior incidência de congelamento durante a sessão do treino nos animais do grupo som-choque e choque. As análises bioquímicas mostraram maior expressão do referido gene no hipocampo medial do grupo som-choque e no hipocampo dorsal para o grupo choque.

Em 2005, Sperandéo avaliou a expressão imunorreativa à proteína-produto do gene de expressão imediata (IEG) *zenk* no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo, detectando maior número de núcleos neuronais imunorreativos no hipocampo, em comparação ao hipocampo dorsal (HpD), após o teste ao contexto.

1.2. Hipocampo, transmissão glutamatérgica e a regulação de mecanismos sinápticos envolvidos em aprendizagem e memória

Há vários neurotransmissores descritos que atuam no hipocampo tanto de mamíferos como de aves, porém é o GLU que parece exercer um papel fundamental na aprendizagem e memória (KREBS *et al.*, 1991). O GLU é um neurotransmissor excitatório que interage três tipos de receptores ionotrópicos: NMDA, AMPA e o receptor cainato. Há também os receptores metabotrópicos para o GLU. Os receptores do tipo NMDA, que se encontra em grande concentração nas células pós-sinápticas, têm função primordial nos circuitos da formação hipocampal e nos mecanismos de aprendizagem e memória. Como já descrito anteriormente, esse tipo de receptor é um canal de Ca^{++} que normalmente está bloqueado pelo íon Mg^{++} impedindo a entrada desse íon na célula. A ligação do GLU no receptor NMDA ativa o canal, porém essa ativação não é suficiente para promover a expulsão do Mg^{++} e conseqüente abertura do canal. Para que o Mg^{2+} saia do canal é necessário que a célula esteja despolarizada. Isso ocorre graças à ativação do receptor AMPA que permite o influxo de Na^+ e a despolarização da membrana pós-sináptica. Quando esses eventos (a interação do GLU com os receptores e a despolarização celular) acontecem simultaneamente o canal de Ca^{++} é aberto e, então, permite a entrada de mais Na^+ e, principalmente de Ca^{++} na célula pós-sináptica (DUNNING *et al.*, 2003).

A literatura sobre condicionamento de medo mostra muitos estudos que usaram antagonistas do receptor NMDA, seja por administração sistêmica ou por infusões intrahipocampais, com o objetivo de bloquear a transmissão

glutamatérgica em circuitos neurais envolvidos com a aprendizagem e memória do medo. Os resultados experimentais indicam que o bloqueio farmacológico do receptor NMDA prejudica esses processos comportamentais. Particularmente, com o uso de infusões intrahipocampais de antagonistas ou agonistas do receptor NMDA, foi possível analisar a participação do HpD e do hipocampo ventral (HpV) de roedores nesses processos (XU e DAVIS, 1992; ZHANG *et al.*, 2001; GOULD *et al.*, 2002).

Em pombos, Scarpim *et al.* (2007) indicaram que infusões intrahipocampais de DNQX, um antagonista do receptor AMPA, prejudicou a aquisição e a consolidação da memória contextual aversiva. Sperandéo *et al.* (2005) relataram que a administração sistêmica de MK-801, antagonista não competitivo do receptor NMDA, 20 min antes do treino, resultou em prejuízo da memória contextual aversiva. Além disso, o grupo que recebeu a infusão intrahipocampal de salina, quando comparado com o grupo que recebeu a infusão do MK-801, expressou significativamente mais núcleos neuronais imunorreativos a Zenk. Esses dados indicam envolvimento dos receptores de GLU do tipo NMDA no hipocampo em mecanismos sinápticos de plasticidade neural e durante a evocação da memória aversiva ao contexto.

1.3. Hipocampo, transmissão glutamatérgica e a síntese do NO

Uma das vias de sinalização intracelular ativadas pela entrada do Ca^{++} através do canal do receptor NMDA na célula é a da cálcio-calmodulina quinase II (CaMKII) que atua fosforilando outras proteínas. Dentre as proteínas ativadas por

esta via está a enzima Sintase do Óxido Nítrico (NOS), responsável pela síntese do óxido nítrico (NO). A NOS catalisa a oxidação de um nitrogênio do grupo guanidino terminal do aminoácido L-arginina pelo oxigênio molecular resultando na formação de L-citrulina e NO (RAMAN *et al.*, 2001).

O NO é uma das menores moléculas sinalizadoras e por ser solúvel tanto em água quanto em lipídios se difunde facilmente pela membrana plasmática sem a necessidade de transportadores específicos, podendo agir como um mensageiro neuronal para a indução da LTP (LU, *et al.*, 1999). Dessa forma, não é um neurotransmissor tradicional, pois não se encontra dentro de vesículas e não é liberado pelo aparato de exocitose dependente de Ca^{++} (GARTHWAITE, 1991; MONCADA *et al.*, 1991; BREDT e SNYDER, 1992; DAWSON e SNYDER, 1994).

Por ter uma ação retrógrada, o NO induz alterações na célula pré-sináptica (BON *et al.*, 2003) através da ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC) que cliva o GTP (guanosina trifosfato) promovendo a síntese de cGMP (guanosina monofosfato cíclico) (GARTHWAITE, 2008). O cGMP está envolvido em mecanismos que são responsáveis pelo fortalecimento sináptico (DAWSON e SNYDER, 1994), colaborando para o estabelecimento da fase inicial da LTP.

Foram descritas três isoformas da NOS: a NOS neuronal (nNOS) é expressa no sistema nervoso central e periférico (KNOWLES e MONCADA, 1994; MONCADA *et al.*, 1997), a NOS endotelial (eNOS) inicialmente detectada no endotélio vascular (MAYER *et al.*, 1991) e a NOS induzível (iNOS) que é induzida por citocinas ou lipopolissacarídeos (LPS) (GARTHWAITE, 2008). As duas primeiras são chamadas de constitutivas porque estão presentes em condições fisiológicas e são dependentes do Ca^{++} . A NOS induzível (iNOS) é expressa em

situações patológicas em resposta a estímulos inflamatórios e é independente de Ca^{++} (MONCADA *et al.*, 1991; GALEA *et al.*, 1992; LEE *et al.*, 1993; TEIXEIRA, 2001; MUNGRUE *et al.*, 2003, GUIX *et al.*, 2005).

As NOS são enzimas homodiméricas (Rosenfeld *et al.*, 2002) e o peso molecular de cada monômero varia de 135 a 164 kDa. Cada monômero é formado por dois domínios: a parte C-terminal do polipeptídio forma o domínio redutase onde há sítios de ligação para a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), para a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e para a flavina mononucleotídeo (FMN). É, também, na parte C-terminal deste domínio que se encontra o sítio de ligação para a CaMKII (MAYER e HEMMENS, 1997). No domínio oxigenase correspondente ao N-terminal se ligam dois co-fatores da enzima: o grupo heme e a 5,6,7,8-(6R)-tetrahidrobiopterina (BH_4), um metal zinco estrutural. É neste domínio que se encontra o sítio de ligação para o substrato L-arginina (ROSENFELD *et al.*, 2002). Os monômeros formam dímeros por meio da interação entre os seus domínios oxigenases e o grupo prostético heme, sendo que a ligação com a BH_4 serve para dar estabilidade ao dímero formado (MAYER e HEMMENS, 1997).

Após a sua ativação pelo complexo CaMKII a NOS catalisa a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina que é convertida em L-citrulina. A reação ocorre em duas etapas, envolvendo a transferência de cinco elétrons. Na primeira etapa acontece a transferência de dois elétrons e a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G -hidroxi-L-arginina (NHA). Essa reação se assemelha às reações mediadas pelas redutases do sistema de citocromo P450, onde um equivalente eletrônico é transferido do NADPH à

flavoproteína FAD, esta reação reduz o FMN, a qual por sua vez, reduz o Fe^{3+} do grupo heme para Fe^{2+} . Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e L-citrulina pela transferência de três elétrons e não está tão bem caracterizada quanto a primeira. Sabe-se que esta reação é inibida por monóxido de carbono (CO) e por análogos da L-arginina (MARLETTA, 1994; GROVES e WANG, 2000; TEIXEIRA, 2001; DUSSE *et al.*, 2003).

Em síntese, ocorre transferência de elétrons do oxigênio dentro da enzima NOS em uma seqüência linear, passando do NADPH para o FAD e FMN e finalmente para o grupo heme. A CaMKII promove a transferência de elétrons entre o FAD e FMN para o grupo heme (MOORE e HANDY, 1997).

A isoforma nNOS foi encontrada primeiramente em uma linha celular derivada de neuroblastoma e estava localizada em seu citoplasma. O isolamento dessa isoforma (BREDT e SNYDER, 1990) permitiu a posterior clonagem molecular (BREDT *et al.*, 1991). Mais tarde descobriu-se que a nNOS também é expressa em neurônios do sistema nervoso central e que ela tem um papel fundamental para a ação do NO em processos de transmissão sináptica neste sistema.

1.4. A participação do NO em processos de aprendizagem e memória

Embora muitos dos dados referentes à função do hipocampo em processos de aprendizagem e memória e, particularmente, no condicionamento de medo sejam provenientes de estudos com lesões (MAREN *et al.*, 1997; LEHMANN *et al.*, 2007), é necessário considerar que as lesões de uma estrutura neural causam

danos estruturais nos corpos celulares e também destroem fibras de passagem. Desse modo, uma alternativa eficaz para as intervenções que usam as lesões do tecido neural é mostrada pelos estudos que utilizam a intervenção farmacológica. De fato, por meio da inativação temporária, e o bloqueio da ação de neurotransmissores numa determinada região, ou de inibição de enzimas envolvidas nas vias de sinalização intracelular que estão envolvidas com os processos de aprendizado e memória, é possível investigar as funções de núcleos específicos no circuito neural subjacente ao condicionamento de medo (JOHNSON, *et al.*, 2000; SANDERS *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2007).

De acordo com isso, a função do NO em processos de aprendizagem e memória é freqüentemente examinada por meio da aplicação de inibidores de enzimas que impedem a sua síntese (SUSSWEIN *et al.*, 2004). Como a liberação do NO ocorre imediatamente após a ativação da NOS, o uso de inibidores da atividade dessa enzima oferece uma possibilidade eficaz para avaliar os efeitos da ausência desse transmissor não convencional. Bloqueadores da nNOS interferem diretamente com a liberação de NO (SUSSWEIN *et al.*, 2004) e dessa forma, podem prejudicar a indução da LTP sob algumas condições experimentais. Esse prejuízo na indução da LTP também é observado em animais *Knock out* tanto para a eNOS quanto para a nNOS (LU *et al.*, 1999; WEITZDOERFER *et al.*, 2004).

Há vários tipos de inibidores da NOS, entre eles, não seletivos, que são aqueles que bloqueiam os três tipos da NOS e os seletivos, isto é, aqueles que têm uma maior afinidade por uma determinada isoforma. Dentre os seletivos para a nNOS, existe o 7-nitroindazole (7-NI), um composto orgânico aromático heterocíclico que possui um nitrogênio ligado ao carbono na posição 7 do anel

aromático. Essa molécula apresenta uma eletronegatividade e, devido a essa característica, se liga ao grupo prostético heme da enzima, interrompendo, assim, a transferência de elétrons e a síntese do NO. A ligação do 7-NI com o grupo heme também interfere tanto com a ligação da L-arginina, quanto com a ligação da BH₄ alterando a estabilidade da enzima (MOORE e HANDY, 1997).

Num trabalho de 1994, Holscher mostrou que uma injeção de 40 mg/kg de 7-NI i.p. aplicada uma hora antes do treino em pintainhos submetidos a um treinamento de esquiva passiva provocou efeitos amnésicos quando os animais eram testados 30 min., 2 horas, ou 24 horas após o treino. Num outro estudo de 1996, Holscher *et al.*, mostraram que o 7-NI, administrado i.p. 30 min antes do treino, numa concentração de 30 mg/kg prejudicou o aprendizado espacial em ratos submetidos ao teste de labirinto aquático, e também no teste do labirinto radial de 8 braços, indicando o envolvimento da nNOS em processos de aprendizagem e memória espacial.

Maren (1998) realizou um estudo com ratos em situação de condicionamento de medo. Ele mediu a capacidade locomotora dos animais durante três minutos antes do condicionamento por meio da contagem de cruzamento da caixa experimental e pode perceber que ratos tratados com 7-NI i.p. (30mg/kg) 30 min antes da sessão de condicionamento aversivo apresentaram diminuição de cruzamentos pela caixa de treinamento. Num segundo momento administrou 7-NI antes do treino ou do teste, na mesma concentração e observou que os ratos tratados com 7-NI antes do teste tiveram níveis maiores de congelamento quando comparados aos animais que receberam o 7-NI i.p. antes

do treino. Assim, ele concluiu que a diminuição de cruzamentos pela caixa experimental apresentada pelos animais que receberam o 7-NI ocorreu em função da diminuição da atividade locomotora provocada pela droga, e que o 7-NI administrado i.p. nesta concentração não afeta a aquisição da memória contextual em situação de condicionamento de medo.

De La Torre e Aliev (2005) administraram o inibidor de NOS nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), o inibidor da nNOS 7-Ni e o inibidor da eNOS nitro-imino-ornitina (L-NIO) em ratos treinados no labirinto aquático de Morris. Somente os ratos que receberam L-NIO tiveram prejuízo do desempenho no teste espacial sugerindo que o NO vascular, derivado da eNOS, preservaria a função da memória espacial durante a isquemia cerebral.

Fornel *et al.* (2006) relataram facilitação da habituação da resposta exploratória a estimulação acústica em pombos quando a sessão de treino foi precedida por administração sistêmica de 7-NI (25 mg/kg).

Em 2007, Akar *et al.* mediu a performance cognitiva de ratos no labirinto em cruz elevado. Neste estudo, a latência de tempo que esses animais mostraram para ir do braço aberto para o fechado foi utilizada como um índice de aprendizagem e memória. Os ratos receberam a administração i.p. de 7-NI em concentrações de 5, 10, 20 e 50 mg/kg. Aqueles que receberam a administração do 7-NI i.p. nas concentrações de 20 e 50 mg/kg mostraram aumento na latência quando testados 24h após quando comparados com os grupos que receberam a administração de salina ou de outras concentrações de 7-NI. Assim o 7-NI, administrado em concentrações de 20 e 50 mg/kg 30 min antes do treino

prejudicou o desempenho cognitivo de ratos no treinamento de esQUIVA passiva em labirinto em cruz elevado.

Alguns estudos, utilizando camundongos modificados geneticamente que tinham ausência de expressão da nNOS (*knock-out* para o gene nNOS) e treinados em labirinto aquático de Morris foram feitos para avaliar a função da enzima nNOS e do NO nos processos de aprendizagem e memória espacial. Os resultados indicaram prejuízos no desempenho no labirinto aquático nos animais *knock-out*, quando comparados aos controles (KIRCHNER *et al.*, 2004; WEITZDOERFER *et al.*, 2004).

Silva (2007), utilizando aprendizagem de escolha alimentar, relatou aumento de células nNOS positiva no hipocampo dorsal quando comparados com o hipocampo ventral dos animais submetidos ao treinamento por cinco dias. Esta marcação também foi maior quando comparado com os animais treinados por apenas um dia. Esses dados mostram que a aprendizagem espacial provocou um aumento da quantidade de nNOS hipocampal e, desse forma, é possível que exista o envolvimento desta enzima em processos de memória espacial de longa duração.

1.5. Caracterização anatômica do sistema hipocampal de aves

O hipocampo, como já comentado é uma estrutura cerebral envolvida na formação da memória contextual aversiva. Em mamíferos ele se encontra localizado bilateralmente no lobo temporal. Essa estrutura é formada por uma dobra interna da parte ântero medial do próprio lobo temporal, que se curva em

direção ao ventrículo lateral. A relação anatômica mais direta entre a região hipocampal de mamíferos e aves apóia-se no fato de que nos dois grupos de animais, a região considerada hipocampo margeia o ventrículo lateral. Porém a topografia apenas não garante relações de proximidade funcional e aumenta a necessidade de maiores estudos a respeito do assunto. Os estudos originais de Ariëns-Kappers *et al.* (*apud* SZEKELY, 1999), referem que a parte medial do telencéfalo dorsal de aves corresponde ao hipocampo dos mamíferos

Do ponto de vista anatômico, a formação hipocampal das aves se localiza na porção dorso medial do cérebro anterior e está dividida em duas frações: a área para-hipocampal (APH) que está localizada dorsolateralmente e o hipocampo (HP) propriamente dito, localizado ventro-medialmente (CAMPBELL e HODOS, 1970). O argumento utilizado para essa divisão foi de que essas regiões possuíam dois padrões distintos de camadas celulares que as diferenciavam.

Krebs *et al.* (1991) e Erichsen *et al.* (1991) fizeram uma divisão baseada em características morfológicas e bioquímicas utilizando marcadores para determinar a imunorreatividade a algumas substâncias encontradas no hipocampo de mamíferos. Assim temos área dorsal, área dorsomedial superior, área dorsomedial, área ventromedial, hipocampo e área parahipocampal. Do ponto de vista neuroquímico o hipocampo de pombos possui diversos tipos de neurotransmissores e neuropeptídeos são encontrados nas sub-regiões hipocampais. Esses estudos indicam um extenso hipocampo, estendendo-se entre os níveis A9.00 e A3.75, e uma divisão em seis áreas (ERICHSEN *et al.*, 1991; KREBS *et al.*, 1991). Krebs *et al.* (1991) descreveram uma região com terminais de fibras mediais aferentes, na qual se encontram fibras imunorreativas para

substância P (SP), colecistoquinina (CCK), leucina encefalina (LENK), polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) e neuropeptídeo Y (NPY); também sugeriram a presença de fibras colinérgicas, catecolaminérgicas e serotoninérgicas. Uma outra região demarcada contém células organizadas em forma de V, sendo que algumas dessas células são piramidais (PISANA, 1986), as quais são rodeadas por células em cesto que expressam marcação com CCK. Entre as células em V, há uma área com células, fibras e terminações imunorreativas ao NPY.

Com relação aos circuitos neurais envolvidos observa-se que o hipocampo de aves recebe projeções indiretas do núcleo amigdalóide palial posterior anteriormente denominada arcopallium (REINER *et al.*, 2005) para a região parahipocampal que, por sua vez, possui conexões recíprocas com o hipocampo. As aferências hipocámpais para o núcleo amigdalóide palial posterior também se dão de forma indireta através da área septal contralateral, que também conecta o hipocampo lateral, tálamo dorsomedial, e formação reticular cinzenta (CASINI *et al.*, 1986). A área septal, o núcleo taenia e o núcleo amigdalóide palial posterior 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. Essas conexões fazem, assim, parte de toda uma rede neural, envolvida em processos de aprendizagem e memória, cujas estruturas recebem e processam informações somatossensoriais.

Kahn *et al.* (2003) injetando marcadores retrógrados e anterógrados na região da formação hipocámpal de pombos sugeriram a existência de um circuito trissináptico equivalente ao encontrado no hipocampo de mamíferos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar os efeitos da administração do 7-NI, um inibidor seletivo da nNOS, no condicionamento clássico aversivo em pombos. As alterações comportamentais observadas serviram como evidências do papel do NO na memória do condicionamento contextual aversivo em pombos.

2.2. Objetivos Específicos

1 – Analisar os efeitos da administração i.p. do 7-NI, imediatamente após a sessão de condicionamento, sobre a memória contextual aversiva. A administração pós-treino permite avaliar esses efeitos sobre a consolidação da memória, independentemente de possíveis interferências sobre a atividade motora durante o teste.

2 – Analisar os efeitos da administração i.p. do 7-NI, imediatamente após a sessão de condicionamento, sobre expressão do comportamento de congelamento durante o teste ao contexto.

3 – Analisar os efeitos da administração i.p. do 7-NI, imediatamente após a sessão de condicionamento, sobre expressão dos comportamentos exploratórios durante o teste ao contexto.

4 – Analisar a atividade bioquímica *ex vivo* da NOS-dependente e NOS-independente de Ca^{++} , no tecido hipocampal, após a evocação da memória contextual aversiva avaliada durante o teste ao contexto, em animais tratados com 7-NI, veículo ou não tratados.

5 – Analisar a expressão protéica da nNOS pelo método semi-quantitativo de *Western blot*, utilizando tecido hipocampal de animais tratados com 7-NI, veículo ou não tratados, após a evocação da memória contextual aversiva avaliada durante o teste ao contexto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sujeitos:

Foram utilizados 29 pombos (*Columba lívia*) adultos, machos, adquiridos de um mesmo fornecedor, pesando, em média 350g. Esses animais foram mantidos em gaiolas-viveiro individuais com água à vontade, com ciclo de claro-escuro de 12/12 horas. Eram alimentados com mistura de quirera de milho, semente de girassol, ração Anhangüera de procedência da Comercial B. L. Calais Ltda. para pombos, areia e farinha de ostra, com administração semanal de complexo vitamínico (Vitagold). Todos os procedimentos seguiram o protocolo experimental de respeito aos princípios éticos em experimentação animal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de

Campinas, sob o protocolo de número 1192-1. Os pombos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos:

1. Grupo 7-nitroindazole (G7-NI; n=5): numa sessão com 20 minutos de duração, os animais foram colocados na caixa experimental e expostos, a cada 5 minutos, a pareamentos dos estímulos som e choque. Esses animais receberam administração do 7-NI via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após o treino e foram testados 24h depois com reexposição ao contexto e sacrificados 3 horas após a reexposição.
2. Grupo Veículo (GV; n=5): numa sessão com 20 minutos de duração, os animais foram colocados na caixa experimental e expostos, a cada 5 minutos, a estímulos som e choque pareados. Esses animais receberam administração do óleo de amendoim via intraperitoneal (i.p.) imediatamente após o treino e foram testados 24h depois com reexposição ao contexto e sacrificados 3 horas após a reexposição.
3. Grupo Controle (GC; n=5): numa sessão com 20 minutos de duração, os animais foram colocados na caixa experimental e expostos, a cada 5 minutos, a estímulos som e choque pareados. Esses animais não receberam nenhum tipo de tratamento e foram testados 24h depois com reexposição ao contexto e foram testados 24h depois com reexposição ao contexto e sacrificados 3 horas após a reexposição.
4. Grupo Manipulação (GM; n=5) animais submetidos ao transporte do biotério até o laboratório e pesagem (manipulação) durante 4 dias. Esses animais foram sacrificados 3 horas após a última pesagem.

3.2. Procedimentos

3.2.1. Droga

A droga 7-nitroindazole (7-NI) (Sigma, USA) foi dissolvida em 1 ml de óleo de amendoim numa dose de 25mg/Kg. (MOORE *et al.*, 1993). A solução a ser administrada aos animais foi preparada no dia do experimento.

3.2.2. Adaptações às condições do biotério

Após a mudança para as gaiolas-viveiros individuais, os animais foram submetidos à adaptação às condições do biotério por um período mínimo de 15 dias, sendo mantido sob temperatura média de 25º C, ciclo claro-escuro 12:12 h e com alimentação *ad libitum*.

3.2.3. Implante de eletrodos

Os pombos tinham seu osso da pelve exposto após a retirada das penas e com o auxílio de algodão embebido em álcool era feita a assepsia local. Então, introduzia-se um fio de aço ortodôntico (0,5mm de espessura e 10 cm de comprimento) ao redor de cada osso púbico.

Após, esse fio de aço era conectado a fios ligados a uma pequena tomada fixa em uma jaqueta de couro sintética colocada no dorso do animal. Os animais do grupo GM não tiveram implante de eletrodos.

3.2.4. Adaptações às condições do laboratório

Os animais dos grupos G7-NI, GV, GC foram pesados e habituados por quatro dias consecutivos que precederam o dia do treino. Os animais eram colocados em uma câmara que media 60x60x60 cm, com três paredes revestidas de fórmica branca, a parede frontal de vidro e com iluminação feita por lâmpada fria, onde permaneciam por 40 min sem receber qualquer estimulação. Os animais do grupo GM não passavam pela habituação, foram apenas pesados e devolvidos à gaiola no biotério.

3.2.5. Treino em condicionamento som-choque

As sessões experimentais de condicionamento som-choque e teste ao contexto foram realizadas numa câmara de observação (30 x 30 x 40 cm), com paredes revestidas por chapas galvanizadas e a porta frontal construída com um espelho de visão unidirecional emoldurado por madeira. As câmaras têm alto-falante embutido ligado a audio-estimuladores com poder de variação de frequência entre 125 a 8000 Hz, e também saída de energia com tomada-macho. A iluminação da caixa foi feita com lâmpadas vermelhas de 20W, localizadas nas paredes laterais. Os choques aplicados através dos eletrodos eram gerados a partir de uma fonte (Foringer, USA), controlada por marcadores de tempo eletromecânicos. Todas as sessões foram gravadas digitalmente com o auxílio do software WinVDR pró versão 3.7.0.

A sessão do treinamento em condicionamento clássico som-choque teve a duração de 20 min. Os animais eram retirados de suas gaiolas, transportados até o laboratório e pesados. Então eram colocados na caixa experimental onde recebiam a apresentação de um som (1000 Hz, 83dB, 1s) cujo término coincidia com a apresentação de um choque (10mA, 35 ms). Os estímulos foram apresentados no quinto, décimo e décimo quinto minuto durante a sessão de 20 min. Imediatamente após os animais G7-NI e GV recebiam a injeção da droga e do veículo, respectivamente. Após o treino, os animais eram recolocados em suas gaiolas-viveiro.

3.2.6. Teste ao contexto de condicionamento

O teste de memória aversiva ao contexto ou de medo condicionado foi realizado 24 h após o treino. Neste teste os animais, G7-NI, GV e GC foram recolocados na mesma câmara de condicionamento som-choque durante 20 min sem apresentação programada de qualquer estímulo. Após o teste todos foram reconduzidos ao biotério onde permaneceram por 3 horas.

3.2.7. Análise da atividade de NOS *ex-vivo*

Após três horas da sessão de teste, no caso do GV, GC e G-7NI, ou da pesagem, no caso do grupo GM, os animais foram novamente transportados para o laboratório e sacrificados com guilhotina. Os cérebros, então removidos tiveram os hipocampus dissecados e estocados em freezer (-70° C) para posteriormente

serem submetidos a análises de atividade da NOS e *Western blot*.

Amostras de hipocampus foram pesadas e homogeneizadas em 5 volumes de tampão de incubação (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) contendo 1 mM de PMSF e 1 mM de L-citrulina. Cinquenta microlitros do homogenato foram incubados na presença de NADPH (1 mM), cloreto de cálcio (CaCl_2) (2 mM) e 10 μM de L-arginina contendo 100.000 cpm de [2,3,4,5- ^3H]L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de 100 μl a temperatura ambiente (25 - 27°C) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-citrulina). Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de tampão HEPES 20 mM, pH 5.4 contendo 1mM de EGTA e 1 mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5' a 10.000 rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6 ml de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em vials de cintilação. As colunas foram lavadas com 1 ml adicional de tampão HEPES e os eluatos foram combinados com aos anteriores. Após a adição de 10 ml de líquido de cintilação a radioatividade foi medida durante 1 min em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do "branco" (onde o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES). Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens (cpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos receberam [2,3,4,5- ^3H]L-arginina mono hidrocloreto diretamente nos vials de cintilação) pela fórmula:

$$\text{pmol L-cit/min} = 1000 \times (\text{dpm amostra} - \text{dpm branco}) / \text{dpm totais} / 30$$

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (em min).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl_2 e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS) e na adição de 1 mM de L-NAME (inibição específica para as NOS).

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando-se kit comercial (Bio Rad, EUA). A atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína.

3.2.9. Análise semi-quantitativa da nNOS

A análise da expressão protéica da nNOS foi realizada em homogenatos de hipocampo dos grupos G7-NI, GV, GC e GM, para tal foi utilizado o mesmo material descrito na sessão acima. Nas amostras foi adicionado tampão de amostra Laemmli (LAEMMLI, 1970), numa proporção 1:1 (50µl Laemmli/50µl de amostra). A seguir, as amostras foram mantidas por 5 min em banho-maria a 95 °C. Para eletroforese, foi utilizado gel bifásico de 1,5mm de espessura: gel de empilhamento (*Stacking* 4%; 4,48ml de água deionizada, 700µl de acrilamida 40%, 1,75ml de tampão Tris-ácido fosfórico 0,5M pH6,9, 70µl de SDS 10%, 35µl de APS 10% e 7µl de Temed) e gel de resolução (*Resolving* 8%; 4,86ml de água deionizada, 1,8ml de acrilamida 40%, 2,25ml de tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,9, 90µl de SDS 10%, 45µl de APS 10% e 4,5µl de Temed). Foram aplicadas 50µg de

proteínas por pocinho do gel. A corrida ocorreu à 200V por aproximadamente 1h e 30min em tampão de corrida (100ml de Tris-glicina, 300ml de água deionizada e 4ml de SDS 10%). As proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad), *overnight* (aproximadamente 12h), 90mA, banhada com tampão de transferência (200ml de Tris-glicina, 440ml de água deionizada, 160ml de metanol e 1,4ml de SDS 10%).

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

A nNOS foi detectada na membrana de nitrocelulose por incubação, *overnight*, à temperatura de 4°C, com anticorpo primário (NOS1 (R-20): sc 648, Santa cruz Biotechnology, INC.), diluição de 1:500 (20µl de anticorpo diluídos em 10ml de albumina 0,3% em solução de PBS Tween). No dia seguinte, a membrana de nitrocelulose foi lavada por 5 min com solução de PBS Tween e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Zymax anti-rabbit, Zymed Laboratories, USA), diluído 1:2000 (5µl de anticorpo em 10ml de leite em pó desnatado 0,3% em solução de PBS Tween), por 1h, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com solução de PBS-Tween,

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

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

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

3.3. Análise comportamental

As gravações das sessões de treino e teste foram transcritas para os registros dos comportamentos. Foram registrados os comportamentos das categorias previamente descritas (Reis *et al.*, 1999): Movimentos isolados, Pré-exploratórios, Exploratórios, Locomoção, Manutenção, Congelamento e Parado (imobilidade relaxada).

1. **Movimentos isolados (MOV):** nesta categoria foram incluídos todos os comportamentos que resultam em mudanças de localização espacial e/ou extensão de partes do corpo do animal.
2. **Comportamentos pré-exploratórios (PRE):** constituem reações que foram geralmente observadas antecedendo o explorar (sobressalto, murchar, estremecer o corpo).

3. **Comportamentos exploratórios (EXP):** 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).
4. **Locomoção (LOC):** deslocamento no espaço, usando como referencial um ponto qualquer que não ele mesmo (andar, circular, pisotear, esvoaçar, voar, pular).
5. **Manutenção (MAN):** comportamentos relacionados com ajustes corporais e vegetativos (bocejar, estremecer a cabeça, deglutir, vomitar, piscar) e de auto-estimulação, como coçar e limpar.
6. **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; o pescoço encolhido ou em pequena extensão apresenta flexão ventral e o bico direcionado para baixo.
7. **Postura de imobilidade tensa ou congelamento (FRZ):** o animal fica imóvel, agachado ou encolhido, geralmente num canto da câmara experimental, com corpo inclinado, apresentando flexão total ou flexão parcial das pernas, separação ampla entre os pés (base de apoio alargada), cauda e asas desalinhadas, região ventral ou peitoral do corpo em contato com o piso ou com uma das paredes da câmara. Apresenta, também, o pescoço com extensão restrita e a cabeça imóvel e direcionada para um único ponto do ambiente (ângulo $> 30^\circ$ em relação ao papo), olhos totalmente abertos, respiração acelerada e

ausência de outros comportamentos observáveis. O registro de congelamento ocorre quando são observados no mínimo 05 desses critérios descritivos.

A fidedignidade dos dados foi avaliada pela análise comparativa de transcrição de dois observadores independentes.

3.4. **Análise estatística dos dados**

Para a análise estatística de cada categoria comportamental nas sessões de treino e de teste, foi utilizada ANOVA de duas vias, tendo grupo (G7-NI, GV e GC) e sessão (treino e teste) como fatores. As análises *post hoc* foram realizadas com o teste para múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Foi utilizada ANOVA de duas vias, tendo grupo (G7-NI, GV e GC) e sessão (treino e teste) como fatores e blocos de apresentação de intervalos de registro (variáveis independentes) como medidas repetidas para analisar os comportamentos de congelamento, parado, movimentos isolados e exploração (variáveis dependentes). As análises *post hoc* foram realizadas com o teste para múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

A análise estatística dos dados da atividade da NOS dependente de Ca^{++} e da atividade da NOS independente de Ca^{++} foi feita com o teste ANOVA não paramétrica de uma via (Kruskal-Wallis).

Os valores de densidade óptica obtidos com as análises por *Western blot* foram analisados por meio do teste ANOVA de uma via.

Considerou-se a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas quando valores de $p \leq 0,05$ eram indicados pelos testes.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do 7-Ni sobre o comportamento dos pombos em situação de condicionamento clássico aversivo

A Figura 1 mostra a porcentagem da frequência dos comportamentos analisados durante a sessão do treino e de teste ao contexto. Cada barra corresponde à porcentagem média calculada considerando como 100% o valor do total geral de comportamentos registrados na sessão, para todas as categorias. Na sessão de treino os grupos apresentaram variabilidade comportamental, indicada pela ocorrência de diferentes comportamentos. Houve maior ocorrência dos comportamentos FRZ, EXP, PAR e MOV nos três grupos. Na sessão de teste também foi observada maior ocorrência desses mesmos comportamentos, valores mais elevados de FRZ para GC e GV, de PAR e MOV para o G7-NI. O comportamento EXP apresentou valores próximos nos três grupos. A análise estatística com o teste ANOVA de duas vias indicou que a ocorrência de MOV na sessão de teste foi significativamente diferente quando comparado os outros grupos ($F_{2,21} = 8,25$; $p < 0,01$) e com a sessão de treino ($F_{1,21} = 7,33$; $p < 0,05$). Com relação à ocorrência de PAR durante o teste, observou-se maiores valores para o G7-NI com diferença estatística marginalmente significativa em comparação com os grupos GC e GV ($F_{2,21} = 3,20$; $p = 0,061$) e uma interação

significativa entre grupos e sessão ($F_{2,1} = 4,56$; $p < 0,05$). A expressão de FRZ pelo G7-NI durante a sessão de teste ao contexto foi significativamente menor quando comparado com a sessão de treino ($F_{1, 21} = 9,05$; $p < 0,01$) e com os grupos GC e GV no teste ($F_{2,21} = 21,57$; $p < 0,001$). Os demais comportamentos não apresentaram diferença significativa entre grupos ($p > 0,05$) ou entre sessões ($p > 0,05$).

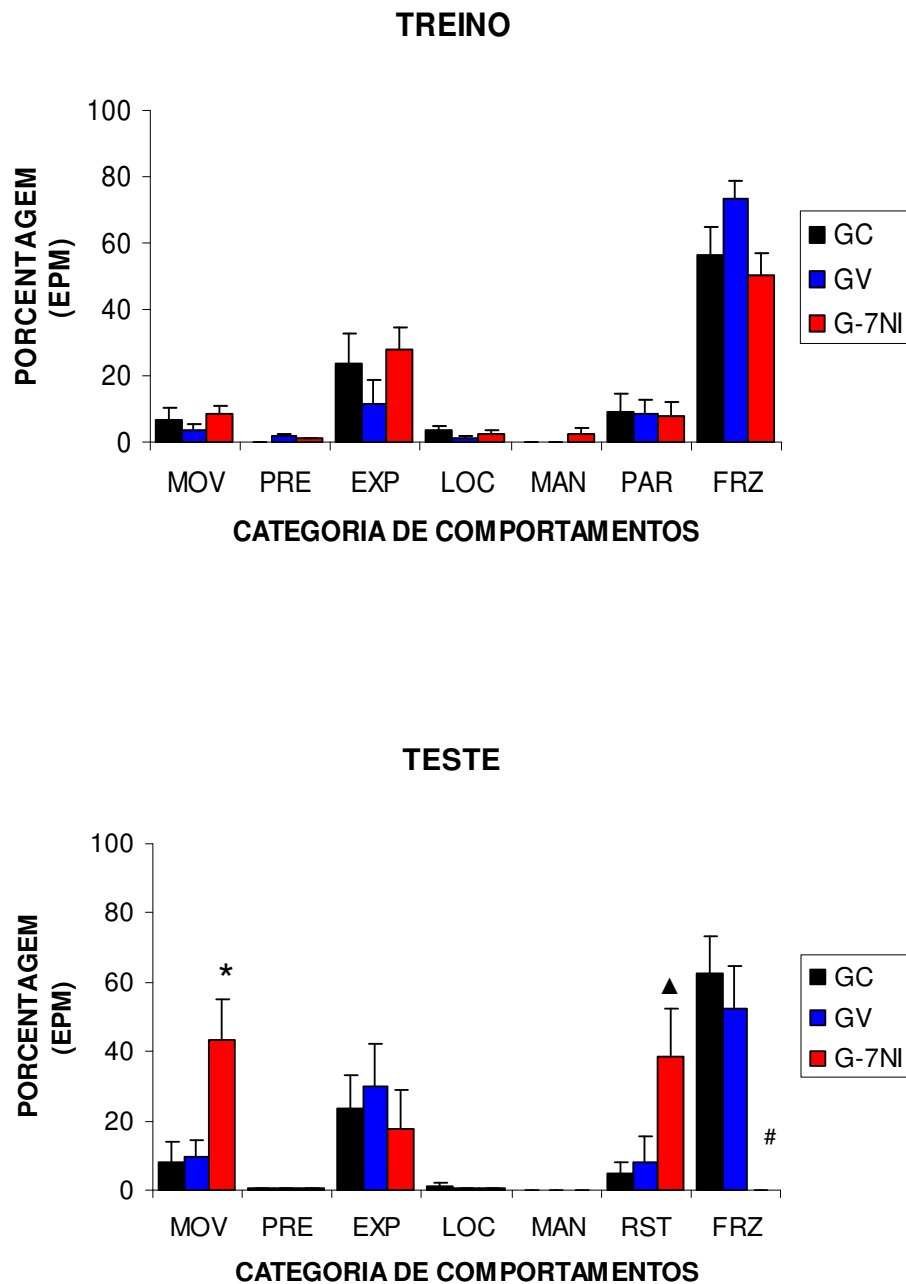


Figura 1: Porcentagem média dos valores de registros comportamentais em cada categoria (MOV=movimentos discretos; PRE = pré-exploratório; EXP = exploratório; LOC = locomoção; PAR = parado; FRZ = congelamento), durante o treino e teste ao contexto computado para os grupos Controle, Veículo e 7-NI. * $p < 0,05$, comparado com o treino e com os outros grupos no teste. # $p < 0,05$, comparado com o treino e grupos no teste. ^ $p < 0,05$, comparado com o treino.

A Figura 2 apresenta os dados médios da ocorrência dos comportamentos de FRZ, PAR, MOV e EXP em função dos blocos de cinco intervalos de 30 s durante as sessões de treino e de teste ao contexto para os grupos GC, GV e G7-NI. Na sessão de treino, observa-se um aumento da ocorrência de FRZ a partir do terceiro bloco de registros, para os três grupos. A ocorrência de PAR e MOV mostrou-se aumentada para os animais do grupo G7-NI na sessão de teste ao contexto. Para os três grupos observam-se maiores valores de EXP no primeiro e segundo blocos da sessão de treino e menores valores na sessão de teste ao contexto. A análise estatística com o teste ANOVA para medidas repetidas indicou diferença significativa entre os grupos para ocorrência de FRZ ($F_{2, 21} = 13,07$; $p < 0,001$). Também mostrou diferença significativa entre as sessões ($F_{2,21} = 11,31$; $p < 0,01$) e uma interação entre grupos e sessões ($F_{2,1} = 6,92$; $p < 0,01$). Efeito significativo de blocos também pode ser notado ($F_{2,7} = 16,08$; $p < 0,0001$). Análises com múltiplas comparações feitas com o teste de Tukey-Kramer indicaram que o grupo G7-NI é significativamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). A sessão de treino é significativamente diferente da sessão de teste ao contexto ($p < 0,05$), existindo uma diferença significativa entre o grupo G7-NI no teste quando comparado aos demais grupos nas duas sessões ($p < 0,05$). Os blocos 1 e 2 diferiram significativamente dos demais blocos da sessão de treino e de teste ($p < 0,05$).

Com relação ao comportamento PAR a análise estatística para medida repetidas indicou diferença significativa entre grupos ($F_{2,21} = 4,18$; $p < 0,05$) e diferença significativa entre os blocos ($F_{7,21} = 2,31$; $p < 0,05$). Apontou, também, interação entre grupos e sessão ($F_{2,2} = 3,70$; $p < 0,05$), interação entre sessão e

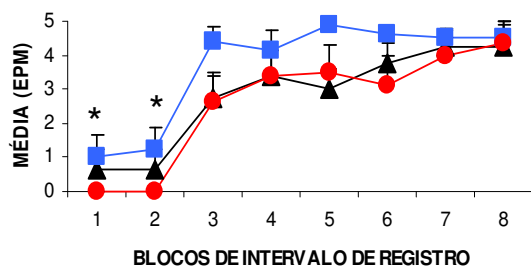
blocos ($F_{1,7} = 2,57$; $p < 0,05$) e interação entre grupos, sessão e blocos ($F_{2,1,7} = 2,00$; $p < 0,05$). Análises com múltiplas comparações indicaram que o grupo GC diferiu significativamente do grupo G7-NI ($p < 0,05$), mas não do GV ($p > 0,05$), que a sessão de teste do G7-NI foi significativamente diferente da sessão de teste dos demais grupos ($p < 0,05$). Quanto à diferença entre os blocos foi indicado que o bloco 2 da sessão de treino diferiu significativamente dos blocos 3,4,6,7 e 8 dessa mesma sessão ($p < 0,05$) e o bloco 7 do treino diferiu significativamente dos blocos 1 e 2 do treino e dos blocos 3, 4 e 6 do teste ($p < 0,05$).

Para o comportamento MOV a análise estatística para medidas repetidas indicou diferença significativa entre grupos para ocorrência de ($F_{2,21} = 7,75$; $p < 0,05$), entre sessão ($F_{1,21} = 7,77$; $p < 0,01$) e entre os blocos ($F_{7,21}=3,02$; $p<0,01$). Mostrou, ainda, interação significativa entre grupos e sessão ($F_{2,2} = 4,15$; $p < 0,05$) e entre sessão e blocos ($F_{1,7} = 5,79$; $p < 0,0001$). As análises com múltiplas comparações indicaram que o grupo G7-NI diferiu significativamente dos demais ($p < 0,05$), que a sessão de treino diferiu significativamente da sessão do teste ($p < 0,05$), sendo que o grupo G7-NI no teste diferiu dos demais grupos nas duas sessões ($p < 0,05$). O bloco 1 do treino foi significativamente diferente dos demais blocos nesta sessão ($p < 0,05$).

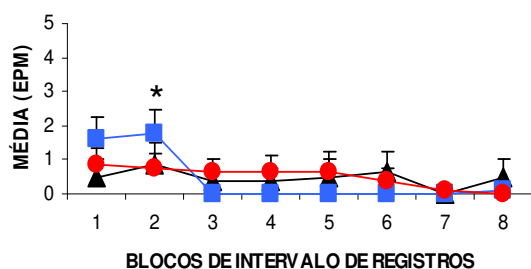
O comportamento EXP mostrou diferença significativa entre os blocos ($F_{7,21} = 5,96$; $p < 0,0001$), mas não entre grupos ($F_{2,21} = 0,07$; $p > 0,05$) e sessões ($F_{1,21} = 0,57$; $p > 0,05$). Análises com múltiplas comparações indicaram que, na sessão de treino, o bloco 1 foi significativamente diferente dos demais ($p < 0,05$), exceto dos blocos 2 e 3 ($p > 0,05$).

TREINO

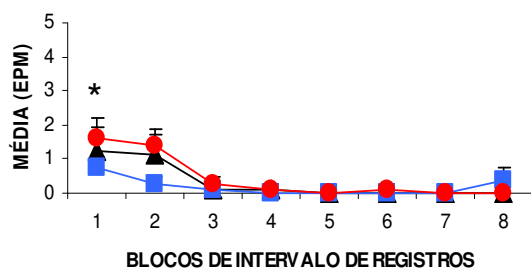
CONGELAMENTO



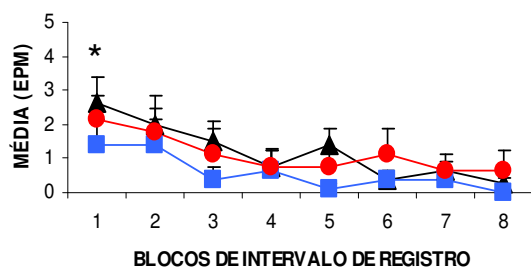
PARADO



MOVIMENTOS GERAIS

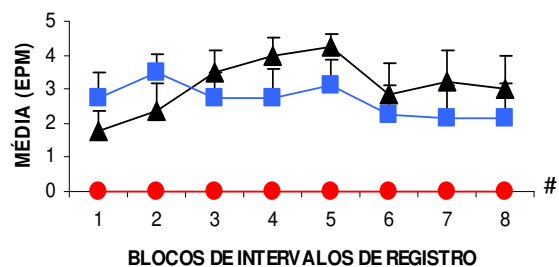


EXPLORAÇÃO

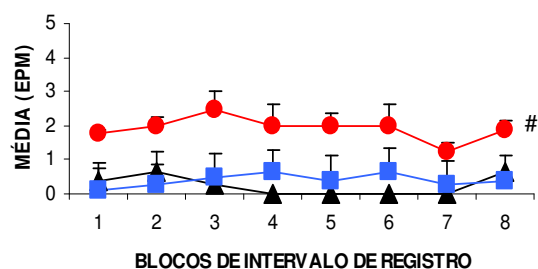


TESTE

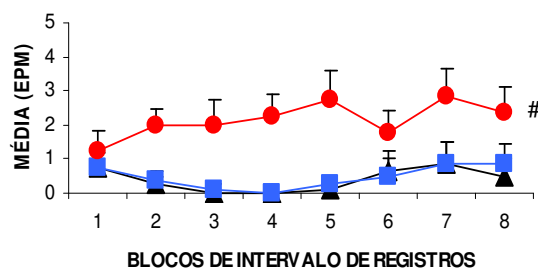
CONGELAMENTO



PARADO



MOVIMENTOS GERAIS



EXPLORAÇÃO

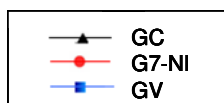
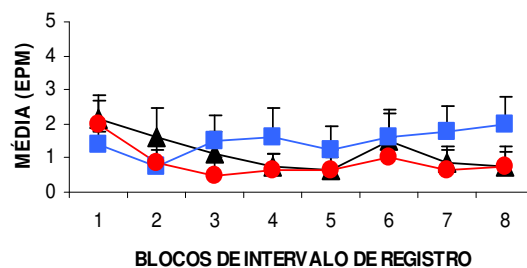


Figura 2. Valores médios (+EPM) dos comportamentos congelamento, parado, movimentos gerais registrados em oito blocos de 150s nas sessões de treino e de teste dos grupos GC, GV, G7-NI. * $p < 0,05$, quando comparados com os demais blocos no treino. # $p < 0,05$, G7-NI comparado com os demais grupos durante o teste.

4.2. Efeitos do 7-NI na atividade da nNOS no hipocampo de pombos.

A Figura 3 mostra a medida da atividade da NOS dependente e independente de Ca^{++} para os quatro grupos GC, GM, GV e G7-NI. Os dados indicam uma diminuição da atividade da NOS dependente de Ca^{++} nos hipocampus de pombos do grupo tratado com 7-NI quando comparados com os grupos GV, GC e GM. A análise estatística com o teste ANOVA não paramétrica de uma via (Kruskal-Wallis) mostrou diferença significativa entre grupos ($F_{3,16} = 5,52$; $p < 0,01$). Nos dados relativos à atividade da NOS independente de Ca^{++} a análise estatística não mostrou diferença significativa entre os grupos ($F_{3,16} = 2,58$; $p > 0,05$).

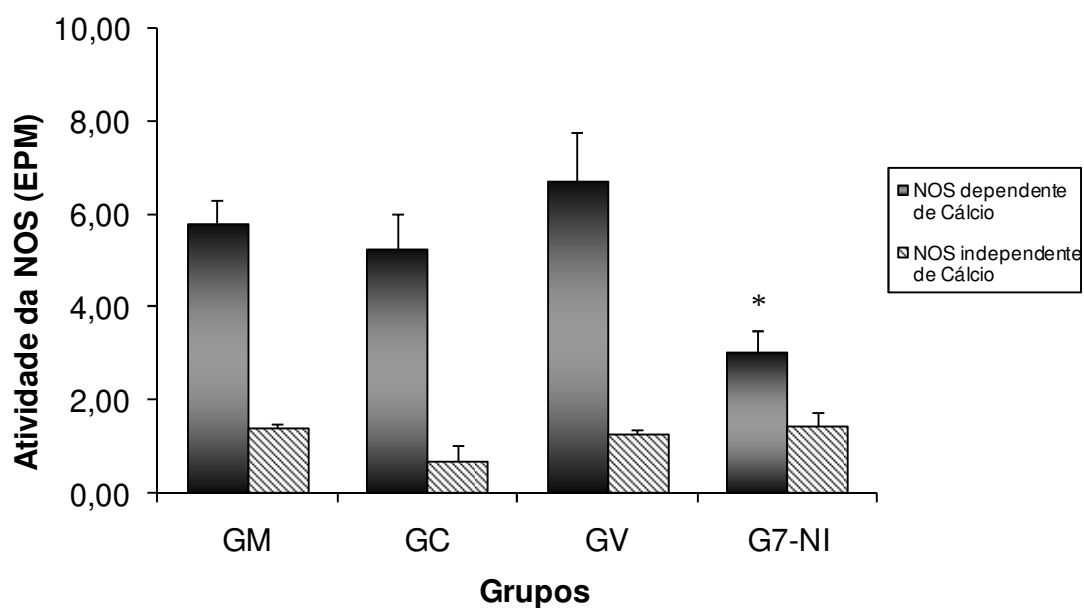


Figura 3. Efeito do 7-NI sobre a atividade da NOS dependente e independente de Ca^{++} no hipocampo dos animais dos grupos GM, GC, GV e G7-NI. * $p < 0,05$, em relação aos demais grupos.

4.3. Avaliação da expressão protéica da nNOS no hipocampo

Na Figura 4 observa-se os valores da expressão protéica da nNOS no hipocampo normalizados pela tubulina obtidos por meio da densitometria óptica para os grupos GM, GC, GV e G7-NI. De acordo com teste ANOVA de uma via não houve diferença significativa entre os grupos ($F_{3,12} = 2,18$; $p = 0,143$).

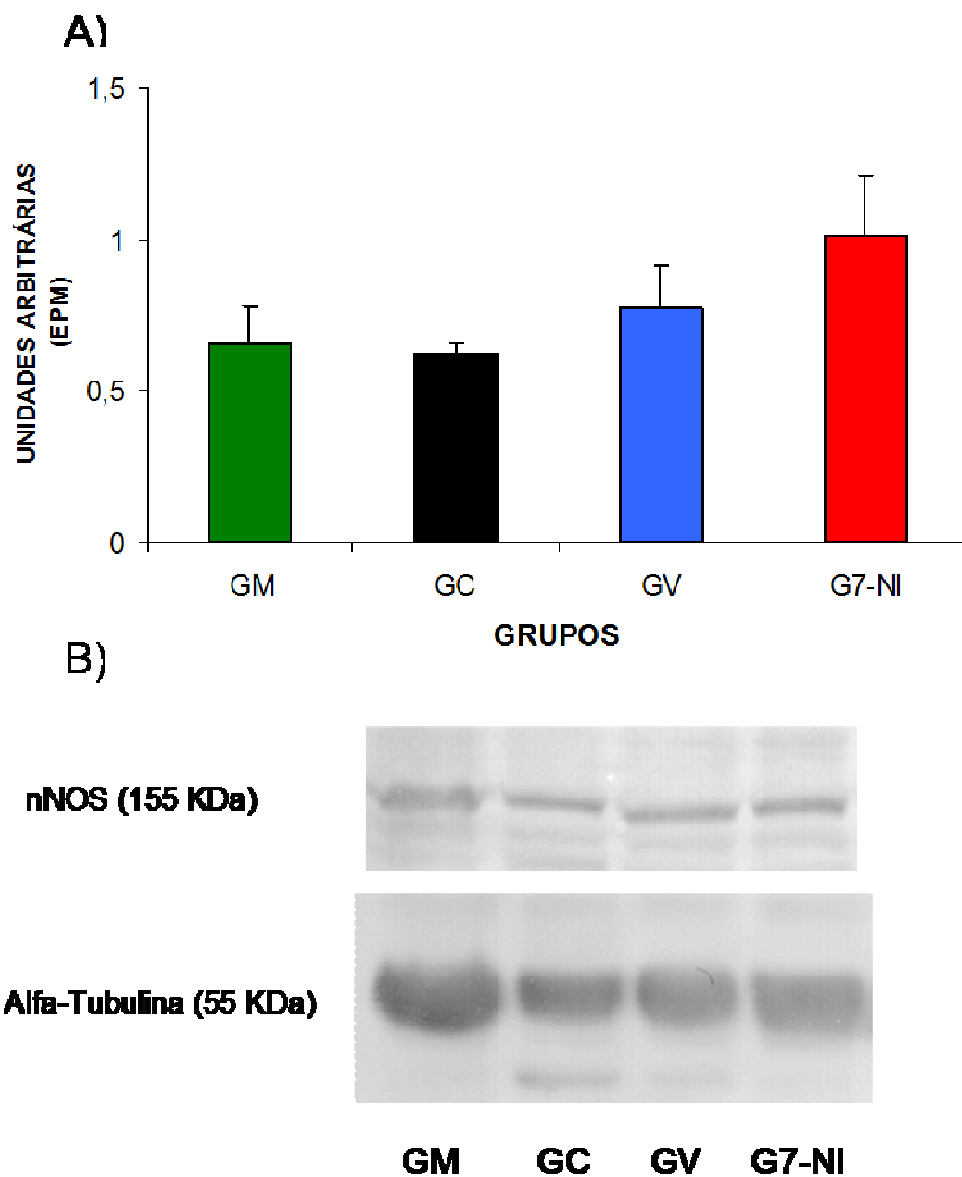


Figura 4. A) Efeito do 7-NI sobre a variação da quantidade de proteína NOS dependente de Ca^{++} no hipocampo de pombos para os grupos GM, GC, GV e G7-NI. **B)** *Western blot* representativo da proteína nNOS em amostras de homogenatos de hipocampo (50µg) de pombos dos grupos GM, GC, GV e G7-NI.

A Figura 5 mostra os valores da expressão protéica da nNOS no hipocampo de pombos dos grupos GC, GV e G7-NI obtidos por meio da densitometria óptica e normalizados pela tubulina. Esses valores expressam a razão calculada em relação ao grupo GM, ou seja, os valores da densidade óptica da nNOS para cada grupo foram divididos pelo valor da densidade óptica da nNOS no GM. A análise estatística com teste ANOVA de uma via indicou diferença significativa entre os grupos ($F_{2,9} = 8,42$; $p < 0,01$).

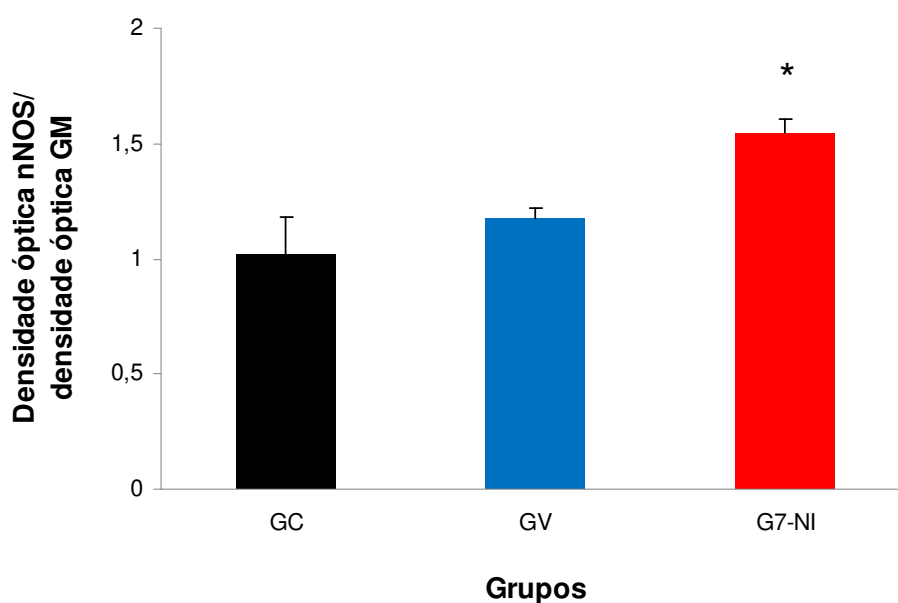


Figura 5. Valores da expressão protéica da nNOS dos grupos GC, GV e G7-NI com relação aos valores do GM. * $p < 0,05$, G7-NI com relação aos demais grupos.

5. DISCUSSÃO

Os dados do presente estudo indicam que a administração i.p. de 7-NI, um inibidor seletivo da nNOS imediatamente após o treino provocou uma diminuição na frequência do comportamento de congelamento em pombos submetidos ao treinamento de condicionamento clássico aversivo durante a sessão de teste ao contexto. O teste ao contexto constitui um teste de recuperação/evocação das informações aversivas consolidadas (ABEL *et al.*, 2001). Os animais do G7-NI expressaram significativamente menos congelamento quando comparados com aqueles que receberam veículo ou não tiveram tratamento algum. Isso pode ser interpretado como um déficit na memória contextual aversiva, pois, os animais do GV e do GC quando recolocados no contexto onde ocorreu a apresentação do estímulo aversivo exibiram o padrão comportamental (congelamento) característico. Essa observação permite inferir que para o GV e GC houve consolidação da memória de que aquele contexto é potencialmente perigoso, contrariamente ao G7-NI que não expressou congelamento ao contexto. Na sessão de teste ao contexto, que aconteceu 24 h após o treino, esses animais apresentaram menor ocorrência de congelamento quando comparados com o GC e GV o que pode indicar que houve um prejuízo na consolidação da memória contextual aversiva e que a nNOS participa ativamente desse processo. Provavelmente, a inibição da atividade da nNOS, resultante da administração de 7-NI afetou os processos de consolidação da memória sobre o contexto aversivo.

Observou-se que na sessão de treino em condicionamento tornou-se evidente a ocorrência de congelamento para os animais 7-NI, GV e GC, a partir do

terceiro bloco de registro comportamental, tempo que coincide com a primeira apresentação do pareamento som-choque, com aumento no término da sessão. Esses dados indicam que o aprendizado foi eficaz para os três grupos, uma vez que os valores do congelamento apresentados pelos três grupos condicionados não tiveram diferenças significantes durante a sessão de treino. Do mesmo modo, analisando a ocorrência dos comportamentos parado, movimentos gerais e exploração, durante a sessão de treino nota-se que os valores não diferiram significativamente entre os grupos e que, quando comparado com os demais blocos, houve uma diferença significativa no primeiro e segundo bloco, momento em que a apresentação dos pareamentos som-choque ainda não havia sido iniciada.

A ocorrência do congelamento na sessão de teste ao contexto para o GV e o GC foi relativamente elevada não apresentando diferença significativa quando comparada com a sessão do treino e, assim, evidenciando que a memória aversiva ao contexto de condicionamento nesses animais foi consolidada e recuperada. Assim, tanto o GV como o GC, quando recolocados no contexto onde ocorreram apresentações som-choque, exibiram um padrão comportamental que permite inferir que houve consolidação da memória das associações contexto-som-choque. Esses animais reagiram com respostas que são características de situações de defesa ou, mais especificamente de congelamento e demonstraram evocação da memória da associação do evento aversivo ao contexto em que foi apresentado (MAREN *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 1999; MAREN e HOLT, 2000; SANDERS *et al.*, 2003). Já os animais do grupo G7-NI não apresentaram congelamento no teste ao contexto, o que diferiu significativamente da sessão de

treino e dos outros grupos na sessão de teste ao contexto, indicando que o tratamento farmacológico prejudicou a ocorrência da resposta condicionada.

Desse modo, contrariamente aos dados dos grupos GC e GV, infere-se que os animais G7-NI não demonstraram evocação da memória aversiva ao contexto. Esse resultado evidencia um efeito amnésico devido à interferência do 7-NI no processo de consolidação da memória da associação contexto-som-choque, através da inibição da nNOS.

Durante a sessão de teste ao contexto o G7-NI mostrou aumento significativo na ocorrência dos comportamentos parado e movimentos gerais quando comparado com a sessão do treino e com o GC e GV que não apresentaram diferença significativa entre si. Isso é perfeitamente compreensível, pois, com a menor ocorrência de congelamento, provavelmente provocado pelos efeitos da inibição da nNOS promovida pelo 7-NI, outros comportamentos se tornaram evidentes. Assim, é provável que o 7-NI provocou um prejuízo na consolidação da memória corroborando a hipótese de que o envolvimento do NO é necessário para a consolidação da memória contextual aversiva (SUSSWEIN *et al.*, 2004, GARTHWAITE, 2008).

A consolidação da memória caracteriza-se como uma gradual reorganização das informações recém armazenadas e ainda instáveis, de forma a torná-las mais estáveis para o armazenamento de longo-prazo. Dessa forma a consolidação é o processo pelo qual as memórias transientes tornam-se persistentes (NADER, 2003) e resistentes à desorganização, e assim, uma

memória recente se transforma em uma memória remota (SQUIRE *et al.* e FRANKLAND *et al. apud* in SQUIRE, 2007).

Para que a memória seja consolidada e armazenada por longo prazo é necessário que haja a expressão de genes e a síntese de novas proteínas, dando origem a mudanças estruturais que armazenam a memória ao longo do tempo (KANDEL *et al.*, 2000; HALL *et al.*, 2001; NADER, 2003). Após consolidada, a memória pode ser acessada em eventos futuros. Existe um tempo decorrente entre a introdução de uma informação na memória e a sua consolidação, denominado período de consolidação e neste momento, a memória, é suscetível a agentes que a prejudiquem (SQUIRE e KANDEL, 2003).

Vários trabalhos descreveram que após o treinamento ou fase de aquisição, o cérebro do animal treinado passa por uma seqüência de alterações intracelulares, bioquímicas e genéticas, que alteram a funcionalidade de circuitos neuronais. Nas 6h que se seguem ao treinamento inicial ocorrem mudanças bioquímicas essenciais em circuitos hipocampusais. Nesta fase, o uso de inibidores de síntese protéica ou de outros agentes farmacológicos que interfiram em processos sinápticos pode prejudicar a consolidação da memória de longa duração (IZQUIERDO, 2006). No presente trabalho, pode-se considerar que a consolidação da memória foi prejudicada, uma vez que a administração do 7-NI ao G7-NI foi feita imediatamente após a sessão de treino, tempo que coincide com esse período inicial de consolidação. Assim, os animais do G7-NI não expressaram resposta condicionada de congelamento ao contexto aversivo, provavelmente por que a memória contextual aversiva não foi consolidada.

Esses resultados indicam o envolvimento da nNOS em processos de aprendizagem e memória em pombos como já relatados para pintainhos que, quando tratados com administração de 40 mg/kg de 7-NI i.p. e submetidos ao treinamento de esquiva passiva, mostraram déficit de memória quando 30 min., 2 horas, ou 24 horas após o treino (HOLSHER, 1994) e estão de acordo com outros testes já realizados com mamíferos que mostraram que o 7-NI, administrado i.p. 30 min antes do treino, numa concentração de 30 mg/kg prejudicou o aprendizado espacial em ratos submetidos ao teste de labirinto aquático, e ao teste do labirinto radial de 8 braços (HOLSHER *et al.*, 1996). O 7-NI administrado i.p. em ratos nas concentrações de 20 e 50 mg/kg, 30 min antes do treino provocou um aumento na latência de tempo para esses animais irem do braço aberto para o braço fechado do labirinto em cruz elevado quando testados 24 h após o treino o que pode ser interpretado como um déficit na memória espacial (AKAR, *et al.*, 2007).

No trabalho de Maren (1998) foi observado aumento na ocorrência de congelamento em ratos que receberam injeção i.p. de 7-NI antes do teste quando comparados com ratos que receberam a mesma injeção antes do treino. Em sua discussão ele afirma que 7-NI administrado i.p. antes do teste não afeta a aquisição da memória contextual em situação de condicionamento de medo e que os valores de congelamento aumentados podem estar relacionados a um déficit na atividade locomotora provocado pela droga. Com os dados obtidos pelo presente trabalho, onde a administração da droga foi feita após o treino, impedindo os efeitos na atividade locomotora, pode-se verificar que a expressão do congelamento frente ao contexto aversivo foi prejudicada. Assim, é possível inferir que a atividade da enzima nNOS é funcionalmente importante para os

processos de aprendizagem e memória, pois a ausência da ocorrência do congelamento apresentado pelo G7-NI, indica que houve prejuízos na consolidação da memória contextual aversiva.

Os efeitos da administração do 7-NI via i.p. são sistêmicos, caracterizando uma ação geral em diferentes estruturas e regiões encefálicas. Como o condicionamento clássico aversivo envolve a ativação de vias neuronais complexas, incluindo a atuação de diferentes sistemas e estruturas neuronais que processam e integram as informações em diferentes níveis do SNC e organizam as respostas condicionadas e incondicionadas, deve-se supor que os efeitos do 7-NI abrangessem esses diferentes sistemas. Dentre esses, o hipocampo e a amígdala são indicados como estruturas que participam de modo essencial nessa rede de circuitos neuronais.

Como o hipocampo é uma estrutura cerebral fundamentalmente envolvida com processos de memória contextual e com o condicionamento contextual aversivo (KIM e FANSELOW, 1992; MAREN *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2001), considera-se que seja uma região onde ocorrem processos de plasticidade sináptica, como a LTP, que garantem a consolidação efetiva da memória. Essa importância funcional do hipocampo e as evidências relativas à importância dos processos glutamatérgicos nos circuitos hipocámpais fundamentaram as análises hipocámpais da atividade da NOS e da variação da nNOS conduzidas no presente estudo.

É importante considerar que a atividade da NOS está diretamente relacionada com processos sinápticos mediados por GLU. Assim, pode-se considerar que a distribuição de células que sintetizam nNOS estaria relacionada com a distribuição

de sinapses glutamatérgicas nos circuitos hipocampais. Suarez *et al.* (2006) observaram que a formação hipocampal e o hiperpálio de galinhas apresentam uma ampla distribuição de células imunoreativas para nNOS e para calbindina (CB). As células CB-positivas têm proteínas ligantes de cálcio e, desse modo, podem sugerir relação com aumento da marcação nNOS-positiva, principalmente na área dorso-lateral do hipocampo onde foram encontradas mais intensamente. Rosinha (2003), focalizando a marcação de subunidades de receptores de GLU do tipo AMPA, observou intensa marcação de células GluR1 e GluR2/R3- positivas na área dorsomedial do Hp de pombos, o que pode também sugerir a atuação da nNOS nessas células. De modo relacionado, Silva (2007) relatou aumento de células nNOS positivas no hipocampo dorsal dos animais treinados por cinco dias em aprendizagem de escolha alimentar, quando comparados com os animais treinados por apenas 1 dia. Esse trabalho demonstra uma relação entre o aprendizado e o aumento da quantidade de nNOS hipocampal sugerindo o envolvimento desta enzima em processos de memória de longa duração. Esses dados sugerem uma regionalização de circuitos que têm mecanismos sinápticos mediados por GLU, NOS e NO.

Como já relatado por Rickard *et al.* (2003) o 7-NI inibe, tanto a nNOS quanto a eNOS *in vitro*, porém não é observado nenhum efeito na pressão arterial *in vivo*, sugerindo uma inibição específica dessa droga para a nNOS. Assim, podemos concluir que a inibição específica da nNOS provocada pelo 7-NI foi efetiva, confirmando as informações já relatadas por diversos trabalhos de que esse composto é um potente inibidor da nNOS (SOUTHAN, *et al.*, 1996; KALISCH, *et al.*, 1996; BUSH *et al.*, 2001; RICKARD e GIBBS, 2003).

Desse modo, podemos concluir que a inibição pelo 7-NI foi efetiva e específica para a NOS dependente de Ca^{++} , confirmando as informações já relatadas por diversos trabalhos de que esse composto é um potente inibidor da nNOS (SOUTHAN, *et al.*, 1996; KALISCH, *et al.*, 1996; BUSH *et al.*, 2001; RICKARD e GIBBS, 2003). Essa especificidade também é indicada pela similaridade estatística entre os grupos quanto aos valores da NOS independente de Ca^{++} .

Assim, os dados que mostram a diminuição da atividade enzimática pelo 7-NI permite supor que a ação da droga sobre a nNOS levou a uma redução de sua atividade e conseqüente redução da síntese do NO. Essas alterações culminaram com o déficit nas vias de sinalizações bioquímicas intracelulares em que o NO está envolvido e, dessa forma, que prejudicaram o fortalecimento sináptico nas células hipocampusais, provocando um prejuízo na memória contextual aversiva que pode ser percebida pela diminuição da freqüência do comportamento de congelamento durante a sessão de teste ao contexto pelo mesmo grupo.

Contudo, é necessário salientar que o GM que não passou pelo treinamento de condicionamento teve valores da atividade da NOS dependente de Ca^{++} que não diferiram significativamente quando comparados ao GC e ao GV que passaram pela situação de treinamento e não receberam infusão do 7-NI. Esses dados sugerem que o aumento na atividade da NOS dependente de Ca^{++} não foi induzido apenas pela situação de teste no condicionamento clássico aversivo. Os animais do GM foram expostos a ambientes diferentes durante quatro dias, quando eram retirados da gaiola, transportados e pesados. As estimulações resultantes dessa manipulação podem também ser indutoras de estresse e ter

provocado ativações de vias de transmissão no hipocampo que utilizam o NO para a sinalização. Conseqüentemente, o aumento da atividade da NOS dependente de Ca^{++} no hipocampo desses animais pode ter sido desencadeado pelo estresse associado a estímulos visuais como, por exemplo, a própria visão e aproximação do experimentador. Ou ainda, é possível que exista uma atividade basal da enzima no cérebro dos animais e que o treinamento de condicionamento aversivo não seja eficaz para promover um aumento na atividade enzimática. Dessa forma, o treinamento não é eficaz em promover o aumento na atividade enzimática, mas a diminuição desta atividade provocada, no caso do presente trabalho, pelo 7-NI provocou uma alteração comportamental que pode ser interpretada como um déficit na memória contextual aversiva e que o NO é fundamental para os processos de plasticidade sináptica que são a base desse tipo de aprendizado.

Outra possibilidade é que se os circuitos glutamatérgicos e nitrérgicos no hipocampo são regionalizados, o fato das análises *ex vivo* terem usado todo o tecido hipocampal poderia explicar, pelo menos parcialmente, a ausência de diferenças significativas na análise da atividade bioquímica entre os grupos GM, GC e GV.

Finalmente, para analisar a expressão protéica da nNOS no hipocampo dos animais dos diferentes grupos, o presente trabalho utilizou a técnica de *Western blot* seguida de análise de densitometria óptica das bandas imunorreativas, no tecido hipocampal. Os resultados indicaram diferença significativa entre os grupos quando a análise feita levou em consideração os valores da expressão protéica da nNOS dos grupos GC, GV e G7-NI com relação aos valores do GM. Assim, o

grupo G7-NI apresentou aumento significativo na expressão da nNOS quando comparado com os demais grupos. Interessantemente, o G7-NI é o grupo no qual a atividade da nNOS foi inibida. Os dados referentes ao aumento da expressão da nNOS no tecido hipocampal em animais tratados com 7-NI, aqui apresentados, são inéditos.

Porém, é importante enfatizar que esses dados podem ser considerados em acordo com o que já foi descrito em tecido vascular de camundongos, anteriormente, num trabalho realizado por Garcia *et al.* (2008). Eles demonstraram um aumento na expressão da nNOS em camundongos selvagens e em camundongos *knock out* para receptores de LDL alimentados com uma dieta rica em colesterol, quando comparados com animais alimentados com dieta padrão. A hipercolesterolemia age no endotélio e provoca a redução da biodisponibilidade do NO para esse tecido. Assim, associando os dados do presente trabalho, com o trabalho de Garcia *et al.* (2008) descrito anteriormente é possível inferir que, ocorrendo déficit na produção e ou na função do NO, ocorre a ativação de mecanismos compensatórios a fim de suprir as necessidades da célula relacionadas com a função desse gás. Contudo, esses resultados ainda precisam ser melhor investigados.

O conjunto de resultados aqui apresentados contribui para a análise da integração dos processos comportamentais de memória contextual aversiva, e dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes. Dessa forma, este estudo mostrou que a inibição da atividade da nNOS pelo 7-NI foi eficaz e que esta inibição está relacionada com o prejuízo na consolidação da memória contextual

aversiva. Esse efeito pode ser evidenciado pela avaliação comportamental dos pombos em situação de condicionamento clássico aversivo, considerando a alteração comportamental vista nos pombos do G7-NI em comparação com os demais grupos. Especificamente, esses dados indicam a participação do hipocampo nesses processos, e sugerem que a atividade da nNOS, necessária para a síntese do NO, participa de processos de plasticidade sináptica no hipocampo que são subjacentes ao medo condicionado. Neste sentido, os dados do presente estudo contribuem para as análises do papel do hipocampo no condicionamento clássico aversivo em pombos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho insere-se numa seqüência dos estudos desenvolvidos sobre condicionamento clássico aversivo em pombos, no nosso laboratório, acrescentando informações que contribuem para a análise dos fundamentos comportamentais, celulares e moleculares dos processos de aprendizagem e memória de eventos aversivos.

1. O hipocampo de aves, tal como de mamíferos, participa da consolidação da memória contextual aversiva.

2. A administração sistêmica do 7-NI imediatamente após o treino teve efeitos amnésicos relacionados com a memória contextual.

3. A isoforma neuronal da NOS, que atua na síntese de NO, está envolvida nesse tipo de aprendizado e memória visto que sua inibição por 7-NI prejudicou a expressão comportamental da memória aversiva ao contexto.

4. A consolidação da memória contextual aversiva em pombos envolve processos de plasticidade neuronal mediados por nNOS.

5. A diminuição da atividade da NOS dependente de Ca^{++} no hipocampo dos animais tratados com 7-NI corroborou a literatura indicativa de que o 7-NI é um inibidor potente da nNOS.

6. A variação da quantidade de nNOS hipocampal, como indicada pelas análises de *Western blot*, sugere que inibição da nNOS pelo 7-NI induziu mecanismos regulatórios intracelulares que resultaram num aumento da quantidade da proteína que foi inibida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, T.; LATTAL, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. ***Curr Opin Neurobiol.***; v. 11; n. 2; p.180-187, 2001.

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

AKAR, U.Y.; ULAK, G.; TANYERI, P.; ERDEN, F.; UTKAN, T.; GACAR, N. 7-Nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, impairs passive-avoidance and elevated plus-maze memory performance in rats. ***Pharmacol, Biochem and Behav.*** v. 87, p. 434 – 443, 2007.

BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats. ***Exp Brain Res.*** v. 139; p. 39-52, 2001.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L.M.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of long-term memory storage requires a

late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261-277, 2007

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci. U S A**. v. 87 n. 2 p. 682-685. 1990.

BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; GLATT, C.E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R.R.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. **Nature**. v. 351 n. 6329 p. 714-718, 1991.

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

BON, C.L.M.; GARTHWAITE, J., On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **J neurosci.**, v. 23, n. 5, p. 1941-1948, 2003.

BRITO, I.; BRITTO, L.G.R.; FERRARI, E.A.M. Classical tone-shock conditioning induces Zenk expression in the pigeon hippocampus. **Behav Neurosci.** v. 120 n. 2 p. 353-61, 2006.

BUSH, M.A.; POLLACK, G.M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 7-nitroindazole, a selective nitric oxide synthase inhibitor, in the rat hippocampus. **Pharmacol Res.** v. 18; n. 11 p. 1607-1612, 2001.

CAMPBELL, C.B.; HODOS, W. The concept of homology and the evolution of the nervous system. **Brain, Behav Evol.**, v.3, p. 353-367, 1970.

CASINI, G.; BIGMAN, V.P.; BAGNOLI, P. Connections of the pigeon dorsomedial forebrain studied with WGA-HRP and H-Proline. **Comp Neurol.**, v. 245 p. 454-470, 1986.

DAWSON, T.M.; SNYDER, S.H. Gases as biologic messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J Neurosci.**, v. 14; n. 9; p. 5147-5159, 1994.

DE LA TORRE, J.C.; ALIEV, G. Inhibition of vascular nitric oxide after rat chronic brain hypoperfusion: spatial memory and immunocytochemical changes. **J Cereb Blood Flow Metab.** v. 25; n. 6; p. 663-672, 2005.

DUNNING, J.; DURING, M.J. Molecular mechanisms of learning and memory. **Expert Rev Mol Med.** v. 7; n. 25; p.1-11, 2003.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

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

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

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

FORNEL, A.C.G.; TEIXEIRA, S.A.; DENADAI, M.A.; MUSCARÁ, M.; FERRARI, E.A.M. Inibição da sintase neuronal do óxido nítrico (nNOS) por 7-nitroindazole e a habituação a som em pombos (*C. livia*). Laboratório de Sistemas Neurais e Comportamento, Depto. De Fisiologia e Biofísica, IB, UNICAMP e Depto. de Farmacologia, ICB, USP. **FeSBE**, 2006.

GALEA, E.; FEINSTEIN, D.L.; REIS, D.J. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. **Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**, v. 89: p. 10945-10949, 1992.

GARCIA, J.A.; DOS SANTOS, L.; MOURA, A.L.; RICARDO, K.F.; WANSCHER, A.C.; SHISHIDO, S.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C.; DE SOUZA, H.P.; KRIEGER M.H. S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by anti-inflammatory action. **J. Cardiovasc Pharmacol**. v. 51, n. 1, p. 78-85, 2008.

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

GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **Eur J Neurosci**. V. 27, p. 2783-2802, 2008.

GOULD, T.J.; MCCARTHY, M.M.; KEITH, R.A. MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. **Behav Pharmacol**. v. 13; n. 4; p. 287-294, 2002.

GROVES, J.T.; WANG, C.C.Y. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Current Opinion in Chem. Biol.**, v. 4, p. 687-695, 2000.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

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

HOLSCHER, C. 7-Nitro indazole, a neuron-specific nitric oxide synthase inhibitor, produces amnesia in the chick. **Learn Mem.**, v. 1, n. 4, p. 213-6, 1994.

HOLSCHER, C.; McGLINCHEY, L.; ANWYL, R.; ROWAN, M.J. 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. **Learn Mem.** V.2, n. 6, p. 267-78, 1996.

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

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. **Braz J Med Biol Res.**, v. 26, p. 573-589, 1993.

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

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci.** v. 29; n. 9; p. 496-505, 2006

JOHNSON, D.M.; BAKER, J.D.; AZORLOSA, J.L. Acquisition, extinction, and reinstatement of Pavlovian fear conditioning: The roles of the NMDA receptor and nitric oxide. **Brain Res.** v. 857; p. 66-70, 2000.

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

KALISCH, B.E.; CONNOP, B.P.; JHAMANDAS, K.; BENINGER, R.J.; BOEGMAN, R.J. Differential action of 7-nitro indazole on rat nitric oxide synthase. **Neurosci. Letters.** v. 219; p. 75-78, 1996.

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

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

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, p. 675-677, 1992.

KIM, J.J.; JUNG, M.W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 30, p.188-202, 2006.

KIRCHNER, L.; WEITZDOERFER, R.; HOEGER, H.; URL A.; SCHMIDT, P.; ENGELMANN, M.; VILLAR, S.R.; FOUNTOLAKIS, M.; LUBEC, G.; LUBEC, B. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. **Nitric Oxide**, v. 11; n. 4; p. 316-30, 2004.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.** v. 298, p. 249-258, 1994.

KREBS, J.R.; ERICHSEN, J.T.; BINGMAN, V.P. The distribution of neurotransmitters and neurotransmitter-related enzymes in the dorsomedial telencephalon of pigeon (*Columba livia*). **Comp Neurol.**, 314:467-477, 1991.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nature Neurosci.** v. 5; p. 45-54, 2004.

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

LEE, S.C.; DICKSON, D.W.; LIU, W.; BROSNAN, C.F. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. **Journal of Neuroimmunology**, v. 46, p. 19-24, 1993.

LE ROUX, N.; AMAR, M.; FOSSIER, P. Acquiring new information in a neuronal network: from Hebb's concept to homeostatic plasticity. **J Soc Biol.** v. 202 n. 2, p. 143-160, 2008

LEHMANN, H.; LACANILAO, S.; SUTHERLAND, R.J. Complete or partial hippocampal damage produces equivalent retrograde amnesia for remote contextual fear memories. **Eur J Neurosci.** v. 25, p 1278-1286, 2007.

LU, Y.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric Oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. **J Neurosci.** v.1, n. 23, p. 10250-10261, 1999.

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

MAREN, S. Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibitor, on locomotors activity and contextual fear conditioning in rats. **Brain Res.**, v 804, p. 155-158, 1998.

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

MAREN, S.; BAUDRY, M. Properties and mechanisms of long term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. **Neurobiol. Learn Mem.**, v. 63, p. 1-18, 1995.

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

MAREN, S.; QUIRK, G.J. Neuronal signalling of fear memory. **Nature Rev.**, v. 5, p. 844-852, 2004.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927-30, 1994.

MAYER, B.; JOHN M.; HEINZEL B.; WERNER E.R.; WACHTER H.; SCHULTZ G.; BÖHME E. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. **FEBS Lett.** v. 288, p. 187-191, 1991.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **TiBS**, v. 22, n. 12, p. 477-481, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v. 43; n. 2; p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS. A.; FURCHGOTT, R. International Union of Pharmacology nomenclature in Nitric Oxide Research. **Pharmacol Rev.** v. 49, n. 2, p. 137-142, 1997.

MOORE, P.K.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z.; HART, S.L.; BABBEDGE, R.C. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related Indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br J Pharmacol.** v. 110, n. 1; p. 219-224, 1993.

MOORE, P.K.; HANDY, R.L.C. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase – is no NOS really good NOS for the nervous system? **TiPS.** v.18, p. 204-211, 1997.

MUNGRUE, I.N.; BREDT, D.S.; STEWART, D.J.; HUSAIN, M. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? **Acta physiological Scandinavica**, v. 179, p. 123-135, 2003.

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

PANG, P.T.; LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. **Ageing Res Rev.** v. 3, n. 4 p. 407-30, 2004.

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

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

PISANA, M. Cytoarchitecture and connectional organization in telencephalic medial wall of the domestic chick (*Gallus domesticus*), 1986. (D. Phill. Thesis-University of Sussex).

RAMAN, C.S.; LI, H.; MARTÁSEK, P.; SOUTHAN, G.; MASTERS, B.S.S.; POULOS, T.L. Crystal structure of nitric oxide synthase bound to nitric indazole reveals a novel inactivation mechanism. **Biochem.**, v. 40, p. 13448-13455, 2001.

REINER, A. A new avian brain nomenclature: Why, how and what. **Brain Res Bul.** v. 66, p. 317-331, 2005.

REIS, F., SCHENKA, A.A., MELLO, L.L., & FERRARI, E.A.M. Role of the hippocampus in contextual memory after classical aversive conditioning in pigeons. **Braz. J Med. and Biol. Res.**, 32, 1127-1131, 1999.

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

RICKARD, N.S.; GIBBS, M.E. Hemispheric Dissociation of the Involvement of NOS Isoforms in Memory for Discriminated Avoidance in the Chick. **Learn Mem.** v. 10; P. 314-318, 2003.

ROSENFELD, R.J.; GARCIN, E.D.; PANDA K.; ANDERSON, G.; ABERG, A.; WALLACE, A.V.; MORRIS G.M.; OLSON, A.; STUEHR, D.J.; TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D. Conformational changes in nitric synthases induced by chlorzoxazone and nitroindazoles: Crystallographic and computational analyses of inhibitor potency. **Biochem.**, v. 41, p. 13915-13925, 2002.

ROSINHA, M.U. Distribuição de neuromarcadores na formação hipocampal de aves. (Dissertação de mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2003.

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

SCARPIM, B.V.; SIQUEIRA, L.O.; FERRARI, E.A.M. Efeitos de infusões intra-hipocâmpais do antagonista do receptor ampa, dnqx, no freezing ao contexto do condicionamento som-choque. In: XI Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2003, Campinas – SP.

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

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 em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2007.

SOUTHAN, G.J.; SZABÓ, C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem Pharmacol.** V. 51; p. 383-394, 1996.

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

SPERANDÉO, M.L.A.S. ; BRITO, I. ; SIQUEIRA L.O. ; BRITTO, L.R.G. ; FERRARI, E.A.M. Evocação da memória contextual aversiva em pombos: efeitos do bloqueio pré-treino do receptor NMDA com o antagonista MK-801 na ativação do produto do proto-oncogene zenk no hipocampo.. In: XX Reunião Anual da FeSBE, 2005, Águas de Lindóia, SP.

SQUIRE, L.R. Rapid Consolidation. **Science.** v. 316; n. 5821; p. 57-58, 2007.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. Memória. Da mente às moléculas. Artmed, 2003.

SUÁREZ, J.; DÁVILA, J.C.; REAL, M.A.; GUIRADO, S.; MEDINA, L. Calcium-binding proteins, neuronal nitric oxide synthase, and GABA help to distinguish different pallial areas in the developing and adult chicken. I. Hippocampal formation and hyperpallium. **J Comp Neurol.** v. 10; p. 751-771, 2006

SUSSWEIN, A.J.; KATZOFF, A.; MILLER N.; HURWITZ I. Nitric Oxide and memory. **The Neurosci.**, v. 10, p. 153-162, 2004.

SZEKELY, A.D. The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. **Behav Brain Res.** v. 98; p. 219-225, 1999.

TEIXEIRA, S.A. Participação do óxido nítrico no desenvolvimento da encefalomielite alérgica experimental em ratos. (Tese de Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas – São Paulo, 2001.

WEITZDOERFER, R.; HOEGER H.; ENGIDAWORK E.; ENGELMANN, M.; SINGEWALD, N.; LUBEC, G; .LUBEC, B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performace. **Nitric Oxide**, v. 10; p. 130-140, 2004.

WHITE, N.M.; SALINAS, J.A. Mnemonic functions of dorsal striatum and hippocampus in aversive condictioning. **Behav Brain Res.**, v. 142, p. 99-107, 2003.

XU, X.; DAVIS, R.E. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 impairs learning but not memory fixation or expression of classical fear conditioning in goldfish (*Carassius auratus*). **Behav Neurosci.** v. 106; n. 2; p. 307-314, 1992.

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

APÊNDICE

TABELA 1 - Valores absolutos de ocorrência de cada categoria de comportamento, com respectivas, porcentagem média, desvio padrão e $\pm$ epm da média, durante a sessão de treino. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI). Movimentos Isolados (MOV); Pré-exploratórios (PRÉ); Exploratórios (EXP); Locomoção (LOC); Manutenção (MAN); Parado (PAR); Congelamento (FRZ).

GRUPO	SUJEITO	CATEGORIAS COMPORTAMENTAIS						
		MOV	PRE	EXP	LOC	MAN	PAR	FRZ
GC	2086	0	0	57,5	0	0	0	42,5
	2087	0	0	55	2,5	0	0	42,5
	2094	0	0	0	2,5	0	0	97,5
	2108	12,5	0	22,5	0	0	32,5	32,5
	2114	0	0	37,5	5	0	0	57,5
	2115	0	0	2,5	7,5	0	25	65
	2149	22,5	0	0	5	0	0	72,5
	2152	17,5	0	15	7,5	0	17,5	42,5
MÉDIA		6,56	0,00	23,75	3,75	0,00	9,38	56,56
DESVIO PARÃO		9,44	0,00	23,79	2,99	0,00	13,55	21,29
ERRO PADRÃO		3,57	0,00	8,99	1,13	0,00	5,12	8,05
GV	2069	7,5	0	0	0	0	17,5	75
	2071	10	0	5	2,5	0	22,5	60
	2075	5	2,5	0	2,5	0	17,5	72,5
	2079	0	2,5	0	2,5	0	0	95
	2080	0	0	27,5	0	0	0	72,5
	2083	0	5	5	0	0	0	90
	2085	7,5	2,5	2,5	2,5	0	12,5	72,5
	2095	0	0	52,5	0	0	0	47,5
MÉDIA		3,75	1,56	11,56	1,25	0,00	8,75	73,13
DESVIO PARÃO		4,23	1,86	18,90	1,34	0,00	9,73	15,10
ERRO PADRÃO		1,60	0,70	7,14	0,51	0,00	3,68	5,71
G7-NI	2047	10	2,5	17,5	0	0	0	70
	2049	2,5	0	45	0	0	2,5	50
	2070	2,5	0	45	0	0	2,5	50
	2072	10	0	15	5	0	32,5	37,5
	2074	0	2,5	45	10	17,5	0	25
	2077	15	0	20	0	0	7,5	57,5
	2078	20	0	0	0	0	5	75
	2084	7,5	2,5	35	2,5	0	15	37,5
MÉDIA		8,44	0,94	27,81	2,19	2,19	8,13	50,31
DESVIO PARÃO		6,81	1,29	17,08	3,64	6,19	11,00	16,98
ERRO PADRÃO		2,57	0,49	6,46	1,38	2,34	4,16	6,42

TABELA 2 - Valores absolutos de ocorrência de cada categoria de comportamento, com respectivas, porcentagem média, desvio padrão e $\pm$ epm da média, durante a sessão de teste. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI). Movimentos Isolados (MOV); Pré-exploratórios (PRÉ); Exploratórios (EXP); Locomoção (LOC); Manutenção (MAN); Parado (PAR); Congelamento (FRZ).

GRUPO	SUJEITO	CATEGORIAS COMPORTAMENTAIS						
		MOV	PRE	EXP	LOC	MAN	PAR	FRZ
GC	2086	2,5	0	50	0	0	0	47,5
	2087	0	2,5	45	5	0	0	47,5
	2094	45	0	0	0	0	12,5	42,5
	2108	0	0	0	0	0	0	100
	2114	0	0	25	0	0	0	75
	2115	0	0	5	0	0	25	70
	2149	0	0	2,5	0	0	0	97,5
	2152	15	0	60	5	0	0	20
MÉDIA		7,81	0,31	23,44	1,25	0,00	4,69	62,50
DESVIO PARÃO		15,89	0,88	25,03	2,31	0,00	9,30	28,03
ERRO PADRÃO		6,01	0,33	9,46	0,87	0,00	3,52	10,59
GV	2069	37,5	0	10	0	0	5	47,5
	2071	12,5	2,5	5	0	0	0	80
	2075	2,5	0	52,5	0	0	0	45
	2079	0	0	7,5	0	0	0	92,5
	2080	0	0	85	0	0	0	15
	2083	22,5	0	5	0	0	57,5	15
	2085	0	0	2,5	2,5	0	0	95
	2095	0	0	70	0	0	0	30
MÉDIA		9,38	0,31	29,69	0,31	0,00	7,81	52,50
DESVIO PARÃO		14,00	0,88	33,90	0,88	0,00	20,15	32,87
ERRO PADRÃO		5,29	0,33	12,81	0,33	0,00	7,62	12,42
G7-NI	2047	62,5	0	15	0	0	22,5	0
	2049	70	2,5	2,5	0	0	25	0
	2070	77,5	0	22,5	0	0	0	0
	2072	22,5	0	5	0	0	72,5	0
	2074	15	0	0	0	0	85	0
	2077	5	0	90	0	0	5	0
	2078	12,5	0	0	0	0	87,5	0
	2084	80	0	5	2,5	0	12,5	0
MÉDIA		43,13	0,31	17,50	0,31	0,00	38,75	0,00
DESVIO PARÃO		32,18	0,88	30,33	0,88	0,00	36,72	0,00
ERRO PADRÃO		12,16	0,33	11,46	0,33	0,00	13,88	0,00

TABELA 3 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de congelamento, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de treino. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	0	0	3	3	3	3	1	4
	2087	0	0	0	0	3	4	5	5
	2094	5	5	4	5	5	5	5	5
	2108	0	0	4	5	0	0	4	0
	2114	0	0	3	4	1	5	5	5
	2115	0	0	3	5	4	5	4	5
	2149	0	0	5	5	5	4	5	5
	2152	0	0	0	0	3	4	5	5
SOMATÓRIA		5	5	22	27	24	30	34	34
MÉDIA		0,6	0,6	2,8	3,4	3,0	3,8	4,3	4,3
DESVIO PADRÃO		1,8	1,8	1,8	2,2	1,8	1,7	1,4	1,8
ERRO PADRÃO		0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,6	0,5	0,7
GV	2069	0	1	4	5	5	5	5	5
	2071	0	1	5	4	5	4	4	1
	2075	0	0	5	4	5	5	5	5
	2079	4	4	5	5	5	5	5	5
	2080	0	0	5	5	5	4	5	5
	2083	4	4	5	4	5	4	5	5
	2085	0	0	5	5	5	5	4	5
	2095	0	0	2	0	4	5	3	5
SOMATÓRIA		8	10	36	32	39	37	36	36
MÉDIA		1,0	1,3	4,5	4,0	4,9	4,6	4,5	4,5
DESVIO PADRÃO		1,9	1,8	1,1	1,7	0,4	0,5	0,8	1,4
ERRO PADRÃO		0,7	0,7	0,4	0,6	0,1	0,2	0,3	0,5
G7-NI	2047	0	0	5	4	5	5	4	5
	2049	0	0	0	0	5	5	5	5
	2070	0	0	4	4	5	4	5	5
	2072	0	0	2	5	0	0	3	5
	2074	0	0	0	4	0	0	1	5
	2077	0	0	5	5	3	1	4	5
	2078	0	0	0	0	5	5	5	5
	2084	0	0	0	0	5	5	5	0
SOMATÓRIA		0	0	16	22	28	25	32	35
MÉDIA		0,0	0,0	2,0	2,8	3,5	3,1	4,0	4,4
DESVIO PADRÃO		0,0	0,0	2,3	2,3	2,3	2,4	1,4	1,8
ERRO PADRÃO		0,0	0,0	0,9	0,9	0,9	0,9	0,5	0,7

TABELA 4 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de congelamento, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de teste. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	0	0	1	3	5	3	4	3
	2087	1	5	5	1	4	0	2	1
	2094	0	3	5	5	4	0	0	0
	2108	5	5	5	5	5	5	5	5
	2114	2	0	4	5	4	5	5	5
	2115	0	0	2	5	5	5	5	5
	2149	4	5	5	5	5	5	5	5
	2152	2	1	0	3	2	0	0	0
SOMATÓRIA		14	19	27	32	34	23	26	24
MÉDIA		1,8	2,4	3,4	4,0	4,3	2,9	3,3	3,0
DESVIO PADRÃO		1,9	2,4	2,1	1,5	1,0	2,5	2,3	2,3
ERRO PADRÃO		0,7	0,9	0,8	0,6	0,4	0,9	0,9	0,9
GV	2069	0	4	4	5	5	1	0	0
	2071	0	2	5	5	5	5	5	5
	2075	1	5	4	2	2	1	1	2
	2079	5	5	5	5	5	5	5	2
	2080	5	1	0	0	0	0	0	0
	2083	4	2	0	0	0	0	0	0
	2085	4	5	4	5	5	5	5	5
	2095	3	4	0	0	3	1	1	0
SOMATÓRIA		22	28	22	22	25	18	17	14
MÉDIA		2,8	3,5	2,8	2,8	3,1	2,3	2,1	1,8
DESVIO PADRÃO		2,1	1,6	2,3	2,5	2,2	2,3	2,4	2,2
ERRO PADRÃO		0,8	0,6	0,9	0,9	0,8	0,9	0,9	0,8
G7-NI	2047	0	0	0	0	0	0	0	0
	2049	0	0	0	0	0	0	0	0
	2070	0	0	0	0	0	0	0	0
	2072	0	0	0	0	0	0	0	0
	2074	0	0	0	0	0	0	0	0
	2077	0	0	0	0	0	0	0	0
	2078	0	0	0	0	0	0	0	0
	2084	0	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		0	0	0	0	0	0	0	0
MÉDIA		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DESVIO PADRÃO		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
ERRO PADRÃO		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

TABELA 5 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de Parado, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de treino. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	0	0	0	0	0	0	0	0
	2087	0	0	0	0	0	0	0	0
	2094	0	0	0	0	0	0	0	0
	2108	0	0	0	0	4	5	0	4
	2114	0	0	0	0	0	0	0	0
	2115	4	5	1	0	0	0	0	0
	2149	0	0	0	0	0	0	0	0
	2152	0	2	2	3	0	0	0	0
SOMATÓRIA		4	7	3	3	4	5	0	4
MÉDIA		0,5	0,9	0,4	0,4	0,5	0,6	0,0	0,5
DESVIO PADRÃO		1,4	1,8	0,7	1,1	1,4	1,8	0,0	1,4
ERRO PADRÃO		0,5	0,7	0,3	0,4	0,5	0,7	0,0	0,5
GV	2069	3	4	0	0	0	0	0	0
	2071	4	4	0	0	0	0	0	1
	2075	3	4	0	0	0	0	0	0
	2079	0	0	0	0	0	0	0	0
	2080	0	0	0	0	0	0	0	0
	2083	0	0	0	0	0	0	0	0
	2085	3	2	0	0	0	0	0	0
	2095	0	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		13	14	0	0	0	0	0	1
MÉDIA		1,6	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
DESVIO PADRÃO		1,8	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
ERRO PADRÃO		0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
G7-NI	2047	0	0	0	0	0	0	0	0
	2049	0	0	0	1	0	0	0	0
	2070	4	3	0	0	0	0	0	0
	2072	1	0	3	0	5	3	1	0
	2074	0	0	0	0	0	0	0	0
	2077	1	2	0	0	0	0	0	0
	2078	1	1	0	0	0	0	0	0
	2084	0	0	2	4	0	0	0	0
SOMATÓRIA		7	6	5	5	5	3	1	0
MÉDIA		0,9	0,8	0,6	0,6	0,6	0,4	0,1	0,0
DESVIO PADRÃO		1,4	1,2	1,2	1,4	1,8	1,1	0,4	0,0
ERRO PADRÃO		0,5	0,4	0,4	0,5	0,7	0,4	0,1	0,0

TABELA 6 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de Parado, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de teste. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	0	0	0	0	0	0	0	0
	2087	0	0	0	0	0	0	0	0
	2094	0	0	0	0	0	0	0	5
	2108	0	0	0	0	0	0	0	0
	2114	0	0	0	0	0	0	0	0
	2115	3	5	2	0	0	0	0	0
	2149	0	0	0	0	0	0	0	0
	2152	0	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		3	5	2	0	0	0	0	5
MÉDIA		0,4	0,6	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6
DESVIO PADRÃO		1,1	1,8	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8
ERRO PADRÃO		0,4	0,7	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
GV	2069	1	0	0	0	0	0	0	1
	2071	0	0	0	0	0	0	0	0
	2075	0	0	0	0	0	0	0	0
	2079	0	0	0	0	0	0	0	0
	2080	0	0	0	0	0	0	0	0
	2083	0	2	4	5	3	5	2	2
	2085	0	0	0	0	0	0	0	0
	2095	0	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		1	2	4	5	3	5	2	3
MÉDIA		0,1	0,3	0,5	0,6	0,4	0,6	0,3	0,4
DESVIO PADRÃO		0,4	0,7	1,4	1,8	1,1	1,8	0,7	0,7
ERRO PADRÃO		0,1	0,3	0,5	0,7	0,4	0,7	0,3	0,3
G7-NI	2047	0	0	3	3	0	2	0	1
	2049	1	3	1	1	0	3	1	0
	2070	0	0	0	0	0	0	0	0
	2072	3	3	5	4	4	4	1	5
	2074	5	3	4	5	5	5	4	3
	2077	0	1	1	0	0	0	0	0
	2078	5	5	5	2	4	4	5	5
	2084	0	1	1	2	0	0	0	1
SOMATÓRIA		14	16	20	17	13	18	11	15
MÉDIA		1,8	2,0	2,5	2,1	1,6	2,3	1,4	1,9
DESVIO PADRÃO		2,3	1,8	2,0	1,8	2,3	2,1	2,0	2,2
ERRO PADRÃO		0,9	0,7	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8

TABELA 7 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de Movimento Gerais, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de treino. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	0	0	0	0	0	0	0	0
	2087	0	0	0	0	0	0	0	0
	2094	0	0	0	0	0	0	0	0
	2108	2	3	0	0	0	0	0	0
	2114	0	0	0	0	0	0	0	0
	2115	0	0	0	0	0	0	0	0
	2149	5	4	0	0	0	0	0	0
	2152	3	2	1	1	0	0	0	0
SOMATÓRIA		10	9	1	1	0	0	0	0
MÉDIA		1,3	1,1	0,1	0,1	0	0	0	0
DESVIO PADRÃO		1,9	1,6	0,4	0,4	0	0	0	0
ERRO PADRÃO		0,7	0,6	0,1	0,1	0	0	0	0
GV	2069	2	0	1	0	0	0	0	0
	2071	1	0	0	0	0	0	0	3
	2075	2	0	0	0	0	0	0	0
	2079	0	0	0	0	0	0	0	0
	2080	0	0	0	0	0	0	0	0
	2083	0	0	0	0	0	0	0	0
	2085	1	2	0	0	0	0	0	0
	2095	0	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		6	2	1	0	0	0	0	3
MÉDIA		0,8	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
DESVIO PADRÃO		0,9	0,7	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1
ERRO PADRÃO		0,3	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
G7-NI	2047	1	3	0	0	0	0	0	0
	2049	1	0	0	0	0	0	0	0
	2070	1	1	0	0	0	0	0	0
	2072	2	1	0	0	0	1	0	0
	2074	0	0	0	0	0	0	0	0
	2077	4	2	0	0	0	0	0	0
	2078	4	4	0	0	0	0	0	0
	2084	0	0	2	1	0	0	0	0
SOMATÓRIA		13	11	2	1	0	1	0	0
MÉDIA		1,6	1,4	0,3	0,1	0,0	0,1	0	0
DESVIO PADRÃO		1,6	1,5	0,7	0,4	0,0	0,4	0	0
ERRO PADRÃO		0,6	0,6	0,3	0,1	0,0	0,1	0	0

TABELA 8 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de Movimentos Gerais, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de teste. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	1	0	0	0	0	0	0	0
	2087	0	0	0	0	0	0	0	0
	2094	5	2	0	0	1	5	5	0
	2108	0	0	0	0	0	0	0	0
	2114	0	0	0	0	0	0	0	0
	2115	0	0	0	0	0	0	0	0
	2149	0	0	0	0	0	0	0	0
	2152	0	0	0	0	0	0	2	4
SOMATÓRIA		6	2	0	0	1	5	7	4
MÉDIA		0,8	0,3	0,0	0,0	0,1	0,6	0,9	0,5
DESVIO PADRÃO		1,8	0,7	0,0	0,0	0,4	1,8	1,8	1,4
ERRO PADRÃO		0,7	0,3	0,0	0,0	0,1	0,7	0,7	0,5
GV	2069	2	0	0	0	0	4	5	4
	2071	3	2	0	0	0	0	0	0
	2075	1	0	0	0	0	0	0	0
	2079	0	0	0	0	0	0	0	0
	2080	0	0	0	0	0	0	0	0
	2083	0	1	1	0	2	0	2	3
	2085	0	0	0	0	0	0	0	0
	2095	0	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		6	3	1	0	2	4	7	7
MÉDIA		0,8	0,4	0,1	0,0	0,3	0,5	0,9	0,9
DESVIO PADRÃO		1,2	0,7	0,4	0,0	0,7	1,4	1,8	1,6
ERRO PADRÃO		0,4	0,3	0,1	0,0	0,3	0,5	0,7	0,6
G7-NI	2047	0	4	2	2	5	3	5	4
	2049	4	2	4	4	5	2	3	4
	2070	0	3	5	5	5	3	5	5
	2072	2	2	0	0	1	0	4	0
	2074	0	2	1	0	0	0	1	2
	2077	1	0	0	1	0	0	0	0
	2078	0	0	0	3	1	1	0	0
	2084	3	3	4	3	5	5	5	4
SOMATÓRIA		10	16	16	18	22	14	23	19
MÉDIA		1,3	2,0	2,0	2,3	2,8	1,8	2,9	2,4
DESVIO PADRÃO		1,6	1,4	2,1	1,8	2,4	1,8	2,2	2,1
ERRO PADRÃO		0,6	0,5	0,8	0,7	0,9	0,7	0,8	0,8

TABELA 9 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de Exploração, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de treino. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	5	5	2	2	2	2	4	1
	2087	5	5	5	4	2	1	0	0
	2094	0	0	0	0	0	0	0	0
	2108	3	2	1	0	1	0	1	0
	2114	5	4	2	0	4	0	0	0
	2115	1	0	0	0	0	0	0	0
	2149	0	0	0	0	0	0	0	0
	2152	2	0	2	0	2	0	0	0
SOMATÓRIA		21	16	12	6	11	3	5	1
MÉDIA		2,6	2,0	1,5	0,8	1,4	0,4	0,6	0,1
DESVIO PADRÃO		2,2	2,3	1,7	1,5	1,4	0,7	1,4	0,4
ERRO PADRÃO		0,8	0,9	0,6	0,6	0,5	0,3	0,5	0,1
GV	2069	0	0	0	0	0	0	0	0
	2071	0	0	0	0	0	1	1	0
	2075	0	0	0	0	0	0	0	0
	2079	0	0	0	0	0	0	0	0
	2080	5	5	0	0	0	1	0	0
	2083	1	0	0	0	0	1	0	0
	2085	0	1	0	0	0	0	0	0
	2095	5	5	3	5	1	0	2	0
SOMATÓRIA		11	11	3	5	1	3	3	0
MÉDIA		1,4	1,4	0,4	0,6	0,1	0,4	0,4	0,0
DESVIO PADRÃO		2,3	2,3	1,1	1,8	0,4	0,5	0,7	0,0
ERRO PADRÃO		0,9	0,9	0,4	0,7	0,1	0,2	0,3	0,0
G7-NI	2047	4	1	0	1	0	0	1	0
	2049	4	5	5	4	0	0	0	0
	2070	0	0	0	0	0	0	0	0
	2072	2	3	0	0	0	0	1	0
	2074	2	0	4	1	4	5	2	0
	2077	0	1	0	0	2	4	1	0
	2078	0	0	0	0	0	0	0	0
	2084	5	4	0	0	0	0	0	5
SOMATÓRIA		17	14	9	6	6	9	5	5
MÉDIA		2,1	1,8	1,1	0,8	0,8	1,1	0,6	0,6
DESVIO PADRÃO		2,0	2,0	2,1	1,4	1,5	2,1	0,7	1,8
ERRO PADRÃO		0,8	0,7	0,8	0,5	0,6	0,8	0,3	0,7

TABELA 10 - Somatória dos valores absolutos de ocorrência de Exploração, com respectivas média, desvio padrão e $\pm$ epm em blocos de intervalos de registro de cada grupo, durante a sessão de teste. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

GRUPO	SUJEITO	BLOCOS DE INTERVALOS							
		05/40	10/40	15/40	20/40	25/40	30/40	35/40	40/40
GC	2086	4	5	4	2	0	2	1	2
	2087	4	0	0	2	1	5	3	3
	2094	0	0	0	0	0	0	0	0
	2108	0	0	0	0	0	0	0	0
	2114	3	5	1	0	1	0	0	0
	2115	2	0	0	0	0	0	0	0
	2149	1	0	0	0	0	0	0	0
	2152	3	3	4	2	3	5	3	1
SOMATÓRIA		17	13	9	6	5	12	7	6
MÉDIA		2,1	1,6	1,1	0,8	0,6	1,5	0,9	0,8
DESVIO PADRÃO		1,6	2,3	1,8	1,0	1,1	2,3	1,4	1,2
ERRO PADRÃO		0,6	0,9	0,7	0,4	0,4	0,9	0,5	0,4
GV	2069	2	1	1	0	0	0	0	0
	2071	2	0	0	0	0	0	0	0
	2075	3	0	1	3	3	4	4	3
	2079	0	0	0	0	0	0	0	3
	2080	0	4	5	5	5	5	5	5
	2083	1	0	0	0	0	0	1	0
	2085	1	0	0	0	0	0	0	0
	2095	2	1	5	5	2	4	4	5
SOMATÓRIA		11	6	12	13	10	13	14	16
MÉDIA		1,4	0,8	1,5	1,6	1,3	1,6	1,8	2,0
DESVIO PADRÃO		1,1	1,4	2,2	2,3	1,9	2,3	2,2	2,3
ERRO PADRÃO		0,4	0,5	0,8	0,9	0,7	0,9	0,8	0,9
G7-NI	2047	5	1	0	0	0	0	0	0
	2049	0	0	0	0	0	0	0	1
	2070	5	2	0	0	0	2	0	0
	2072	0	0	0	1	0	1	0	0
	2074	0	0	0	0	0	0	0	0
	2077	4	4	4	4	5	5	5	5
	2078	0	0	0	0	0	0	0	0
	2084	2	0	0	0	0	0	0	0
SOMATÓRIA		16	7	4	5	5	8	5	6
MÉDIA		2,0	0,9	0,5	0,6	0,6	1,0	0,6	0,8
DESVIO PADRÃO		2,3	1,5	1,4	1,4	1,8	1,8	1,8	1,8
ERRO PADRÃO		0,9	0,6	0,5	0,5	0,7	0,7	0,7	0,7

TABELA 11 – Valores da atividade da NOS dependente de cálcio no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo com respectivas, média, desvio padrão e $\pm$ epm da média, durante a sessão de teste. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

SUJEITOS	GRUPOS			
	GM	GC	GV	G7-NI
1	4,85	7,62	3,94	2,78
2	5,00	5,13	9,34	3,86
3	6,38	3,73	5,44	1,59
4	7,21	4,15	6,54	2,97
5	5,58	5,62	8,26	3,94
MÉDIA	5,80	5,25	6,70	3,03
DESVIO PADRÃO	0,99	1,52	2,16	0,96
ERRO PADRÃO	0,50	0,76	1,08	0,48

TABELA 12 – Valores da atividade da NOS independente de cálcio no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico aversivo com respectivas, média, desvio padrão e $\pm$ epm da média. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

SUJEITOS	GRUPOS			
	GM	GC	GV	G7-NI
1	0,54	0,96	1,24	1,17
2	0,89	0,74	1,03	1,70
3	2,24	0,42	1,40	4,71
4	1,46	0,69	1,15	0,45
5	1,85	0,59	1,46	1,85
MÉDIA	1,39	0,68	1,26	1,98
DESVIO PADRÃO	0,69	0,20	0,18	1,62
ERRO PADRÃO	0,31	0,09	0,08	0,72

TABELA 13 – Valores da expressão protéica de nNOS no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico normalizados pela tubulina, com suas respectivas médias, desvio padrão e $\pm$ epm da média. Grupos: Manipulação (GM), Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

SUJEITOS	GRUPOS			
	GM	GC	GV	G7-NI
1	0,43	0,58	0,52	0,66
2	0,56	0,65	0,61	0,79
3	0,92	0,70	1,06	1,40
4	0,71	0,56	0,90	1,21
MÉDIA	0,66	0,62	0,77	1,01
DESVIO PADRÃO	0,212311	0,06509	0,250541	0,345672
ERRO PADRÃO	0,122578	0,03758	0,14465	0,199574

TABELA 14 – Valores da expressão protéica de nNOS no hipocampo de pombos submetidos ao condicionamento clássico normalizados pela tubulina, com suas respectivas médias, desvio padrão e $\pm$ epm da média. Esses valores expressão a razão calculada em relação ao grupo GM. Grupos: Controle (GC), Veículo (GV), 7-NI (G7-NI).

SUJEITOS	GRUPOS		
	GC	GV	G7-NI
1	1,35	1,21	1,54
2	1,17	1,09	1,42
3	0,76	1,15	1,51
4	0,79	1,26	1,69
MÉDIA	1,02	1,18	1,54
DESVIO PADRÃO	0,29	0,07	0,11
ERRO PADRÃO	0,15	0,04	0,06

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de mestrado intitulada "EFEITOS DO 7-NITROINDAZOLE, UM INIBIDOR DA SINTASE NEURONAL DO ÓXIDO NITRICO (nNOS) SOBRE O CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL EM POMBOS."

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

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

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1192-1).

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

Magda A. Denadai

Aluno

Eleni

Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Nome:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Função:

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP