

ALESSANDRA FERNANDES DRUZIAN

**A INFLUÊNCIA DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NA MEMÓRIA
ESPACIAL DE CAMUNDONGOS SWISS EM TRÊS DIFERENTES
FAIXAS ETÁRIAS**

**CAMPO GRANDE
2013**

ALESSANDRA FERNANDES DRUZIAN

**A INFLUÊNCIA DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NA MEMÓRIA
ESPACIAL DE CAMUNDONGOS SWISS EM TRÊS DIFERENTES
FAIXAS ETÁRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

**CAMPO GRANDE
2013**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e conquistas que tem me proporcionado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Albert, por ter acreditado em mim e aceitado me orientar em uma área diferente da minha área de atuação. Serei eternamente grata pelos seus ensinamentos e pela oportunidade de me permitir aprender um pouco sobre uma área tão bela, a neurociência.

Ao técnico do Laboratório de Biomorfofisiologia Luiz, o arquiteto do ambiente enriquecido e do labirinto aquático, pela ajuda em todos os momentos.

Ao fisioterapeuta José Aparecido, pela grande ajuda durante a pesquisa, que dividiu meu trabalho pela metade. Meu muito obrigada!

À equipe do Biotério, Telma, Ingrid, Tuka, Adriana, Edson, e especialmente à Elaine, que manteve tudo na sua mais perfeita organização para que esse trabalho pudesse ser realizado. Meu muitíssimo obrigada!

Às amigas Olinda e Mara, pelas grandes contribuições que deram a esse trabalho na qualificação.

Ao meu marido Luiz Claudio, meu amor, meu maior tesouro, por acreditar em mim em todos os momentos e me apoiar em todas as decisões. Obrigada pelo companheirismo, pela paciência e pela compreensão nos momentos de ausência e estresse ao longo dessa empreitada. Muito obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus pais, Leoclides e Maria, meus maiores exemplos de vida, pelos ensinamentos, pelo incentivo, e pela base sólida que me permitiram chegar até aqui.

À minha irmã Angelita, meu anjo da guarda, e minha grande incentivadora, por nunca ter medido esforços para que eu chegasse até aqui. O agradecimento não cabe nas palavras.

Ao meu irmão Sérgio, pelo apoio, pela torcida e pelo incentivo constante.

Aos meus cunhados Jacob e Jonathan, pela amizade e pelo apoio.

Aos meus sogros Juarez e Esméria, pelo apoio e pela torcida.

Aos meus queridos residentes da Residência Multiprofissional, enfermeiros, nutricionistas, farmacêuticos, cirurgiões-dentistas e fisioterapeutas, especialmente aos meus pupilos Bruna, Júlio, Lucas e Rodrigo, pela compreensão nos momentos de ausência e pela amizade. Vocês também colherão frutos dessa conquista.

Às minhas ex-residentes e grandes amigas Alessandra, Delaine e Juliana, meus orgulhos, por terem me feito crescer como profissional. Muito obrigada pelo carinho e pela amizade.

Aos meus amigos Gustavo, Denise, André e Karen, pelos momentos de lazer para aliviar o estresse durante o mestrado, e pela amizade.

À minha equipe de trabalho do CTI Adulto, por ter carinhosamente me acolhido há seis anos. Meus sinceros agradecimentos pelo respeito ao meu trabalho, pela ajuda diária, pela amizade e pelos cafés com bobagem.

*“Se não fores estrada, sê vereda.
Se não puderes ser sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que se vence...
Sê o melhor naquilo que fores.”*

- Douglas Malloch -

RESUMO

Druzian, AF. A influência do ambiente enriquecido na memória espacial de camundongos *Swiss* em três diferentes faixas etárias. Campo Grande; 2013. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

O Ambiente Enriquecido, por promover neurogênese hipocampal, parece ter efeito neuroprotetor sobre os comprometimentos de memória relacionados ao envelhecimento, resultando em melhora da memória espacial de camundongos, porém, ainda há dúvidas quanto à melhor idade para se iniciar o enriquecimento ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do Ambiente Enriquecido na aquisição da memória espacial de camundongos submetidos a este ambiente em três diferentes faixas etárias. Camundongos fêmeas *Swiss* recém-desmamados (21 dias), jovens (três meses) e adultos jovens (sete meses) foram alojados em ambiente padrão controle ou em ambiente enriquecido durante 50 dias, e sua memória espacial foi testada por meio do Labirinto Aquático de Morris. Após 40 dias de alojamento foram iniciados os treinos de memória espacial no Labirinto Aquático de Morris, onde a variável mensurada foi a latência para encontrar a plataforma escondida, e o teste final foi realizado no 50º dia de alojamento. Não houve efeito do grupo experimental (grupo controle e grupo enriquecido) na aquisição de memória espacial (teste ANOVA de duas vias, $p=0,471$). Não houve efeito do momento de análise, ou seja, das três faixas etárias avaliadas ($p=0,341$), e também não houve interação entre o grupo experimental e o momento de análise ($p=0,590$). Não houve efeito do grupo experimental e do dia de treino, tampouco interação entre esses fatores em relação à latência para encontrar a plataforma para os camundongos recém-desmamados (teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,481$, $p=0,448$ e $p=0,827$, respectivamente) e para os camundongos jovens ($p=0,301$, $p=0,053$ e $p=0,941$, respectivamente). Em relação aos camundongos adultos jovens, observou-se efeito do grupo experimental ($p=0,027$), onde menor latência para encontrar a plataforma foi obtida pelo grupo controle (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Porém, não houve efeito dos dias de treino ($p=0,846$), nem interação entre o grupo experimental e o dia de treino, em relação à latência para encontrar a plataforma escondida ($p=1,000$). A partir deste estudo, pôde-se concluir que o enriquecimento ambiental não interferiu na aquisição de memória espacial de camundongos fêmeas *Swiss* recém-desmamados, jovens e adultos jovens.

Palavras-chave: ambiente enriquecido, memória espacial, labirinto aquático de Morris.

ABSTRACT

Druzian, AF. Influence of enriched environment on spatial memory of three different age groups of Swiss mice. Campo Grande; 2013. [Dissertation – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

By promoting hippocampal neurogenesis, Enriched Environment appears to have a neuroprotective effect on memory impairment associated with aging, resulting in improved spatial memory of mice. However, doubts remain as to the best age for initiating environmental enrichment. The objective of this study was to evaluate the influence of enriched environment on the acquisition of spatial memory in mice of three different age groups subjected to this environment. Weanling (21 days), young (three months) and young adult (seven months) female Swiss mice were housed in a standard control environment or an enriched environment for 50 days, and their spatial memory was tested using the Morris Water Maze. After 40 days of housing, training of spatial memory in the Morris Water Maze was initiated, measuring the variable of latency in finding the hidden platform. The final test was performed on the 50th day housing. No experimental effect in control and enriched groups in the acquisition of the spatial memory test was observed (two-way ANOVA, $p = 0.471$). No effect of time of analysis, i.e. among the three age groups studied ($p = 0.341$) and no interaction between the experimental group and the time of analysis ($p = 0.590$) was observed. No effect of experimental group and training day, nor interaction between these factors was demonstrated in relation to the latency in finding the platform for weanling mice (two-way ANOVA for repeated measures, $p = 0.481$, $p = 0.448$ and $p = 0.827$, respectively) and young mice ($p = 0.301$, $p = 0.053$ and $p = 0.941$, respectively). Regarding young adult mice, an effect in the experimental group was observed ($p = 0.027$), with a lower latency to find the platform obtained by the control group (Tukey post-test, $p < 0.05$). However, there was no effect of training day ($p = 0.846$), nor interaction between the experimental group and training day in relation to the latency in finding the hidden platform ($p=1.000$). In this study, environmental enrichment was shown to not interfere with the acquisition of spatial memory in weanling, young and young adult female Swiss mice.

Keywords: enriched environment, spatial memory, Morris water maze.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultados referentes à latência para os animais encontrarem a plataforma submersa no teste final, de acordo com os grupos controle e enriquecido em cada momento de análise, no Labirinto Aquático de Morris.....40
- Tabela 2 – Resultados referentes à latência para encontrar a plataforma submersa em cada dia de treino, de acordo com os grupos controle e enriquecido em cada momento de análise, no Labirinto Aquático de Morris.....41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fotografia do ambiente enriquecido, mostrando roda de correr, túnel e passarelas.....	36
Figura 2 –	Fotografia mostrando detalhe de túnel, brinquedos e materiais para fazer ninho.....	36
Figura 3 –	Fotografia do Labirinto Aquático de Morris.....	38
Figura 4 –	Fotografia mostrando camundongo na plataforma escondida no LAM.....	38
Figura 5 –	Gráfico de linhas representando a latência para encontrar a plataforma para os grupos recém-desmamados controle e enriquecido de acordo com os dias de treino.....	42
Figura 6 –	Gráfico de linhas representando a latência para encontrar a plataforma para os grupos jovens controle e enriquecido de acordo com os dias de treino.....	42
Figura 7 –	Gráfico de linhas representando a latência para encontrar a plataforma para os grupos adultos jovens controle e enriquecido de acordo com os dias de treino.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ambiente Padrão Controle
AE	Ambiente Enriquecido
AMPA	Alfa-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico
AMPc	Derivado de Adenosina Monofosfato
CA	Corno de Ammon
CaMKII	Cálcio-Calmodulina Quinase do Tipo II
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERKs	Proteínas Cinase Ativáveis Extracelularmente
EVA	Espuma Vinílica Acetinada
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
LAM	Labirinto Aquático de <i>Morris</i>
NMDA	N-Metil D-Aspartato
PKA	Proteínas Dependentes do AMPc
PKC	Proteínas Cinase Cálcio Dependentes
PLD	Potenciação de Longa Duração
PVC	Cloreto de Polivinil
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensageiro
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Memória	14
2.1.1 <u>Estágios da memória</u>	14
2.2 Tipos e formas de memória	15
2.2.1 <u>Memória de Trabalho</u>	16
2.2.2 <u>Memórias declarativas e não declarativas</u>	16
2.2.3 <u>Memórias de curta duração, de longa duração e remotas</u>	17
2.3 Anatomia da memória	19
2.4 Fisiologia da memória	22
2.4.1 <u>Potenciação de longa duração e plasticidade sináptica</u>	22
2.4.2 <u>Formação das memórias</u>	25
2.5 Memória Espacial	26
2.6 Uso de camundongos em pesquisas	28
2.7 Estímulo ambiental	29
2.7.1 <u>Ambiente Enriquecido</u>	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Amostra, Local e Período do Estudo	34
4.2 Delineamento Experimental	34
4.3 Procedimentos	34
4.3.1 <u>Ambiente Enriquecido e Ambiente Padrão Controle</u>	35
4.3.2 <u>Labirinto Aquático de Morris</u>	37
4.4 Aspectos Éticos	39
4.5 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 <u>Resultado do teste final no Labirinto Aquático de Morris</u>	40
5.2 <u>Resultados dos dias de treino no Labirinto Aquático de Morris</u>	40

6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO.....	67

1 INTRODUÇÃO

Memória e aprendizagem estão em íntima associação e vêm avançando em pesquisas desde que se conheceram suficientemente o sistema nervoso e as técnicas de pesquisa para sua compreensão (ANDERSON, 2005).

Modelos animais têm sido amplamente utilizados no campo de pesquisas de distúrbios neurocomportamentais (VAN DER STAAY; ARNDT; NORDQUIST, 2009), incluindo os comprometimentos de aprendizagem e memória de doenças neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer, Doença de Huntington e Doença de Parkinson (PATEL, 2012). Porém, com o aumento da expectativa de vida, os prejuízos de memória relacionados ao envelhecimento têm despertado interesse nos pesquisadores (PATEL, 2012).

Estratégias para minimizar os efeitos do envelhecimento sobre a memória e, assim, garantir a qualidade de vida, têm sido empregadas em diversos estudos nessa área, sendo o Ambiente Enriquecido (AE) uma delas. Este consiste em condições de alojamento que possibilitem a estimulação sensorial, visual, cognitiva e motora do cérebro (ARAI; FEIG, 2011; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

O estímulo cognitivo, pela complexidade espacial e novidade, e a atividade física, pelo uso de rodas de correr, afetam a plasticidade cerebral, promovendo neurogênese hipocampal (KEMPERMANN et al., 2010), e, conseqüentemente, interferindo positivamente na memória espacial, uma vez que esta é dependente do hipocampo e decai com o envelhecimento (HEO et al., 2010; FOSTER; DEFAZIO; BIZON, 2012). Contudo, o AE pode trazer, além de resultados positivos, resultados negativos ou nenhum efeito, o que vai depender dos recursos utilizados para enriquecimento, das variáveis estudadas, das linhagens de animais utilizadas e do tempo de enriquecimento ambiental (TSAI et al., 2002).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental sobre a memória espacial de camundongos em várias idades (FRICK et al., 2003; HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007; HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; GRESACK; KERR; FRICK, 2007; SANTOS, 2009; DINIZ et al.; 2010; KULESSKAYA; RAUVALA; VOIKAR, 2011), porém são poucos os que utilizam mais de uma faixa etária no mesmo estudo. Assim, questões como a melhor idade para se iniciar o enriquecimento ambiental, e se a exposição precoce, logo

após o desmame, influencia positiva ou negativamente na aquisição da memória espacial permanecem não resolvidas.

Neste estudo, optou-se por submeter camundongos fêmeas recém-desmamados, jovens e adultos jovens ao AE por um período total de 50 dias, para se avaliar se este influencia na aquisição da memória espacial e se há interação entre o enriquecimento ambiental e a idade em que os camundongos são submetidos a ele. Utilizou-se o Labirinto Aquático de Morris (LAM) como metodologia para avaliação da memória espacial, por este ser o método mais largamente empregado nos estudos com esta finalidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Memória

A memória representa o conjunto de informações a respeito da vida de um indivíduo, ou seja, sua história, e determina sua personalidade (IZQUIERDO, 2011).

Existem vários tipos de memórias, e estas são codificadas por neurônios, armazenadas e recuperadas por redes neurais, e recebem forte influência dos estados emocional, de consciência e de humor (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008).

Para que se forme uma memória, é necessário que haja aprendizagem. A aprendizagem é um processo de modificação resultante de uma determinada experiência, e a memória refere-se ao produto desta modificação. Logo, como produto da aprendizagem, estabelecem-se registros permanentes: as memórias.

Para que uma espécie sobreviva em determinado ambiente, ela precisa comportar-se de maneira a adaptar-se a ele. Através da aprendizagem, uma das formas de adaptação, o organismo ajusta seu comportamento para refletir o que aprendeu sobre o seu ambiente. O rato, por exemplo, é capaz de aprender muito sobre a natureza de seu ambiente, além de explorar o conhecimento obtido sobre ele, sendo, portanto, o animal preferido para estudos de aprendizagem em laboratório (ANDERSON, 2005).

2.1.1 Estágios da memória

Memória traduz-se por aquisição, formação, conservação e evocação de informações (IZQUIERDO, 2011).

A aquisição, também chamada de aprendizagem, refere-se ao processo de adaptação do comportamento à experiência (ANDERSON, 2005; IZQUIERDO, 2011), ou ainda, à forma como uma representação permanente da informação é

codificada e como esse registro é fortalecido. Esse fortalecimento acontece com a prática, a repetição da informação aprendida (ANDERSON, 2005).

A codificação implica em perceber os sinais sensoriais e seus efeitos, sendo, portanto, o ponto de partida para a criação da memória (MYSKIW; IZQUIERDO, 2012).

À maneira como a informação é mantida na memória dá-se o nome de conservação ou retenção. A memória se adapta à estrutura estatística do ambiente, ou seja, retêm-se melhor as informações que aparecem constantemente, haja vista que estas apresentam maior tendência a serem necessárias. A prática, como na aquisição, também está associada à retenção de informações na memória, e seu curto espaçamento leva a uma retenção de lenta deterioração, isto é, um retardamento do esquecimento (ANDERSON, 2005).

Consolidação consiste em um processo lento e persistente após o estímulo perceptivo, podendo sofrer mudanças, para tornar-se ou não uma memória duradoura (GARCÍA-LÁZARO et al., 2012).

Já a evocação pode ser denominada recordação, lembrança ou recuperação (IZQUIERDO, 2011) e refere-se a como a informação é recuperada da memória quando necessária, sendo realçada ao usarem-se pistas para que o registro da memória torne-se mais ativo (ANDERSON, 2005). A evocação sem reforço da memória após sua consolidação torna-a lábil, o que faz com que esta possa ter seu conteúdo modificado por dois mecanismos, a extinção e a reconsolidação (FIORENZA et al., 2011).

A extinção não representa esquecimento, e sim um novo aprendizado. As memórias extintas permanecem armazenadas de forma latente, podendo ser evocadas em alguma circunstância, pelo ressurgimento da situação ou do estímulo usados para gerá-las da primeira vez. Nesse caso, a reativação da memória pode conduzir à sua reconsolidação, ou seja, sua reafirmação a partir a repetição. Na reconsolidação, entretanto, novas informações são incorporadas à memória, fazendo com que seu conteúdo seja alterado (IZQUIERDO, 2011).

2.2 Tipos e formas de memória

2.2.1 Memória de trabalho

De acordo com a função, há um tipo de memória, que tem por objetivo gerenciar a realidade: a memória de trabalho (IZQUIERDO, 2011). Esta é responsável por coletar capacidades temporárias intrínsecas às regiões de processamento de informações e mantê-las em mente por um breve período de tempo, para desenvolver comportamentos direcionados por um objetivo e executar funções (JENESON et al., 2012; JENESON; SQUIRE, 2012).

A memória de trabalho dura, portanto, de poucos segundos a um a três minutos, e analisa as informações que chegam ao cérebro, comparando-as às demais memórias existentes. Esse tipo de memória é produzido no córtex pré-frontal, não fica armazenado, e precede as memórias de curta e longa duração (IZQUIERDO, 2011). Sugere-se que o córtex parietal posterior também esteja envolvido no processamento da memória imediata, que é uma medida da memória de trabalho (MYSKIW; IZQUIERDO, 2012). A memória de trabalho não depende, portanto, do lobo temporal, e a ativação dessa área do cérebro se faz necessária somente quando a capacidade da memória de trabalho é excedida por uma quantidade de informações maior que sua capacidade ou pela acessibilidade da informação (JENESON et al., 2012; JENESON; SQUIRE, 2012).

A memória de trabalho depende de atividades elétricas de neurônios, e dura enquanto existirem tais atividades, sendo, portanto, um sistema *online*, não estando relacionada à formação da memória de curta duração (CAMMAROTA et al., 2007).

2.2.2 Memórias declarativas e não declarativas

De acordo com seu conteúdo, as memórias podem ser declarativas e não declarativas (procedurais).

As declarativas são as que registram eventos, fatos ou conhecimentos, e são coordenadas pelo hipocampo e suas conexões (IZQUIERDO, 2011). Esse tipo de memória permite que as informações armazenadas sejam acessíveis à consciência, podendo orientar no desempenho em vários contextos (SQUIRE; WIXTED, 2011).

As memórias declarativas dividem-se em episódicas (ou autobiográficas) e semânticas. As episódicas referem-se a informações sobre a existência do indivíduo e eventos onde há sua participação (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008; IZQUIERDO, 2011), sendo as mais estudadas em animais de laboratório (IZQUIERDO, 2011). Elas são responsáveis por definir a identidade e a individualidade, sendo parte elementar da consciência do indivíduo (GARCÍA-LÁZARO et al., 2012). As semânticas referem-se às memórias de conhecimento geral, às relacionadas ao ambiente do indivíduo (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008; IZQUIERDO, 2011).

As não declarativas (procedurais), coordenadas pelo núcleo caudado e suas conexões e pelo cerebelo, compreendem memórias de capacidades e habilidades sensoriais e motoras, de hábitos, de aprendizado emocional e perceptual, *priming* (memória adquirida e evocada através de dicas), e plasticidade comportamental, como habituação e sensibilização (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; WIXTED, 2011). Essas memórias funcionam automaticamente, se manifestando através da *performance* em vez da lembrança (CARLSON, 2002; SQUIRE; WIXTED, 2011).

As memórias não declarativas podem ser implícitas, adquiridas automaticamente e sem a percepção do processo, ou explícitas, adquiridas conscientemente. As memórias declarativas são consideradas explícitas (IZQUIERDO, 2011).

2.2.3 Memórias de curta duração, de longa duração e remotas

Conforme o tempo de duração, as memórias podem ser classificadas em memórias de longa duração, de curta duração e remotas.

As memórias de longa duração duram alguns dias, meses ou anos e requerem cerca de seis horas até sua consolidação, sendo instáveis nas primeiras horas de aquisição e podendo sofrer interferência de vários fatores previamente ao seu armazenamento definitivo. Após anos ou meses de armazenamento passam a se denominar memórias remotas (IZQUIERDO, 2011). As memórias de longa duração podem ser resgatadas dos locais de armazenamento de informações passadas quando estas não estão mais presentes no pensamento, ou quando a

capacidade da memória imediata foi excedida ou a atenção da memória foi desviada (JENESON; SQUIRE, 2012).

As memórias de curta duração duram de uma a seis horas, e requerem as mesmas estruturas nervosas que as de longa duração, mas utilizam-se de mecanismos distintos (IZQUIERDO, 2011). Cammarota et al. (2007) evidenciaram que a formação e a manutenção da memória de curto prazo necessitam de mecanismos diferentes dos envolvidos na consolidação da memória de longo prazo, apesar de os processos envolvidos na formação desses dois tipos de memória estarem relacionados.

Para seu processamento, esses dois tipos de memória utilizam-se das mesmas áreas do cérebro: o hipocampo, o córtex entorrinal e o córtex parietal (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008).

O papel da memória de curta duração é o de ler, de dar continuidade a conversas e episódios enquanto a memória de longa duração não é formada, servindo, por conseguinte, como um armazenamento temporário da memória (IZQUIERDO, 2011). Para Anderson (2005), a informação chega até a memória de curto prazo através de vários processos perceptivos, e a repetição dessa informação aumenta a probabilidade de retenção na memória de longo prazo.

As memórias de trabalho, de curta e de longa duração pertencem e são reguladas por subsistemas cerebrais separados. Estes podem estar presentes nas mesmas estruturas cerebrais ou em estruturas diferentes, e compreendem uma grande variedade de mecanismos moleculares, muitos dos quais podem estar relacionados (CAMMAROTA et al., 2007).

Para Squire e Zola-Morgan (1991), o lobo temporal é essencial para o funcionamento da memória, sobretudo da memória declarativa. Acreditava-se que esta região do cérebro fosse responsável pela formação e armazenamento da memória. Porém, alguns estudos em seres humanos mostraram que sua função é formar, reorganizar, consolidar informações durante um longo período de aprendizagem, e então distribuir elementos da memória para outras áreas de armazenamento (SQUIRE, 2009; SQUIRE; WIXTED, 2011).

Presume-se que a memória de longo prazo, após sua consolidação pelo hipocampo, seja armazenada de forma estável no neocórtex pelo aumento da conectividade entre regiões corticais, sendo este também responsável por resgatá-la (SQUIRE, 2009; SQUIRE; WIXTED, 2011).

Diferentemente da memória de trabalho, as memórias de curto e longo prazo ficam armazenadas quando não estão sendo utilizadas, podendo ser resgatadas quando necessário (CAMMAROTA et al., 2007).

2.3 Anatomia da memória

Sabe-se que quase toda a aprendizagem acontece no cérebro, e o córtex cerebral está envolvido na maioria das funções cognitivas. Três dos quatro lobos do córtex cerebral (parietal, temporal frontal) estão envolvidas no processo de aprendizagem e memória (ANDERSON, 2005).

De acordo com o número de camadas celulares do córtex cerebral, ele pode ser dividido em neocórtex, paleocórtex e alocórtex. O neocórtex possui seis camadas celulares e representa mais de 90% do córtex cerebral, incluindo os córtices sensorial e motor primários e de associação. Regiões com menos de seis camadas são classificadas como alocórtex e estão representadas por estruturas do sistema límbico, o responsável pelo comportamento, como memória e aprendizagem. O alocórtex é subdividido em paleocórtex e arquicórtex. Regiões formadas por três a cinco camadas celulares são classificadas como paleocórtex e englobam o córtex entorrinal, o córtex piriforme e o giro olfatório. O arquicórtex compreende regiões com apenas três camadas celulares e está representado pelo giro denteado e pelo hipocampo. Não existe uma separação entre neocórtex e alocórtex, e sim uma transição entre essas duas regiões, o que estreita a entrada das áreas de associação do primeiro no segundo (CHRONISTER; HARDY, 2006).

O lobo frontal, por meio do córtex pré-frontal, rostral ao córtex motor de associação, que é a área mais anterior do córtex cerebral, tem papel importante no processamento da memória, atuando no planejamento e resolução de problemas (ANDERSON, 2005; CARLSON, 2002).

O córtex parietal posterior, localizado na região posterior do lobo parietal, é uma área multissensorial complexa e está reciprocamente conectado com os demais córtices de associação multimodal (pré-frontal, temporal e córtex de associação límbica) (WHITLOCK et al., 2008). Participa do processamento da memória de trabalho e também da formação e evocação de memórias episódicas (MYSKIW;

IZQUIERDO, 2012), dentre estas, a memória espacial (CARLSON, 2002; WHITLOCK et al., 2008; TORREALBA; VALDÉS, 2008).

As estruturas presentes no lobo temporal são essenciais para a formação e processamento da memória, sobretudo das memórias de curta e longa duração (SQUIRE, 2009; SQUIRE; WIXTED, 2011; WIXTED; SQUIRE, 2011).

Dentre as estruturas cerebrais do lobo temporal localizadas no allocórtex está a formação hipocampal, uma parte importante do sistema límbico, composta pelo complexo subicular, pelo giro denteado e pelo hipocampo propriamente dito (ou corno de Ammon) (HAINES; MIHAILOFF, 2006). Dentre as funções da formação hipocampal está a elaboração de um mapa cognitivo do ambiente e das experiências sensoriais de animais (CANTERAS; BITTENCOURT, 2008).

O hipocampo, o responsável pela criação de memórias declarativas (ANDERSON, 2005; IZQUIERDO, 2011; WIXTED; SQUIRE, 2011), é conhecido também pela sigla CA (Corno de Ammon). Divide-se em três regiões em roedores (CA1 a CA3) e em quatro nos primatas (CA1 a CA4) (CANTERAS; BITTENCOURT, 2008), e interliga-se a outras regiões do cérebro por meio de um feixe de axônios denominado fórnix (CARLSON, 2002). CA1 é a região mais importante na formação de memórias declarativas nos mamíferos, mas atua em associação com o córtex entorrinal e as demais áreas da formação hipocampal (IZQUIERDO, 2011).

O córtex entorrinal, que também faz parte do lobo temporal, é a principal origem de aferências à formação hipocampal, conectando-a ao neocórtex. As informações recebidas pelos neurônios do córtex entorrinal são transmitidas para as células granulares do giro denteado por meio da via perfurante (feixe de axônios), e este, por sua vez, faz sinapse com as células piramidais da área CA3. Os axônios da área CA3 dividem-se: um ramo faz sinapse com células piramidais da área CA1 e outro se projeta para fora da formação hipocampal pelo fórnix. Além das regiões do sistema límbico, o córtex entorrinal recebe aferências do neocórtex por via direta ou por meio de áreas adjacentes ao sistema límbico: o córtex perirrinal e o córtex parahipocampal (CARLSON, 2002). O córtex entorrinal trabalha associado ao hipocampo na formação de memórias declarativas, e estes, em comunicação, ainda, com outras áreas: o córtex cingulado, o córtex parietal e os núcleos basal e lateral da amígdala (IZQUIERDO, 2011).

A amígdala, também localizada no lobo temporal, é composta por vários grupos celulares divididos em caudomediais, basolaterais e centrais (HAINES;

MIHAILOFF, 2006). Dentre as funções da amígdala, mais especificamente por meio dos núcleos basolaterais, estão modular e armazenar as memórias comportamentais associadas a emoções, a comportamentos motivados (CANTERAS; BITTENCOURT, 2008; IZQUIERDO, 2011). Lesões no lobo temporal levam à redução da agressividade (lesão da amígdala) e incapacidade de armazenar informações novas (lesão do hipocampo), enquanto há preservação de memórias antigas (HAINES; MIHAILOFF, 2006). Isto ressalta a hipótese de que memórias de longo prazo sejam armazenadas no neocórtex (SQUIRE, 2009; SQUIRE; WIXTED, 2011).

O que distingue o hipocampo das demais estruturas do lobo temporal envolvidas na memória é o fato de que aquele tem a capacidade de combinar uma grande variedade de atributos para formar uma memória (WIXTED; SQUIRE, 2011).

O núcleo caudado, juntamente com o lenticular, forma o corpo estriado, que faz parte dos núcleos da base (HAINES; MIHAILOFF, 2006). Embora os núcleos da base atuem principalmente sobre o sistema motor, há evidências de que lesões nesses núcleos em animais de laboratório prejudicam o aprendizado de tarefas de condicionamento instrumental (CARLSON, 2002). Sabe-se, portanto, que o núcleo caudado é um dos responsáveis pelas memórias procedurais (CARLSON, 2002; IZQUIERDO, 2011), embora estas utilizem-se na sua aquisição do hipocampo e do córtex entorrinal (IZQUIERDO, 2011). O estriado ventral, que também faz parte dos núcleos da base, parece estar relacionado ao armazenamento de memória espacial (FERRETTI et al., 2010).

O cerebelo é composto pelo córtex cerebelar, formado por uma camada de células de Purkinge, e pelos núcleos cerebelares, que estão presentes na substância branca. Fica ligado ao tronco encefálico através de pedúnculos cerebelares (HAINES; MIHAILOFF; BLOEDEL, 2006). Essa estrutura desempenha papel importante no aprendizado motor, mas também está envolvida em processos cognitivos, como as memórias procedurais (IZQUIERDO, 2011; PASSOT et al., 2012), e atua juntamente com o núcleo caudado no processamento destas (IZQUIERDO, 2011).

2.4 Fisiologia da memória

O hipocampo é uma das estruturas mais importantes na construção das memórias declarativas, e a área CA1 é fundamental nesse processo (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008), mas atua em associação com o subículo, o córtex entorrinal, o giro dentado e a área CA3, sendo, portanto, parte de um circuito funcional da formação hipocampal (IZQUIERDO, 2011).

O córtex entorrinal possui fibras aferentes e eferentes em comunicação com a amígdala, com o córtex pré-frontal, com o córtex parietal associativo e com o córtex sensorial, o que faz com que CA1 esteja conectada com todas as regiões do cérebro relacionadas a emoções e experiências.

O hipocampo, o córtex entorrinal, o parietal e o pré-frontal recebem vias aferentes (dopaminérgicas, serotoninérgicas, colinérgicas e noradrenérgicas) de regiões que processam informações relacionadas aos estados de consciência, alerta e ansiedade (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008).

Estudos tentam entender os mecanismos bioquímicos envolvidos na construção de memórias declarativas, e estes parecem ser semelhantes aos que ocorrem na indução da potenciação de longa duração (CAMMAROTA; BEVILAQUA; IZQUIERDO, 2008; IZQUIERDO, 2011).

2.4.1 Potenciação de longa duração e plasticidade sináptica

A potenciação de longa duração (PLD) é um processo eletrofisiológico que ocorre pós-sinapse nas espinhas dendríticas, onde a estimulação repetitiva, com pulsos de alta frequência, de um axônio ou um conjunto deles em algumas áreas do hipocampo leva, em longo prazo, ao aumento na resposta das células a estímulos posteriores (CARLSON, 2002; ANDERSON, 2005; IZQUIERDO, 2011). Esse processo eletrofisiológico dura de horas a meses, e tem sido bastante estudado no hipocampo de roedores, embora aconteça também em outras regiões do cérebro, por acreditar-se que seja a base para a formação e armazenamento da memória (IZQUIERDO, 2011).

A partir da interpretação de alguns estudos, Anderson (2005) sugere que a PLD seja apenas parte das modificações neurais subjacentes à aprendizagem no hipocampo, e que a aprendizagem aconteça por meio de algum outro processo hipocampal. Mas, acredita-se que esse mecanismo seja responsável por algumas mudanças sinápticas que acontecem no momento da aprendizagem (CARLSON, 2002).

O receptor NMDA (N-metil D-aspartato), presente na formação hipocampal, sobretudo na região CA1, é essencial para a formação da PLD (CARLSON, 2002). Esse fato pode ser percebido quando se administram antagonistas desse receptor, e não há indução da PLD (GRUART; MUNÕZ; DELGADO-GARCÍA, 2006). O receptor NMDA é responsável por controlar um canal de cálcio geralmente bloqueado pelo íon magnésio, que impede a entrada do cálcio na célula, mesmo sob estimulação do glutamato, o neurotransmissor excitatório mais importante do cérebro. Por ser um receptor dependente de neurotransmissor e voltagem, os íons cálcio conseguem adentrar as células somente quando o glutamato está ligado ao receptor e quando a membrana pós-sináptica está despolarizada. A despolarização da membrana dendrítica ocorre apenas quando há sinapses fortes, e, se ocorrerem sinapses fortes e fracas no mesmo neurônio ao mesmo tempo, as fracas são fortalecidas, e isto resulta na chamada PLD associativa (CARLSON, 2002).

Alterações na estrutura e na bioquímica das sinapses em neurônios pós-sinápticos estão relacionadas à formação da memória. A essas alterações dá-se o nome de plasticidade sináptica (CARLSON, 2002). Durante o processo de aprendizagem, há alterações estruturais nas espinhas dendríticas existentes pelo aumento do número de botões multissinápticos (REKART; HOLAHAN; ROUTTENBERG, 2007). Acredita-se que três mecanismos estejam envolvidos na plasticidade sináptica: o aumento do número de receptores pós-sinápticos do tipo AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), a alteração das estruturas das sinapses, e a síntese de novas proteínas (CARLSON, 2002).

A PLD promove um aumento no número de receptores do tipo AMPA (receptores de glutamato não-NMDA), o que faz com que um potencial pós-sináptico de maior amplitude se estabeleça mediante a liberação de glutamato. A PLD também altera as estruturas sinápticas formando sinapses perfuradas, que dão origem a três novos botões terminais. Estes fazem sinapse com mais espinhas dendríticas, o que resulta em sinapses fortalecidas (CARLSON, 2002).

O influxo de cálcio nas espinhas dendríticas pela ativação dos receptores NMDA leva aos surgimentos de novas sinapses e a inserção de receptores AMPA nas já existentes (CARLSON, 2002). O aumento do cálcio intracelular leva à ativação de várias proteínas cinase, enzimas cuja função é regular a transferência de íons fosfato para sítios específicos de proteínas, e a fosforilação dessas proteínas incrementa sua função (IZQUIERDO, 2011).

Uma dessas proteínas cinase é a cálcio-calmodulina quinase do tipo II (CaMKII), dependente de cálcio presente no espessamento de membranas pós-sinápticas da formação hipocampal (IZQUIERDO, 2011; CARLSON, 2002). Essa enzima tem a capacidade de autofosforilação, o que permite com que ela permaneça ativa, mesmo sem a presença de cálcio. Assim, ela fosforila receptores AMPA e outros tipos de receptor de glutamato, tornando-os mais sensíveis a esse neurotransmissor, o que torna as sinapses mais fortes (CARLSON, 2002).

A PLD também parece aumentar a quantidade de glutamato liberada no botão terminal pré-sináptico. A entrada de cálcio na espinha dendrítica ativa a enzima sintase de óxido nítrico, e o óxido nítrico, que é um mensageiro retrógrado, difunde-se para fora da espinha dendrítica agindo sobre o botão terminal e provocando um aumento na liberação de glutamato (CARLSON, 2002; IZQUIERDO, 2011). Também participam desse processo as proteínas dependentes do AMPc (derivado de adenosina monofosfato)(PKA) e o monóxido de carbono (IZQUIERDO, 2011).

As proteínas cinase cálcio dependentes (PKC) e as proteínas cinase ativáveis extracelularmente (ERKs) também fosforilam vários tipos de receptores de glutamato, mas sua função mais importante é fosforilar fatores de transcrição de ácido desoxirribonucleico (DNA) dos núcleos celulares. Esse processo é a ponte para a produção de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e a consequente síntese de proteínas (IZQUIERDO, 2011). Esta ocorre nos dendritos e pode incluir componentes do citoesqueleto, além de proteínas cinase e receptores, o que provoca as mudanças estruturais requeridas para a PLD (CARLSON, 2002).

Além da plasticidade estrutural pós-sináptica, também há plasticidade pré-sináptica no hipocampo durante o processo de aprendizagem, mas este mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Uma das possibilidades é que haja um crescimento dos terminais pré-sinápticos induzido pela aprendizagem, ou seja, a aprendizagem sustentada pode levar ao surgimento de novos terminais pré-sinápticos que farão sinapse com espinhas dendríticas existentes. Também se

especula que haja um remodelamento dos terminais pré-sinápticos existentes durante a aprendizagem (REKART; HOLAHAN; ROUTTENBERG, 2007).

Acredita-se, ainda, que haja plasticidade não sináptica participando da formação das memórias. Alterações na excitabilidade neuronal dependentes de aprendizagem podem fazer parte da formação das memórias, ou por promover a ocorrência de mudanças neurais, ou por servir como um mecanismo de armazenamento ativo para uma fase temporária da memória (MOZZACHIODI; BYRNE, 2010).

2.4.2 Formação das memórias

Alguns estudos sugerem que a PLD seja a base da formação e consolidação das memórias, seja pelos seus processos bioquímicos subjacentes ou pelo seu mecanismo em si.

O avanço em tecnologias de imagem, como o surgimento da ressonância magnética funcional, permitiu com que se explorassem áreas do cérebro relacionadas à memória, e se verificasse que os mecanismos utilizados na formação e na consolidação das memórias no hipocampo são os mesmos da PLD na área CA1 (IZQUIERDO, 2011). Clarke et al. (2010) mostram evidências de que a formação de PLD no reconhecimento de objetos, uma tarefa dependente do hipocampo, induz mudanças na eficácia sináptica, semelhantes às que são a base do armazenamento de memórias, e também plasticidade sináptica de longa duração nas áreas CA1 e CA3, com papel importante na codificação da memória nas primeiras horas. Quando a PLD é inibida por algum processo, as transformações funcionais de CA1 não ocorrem, o que impossibilita a adequada aquisição e evocação de memórias (GRUART; MUÑOZ; DELGADO-GARCÍA, 2006).

Embora a formação de memórias tenha o mesmo mecanismo da formação da PLD, existem algumas diferenças em algumas etapas desse processo, seja pelo tempo necessário para a finalização de cada uma delas, seja pelo pico de atividade de cada enzima (IZQUIERDO, 2011).

A liberação de neurotransmissores também varia conforme o tipo de memória a ser formada e os processos requeridos para essa formação. A liberação de

acetilcolina está relacionada à detecção de estímulos novos, e depende do nível de estresse, atenção, excitação e ansiedade, enquanto a dopamina é liberada quando há necessidade de se formularem novas estratégias comportamentais. Já a liberação de noradrenalina ocorre quando há formação de memórias moduladas por emoções, como o medo, por exemplo, enquanto a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) está relacionada à habituação (MIRANDA, 2007).

Em relação aos mecanismos de formação das memórias não declarativas ou procedurais, não há muitos estudos, uma vez que essas memórias raramente ficam comprometidas, mas eles são semelhantes aos das memórias declarativas e acontecem em outras regiões do cérebro (IZQUIERDO, 2011).

2.5 Memória Espacial

A memória espacial, um tipo de memória declarativa episódica, é aquela que depende da habilidade de codificar, armazenar e recuperar informações sobre orientação sobre o esboço espacial ou temporal no ambiente (SARKISYAN; HEDLUND, 2009; SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010). Possibilita ao indivíduo orientar-se espacialmente em qualquer local, seja este familiar ou não (POMPEU; POMPEU, 2010). Permite, além de aprender caminhos, lembrar a localização de objetos (SARKISYAN; HEDLUND, 2009). Está relacionada ao hipocampo e é particularmente vulnerável aos efeitos do envelhecimento, mesmo naqueles indivíduos sem comprometimento neurológico (HEO et al., 2010; SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010; FOSTER; DEFAZIO; BIZON, 2012).

Os declínios relacionados à idade interferem negativamente na qualidade de vida, haja vista que a memória espacial é fundamental para que o indivíduo adapte-se ao ambiente em que vive e, dessa forma, possa viver de maneira independente (FOSTER; DEFAZIO; BIZON, 2012). Esta torna-se, também, indispensável à sobrevivência de animais, por permear a relação destes com o ambiente, por meio da exploração do ambiente na busca por alimentos, da fuga de predadores e da percepção da presença ou ausência de indivíduos da mesma espécie (VIEIRA, 2006).

Uma das formas mais simples de aprendizado espacial faz com que roedores, por exemplo, não dispendam tempo explorando ambientes previamente explorados, onde as fontes de alimento já se esgotaram (SANDERSON; BANNERMAN, 2012).

Animais e humanos utilizam-se de substratos anatômicos semelhantes para o processamento da memória espacial (FOSTER; DEFAZIO; BIZON, 2012). Os animais apresentam muitas estratégias de navegação em direção a um local em um determinado ambiente. Para as tarefas de navegação, os roedores, por exemplo, necessitam associar informações do próprio movimento com informações do ambiente para gerar movimentos orientados pela meta a ser atingida (WHITLOCK et al., 2008). Para que esta navegação seja possível, é necessário que o animal seja capaz de adquirir e reter memórias espaciais (ROSENBAUM et al., 2012).

Os ratos são capazes de aprender e lembrar-se de localizações espaciais a partir do momento em que abrem os olhos e começam a explorar o ambiente. Contudo, passam a resolver tarefas de memória espacial aloccêntrica baseadas em pistas visuais somente por volta de quatro semanas pós-natal, em decorrência da maior experiência na exploração do ambiente, e, conseqüentemente, aprimoram sua capacidade de navegação (AINGE; LANGSTON, 2012).

A memória espacial aloccêntrica, gerada a partir de referências espaciais do ambiente, independente do ponto de vista do indivíduo (SHRAGER et al., 2007), está relacionada ao hipocampo e é embasada na teoria da formação de mapas cognitivos (ROSENBAUM et al., 2012; SHRAGER et al., 2007). Acredita-se, entretanto, que o hipocampo não seja necessário para sustentar representações esquemáticas requeridas para a navegação, mas que sua função seja estabelecer memórias espaciais, além de reter e evocar detalhes visuais e de experiências obtidas até mesmo há bastante tempo atrás. Tais representações esquemáticas são sustentadas por regiões extra-hipocampais, dentre elas o córtex para-hipocampal, o córtex retrosplenial e o córtex parietal posterior, que têm forte conexão com as estruturas do lobo temporal. Essas regiões têm a função de efetuar a codificação inicial das diferentes informações vindas do ambiente dentro de visões aloccêntricas ou egocêntricas (onde o corpo do indivíduo é a referência) ou de ambas (ROSENBAUM et al., 2012). Isto sustenta a hipótese de Rosenbaum et al. (2012), de que memórias espaciais, com tempo e experiência suficientes, podem existir independentemente do hipocampo e do lobo temporal. Pode-se pressupor, por conseguinte, que a informação espacial é armazenada tanto em estruturas do lobo

temporal quanto em estruturas subcorticais, e que aquelas sejam necessárias na identificação de mudanças no ambiente (FERRETTI et al., 2010).

Existem vários métodos para se avaliar a memória espacial em roedores, os quais compreendem vários tipos de labirintos.

O Labirinto Aquático de Morris tem sido um dos mais amplamente usados, e a aprendizagem é mais rápida em relação aos demais, por requerer treinamento prévio aos testes de memória, além de seu estímulo aquático ser estressante, por não ser habitual aos animais (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010). Uma de suas maiores vantagens é que a água elimina a possibilidade de os animais utilizarem pistas odoríficas para encontrar o alvo. Este método de avaliação é simples de construir e adaptar, mas, utiliza-se de várias medidas de variáveis, como latência, velocidade de nado, distância percorrida, requerendo um sistema de câmeras para gravação e *software* para análise de comportamento, o que pode dificultar sua aplicação (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010).

2.6 Uso de camundongos em pesquisas

Os primeiros estudos com uso de animais e transposição para a fisiologia humana datam do final do século XIX, onde Claude Bernard provocava situações físicas e químicas, que resultavam em alterações nos animais semelhantes às de doença em humanos. Para que um animal seja usado como modelo experimental, este deve ter características suficientemente semelhantes às do objeto imitado, além de ser passível de manipulação sem as limitações do objeto imitado (FAGUNDES; TAHA, 2004). Os animais vertebrados utilizam as mesmas regiões cerebrais que os humanos e mecanismos moleculares semelhantes para a construção e evocação de memórias (IZQUIERDO, 2011). Os roedores são os animais mais amplamente utilizados em estudos relacionados ao cérebro, seu desenvolvimento e funções (KRUBITZER; CAMPI; COOKE, 2011).

Desde sua introdução em laboratórios, os camundongos tornaram-se um dos mais importantes animais experimentais (SANTOS, 2009). Depois do rato, o camundongo é o animal mais usado em pesquisas (FAGUNDES; TAHA, 2004; MONTEIRO et al., 2009). Esses animais têm sido amplamente usados como objetos

de estudo no campo da memória e aprendizagem (HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007; HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; MADROÑAL et al., 2010; FRICK et al., 2003; HUANG et al., 2006) e na associação destas com algumas doenças neurodegenerativas (JAMKOWSKY et al., 2005; CRACCHIOLO et al., 2007; VAN DELLEN et al., 2008; WOOD et al., 2010) .

Entretanto, há que se levar em consideração a escolha da espécie para a pesquisa, uma vez que há uma variação comportamental entre e até mesmo interespecies, o que pode interferir negativamente nos resultados do estudo. Algumas espécies de camundongos expressam maior ansiedade, estresse e medo que outras, tendo dificuldade de habituação ao novo, o que caracteriza o animal como não adaptável (BOLEIJ et al., 2012). Outras são mais agressivas, como é o caso da linhagem *Swiss*, e a agressividade é mais acentuada nos machos para as espécies em geral (LOO et al., 2004). Também há variações entre as espécies quanto à atividade exploratória e aprendizagem e memória (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2009).

2.7 Estímulo ambiental

A preocupação com o ambiente em que os animais vivem nos laboratórios tem sido uma constante, pois há interferência deste ambiente no comportamento do animal.

As instalações dos animais de laboratório tendem a proporcionar adequadas condições de higiene, climatização e dieta bem balanceada para garantir boa saúde física, mas o comportamento fica restrito pelas condições de alojamento padrão.

Condições restritivas por si só podem agir como um agente causador de estresse se comportamentos muito motivadores são frustrados, além de limitar o animal no controle do seu ambiente físico e social (OLSSON; DAHLBORN, 2002). Isso, além de interferir no bem estar do animal, pode interferir nos resultados da pesquisa (SORRELLS et al., 2009).

Para se minimizar a interferência desses fatores causadores de estresse, têm-se aumentado a complexidade do ambiente em que vivem esses animais por meio do chamado Ambiente Enriquecido.

Para que um ambiente seja considerado enriquecido, as mudanças na condição de habitação devem aumentar a frequência e a diversidade de comportamentos naturais, reduzindo a ocorrência de comportamentos anormais, maximizar a utilização do ambiente e aumentar a habilidade do animal aos desafios do cativeiro (OLSSON; DAHLBORN, 2002).

Os ninhos permitem aos animais controlar seu próprio ambiente, pela construção de esconderijos contra agressores, além de promover abrigo à superexposição à luz e regular a temperatura mais adequada às suas necessidades (VAN LOO; BAUMANS, 2004).

Comportamentos agressivos, uma preocupação em ambientes de laboratório, podem ser resolvidos, além do uso de materiais para a construção de ninhos, pela utilização de gaiolas grandes, que permitem aos animais evitarem seus possíveis agressores (BALCOMBE, 2006). Ratos e camundongos preferem companhia ao isolamento, e recursos como refúgios e materiais para ninhos são indispensáveis para o seu bem estar (VAN LOO et al., 2004; BALCOMBE, 2006).

2.7.1 Ambiente Enriquecido

Denomina-se Ambiente Enriquecido a exposição de animais de laboratório a condições de alojamento que possibilitem a estimulação sensorial, visual, cognitiva e motora do cérebro, quando comparado com condições de alojamento padrão (ARAI; FEIG, 2011; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006). O AE também compreende a interação social, pelo alojamento conjunto de animais, em grandes gaiolas, com câmaras exploratórias (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; DHANUSHKODI; SHETTY, 2008), pois animais alojados isoladamente em um ambiente enriquecido tendem a aumentar sua resposta ao estresse agudo em vez de diminuí-la (MEIJER et al., 2007).

Para se enriquecer o ambiente, são introduzidos diversos brinquedos com cores, formas, cheiros e texturas variadas, para estimulação visual, objetos de madeira para percepção sensorial, túneis de vários formatos viabilizando navegação espacial, rodas de correr para exercício físico, além de balanços e aparatos para escalada (REYNOLDS; LANE; RICHARDS, 2010; DHANUSHKODI; SHETTY, 2008)

e materiais para fazer ninhos (MADROÑAL et al., 2010). Pela acuidade visual diminuída dos roedores, os sistemas mais apurados e os que mais se beneficiam, no entanto, são o somatossensorial e o olfatório (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2009).

O termo “enriquecido”, por vezes, pode ser substituído por “complexidade” ou “novidade” (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006), mas ambos podem estar presentes em um mesmo AE. A complexidade e o conceito de novidade são mantidos pela troca frequente dos objetos (REYNOLDS; LANE; RICHARDS, 2010), do formato dos tubos (CARVALHO et al., 2009) e da configuração dos labirintos utilizados em algumas gaiolas (FARES et al., 2013).

Pode haver, ainda, uma diferenciação no AE pela utilização ou não de rodas de correr. Entretanto, o exercício físico isoladamente não produz os amplos efeitos associados ao AE. Além disso, as rodas de correr somente realçam o exercício físico aeróbico grosso, enquanto o AE sem rodas de correr intensifica a estimulação motora fina, mais complexa (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2009).

O AE promove mudanças qualitativas e quantitativas na PLD (ARAI; FEIG, 2011), expressas pela indução da plasticidade neural em vários níveis no cérebro, por meio da modificação de estruturas e circuitos neurais e de processos bioquímicos, melhorando as funções cognitivas (DHANUSHKODI; SHETTY, 2008). Por essa razão, o enriquecimento ambiental tem sido usado tanto em sistemas nervosos intactos quanto nos lesados (MADROÑAL et al., 2010).

Além das alterações que ocorrem no hipocampo, implicando na melhora da aprendizagem e memória (HUANG et al., 2006), o AE também promove uma variedade de mudanças no corpo estriado, interferindo, assim nas funções motoras e comportamentos motivados (THIRIET et al., 2008). Para Madroñal et al. (2010), o enriquecimento ambiental melhora o desempenho e o condicionamento motor de camundongos. Pang et al. (2006) observaram melhora nos *déficits* do corpo estriado em modelo animal de Doença de Huntington, como retardo do início da doença pelo uso de rodas de correr.

A neurogênese hipocampal aumentada pela aplicação do AE é particularmente interessante na pesquisa de distúrbios neurodegenerativos, uma vez que estes interferem negativamente nos processos de aprendizagem e memória (DHANUSHKODI; SHETTY, 2008).

Modelos animais de alguns tipos de doenças neurodegenerativas têm sido estudados para se verificar a interferência do AE nos prejuízos cognitivos relacionados a tais doenças. Para Jankowsky et al. (2005), Cracchiolo et al. (2007) e Valero et al. (2011), o enriquecimento ambiental pode minimizar os prejuízos cognitivos decorrentes da progressão da Doença de Alzheimer. Wood et al. (2010) referem que o AE pode acarretar uma melhora da função cognitiva, da sobrevivência e da qualidade de vida em modelos animais de Doença de Huntington. Já para van Dellen et al. (2008), a estimulação física e mental pode retardar o surgimento de apenas alguns sinais da doença. Sugere-se, a partir desses estudos, que o AE possa ser adaptado para o tratamento de tais doenças (VALERO et al., 2011; WOOD et al., 2010).

Alguns estudos propõem que o AE possa abrandar os declínios cognitivos relacionados ao envelhecimento. Harburger, Lambert e Frick (2007) e Harburger, Nzerem e Frick (2007), em estudos realizados em camundongos, observaram efeito positivo na memória de idosos submetidos a enriquecimentos ambientais complexos, o que já tinha sido observado em camundongos de meia idade por Frick et al. (2003).

Em contrapartida, há estudos relatando efeitos negativos do AE, como elevado nível de estresse e outros problemas relacionados à saúde dos animais (HUTCHINSON; AVERY; VANDEWOUDE, 2012). O AE pode ocasionar efeitos positivos, negativos ou neutros, dependendo da espécie, do sexo e da idade do animal (TOTH et al., 2011).

A despeito de tantos estudos, algumas questões permanecem não resolvidas, como a idade mais adequada para se submeter o animal ao AE, ou se há períodos críticos para o maior impacto dos efeitos do AE sobre as estruturas cerebrais e o comportamento, ou como a genética e o gênero afetam a interação dos animais em seus ambientes. E, ainda, como o AE pode nortear estratégias para o desenvolvimento de terapias ocupacionais ou tratamentos médicos em humanos (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do ambiente enriquecido na aquisição da memória espacial de camundongos em três diferentes faixas etárias.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a aquisição de memória espacial em camundongos expostos ou não ao AE nas faixas etárias de recém-desmamados, jovens e adultos jovens, no Labirinto Aquático de Morris, durante os diferentes dias de treinamento e no dia do teste final.
- b) Comparar camundongos submetidos ao alojamento nas faixas etárias de recém-desmamados, jovens e adultos jovens em relação à aquisição de memória espacial.
- c) Verificar se o enriquecimento do ambiente interfere na aquisição da memória espacial em três diferentes idades de camundongos.
- d) Avaliar se há interação entre o enriquecimento ambiental e a idade dos animais em relação à aquisição de memória espacial de camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostra, Local e Período do Estudo

Neste estudo foram utilizados 47 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, de três faixas etárias: recém-desmamados (21 dias), jovens (três meses) e adultos jovens (sete meses). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sendo submetidos ao estudo no Setor de Experimentação desse mesmo local, no período compreendido entre fevereiro e setembro de 2012.

4.2 Delineamento Experimental

Tratou-se de um estudo experimental, onde os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, o grupo controle e o grupo enriquecido, de acordo com o tipo de alojamento, os quais foram subdivididos em três diferentes faixas etárias. Tanto o grupo controle quanto o enriquecido compreendiam subgrupos de camundongos recém-desmamados (n=8 para cada grupo), jovens (n=8 para cada grupo) e adultos jovens (n=7 e n=8, respectivamente).

4.3 Procedimentos

Todos os camundongos, ao completarem a idade requerida para o estudo (21 dias, três meses e sete meses, respectivamente), foram submetidos a um de dois diferentes tipos de alojamento: o grupo controle no Ambiente Padrão Controle (AC) e o grupo experimental no Ambiente Enriquecido (AE), conforme descrito abaixo. Os animais permaneceram nos seus respectivos alojamentos durante 50 dias consecutivos.

Após 40 dias de alojamento, estes foram treinados no Labirinto Aquático de Morris durante cinco dias consecutivos, e, após um intervalo de descanso de quatro dias, foi realizado o teste final, conforme descrito abaixo. Quando os testes foram finalizados, os animais foram submetidos à eutanásia na câmara de gás com dióxido de carbono e encaminhados à incineração.

4.3.1 Ambiente Enriquecido e Ambiente Padrão Controle

O AC compôs-se por caixa padrão para roedores, medindo 31 cm de largura, 39 cm de comprimento e 18 cm de altura, sem nenhum objeto para estímulo dos animais em seu interior, apenas com cama de maravalha, comida e água *ad libitum*.

O AE compôs-se por uma gaiola metálica de dois níveis, medindo 60 cm de largura, 81 cm de comprimento e 46 cm de altura, contendo duas escadas com acesso ao andar superior, onde água e comida foram servidas *ad libitum*. Esta continha também uma passarela comunicando os dois lados do pavimento superior, uma passarela elevada comunicando um lado ao outro da gaiola na extensão de seu comprimento, e uma passarela imediatamente acima do chão, comunicando a gaiola de um lado a outro na extensão de sua largura, além de uma roda de correr e um trampolim. O andar inferior da gaiola era forrado com maravalha (Figura 1).

A gaiola era também provida de objetos e brinquedos de várias cores, formas, tamanhos e texturas, alguns destes afixados na gaiola, e materiais para fazer ninho. Tais objetos compreendiam dois túneis de cloreto de polivinil (PVC) de formato e diâmetro diferentes, e diversos brinquedos disponíveis comercialmente para crianças (bolas, potes, panelinhas, animais, carrinhos, flores, árvores, cones, homens, letras, números, dentre outros). Os materiais para fazer ninho compreendiam papel toalha, papel crepom e lenços de papel (Figura 2).

Os brinquedos móveis e os materiais para fazer ninho eram trocados duas vezes por semana, sendo colocados de 10 a 15 objetos diferentes e quatro folhas ou pedaços amassados de um único tipo de papel a cada troca.

Em ambos os ambientes, a limpeza das gaiolas era realizada duas vezes por semana. O ciclo de luz era controlado, com período claro/escuro de 12 horas, sendo as luzes ligadas automaticamente às seis horas da manhã. A sala do setor de

experimentação era mantida a uma temperatura ambiente de $21\pm 3^{\circ}\text{C}$ e água e ração própria para roedores eram fornecidas *ad libitum* (SANTOS, 2009).



Figura 1 – Fotografia do Ambiente Enriquecido, mostrando roda de correr, túnel e passarelas. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 2 – Fotografia mostrando detalhe de túnel, brinquedos e materiais para fazer ninho. Fonte: arquivo pessoal.

4.3.2 Labirinto Aquático de Morris

O LAM constituiu-se por um tanque circular de polietileno de cor preta, medindo 101 cm de diâmetro e 53 cm de altura, preenchido previamente aos treinos com água à temperatura ambiente de $21\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Esse tanque era subdividido virtualmente em quatro quadrantes. Em um dos quadrantes era afixada uma plataforma de PVC na mesma cor do tanque, de 11 cm de diâmetro e 19,5 cm de altura, que ficava submersa, com a parte superior localizada imediatamente abaixo da superfície da água (cerca de um centímetro), e servia como refúgio. A plataforma apresentava a superfície áspera, revestida com Espuma Vinílica Acetinada (EVA), para facilitar a subida do animal, e sua posição permanecia inalterada durante todos os treinos e teste final para todos os grupos de animais (ROSSATO et al., 2006).

Nas paredes internas do tanque, acima da água, nos quatro quadrantes, estavam fixadas figuras sinalizadoras, que poderiam ser usadas como pontos de referência pelos animais durante os treinos e/ou o teste final (Figura 3).

Os animais eram colocados individualmente no tanque em um dos quadrantes (exceto naquele onde se encontra a plataforma escondida), sorteado por meio de um dado, com sua visão voltada para a borda. Cada camundongo tinha 90 segundos para encontrar a plataforma submersa (Figura 4). Se o animal não conseguisse fazê-lo durante os treinos, este era colocado pelo examinador sobre a plataforma, onde permanecia por 30 segundos (GRESACK; KERR; FRICK, 2007; ROSSATO et al., 2006).

Os treinos eram realizados durante cinco dias consecutivos, três vezes por dia, com um intervalo de 30 segundos entre cada um. Após os cinco dias de treino, os animais descansavam em suas respectivas gaiolas por quatro dias, até a realização do teste de memória espacial, desenvolvido em um único dia, durante três vezes, com intervalo de 30 segundos entre cada sessão de teste (ROSSATO et al., 2006).

O período de latência que o camundongo levava desde sua colocação na água até encontrar a plataforma escondida (refúgio) em cada treino/teste era mensurado por meio de um cronômetro digital. A cada dia de treino/teste era calculada a média de latência do animal para encontrar o refúgio.

Após os treinos/testes, os animais eram enxugados com toalhas e colocados em uma caixa forrada com maravalha e aquecida com uma lâmpada incandescente de 60 Watts, de onde retornavam às suas respectivas gaiolas depois que todos os seus companheiros de alojamento tivessem sido submetidos ao treino/teste do dia. Todos os treinos e testes eram realizados na fase clara do período claro/escuro.



Figura 3 – Fotografia do Labirinto Aquático de Morris. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 4 – Fotografia mostrando o camundongo na plataforma escondida no LAM. Fonte: arquivo pessoal.

4.4 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob protocolo nº 336, na reunião ordinária de 11 de agosto de 2011 (Anexo).

4.5 Análise Estatística

A avaliação do efeito do grupo experimental (Controle e Ambiente Enriquecido), do efeito da idade dos animais (recém-desmamados, jovens e adultos jovens), bem como da interação entre estes fatores, em relação à latência de tempo para encontrar a plataforma escondida no LAM no teste final, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias. Já a avaliação do efeito do grupo experimental (Controle e Ambiente Enriquecido), do efeito do dia de treino (um a cinco dias), bem como da interação entre estes fatores, em cada um dos momentos de análise, em relação à latência de tempo para encontrar a plataforma escondida no LAM, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey. A análise estatística foi realizada utilizando-se o *software* SigmaStat para Windows® na versão 3.5, considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Resultado do teste final no Labirinto Aquático de Morris

Os resultados referentes à latência para encontrar a plataforma no teste final para os grupos controle e enriquecido, de acordo com cada faixa etária, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados referentes à latência para os animais encontrarem a plataforma submersa no teste final, de acordo com os grupos controle e enriquecido em cada momento de análise, no Labirinto Aquático de Morris.

	Grupo Controle	Amb. Enriquecido	P
Recém-desmamados	31,37±4,09	23,16±5,34	0,243
Jovens	26,54±4,08	20,33±4,42	0,319
Adultos jovens	30,67±8,34	34,29±8,75	0,771

Nota: os dados estão apresentados na forma de média±erro padrão da média.

Não houve efeito do grupo experimental, ou seja, não houve diferença entre o ambiente controle e ambiente enriquecido (teste ANOVA de duas vias, $p=0,471$). Não houve efeito do momento de análise (idades de recém-desmamados, jovens e adultos jovens), ou seja, independente do grupo experimental, não houve diferença entre os momentos de análise ($p=0,341$). Não houve interação entre o grupo experimental e o momento de análise, ou seja, a diferença entre os grupos experimentais não variou nos três momentos de análise avaliados ($p=0,590$).

5.2 Resultados dos dias de treino no Labirinto Aquático de Morris

Para os animais recém-desmamados, não houve efeito do grupo experimental (teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,481$) e do dia de treino ($p=0,448$). Também não foi observada interação entre o grupo experimental e os dias de treino, em relação à latência para que os animais achassem a plataforma escondida ($p=0,827$). A latência para encontrar a plataforma escondida para os camundongos recém-desmamados está representada na Figura 5. O mesmo foi observado em relação aos animais jovens (teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, efeito do grupo experimental: $p=0,301$; efeito do dia de treino: $p=0,053$; interação entre grupo experimental e dia de treino: $p=0,941$). Esses resultados são apresentados na Figura 6. Em relação aos animais adultos jovens, houve efeito do grupo experimental (teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, $p=0,027$), porém não houve efeito do dia de treino ($p=0,846$), nem interação entre o grupo experimental e os dias de treino, em relação à latência para que os animais achassem a plataforma escondida ($p=1,000$). Quanto ao efeito do grupo experimental adulto jovem, a latência dos animais do grupo controle foi significativamente menor do que a daquela observada para os animais do grupo Ambiente Enriquecido nos dias de treino em geral (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Esses resultados estão apresentados na Figura 7.

Os resultados referentes à latência para achar a plataforma em cada dia de treino, para os grupos controle e enriquecido, de acordo com cada faixa etária, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados referentes à latência para encontrar a plataforma submersa em cada dia de treino, de acordo com os grupos controle e enriquecido em cada momento de análise, no Labirinto Aquático de Morris.

Dia de treino	Grupo Controle			Ambiente Enriquecido		
	Recém-desmam.	Jovens	Adultos Jovens	Recém-desmam.	Jovens	Adultos Jovens
1	41,33±6,34	37,71±5,11	25,24±6,95	33,04±7,10	40,75±6,63	38,92±5,77
2	34,62±8,29	31,29±6,58	22,14±3,52	28,08±6,97	38,67±8,31	36,17±9,63
3	26,21±6,76	20,75±4,17	27,47±5,25	32,17±8,80	28,00±6,60	42,87±8,36
4	33,37±5,82	26,12±2,76	25,38±4,86	29,00±5,52	26,12±5,57	39,12±8,22
5	23,33±4,06	29,38±6,13	30,24±7,79	27,84±6,10	37,33±6,53	44,08±11,38

Nota: os dados estão apresentados na forma de média±erro padrão da média. Não houve interação entre o grupo experimental e os dias de treino: recém-desmamados ($p=0,827$), jovens ($p=0,941$), adultos jovens ($p=1,000$).

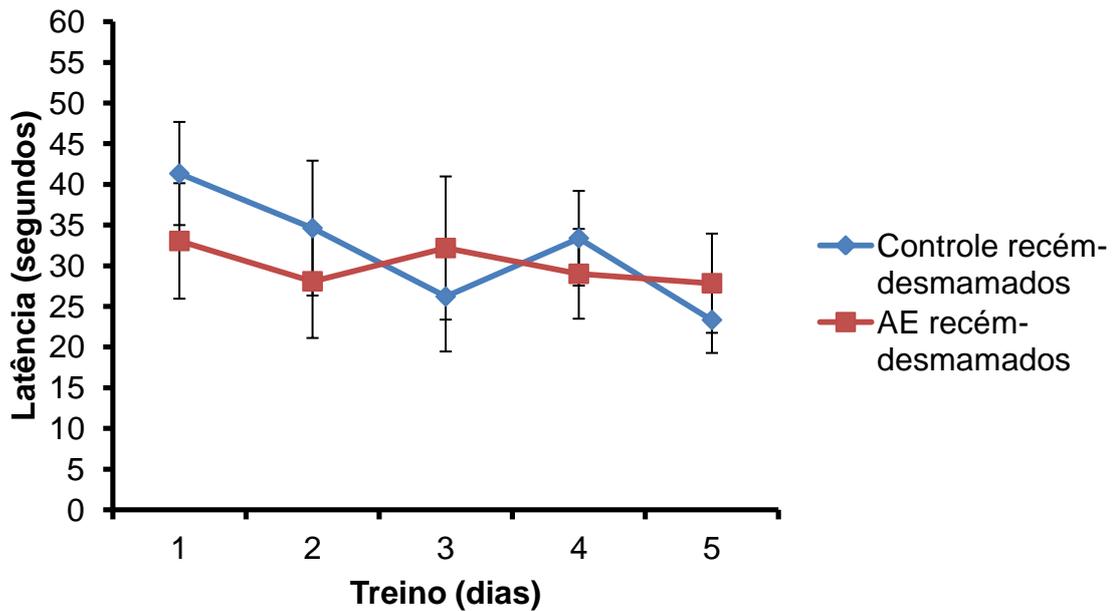


Figura 5 - Gráfico de linhas representando a latência para encontrar a plataforma para os grupos recém-desmamados controle e enriquecido de acordo com os dias de treino. Cada símbolo representa a média e a barra, o erro padrão da média.

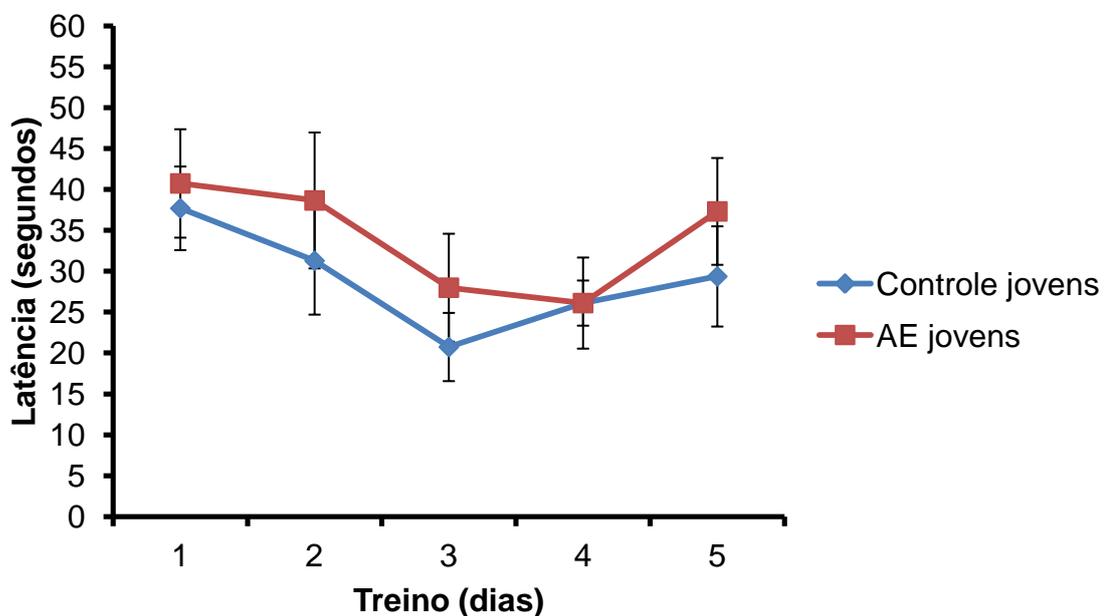


Figura 6 - Gráfico de linhas representando a latência para encontrar a plataforma para os grupos jovens controle e enriquecido de acordo com os dias de treino. Cada símbolo representa a média e a barra, o erro padrão da média.

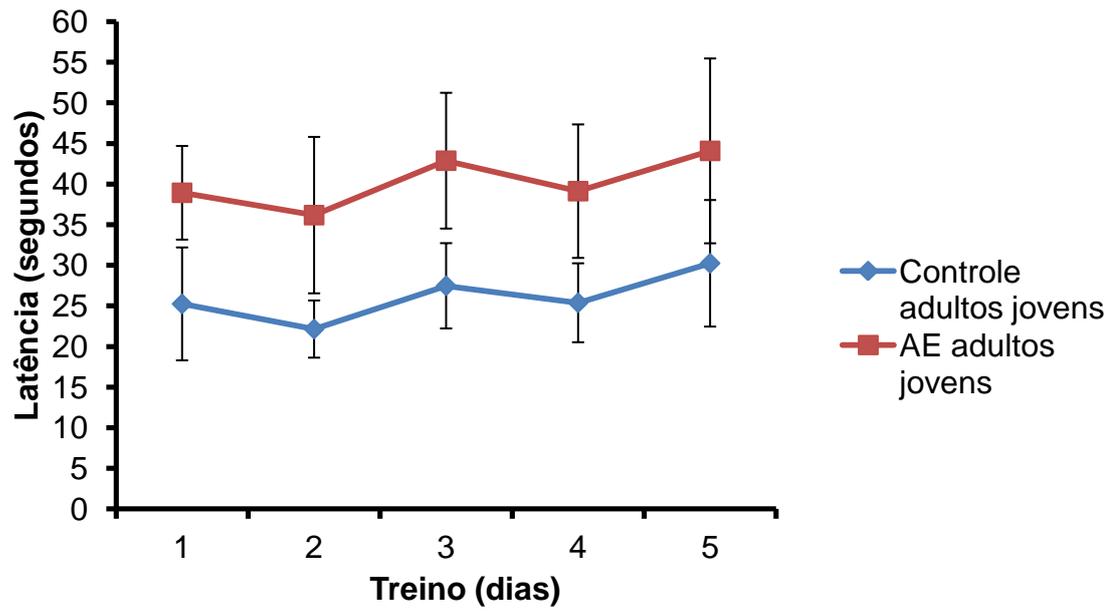


Figura 7 - Gráfico de linhas representando a latência para encontrar a plataforma para os grupos adultos jovens controle e enriquecido de acordo com os dias de treino. Cada símbolo representa a média e a barra, o erro padrão da média.

6 DISCUSSÃO

Os primeiros estudos relacionados ao enriquecimento ambiental em animais surgiram em meados de 1960, analisando a relação entre o ambiente do animal e sua constituição cerebral. Desde então, ele tem sido amplamente estudado, a fim de se verificar seus efeitos sobre o comportamento e o bem estar de animais de laboratório (HUTCHINSON; AVERY; VANDEWOUDE, 2005). Tem sido estudado, ainda, na área da aprendizagem e memória em animais saudáveis, para avaliar os declínios da memória relacionados à idade, ou em modelos animais de doenças (PATEL, 2012), pois esta área é de grande interesse para a saúde humana. Porém, ainda há dúvidas em relação à forma de adaptação dessas pesquisas aos humanos.

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do ambiente enriquecido na memória espacial de camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, recém-desmamados (21 dias), jovens (três meses) e adultos jovens (sete meses), a fim de se verificar se o AE influencia na memória e se tal influência é dependente da faixa etária. Neste estudo não foi observada alteração significativa na memória espacial dos camundongos submetidos ao AE em relação aos controles, tampouco entre as faixas etárias dos camundongos enriquecidos. Porém, foi observado efeito do grupo experimental nos camundongos adultos jovens, onde a latência para encontrar a plataforma escondida foi menor no grupo controle.

O AE tem sido empregado em estudos de doenças neurodegenerativas para avaliar seus efeitos sobre a memória espacial. Embora alguns não evidenciem melhora ou redução dos prejuízos de memória relacionados à Doença de Alzheimer (GÖRTZ et al., 2008), são observadas melhorias em tarefas dependentes do hipocampo, relacionadas à memória espacial nesta doença (JANKOWSKY et al., 2005; VALERO et al., 2011). Mas somente o enriquecimento complexo, incluindo estimulação cognitiva, física e social, por um longo período, é capaz de proteger o cérebro contra prejuízos cognitivos relacionados à Doença de Alzheimer (CRACCHIOLO et al., 2007). O enriquecimento ambiental complexo também parece postergar o início dos sintomas da Doença de Huntington (VAN DELLEN et al., 2008), além de melhorar a função cognitiva, a sobrevivência e a qualidade de vida em modelos animais (WOOD et al., 2010).

Os estudos que avaliam a interferência do AE nos declínios de memória relacionados à idade em camundongos apresentam resultados contraditórios. Enquanto alguns observam efeitos positivos significativos sobre a memória espacial apenas em camundongos idosos (HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007), outros evidenciam tais efeitos em camundongos idosos e também nos de meia idade (FRICK et al., 2003). Já outros apontam evidências de melhora na execução de tarefas espaciais, além de grupos de meia idade (de 13 a 17 meses) e idosos (a partir de 18 meses), também nos grupos de camundongos jovens (até seis meses) e adultos jovens (de seis a 12 meses) (HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; GRESACK; KERR; FRICK, 2007; SANTOS, 2009; DINIZ et al.; 2010; KULESSKAYA; RAUVALA; VOIKAR, 2011).

Estudos realizados com camundongos de faixas etárias semelhantes às deste também não obtiveram resultado significativo nas tarefas de memória espacial. Prusky, Reidel e Douglas (2000), ao avaliarem camundongos fêmeas de dois meses de idade submetidos ao AE desde o nascimento, não evidenciaram diferença significativa no tempo gasto para encontrar a plataforma escondida no LAM. Harburger, Lambert e Frick (2007), ao avaliarem os efeitos do AE na memória espacial em camundongos machos jovens (três meses), de meia idade (15 meses) e idosos (21 meses), não encontraram diferenças significativas entre os grupos enriquecido e controle jovens e de meia idade, observando efeitos positivos sobre a memória espacial apenas nos idosos. Harburger, Nzerem e Frick (2007) submeteram a três formas de enriquecimento ambiental camundongos fêmeas jovens (três meses), de meia idade (15 meses) e idosos (21 meses), e observaram que o grupo jovem submetido ao enriquecimento complexo, como neste estudo, não obteve resultados significativos nas tarefas do LAM.

A duração do enriquecimento ambiental parece influenciar na magnitude dos efeitos comportamentais, bem como a linhagem de camundongo, o protocolo e tarefas comportamentais utilizadas, e a idade em que estes são submetidos ao alojamento (AMARAL et al., 2008). Um enriquecimento ambiental de longa duração está associado à maior habituação a novidades em camundongos, além de promover neurogênese hipocampal e manter seus efeitos em longo prazo (KEMPERMANN; GAGE, 1999).

Em consonância com o presente estudo, que utilizou um total de aproximadamente sete semanas (50 dias) de alojamento, os estudos, cujos

resultados se assemelham aos deste, utilizaram o AE por um período que variou de seis a oito semanas (PRUSKY; REIDEL; DOUGLAS, 2000; HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007). Já os estudos que obtiveram resultados significativos em relação à memória espacial mantiveram o AE por períodos que variaram entre um (FRICK et al., 2003) e dois a 21 meses (GRESACK; KERR; FRICK, 2007; SANTOS, 2009; DINIZ et al.; 2010; KULESSKAYA; RAUVALA; VOIKAR, 2011).

Da mesma forma, períodos superiores a três meses também foram empregados nos estudos que avaliaram prejuízos de memória relacionados a doenças neurodegenerativas (GÖRTZ et al., 2008; CRACCHIOLO et al., 2007; VALERO et al., 2011; VAN DELLEN et al., 2008). Porém, por se tratarem de estudos cuja evolução natural das doenças engloba importante comprometimento da memória, não cabe aqui a comparação dos resultados desses estudos com o presente.

Alguns estudos que obtiveram resultados significativos com um período de enriquecimento ambiental semelhante ao deste (FRICK et al., 2003; HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007) avaliaram camundongos de meia idade e idosos. Isto pode explicar a discrepância de seus resultados em relação aos deste, haja vista que os declínios de memória iniciam-se por volta da meia idade (dos 13 aos 17 meses de vida), com a diminuição da atividade exploratória (FRANCIA et al., 2006), agravando-se ao longo do envelhecimento (FRICK et al., 2000). Além disso, o protocolo aqui utilizado pode não beneficiar camundongos mais jovens. Camundongos a partir da meia idade, portanto, podem ser mais favorecidos pelo enriquecimento ambiental, uma vez que a neurogênese hipocampal diminui ao longo do envelhecimento (VERRET et al., 2007).

Os protocolos de enriquecimento ambiental também podem influenciar nos resultados, uma vez que não há uma padronização do tamanho das gaiolas e tipos de objetos usados para estimulação física e cognitiva (SIMPSON; KELLY, 2011). Há pouca evidência sobre a contribuição de objetos específicos ou suas combinações nas respostas comportamentais (ABRAMOV et al., 2008).

A maioria dos estudos, inclusive este, utiliza o superenriquecimento, com múltiplas estratégias de enriquecimento ao mesmo tempo ou em alternâncias periódicas. Porém, há a necessidade de se considerar o comportamento de cada

espécie ou linhagem. Pela sua tendência natural de cavar e construir ninhos para se esconder de predadores (HUTCHINSON; AVERY; VANDEWOUDE, 2005), os camundongos preferem materiais para fazer ninho a quaisquer outros, além de preferirem estruturas opacas ou coloridas a gaiolas grandes (OLSSON; DAHLBORN, 2002). Isso explica a divergência de resultados entre este estudo e o de Kuleskaya, Rauvala e Voikar (2011), que, embora também tenham submetido camundongos recém-desmamados ao AE por um período de alojamento semelhante ao deste estudo, observaram melhor desempenho no LAM dos camundongos enriquecidos. Diferentemente deste estudo, esses autores utilizaram apenas material para fazer ninho como estratégia de enriquecimento ambiental.

Apesar de camundongos preferirem estruturas opacas a largas gaiolas, estes podem se adaptar às gaiolas, contanto que haja locais para serem utilizados como esconderijo (OLSSON; DAHLBORN, 2002). Grande parte dos estudos acima citados, tanto os com resultados positivos quanto os demais, utilizaram amplas caixas plásticas com tampas perfuradas para ventilação, enquanto o AE deste estudo foi desenvolvido em uma gaiola com grades, coberta com tela, com dois túneis para esconderijo. O mesmo tipo de gaiola foi mencionado por Santos (2009) e Diniz et al. (2010) em seus estudos, que obtiveram resultados significativos nas tarefas dependentes do hipocampo em camundongos, em discordância com os resultados deste estudo. Contudo, as diferenças estão no tempo de enriquecimento e nos protocolos de avaliação utilizados.

O superenriquecimento, pela sua complexidade estrutural e pela introdução de novos objetos, pode levar a comportamentos de demarcação de território e, assim, aumentar o estresse e a agressividade entre os camundongos, interferindo negativamente na pesquisa. Além disso, objetos estáticos e repetitivos, pela exposição prolongada, podem induzir à diminuição das respostas comportamentais a novidades (HUTCHINSON; AVERY; VANDEWOUDE, 2005). Diferentemente dos trabalhos aqui citados, o presente estudo incluiu em seu AE alguns brinquedos estáticos, afixados na gaiola, que permaneceram inalterados durante todo o período de enriquecimento, além da posição das passarelas e do trampolim e das configurações dos túneis, que também não foram modificadas. Todavia, assim como nos demais estudos, também foi realizada a substituição de brinquedos, dos quais alguns podiam ser modificados pelos animais. Essa prática é mais efetiva em evocar

uma nova resposta interativa (HUTCHINSON; AVERY; VANDEWOUDE, 2005), mas pode ter sido sobrepujada pelos objetos estáticos e de configuração imutável.

Protocolos de superenriquecimento impossibilitam determinar ao certo o efeito de cada estratégia de enriquecimento sobre a memória espacial. Harburguer, Nzerem e Frick (2007) avaliaram separadamente cada uma delas: estimulação cognitiva, estimulação física e enriquecimento complexo (englobando estimulações física e cognitiva e interação social). Estes autores avaliaram camundongos fêmeas jovens (três meses), de meia idade (15 meses) e idosos (21 meses). Corroborando com os resultados do presente estudo, aqueles, utilizando um período de AE semelhante ao deste, não observaram qualquer resultado significativo no grupo jovem submetido ao enriquecimento complexo. Em contrapartida, os grupos de meia idade e idoso submetidos ao enriquecimento complexo apresentaram melhor desempenho nas tarefas do LAM. Camundongos das três faixas etárias, contudo, quando submetidos à estimulação física apresentaram melhora da memória espacial, enquanto o grupo idoso apresentou resultados significativos em algum aspecto das tarefas espaciais quando submetido a qualquer uma das três estratégias de enriquecimento.

Cain, Green e Bardo (2006) observaram uma diminuição na resposta visual a novidades em ratos jovens submetidos ao enriquecimento ambiental social e cognitivo por um mês, sem estimulação física. O enriquecimento complexo, por períodos breves, parece beneficiar camundongos somente a partir da meia idade, onde se iniciam os prejuízos de memória. A estimulação física, no entanto, parece trazer benefícios à memória espacial de camundongos em idades onde ainda não há comprometimento desta (MELLO et al., 2008).

O exercício físico promove mudanças em células da glia envolvidas no remodelamento sináptico, com prováveis efeitos sobre a plasticidade cerebral, podendo ser, portanto, uma estratégia neuroprotetora (BERNARDI et al., 2013). Conforme Kempermann et al. (2010), o exercício físico atua na proliferação celular, enquanto o enriquecimento ambiental atua na sobrevivência dos novos neurônios. Estudos que utilizaram mais de uma roda de correr no AE apresentaram resultados positivos (HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; GRESACK; KERR; FRICK, 2007; DINIZ et al., 2010). O maior acesso à estimulação física, associado ao maior tempo de exposição ao estímulo, pode ter intensificado os efeitos sobre a memória

espacial. A única roda de correr disponibilizada neste experimento pode ter sido insuficiente para o número de camundongos alojados.

O enriquecimento ambiental, pela exposição a novidades, pode exercer comportamentos emocionais específicos, como medo e ansiedade, de acordo com o sexo e com a linhagem do animal (ADAMEC et al., 2006; ENNACEUR et al., 2006). E pode, ainda, acentuar as diferenças comportamentais entre as linhagens (ABRAMOV et al., 2008). Situações causadoras de estresse inibem a potenciação de longa duração pela aumentada liberação de corticosteroides, prejudicando, dessa forma, a aprendizagem (HÖLSCHER, 1999). O estresse crônico, por sua vez, prejudica a neurogênese hipocampal, alterando a função cognitiva e emocional (CASTILLA-ORTEGA et al., 2011).

Fêmeas parecem ser mais suscetíveis negativamente a fatores causadores de estresse (ADAMEC et al., 2006). E condições estressantes durante o período pós-natal podem acentuar os níveis de ansiedade destas e, por conseguinte, interferir negativamente na memória dependente do hipocampo (COUTELLIER; WÜRBEL, 2009).

Coutellier e Würbel (2009), ao avaliarem camundongos adultos que foram submetidos junto com suas progenitoras ao AE, com e sem fatores causadores de estresse, no período pós-natal até o desmame, não observaram resultados significativos nas tarefas de memória dependentes do hipocampo em fêmeas na ausência de estresse. Porém, evidenciaram resultados negativamente significativos na presença deste, o que não se aplicou aos machos. Lin et al. (2011) observaram um efeito ansiogênico em camundongos fêmeas submetidos ao AE, além de comportamento depressivo avaliado pelo aumentado tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Já nos machos, o AE exerceu um efeito ansiolítico, e o tempo de imobilidade no nado forçado foi significativamente menor.

No presente experimento, embora não se tenha objetivado avaliar comportamentos emocionais, observou-se um aumento no tempo de imobilidade e de flutuação no LAM nos grupos submetidos ao AE. Esse comportamento depressivo pode ter inibido a motivação necessária para os treinos e o teste final no LAM, interferindo nos resultados. E o maior tempo de flutuação observado pode explicar a maior latência para encontrar a plataforma, para os camundongos enriquecidos adultos jovens em relação a seus controles. Além disso, o tempo de alojamento no AE pode ter sido insuficiente para a habituação ao

superenriquecimento de camundongos fêmeas nas faixas etárias analisadas neste estudo, bem como naqueles utilizando camundongos fêmeas, com algum grupo com idade e tempo de enriquecimento ambiental semelhante a este (PRUSKY; REIDEL; DOUGLAS, 2000; HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007).

Santos (2009), diferentemente desses estudos, alojou no mesmo AE camundongos de ambos os sexos desde o nascimento, juntamente com suas progenitoras. Seus achados de melhora significativa na memória espacial podem ter sido ressaltados pelo desempenho dos machos, pois as médias de latência para encontrar a plataforma foram de todos os animais de cada grupo, e não foi especificado o número de machos e fêmeas em cada um deles.

Em relação às linhagens, Diniz et al. (2010), como neste estudo, utilizaram camundongos *Swiss*. A divergência entre os resultados pode, mais uma vez, estar relacionada ao tempo de enriquecimento, uma vez que as mudanças no comportamento emocional de camundongos *Swiss* parecem ser bastante resistentes às variações ambientais em relação a outras linhagens (SILVA et al., 2011). Santos (2009) verificou que o desempenho dos camundongos *Swiss* foi inferior ao dos camundongos C57BL/6, em concordância com Van Dam, Leders e De Deyn (2006), que compararam esta linhagem a outras duas. Todos os demais estudos utilizaram a linhagem C57BL/6 ou alguma sublinhagem desta (PRUSKY; REIDEL; DOUGLAS, 2000; FRICK et al., 2003; HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007; GRESACK; KERR; FRICK, 2007; HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007; KULESSKAYA; RAUVALA; VOIKAR, 2011). Esta linhagem parece ter bom desempenho em tarefas dependentes do hipocampo, sobretudo no LAM, e deve ser considerada na escolha para pesquisas de avaliação de memória espacial.

A avaliação da memória espacial foi realizada por meio de um labirinto aquático, proposto inicialmente por Morris (1981), o Labirinto Aquático de Morris, onde foi mensurada a latência para o escape da água. O LAM foi desenvolvido para avaliar memória espacial em ratos (MORRIS, 1981, 1984), sendo, mais tarde, adaptado para camundongos. Conseqüentemente, o diâmetro do tanque também precisou ser modificado. Entretanto, não há uma padronização na literatura em relação a essa variável. Neste estudo, utilizou-se um tanque de 101 cm de diâmetro, enquanto a medida dos diâmetros dos tanques dos estudos aqui enumerados variou de 94 a 120 cm. O diâmetro do LAM pode afetar a habilidade do camundongo em determinar sua posição no espaço, uma vez que a motivação aversiva à água pode

induzir ao estresse, e este, por sua vez, pode ser acentuado na presença de um tanque grande (VAN DER STAAY, 2000).

Os resultados referentes às tarefas de localização espacial de acordo com o diâmetro do tanque, porém, estão diretamente relacionados à linhagem de camundongo avaliada (VAN DAM; LENDERS; DE DEYN, 2006). Van Dam, Lenders e De Deyn (2006) mostraram que, apesar de o diâmetro do LAM interferir nos resultados das tarefas de memória espacial em algumas linhagens, a metodologia utilizada para a avaliação de tais tarefas não é adequada a outras. Estes autores observaram um desempenho prejudicado em camundongos albinos em relação a linhagens não albinas, independente do diâmetro do tanque. Este fator pode ser associado à diminuição da acuidade visual (necessária para a utilização de pistas fora do labirinto como referência) observada em linhagens albinas (PRUSKY et al., 2002).

O diâmetro do tanque utilizado no presente estudo, portanto, não parece ter interferido nos resultados. Todavia, a ausência da aquisição de memória espacial esperada pode ter sido resultado da acuidade visual prejudicada nos camundongos *Swiss*, uma linhagem albina. Não obstante, a redução no diâmetro do LAM pode reduzir o estresse provocado pela aversão à água, permitindo uma melhor aquisição de informação espacial (VAN DER STAAY, 2000; VAN DAM; LENDERS; DE DEYN, 2006), o que deve ser considerado, juntamente com a escolha da linhagem a ser avaliada.

O pré-treino em diferentes tarefas também pode melhorar a execução das tarefas no LAM (HÖLSCHER, 1999), uma vez que o desempenho prejudicado pela aversão à água pode ser equivocadamente interpretado como aprendizagem espacial deficiente. Sugere-se, para tanto, que se utilize pelo menos um labirinto não aquático associado ao LAM para melhor fidedignidade dos resultados (PATIL et al., 2009). Este experimento utilizou somente o LAM, enquanto alguns dos estudos com resultados significativos utilizaram outros tipos de testes previamente a este labirinto (GRESACK; KERR; FRICK, 2007; DINIZ et al.; 2010; KULESSKAYA; RAUVALA; VOIKAR, 2011), o que pode ter minimizado os possíveis efeitos do estresse.

A maior latência para encontrar a plataforma observada nos camundongos adultos jovens em relação aos controles, bem como a ausência de efeito dos dias de treino, pode ter sido consequência de estresse crônico, uma vez que não houve a aquisição esperada de memória espacial.

O teste de memória espacial no LAM requer esforço físico por meio do nado, além de necessitar de treinos prévios, realizando-se uma bateria de treinos diários, o que pode levar os camundongos à fadiga. A fadiga produzida pelo exercício físico pode prejudicar alguns aspectos de função cerebral como discriminação e aprendizagem (MIZUNOYA et al., 2004). Neste experimento, foram realizados cinco dias de treinos consecutivos, com três sessões por dia, anteriormente ao teste final, e o intervalo entre os treinos foi de um período curto de tempo (30 segundos), conforme o protocolo descrito por Rossato et al. (2006). Em contrapartida, a maioria dos estudos aqui elencados, independente dos resultados, embora tenha utilizado períodos mais longos de intervalo entre os treinos, utilizou baterias com maior número de testes por dia. Zhou et al. (2009) observaram menor latência para encontrar a plataforma em breves intervalos interteste (15 segundos, comparados a 10 e 60 minutos). Portanto, o curto intervalo de descanso entre os treinos não deve ter influenciado nos resultados.

Um dos estudos descreveu uma maior velocidade de nado em um dos grupos controle em relação ao seu respectivo grupo enriquecido (GRESACK; KERR; FRICK, 2007). Outro verificou maior tempo de nado de camundongos jovens submetidos ao enriquecimento complexo em relação aos demais, incluindo o grupo controle, na primeira sessão de treinos (HARBURGER; NZEREM; FRICK, 2007), com melhora ao longo deles. Ambos utilizaram maior número de treinos diários em relação a este estudo, e o último realizou a tarefa de reconhecimento de objetos anteriormente ao LAM, o que pode explicar o fato de os camundongos adultos jovens enriquecidos deste estudo não terem superado seus controles ao longo dos treinos.

Embora pareça ter havido interferência de alguns fatores nos resultados deste estudo, o tempo insuficiente de enriquecimento ambiental mostrou-se ser o de maior influência na ausência da aquisição esperada de memória espacial pelos camundongos estudados. Além disso, as faixas etárias analisadas, ainda sem comprometimento de memória, poderiam ter obtido resultados significativos de memória espacial durante o período de enriquecimento ambiental utilizado se tivesse se incrementado a estimulação física pelo uso de mais rodas de correr.

Apesar de os resultados não terem sido significativos, observou-se uma menor latência de tempo para encontrar a plataforma submersa nos camundongos recém-desmamados e jovens do grupo enriquecido em relação aos seus controles

no teste final de memória espacial. Ao longo dos dias de treino, embora sem significância estatística, pôde-se observar, ainda, uma redução no tempo de latência para encontrar a plataforma submersa para esses mesmos grupos. Um maior período de alojamento no ambiente enriquecido poderia ter tornado esses resultados significativos.

7 CONCLUSÕES

- a) Não se observou efeito significativo do enriquecimento ambiental na aquisição de memória espacial nos camundongos em geral.
- b) Não houve diferença significativa na aquisição de memória espacial entre os camundongos em relação à faixa etária.
- c) Os dias de treino no Labirinto Aquático de Morris e o grupo experimental não interferiram na latência para encontrar a plataforma escondida nos camundongos recém-desmamados e jovens.
- d) Em relação aos camundongos adultos jovens, apesar de não ter havido influência dos dias de treino para encontrar a plataforma, houve efeito do grupo experimental, apresentando o grupo controle uma menor latência.
- e) A partir deste estudo, pôde-se concluir que o enriquecimento ambiental não interferiu na aquisição de memória espacial de camundongos fêmeas *Swiss* recém-desmamados, jovens e adultos jovens.

REFERÊNCIAS

Abramov U, Puusaar T, Raud S, Kurrikoff K, Vasar E. Behavioural differences between C57BL/6J and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci Lett*. 2008; 443 (3): 223-7.

Adamec R, Head D, Blundell J, Burton P, Berton O. Lasting anxiogenic effects of feline predator stress in mice: sex differences in vulnerability to stress and predicting severity of anxiogenic response from the stress experience. *Physiol Behav*. 2006; 88 (1-2): 12-29.

Ainge JA, Langston RF. Ontogeny of neural circuits underlying spatial memory in the rat. *Front Neural Circuits*. 2012; 6(8): doi: 10.3389/fncir.2012.00008.

Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav*. 2008; 93(1-2): 388-94.

Anderson JR. *Aprendizagem e memória: uma abordagem integrada*. 2 ed. Rio de Janeiro: LTC; 2005.

Arai JA, Feig LA. Long-lasting and transgenerational effects of an environmental enrichment of memory formation. *Brain Res Bull*. 2011; 85(1-2): 30-5.

Balcombe JP. Laboratory environments and rodents' behavioural needs: a review. *Lab Anim*. 2006; 40(3): 217-235.

Bernardi C, Tramontina AC, Nardin P, Biasibetti R, Costa AP, Vizueti AF, et al. Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats. *Neural Plast*. 2013; 2013: doi: 10.1155/2013/709732.

Boleij H, Salomons AR, van Sprundel M, Arndt SS, Ohl F. Not all mice are equal: welfare implications of behavioural habituation profiles in four 129 mouse substrains. *PLoS ONE*. 2012; 7(8): e42544.

Cain ME, Green TA, Bardo MT. Environmental enrichment decreases responding for visual novelty. *Behav Processes*. 2006; 73(3): 360-6.

Cammarota M, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I. Studies of short-term avoidance memory. In: Bermúdez-Rattoni, F. *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging*. Boca Raton: CRC Press; 2007. chap. 10.

Cammarota M, Bevilaqua LRM, Izquierdo I. Aprendizado e memória. In: Lent R. *Neurociência da mente e do comportamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. cap. 11, p. 241-52.

Canteras NS, Bittencourt JC. Comportamentos motivados e emoções. In: Lent R. *Neurociência da mente e do comportamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. cap. 10, p. 227-40.

Carlson NR. *Fisiologia do comportamento*. 7 ed. Barueri: Manole; 2002.

Castilla-Ortega E, Hoyo-Becerra C, Pedraza C, Chun J, De Fonseca FR, Estivill-Torrús G, et al. Aggravation of chronic stress effects on hippocampal neurogenesis and spatial memory in LPA₁ receptor knockout mice. *PLoS ONE*. 2011; 6(9): e25522.

Carvalho AFU, Araújo AJ, Farias DF, Rocha-Bezerra LCB, Cavalheiro MG. Development and reproductive performance of Swiss mice in an enriched environment. *Braz J Biol*. 2009; 69(1): 153-60.

Chronister RB, Hardy SGP. Sistema límbico. In: Haines, DE. *Neurociência fundamental: para aplicações básicas e clínicas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. cap. 31, p. 583-95.

Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(6): 2652-7.

Coutellier L, Würbel H. Early environmental cues affect object recognition memory in adult female but not male C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2009; 203(2): 312-5.

Cracchiolo JR, Mori T, Nazian SJ, Tan J, Potter H, Arendash GW. Enhanced cognitive activity – over and above social and physical activity – is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce A β deposition, and increase synaptic immunoreactivity. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 88(3): 277-94.

Dhanushkodi A, Shetty AK. Is exposure to enriched environment beneficial for functional post-lesional recovery in temporal lobe epilepsy? *Neurosci Behav R.* 2008; 32(4): 657-74.

Diniz DG, Foro CAR, Rego CMD, Gloria DA, Oliveira FRR Paes JMP, et al. Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial memory, and dentate gyrus astrocytes. *Eur J Neurosci.* 2010; 32(3): 509-19.

Ennaceur A, Michalikova S, van Rensburg R, Chazot PL. Models of anxiety: responses of mice to novelty and open spaces in a 3D maze. *Behav Brain Res.* 2006; 174(1): 9-38.

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(1): 59-65.

Ferreti V, Roullet P, Sargolini F, Rinaldi A, Perri V, Del Fabbro M, et al. Ventral striatal plasticity and spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(17): 7945-50.

Fares RF, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, et al. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS ONE.* 2013; 8(1): e53888.

Fiorenza NG, Sartor D, Myskiw JC, Izquierdo I. Treatment of fear memories: interactions between extinction and reconsolidation. *An Acad Bras Cienc.* 2011; 83(4): 1363-72.

Foster TC, Defazio RA, Bizon JL. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. *Front Aging Neurosci.* 2012; 4(12): doi: 10.3389/fnagi.2012.00012.

Francia N, Cirulli F, Chiarotti F, Antonelli A, Aloe L, Alleva E. Spatial memory deficits in middle-aged mice correlate with lower exploratory activity and a subordinate status: role of hippocampal neurotrophins. *Eur J Neurosci.* 2006; 23(3): 711-28.

Frick KM, Burlingame LA, Arters JA, Berger-Sweeney J. Reference memory, anxiety and estrous cyclicity in C57BL/6NIA mice are affected by age and sex. *Neuroscience.* 2000; 95(1): 293-307.

Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. *Learn Memory.* 2003; 10(3): 187-98.

García-Lázaro HG, Ramirez-Carmona R, Lara-Romero R, Roldan-Valadez E. Neuroanatomy of episodic and semantic memory in humans: a brief review of neuroimaging studies. *Neurol India.* 2012; 60(6): 613-7.

Görtz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambrée O, Keyvani K, Paulus N, et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav Brain Res.* 2008; 191(1): 43-8.

Gresack JE, Kerr KM, Frick KM. Life-long environmental enrichment differentially affects the mnemonic response to estrogen in young, middle-aged, and aged female mice. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 88(4): 393-408.

Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci.* 2006; 26(4): 1077-87.

Haines DE, Mihailoff GA. Telencéfalo. In: Haines DE. *Neurociência fundamental: para aplicações básicas e clínicas.* 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. cap. 16, p. 285-303.

Haines DE, Mihailoff GA, Bloedel JR. Cerebelo. In: Haines DE. *Neurociência fundamental: para aplicações básicas e clínicas.* 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. cap. 27, p. 503-27.

Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res.* 2007; 185(1): 47-8.

Harburger LL, Nzerem CK, Frick KM. Single enrichment variables differentially reduce aged-related memory decline in female mice. *Behav Neurosci.* 2007; 121(4): 679-88.

Heo S, Prakash RS, Voss MW, Erickson KI, Ouyang C, Sutton BP, et al. Resting hippocampal blood flow, spatial memory and aging. *Brain Res.* 2010; 1315: 119-27.

Hölscher C. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res.* 1999; 100(1-2): 225-35.

Huang FL, Huang KP, Wu J, Boucheron C. Environmental enrichment enhances neurogranin expression and hippocampal learning and memory but fails to rescue the impairments of neurogranin null mutant mice. *J Neurosci.* 2006; 26(23): 6230-7.

Hutchinson EK, Avery AC, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J.* 2005; 46(2): 148-61.

Hutchinson EK, Avery AC, Vandewoude S. Environmental enrichment during rearing alters corticosterone levels, thymocyte numbers, and aggression in female BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012; 51(1): 18-24.

Izquierdo, I. *Memória*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.

Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, et al. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005; 25(21): 5217-24.

Jeneson A, Mauldin KN, Hopkins RO, Squire LR. The role of the hippocampus in retaining relational information across short delays: The importance of memory load. *Learn Memory*. 2012; 18(5): 301-5.

Jeneson A, Squire LR. Working memory, long-term memory, and medial temporal lobe function. *Learn Memory*. 2012; 19(1): 15-25.

Kempermann G, Faber K, Ehninger D, Babu H, Leal-Galicia P, Garthe A, et al. Why and how physical activity promotes experience-induced brain plasticity. *Front Neurosci*. 2010; 4(189): doi: 10.3389/fnins.2010.00189.

Kempermann G, Gage FH. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus*. 1999; 9(3): 321-32.

Krubitzer L, Campi KL, Cooke DF. All rodents are not the same: a modern synthesis of cortical organization. *Brain Behav Evol*, 2011;78(1): 51-93.

Kuleshkaya N, Rauvala H, Voikar V. Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. *PLoS ONE*. 2011; 6(9): e24755.

Lin EJD, Choi E, Liu X, Martin A, During MJ. Environmental enrichment exerts sex-specific effects on emotionality in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2011; 216(1): 349-57.

Madroñal N, López-Aracil C, Rangel A, del Rio JA, Delgado-García JM. Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS ONE.* 2010; 5(6): e111130.

Meijer MK, Sommer R, Spruijt MB, van Zutphen LFM, Baumans V. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim.* 2007; 41(2): 161-73.

Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc.* 2008; 80(2): 301-9.

Miranda MI. Changes in neurotransmitter extracellular levels during memory formation. In: Bermúdez-Rattoni F. *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging.* Boca Raton: CRC Press; 2007. chap. 7.

Mizunoya W, Oyaizu S, Hirayama A, Fushiki T. Effects of physical fatigue in mice on learning performance in a water maze. *Biosci Biotech Bioch.* 2004; 68(4): 827-34.

Monteiro R, Brandau R, Gomes WJ, Braile DM. Tendências em experimentação animal. *Rev Bras Cir Cardiovas.* 2009; 24(4): 506-13.

Morris R. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 1981; 12(2): 239-60.

Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth.* 1984; 11(1): 47-60.

Mozzachiodi R, Byrne JH. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci.* 2010; 33(1): doi:10.1016/j.tins.2009.10.001.

Myskiw JC, Izquierdo I. Posterior parietal cortex and long-term memory: some data from laboratory animals. *Front Integr Neurosci.* 2012; 6(8): doi: 10.3389/fnint.2012.00008.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(9): 697-709.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol.* 2009; 89(4): 369-82.

Olsson AS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of 'environmental enrichment'. *Lab Anim.* 2002; 36(3): 243-70.

Pang TYC, Stam NC, Nithianantharajah J, Howard ML, Hannan AJ. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience.* 2006; 141(2): 569-84.

Passot JB, Sheynikhovick D, Duvelle E, Arleo A. Contribution of cerebellar sensorimotor adaptation to hippocampal spatial memory. *PLoS ONE.* 2012; 7(4): e32560.

Patel TR. Environmental enrichment: aging and memory. *Yale J Biol Med.* 2012; 85(4): 491-500.

Patil SS, Sunyer B, Höger H, Lubec G. Evaluation of spatial memory of C57BL/6J and CD1 mice in the Barnes maze, the multiple T-maze and in the Morris water maze. *Behav Brain Res.* 2009; 198(1): 58-68.

Pompeu SMAA, Pompeu JE. Estudo da utilização de pistas visuais na orientação espacial de um paciente com Doença de Alzheimer. *J Health Sci Inst.* 2010; 28(4): 352-5.

Prusky GT, Reidel C, Douglas RM. Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behav Brain Res.* 2000; 114(1-2): 11-5.

Prusky GT, Harker KT, Douglas RM, Whishaw IQ. Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. *Behav Brain Res.* 2002; 136(2): 339-48.

Rekart JL, Holahan MR, Routtenberg A. Presynaptic structural plasticity and long-lasting memory: focus on learning-induced redistribution of hippocampal mossy fibers. In: Bermúdez-Rattoni F. *Neural plasticity and memory: from genes to brain imaging.* Boca Raton: CRC Press; 2007. chap. 5.

Reynolds S, Lane SJ, Richards L. Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. *J Neurodevelop Disord.* 2010; 2: 120-32.

Rosenbaum RS, Winocur G, Binns MA, Moscovitch M. Remote spatial memory in aging: all is not lost. *Front Aging Neurosci.* 2012; 4(25): doi: 10.3389/fnagi.2012.00025.

Rossato JI, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Memory.* 2006; 13(4): 431-40.

Sanderson DJ, Bannerman DM. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. *Hippocampus.* 2012; 22(5): 981-94.

Santos AF. Influência do enriquecimento ambiental na aquisição, retenção e evocação da memória espacial em duas linhagens de camundongos [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco; 2009.

Sarkisyan G, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res.* 2009; 202(1): 26-31.

Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci.* 2010; 87(17-18): 521-36.

Shrager Y, Bayley PJ, Bontempi B, Hopkins RO, Squire LR. Spatial memory and the human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(8): 2961-6.

Silva CF, Duarte FS, de Lima TCM, Oliveira CL. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. *Behav Brain Res.* 2011; 225(1): 85-90.

Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats - behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res.* 2011; 222(1): 246-64.

Sorrells AD, Corcoran-Gomez K, Eckert KA, Fahey AG, Hoots BL, Charleston LB, et al. Effects of environmental enrichment on the amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Lab Anim.* 2009; 43(2): 182-90.

Squire LR, Zola-Morgan JT. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu Rev Neurosci.* 2011; 34: 259-88.

Squire, L. R. Memory and brain systems: 1969-2009. *J Neurosci.* 2009; 29(41): 12711-6.

Thiriet N, Amara L, Toussaya X, Lardeuxa V, Ladenheimc B, Beckerb KG, et al. Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. *Brain Res.* 2008; 1222: 31-41.

Torrealba F, Valdés JL. The parietal association cortex of the rat. *Biol Res.* 2008; 41(4): 369-77.

Toth LA, Kregel K, Leon L, Musch TI. Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question. *Comparative Med.* 2011; 61(4): 314-21.

Tsai PP, Pachowsky HD, Stelzer D, Hackbarth H. Impact of environmental enrichment in mice. 1: Effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim.* 2002; 36(4): 411-9.

Valero J, España J, Parra-Damas A, Martín E, Rodríguez-Álvarez J, Saura, C. A. Short-term environmental enrichment rescues adult neurogenesis and memory deficits in APP_{Sw,Ind} transgenic mice. *PLoS ONE.* 2011; 6(2): e16832.

Van Dam D, Lenders G, De Deyn PP. Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strain. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; 85(2): 164-72.

van Dellen A, Cordery PM, Spires TL, Blakemore C, Hannan AJ. Wheel running from a juvenile age delays onset specific motor deficits but does not alter protein aggregate density in a mouse model of Huntington's disease. *BMC Neurosci.* 2008; 9(34): doi:10.1186/1471-2202-9-34.

van der Staay FJ. Effects of the size of the Morris water tank on spatial discrimination learning in the CFW1 mouse. *Physiol Behav.* 2000; 68(4): 599-602.

van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behav Brain Funct.* 2009; 5(11): doi: 10.1186/1744-9081-5-11.

Van Loo PLP, Baumans V. The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory animals. *Lab Anim.* 2004; 38(1): 17-24.

Van Loo PLP, Van De Weerd HA, Van Zutphen LFM, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim.* 2004; 38(2): 178-88.

Verret L, Trouche S, Zerwas M, Rampon C. Hippocampal neurogenesis during normal and pathological aging. *Psychoneuroendocrinol.* 2007; 32 Suppl 1: 26-30.

Vieira PR. Memória espacial em macacos pregos (*Cebus apella*) e humanos [Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2006.

Whitlock JR, Sutherland RJ, Witter MP, Moser MB, Moser EL. Navigating from hippocampus to parietal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(39): 14755-62.

Wixted JT, Squire LR. The medial temporal lobe and the attributes of memory. *Trends Cogn Sci.* 2011; 15(5): 210-7.

Wood NI, Carta V, Milde S, Skillings EA, Mcallister CJ, Ang YLM, et al. Responses to environmental enrichment differ with sex and genotype in a transgenic mouse model of Huntington's Disease. *PLoS ONE.* 2010; 5(2): e9077.

Zhou S, Zhu M, Shu D, Du X, Song X, Wang X, et al. Preferential enhancement of working memory in mice lacking adenosine A2A receptors. *Brain Res.* 2009; 1303: 74-83.

**Anexo – Carta de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 336 do Pesquisador Albert Schiaveto de Souza referente ao projeto de pesquisa, “A influência do ambiente enriquecido na memória de camundongos avaliada por meio do labirinto aquáticos de Morris e do labirinto de Barnes”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 11 de agosto de 2011.


Dr^a Joice Stein
Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 16 de agosto de 2011