Carolina de Souza Goulart

**Enriquecimento ambiental, ansiedade,
cognição e neurogênese hipocampal**

Environmental enrichment, anxiety, cognition and
hippocampal neurogenesis

São Paulo

2014

Carolina de Souza Goulart

Enriquecimento ambiental, ansiedade, cognição e
neurogênese hipocampal

Environmental enrichment, anxiety, cognition and hippocampal
neurogenesis

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia
Geral.

Orientador(a): Gilberto Fernando
Xavier

São Paulo

2014

Goulart, Carolina de Souza

Enriquecimento ambiental, ansiedade, cognição e neurogênese
hipocampal / Carolina de Souza Goulart ; orientador Gilberto Fernando
Xavier. – São Paulo, 2014.

98 f.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Hipocampo. 2. Enriquecimento. 3. Memória. I. Universidade de
de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia Geral.
II. Título.

Comissão Julgadora

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier

*Às pessoas que mais amo nesse mundo
Ester, Braz, Beatriz e Felipe.*

Agradecimentos

Difícil reduzir meus agradecimentos em apenas uma folha, pois todos que fizeram parte da minha vida nesse período contribuíram de alguma forma para o resultado final.

Primeiramente, agradeço aos meus amados pais, Ester e Braz, por todo exemplo e amor durante a minha vida, pela força e motivação durante o curso de Mestrado. À minha irmã Beatriz, por me fazer rir até depois de longas horas de experimento aos finais de semana. Ao meu querido companheiro Felipe, por me acompanhar aos finais de semana, pela paciência de ler meu trabalho e pelos conselhos nos momentos difíceis.

Sinto-me honrada de ter sido aluna de uma pessoa tão inspiradora quanto o Prof. Dr. Gilberto. Agradeço pela oportunidade de trabalho, pela paciência e dedicação constantes. Um agradecimento especial aos meus colegas e amigos do LabNec, principalmente ao nosso querido Manu, que sempre me ajudou com bom humor e disposição, em qualquer problema durante os experimentos.

Meu trabalho não seria completo sem a colaboração da Prof.^a Dra. Maria Inês Nogueira que, com seu enorme coração, acolhe com carinho todos que a procuram. Agradeço também toda a sua equipe e os amigos da Anatomia, que sempre me ajudaram muito.

Ao Prof. Dr. Jackson, que disponibilizou seu laboratório e sua atenção. A sua aluna/técnica Jô, que dividiu comigo toda sua rica experiência em imunohistoquímica.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação, que contribuíram no meu trabalho de forma enriquecedora.

Às minhas queridas amigas de colégio e faculdade, que sempre me escutaram e aconselharam.

1.INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1.ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	8
1.1.1.ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL E A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL	10
1.1.2.ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL, ANSIEDADE E MEMÓRIA.....	13
1.2.ENVELHECIMENTO	16
1.2.1.ENVELHECIMENTO E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	19
2.OBJETIVOS GERAIS	21
3.JUSTIFICATIVA	22
4.PROCEDIMENTOS GERAIS	23
4.1.ANIMAIS.....	23
4.2.ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	23
5.ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL ALTERA A ANSIEDADE E A MEMÓRIA AVALIADOS POR MEIO DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO?	26
RESUMO/ABSTRACT	27
5.1.INTRODUÇÃO	28
5.2.OBJETIVOS	30
5.3.METODOLOGIA	30
5.4.RESULTADOS	33
5.5.DISSCUSSÃO	38
6.ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL ALTERA A MEMÓRIA OPERACIONAL E A NEUROGÊNESE?	43
RESUMO/ABSTRACT	44
6.1.INTRODUÇÃO	45
6.2.OBJETIVOS	49
6.3.METODOLOGIA	49
6.4.RESULTADOS	58
6.5.DISSCUSSÃO	71
7.DISSCUSSÃO GERAL	80
8.REFERÊNCIAS	88

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da circuitaria hipocampal em cérebro de rato.	11
Figura 2: Enriquecimento ambiental e ativação neural	13
Figura 3: (A) Foto gaiola de enriquecimento (B) Enriquecimento	25
Figura 4: Representação esquemática do labirinto em cruz elevado	32
Figura 5: Média (+E.P.M.) do LCE aos 3 e 15 meses de idade.....	34
Figura 6: Divisões virtuais da piscina.	54
Figura 7: Fotomicrografia de secção hipocampal	59
Figura 8: Média (+ D.P.M.) da neurogênese nas lâminas superior e inferior..	60
Figura 9: Média (+ D.P.M.) da taxa de sobrevivência da neurogênese	61
Figura 10. Média (+D.P.M.) da latência no LAM com 9 meses	63
Figura 11: Média (+ D.P.M.) nos anéis intermediário e periférico	65
Figura 12: Média (+D.P.M.) das latências no LAM com ITI de 10 e 20 minutos em animais com 9 meses de idade.	66
Figura 13: Média (+D.P.M.) no LAM dos animais com 16 meses de idade	68
Figura 14: Média (+D.P.M.) da latência para encontrar a plataforma na primeira (T1) e segunda (T2) das latências no LAM com ITI de 10 e 20 minutos em animais com 16 meses de idade.....	70

Lista de quadros

Quadro 1: Idade em que cada animal iniciou os experimentos.....	24
Quadro 2: Tratamentos realizados em cada grupo	51

Lista de abreviaturas

%EBA - Porcentagem de entrada nos braços abertos

%TBA - Porcentagem de tempo nos braços abertos

BDNF- "Brain-derived neurotrophic factor"

BrdU - Bromodeoxyuridina

CTL- controle

EBF - Entradas nos braços fechados

ENR- enriquecido

EA - Enriquecimento ambiental

EPM - erro padrão da média

GDNF - "glial cell line-derived neurotrophic factor"

HCl- Ácido Clorídrico

ITI - "intertrial interval "

LAM - labirinto aquático de Morris

LCE - labirinto em cruz elevado

NeuN - "Neuronal Nuclei"

NGF - "Nerve growth factor"

NGS - "Normal goat serum"

NT-3 - Neurotrofina-3

PB- "phosphat buffer"

PBS - "phosphat buffer saline"

TC - Tempo no Quadrado Central

1. Introdução Geral

1.1. Enriquecimento ambiental

No decorrer da vida, passamos por uma série de alterações físicas e cognitivas decorrentes do ambiente no qual estamos inseridos. Somos expostos a uma série de experiências novas e desafiadoras, em um ambiente que se encontra em constante mudança. Por trás de tudo isso, encontram-se mecanismos biológicos que são capazes de alterar tanto a estrutura, quanto a função do cérebro, contribuindo para a individualidade de cada ser.

O enriquecimento ambiental corresponde a uma condição que proporciona aumento da estimulação sensorial, cognitiva e motora em relação a uma condição padrão, no caso de animais de laboratório, as caixas padrão (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006). A combinação desses estímulos proporcionada pelo enriquecimento, que podem ser inanimados e/ou sociais, seria a responsável pelos efeitos benéficos observados após exposição a esse tipo de ambiente (VAN PRAAG *et al.*, 2000).

A ideia de que experiências poderiam alterar, de alguma forma, o cérebro, já existe desde o início do século XIX. Spurzheim comparou o cérebro aos músculos; como estes aumentam seu tamanho em função do exercício, aquele também poderia aumentar em função de alguma atividade (SPURZHEIM, 1815 *apud* DIAMOND, 2001). Charles Darwin, em 1874, mostrou que cérebros de

coelhos selvagens eram maiores do que os de coelhos domesticados (Darwin, 1874 apud Diamond, 2001 & Mohammed et al.,2002). Ramon y Cajal (1895, apud Bennet, 1964) também especulou que o “exercício cerebral”, diferentemente do muscular que, segundo ele levaria a multiplicação das células musculares, geraria uma espécie de expansão neuronal e consequentemente um aumento de conexões entre os córtices (apud Bennet et al.,1964).

Donald Hebb, em 1947, foi o primeiro a demonstrar que o enriquecimento durante o desenvolvimento era capaz de melhorar o desempenho de ratos adultos em uma tarefa cognitiva. Hebb levou para sua própria casa um grupo de ratos de laboratório para serem tratados como “animais de estimação”, isto é, tinham um ambiente amplo para poderem explorar, enquanto que outro grupo de ratos foi mantido nas gaiolas de laboratório. Quando Hebb testou ambos os grupos em tarefas de labirinto, percebeu que os ratos criados em sua casa tinham um desempenho melhor que os animais criados em laboratório, sugerindo que o enriquecimento no início do desenvolvimento traria benefícios que se prolongariam até a maturidade (HEBB, 1949, BROWN & MILNER, 2003). Em relação à parte anatômica, o primeiro relato de que um ambiente rico em estímulos poderia alterar estruturas neurais foi o de Rosenzweig e colaboradores (1962), no início da década de 60. Eles mantiveram os roedores em caixas maiores que as convencionais e incluíram uma série de estímulos sensoriais. Como resultado, encontraram que os encéfalos eram mais pesados que os de animais mantidos

em gaiolas padrão, sugerindo uma mudança anatômica no encéfalo (ROSENZWIEG *et al.*, 1962).

A partir dessa descoberta, uma série de estudos foi realizada para entender melhor essas mudanças, principalmente no neocortex e no hipocampo (ECKERT & ABRAHAM, 2012). Atualmente, sabe-se que o enriquecimento ambiental aumenta a densidade da árvore dendrítica e dos botões dendríticos (JOHANSSON & BELICHENKO, 2002), muito provavelmente através da indução da liberação de neurotrofinas (MOHAMMED *et al.*, 2002). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma neurotrofina encontrada em altos níveis em animais expostos a ambientes enriquecidos, parece ter papel crítico tanto na fase do desenvolvimento cerebral quanto na fase adulta, promovendo a regeneração e a sobrevivência neuronal. Outras neurotrofinas importantes também são encontradas em altos níveis no cérebro, como a neurotrofina 3 (NT-3) e o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), responsáveis respectivamente, pelo crescimento e sobrevivência neuronal (OLSON *et al.*, 2006).

1.1.1. Enriquecimento ambiental e a Formação Hipocampal

A formação hipocampal é uma estrutura localizada no lobo temporal medial, composta pelo hipocampo propriamente dito, dividido em três regiões CA1, CA2, CA3 (referente a corno de Ammon) e pelo giro dentado (DG) (O'KEEFE & NADEL, 1978). A formação hipocampal parece não funcionar

como uma estrutura única, podendo ser dividida entre região dorsal e ventral. Esta última conecta-se com amígdala e hipotálamo, enquanto aquela recebe e envia projeções principalmente das áreas sensoriais e associativas do córtex (ver Figura 1). Essas diferenças hodológicas são responsáveis pelo engajamento hipocampal em diferentes funções cognitivas (ECKERT & ABRAHAM, 2012). É bem conhecida a função do hipocampo dorsal nos processos envolvendo memória espacial, assim como a participação do hipocampo ventral na ansiedade (MOSER & MOSER, 1998; BARNNERMAN *et al.*, 2004; FANSELOW & DONG, 2010).

Figura 1: Representação esquemática das diferenças hodológicas entre o hipocampo dorsal e ventral do encéfalo de ratos. A porção dorsal recebe informações das áreas sensoriais e associativas via córtex entorrinal e se projeta para essas áreas. A porção ventral do hipocampo se comunica com amígdala e hipotálamo também via córtex entorrinal (adaptada de TANNENHOLZ *et al.*, 2014).

O fato de encontrar-se numa posição anatômica estratégica, além de exibir conexões recíprocas com áreas sensoriais polimodais e olfatórias, facilita a influencia do enriquecimento ambiental sobre o hipocampo. Em outras palavras, a exposição a uma série de estímulos de diferentes

modalidades ativa regiões encefálicas (Figura 2), inclusive a formação hipocampal. Além disso, o reposicionamento frequente de objetos no ambiente contribui para um aumento da plasticidade hipocampal (NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2006).

Esse ambiente dinâmico e o aumento de entrada de estímulos sensorio-motores, estimulam a plasticidade hipocampal caracterizada pelo aumento da arborização dendrítica e alteração na quantidade e tamanho das sinapses hipocampais (ECKERT & ABRAHAM, 2012). Além disso, o enriquecimento ambiental estimula também o aumento da neurogênese hipocampal (NILSSON *et al.*,1999; VAN PRAAG *et al.*,2000; KEMPERMANN *et al.*,2002; BRUEL-JUNGERMAN *et al.*,2005; Simpson *et al.*,2011). Considerando que cerca de 60% das novas células morrem antes de se tornarem maduras (ABROUS *et al.*,2005), um ambiente desafiador, que proporcione novas experiências, pode aumentar essa taxa de sobrevivência das novas células geradas (FABEL *et al.*,2009; RIZZI *et al.*,2011). É possível, talvez, que esse efeito de maior sobrevivência seja decorrente da estimulação por fatores de crescimento (YOUNG *et al.*,1999). A exposição ao enriquecimento ambiental é capaz de estimular a produção de diversos fatores tróficos como BDNF, que promove regeneração e sobrevivência celular, GDNF que aumenta a proliferação e diferenciação celular (OLSON *et al.*,2006; VAN PRAAG, *et al.*,2000), e NGF que é um fator de crescimento neuronal (YOUNG *et al.*,1999).

Figura 2: Representação esquemática do enriquecimento ambiental e ativação nervosa decorrente da utilização de estímulos de diferentes modalidades, entre elas, regiões visual e somatossensorial, regiões motoras e regiões envolvidas em processos cognitivos, e.g., hipocampo envolvido no mapeamento espacial (adaptada de Nithianantharajah and Hannan, 2006).

Estudos envolvendo enriquecimento ambiental mostram que 8-12 semanas de estimulação proporcionam melhor desempenho em tarefas dependentes do hipocampo (e.g., WILLIAMS *et al.*, 2001; LEGGIO *et al.*, 2005; ECKERT *et al.*, 2010).

1.1.2. Enriquecimento ambiental, ansiedade e memória

Ansiedade pode ser definida como uma resposta desencadeada por possível ameaça a homeostase do organismo (SALUM *et al.*, 2000; BELZUNG & GRIEBEL, 2001). Segundo Blanchard & Blanchard (1998), a ansiedade está relacionada à avaliação de risco. Mudanças no ambiente, ou situações de perigo incerto, desencadeiam comportamentos de avaliação de risco que, com a passagem do tempo, quando não existe ameaça real, levam o animal a

exibir comportamento exploratório direcionada à mudança ou novidade. Assim, a ansiedade gera um conflito entre aproximação e evitação.

A memória pode ser definida como a alteração do comportamento em decorrência de experiências anteriores (XAVIER, 1993). Assim, experiências que demandam processamento de informação podem alterar a estrutura do sistema nervoso central e, por conseguinte, alterações nas respostas comportamentais.

No labirinto aquático de Morris, o animal é colocado numa piscina e deve encontrar uma plataforma submersa de escape guiando-se apenas por pistas distais; a memória é mensurada por meio da diminuição do tempo e do percurso para encontrar a plataforma ao longo das tentativas. Estudos que compararam o desempenho de animais criados em ambiente enriquecido e em caixas convencionais descrevem que os primeiros apresentam menor trajeto e menor tempo para encontrar a plataforma em relação aos últimos, sugerindo uma função mnemônica superior após a exposição ao ambiente enriquecido (NILSSON *et al.*,1999, WILLIAMS *et al.*,2001; MESHI *et al.*, 2006, ECKERT *et al.*,2010). Já no labirinto radial de 8 braços, em que a memória é avaliada através da diminuição do número de entradas nos braços já visitados ao longo da tentativa, Leggio e colaboradores (2005) encontraram que os animais do grupo controle cometiam mais erros em relação aos animais criados em ambiente enriquecido.

Em tarefa de reconhecimento de objetos, na qual dois objetos são apresentados em uma tentativa, e posteriormente um novo objeto é

introduzido no local de um dos objetos antigos, deduz-se que há memória sobre os objetos antigos pois os animais dedicam mais atividade exploratória ao objeto novo. Nesse tipo de tarefa, animais expostos ao ambiente enriquecido passam mais tempo explorando o objeto novo, enquanto os animais do controle exploraram os objetos (novo e antigo) igualmente (LEGER *et al.*, 2012).

A exposição a ambiente enriquecido, além de favorecer os processos de memória, parece exercer também um efeito ansiolítico. O labirinto em cruz elevado vem sendo amplamente empregado para avaliação da ansiedade. O aparelho inclui braços "fechados", i.e., em que o animal fica pouco exposto a ambiente aberto, e braços "abertos", em que além da exposição ao ambiente, há uma altura de 50 cm do piso. Assim, a exposição e esse labirinto induz comportamento exploratório pela novidade do ambiente e também comportamentos aversivos, por se tratar de uma situação que envolve ambientes abertos e altura. O tempo de permanência e frequência de entradas nos braços abertos (aversivos) e fechados (protegidos) permitem gerar indicadores dos níveis de ansiedade (para mais detalhes, ver item 5). Baldini e colaboradores (2013) mostraram que animais criados em ambiente enriquecido desde o nascimento e submetidos ao labirinto em cruz elevado com 2 meses de idade eram menos ansiosos (permaneciam mais tempo nos braços abertos) do que animais que permaneceram na gaiola padrão durante o mesmo período. Outro estudo expôs os animais ao enriquecimento ambiental a partir da 4ª semana até 16ª semana de vida. Na 21ª semana os animais

passaram pelo labirinto em cruz elevado, e mais uma vez, os animais expostos ao ambiente enriquecido mostraram-se menos ansiosos que os controles, uma vez que a percentagem de entradas nos braços abertos era maior que em relação aos controles (PEÑA *et al.*, 2009).

Embora a grande maioria dos estudos envolvam animais jovens adultos, os efeitos benéficos do enriquecimento ambiental também ocorrem ao longo do envelhecimento, inclusive em animais com idade avançada.

1.2. Envelhecimento

O envelhecimento, fisiologicamente, provoca uma série de prejuízos celulares em todos os sistemas orgânicos e, o sistema nervoso central parece ser o mais afetado por essas mudanças, levando a um prejuízo nas funções motoras, sensoriais e cognitivas ao longo do tempo (MATTISON *et al.*, 2006).

Essas alterações podem ser explicadas, em parte, pelas alterações nas propriedades dos neurônios. Em relação a morfologia, acreditava-se que o envelhecimento diminuía o número de espinhas dendríticas e brotamentos dendríticos no hipocampo. Entretanto, não foi encontrada redução dessas estruturas nas células hipocâmpais, e sim em determinadas camadas do córtex pré-frontal (BURKE & BARNES, 2006).

Propriedades elétricas básicas da membrana celular, como potencial de repouso, resistência, amplitude do potencial de ação e limiar de

disparo permanecem constantes durante a vida (BILLARD *et al.*,2006; BURKE & BARNES, 2006). No entanto, a excitabilidade neuronal está altamente prejudicada durante o envelhecimento, muito provavelmente pelo excesso de cálcio e a depleção de magnésio, o que dificultaria a transmissão de informação na rede hipocampal (BILLARD *et al.*,2006). No processo de envelhecimento ocorre uma diminuição da neurogênese independentemente da espécie (KUHN *et al.*,1996; SIWAK-TAPP *et al.*,2008; MORGENSTERN *et al.*,2008; AIZAWA *et al.*,2009; JINNO 2011). Estudos envolvendo animais jovens, de meia idade (aprox. 10 meses) e idosos (aprox. 20 meses) mostram um declínio acentuado da neurogênese durante a meia idade, seguido de um declínio mais moderado nos idosos (KUHN *et al.*,1996; JINNO 2011).

A razão pela qual ocorre esse declínio dependente da idade na neurogênese permanece desconhecida. Alguns autores apontam que a redução pode ser devida a supressão da proliferação das células progenitoras (KUHN *et al.*,1996; LAZAROV *et al.*,2010), ou ainda pela falta de suporte trófico e déficits no nicho neurogênico (LAZAROV *et al.*,2010).

O envelhecimento altera a capacidade cognitiva de animais de meia idade e idosos, quando comparados a animais jovens. Em tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris, estudos mostraram que o prejuízo no desempenho é diretamente proporcional ao avanço da idade, isto é, animais idosos (22-24 meses) tem pior desempenho em relação aos animais de meia idade (10-12 meses) que por sua vez, são piores que os jovens (4 meses) (LINDNER *et al.*,1992, FRICK *et al.*,2005, e BIZON *et al.*,2009). Em relação

a memória operacional espacial, os resultados encontrados foram distintos. Enquanto Lindner e colaboradores (1992) encontraram uma tendência ao prejuízo da memória operacional em animais de meia idade e idosos, Frick e colaboradores (1995) mostraram que só existe prejuízo em animais idosos (24 meses). Já Bizon e colaboradores (2009) encontraram que o intervalo entre as tentativas é um fator determinante no desempenho dos animais, isto é, a memória operacional foi mantida em todos os grupos durante o intervalo de 30 minutos; no entanto, quando o intervalo passou para 2 horas, animais idosos tiveram seu desempenho prejudicado, enquanto que os animais de meia idade só apresentaram prejuízo no intervalo de 6 horas.

Animais idosos também apresentam desempenho prejudicado em relação aos jovens em uma tarefa de reconhecimento de objeto, em que dois objetos são apresentados em uma sessão, e em uma segunda sessão, um desses objetos é posicionado em local novo. O esperado seria que os animais explorassem mais o objeto posicionado no local novo; no entanto, idosos exploram igualmente ambos os objetos, indicando um prejuízo na memória espacial (WIMMER *et al.*, 2012). Contudo, quando a tarefa não envolve a mudança espacial de um objeto, e sim a introdução de um objeto novo, o desempenho dos idosos é semelhante ao dos jovens (MASSBERG *et al.*, 2012; WIESCHOLLECK *et al.*, 2014).

Tarefas envolvendo memória espacial, como a versão de memória operacional e de referência do labirinto aquático de Morris, assim como o reposicionamento de objetos estão intimamente ligadas ao desempenho da

função hipocampal (XAVIER *et al.*,1999, D’HOOGE & DEYN, 2001), enquanto que tarefas de reconhecimento de objetos, sem mudança espacial, parecem não ser dependentes do funcionamento do hipocampo (BROADBEND *et al.*,2004). Assim, considerando que o desempenho apresenta-se prejudicado nas tarefas espaciais e intacto nas tarefas de reconhecimento de objetos, pode-se inferir que parte do prejuízo cognitivo presente no envelhecimento deve-se principalmente, ao funcionamento comprometido do hipocampo, e ainda, que manobras que visam diminuir os impactos do envelhecimento na função hipocampal podem ser consideradas determinantes para um melhor desempenho.

1.2.1. Envelhecimento e Enriquecimento ambiental

Ratos idosos expostos ao enriquecimento ambiental apresentam melhor desempenho cognitivo quando comparados aos controles. Esse efeito parece acontecer mesmo quando o período de enriquecimento é relativamente curto e seu início ocorre na meia idade (FRICK *et al.*,2003).

Ainda que exista uma escassez de estudos que investigaram os efeitos prolongados do enriquecimento ambiental iniciado na infância, os resultados envolvendo observações comportamentais sugerem efeitos positivos. Leal-Galicia e colaboradores (2008) mostraram que 18 meses de enriquecimento ambiental melhora o desempenho em memória de reconhecimento em ratos machos Wistar em relação aos controles não

expostos. Kobayash e colaboradores (2002) mostraram que a exposição ao enriquecimento ambiental por 15 ou 25 meses permitiu que ratos Fisher machos tivessem um desempenho melhor no labirinto de William-Hebb em relação aos seus respectivos controles. Harati e colaboradores (2011) também descreveram o mesmo efeito benéfico do enriquecimento (12 e 24 meses) em ratas Long-Evans em um teste envolvendo memória de referência espacial.

Apesar dos estudos mostrarem que a longa exposição ao enriquecimento ambiental melhora o desempenho em tarefas de memória de referência e reconhecimento de objetos, nenhum estudo investigou os efeitos da exposição prolongada ao enriquecimento ambiental na memória operacional. Sabe-se que a memória operacional espacial é a função cognitiva mais prejudicada pelo processo de envelhecimento (BADDELEY, 1998), e que seu bom funcionamento está intimamente ligado à integridade do giro denteado (XAVIER *et al.*, 1999), uma região cerebral onde comprovadamente ocorre neurogênese adulta, cuja taxa pode ser aumentada pela exposição ao enriquecimento ambiental, mesmo durante o envelhecimento.

É bem estabelecido que o exercício físico, exposição ao enriquecimento ambiental e aprendizado aumentam as taxas de neurogênese em ratos jovens (GOULD *et al.*, 1999; SHORS *et al.*, 2001; TASHIRO *et al.*, 2007; DUPRET *et al.*, 2008) e em ratos idosos (MORA *et al.*, 2007; KRONENBERG *et al.*, 2006). Kempermann e colaboradores (1998) expuseram animais de meia idade e idosos ao enriquecimento ambiental por 28 dias e observaram um aumento da taxa de neurogênese nesses animais. Em um estudo posterior,

camundongos fêmeas com 10 meses foram expostas ao enriquecimento ambiental por mais 10 meses, e observaram um aumento de 5 vezes na quantidade de neurônios novos em relação aos controles (KEMPERMANN *et al.*, 2002). Esses estudos mostram que mesmo quando iniciado em fase tardia, o enriquecimento a curto e longo prazos mantém efeitos positivos nas taxas de neurogênese. Nessa linha de raciocínio, pode-se especular que animais expostos ao enriquecimento ambiental desde jovens até a meia idade podem apresentar resultados tão positivos na geração de novos neurônios quanto os expostos em idade já avançada.

2. Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, em ratos, os efeitos do enriquecimento ambiental prolongado no desempenho de tarefas envolvendo ansiedade e memória, em animais de diferentes idades, a fim de analisar se esse enriquecimento reverte ou adia deficiências cognitivas usualmente observadas ao longo do envelhecimento. Adicionalmente, pretendemos avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental na taxa de neurogênese hipocampal e também do treinamento em tarefa que requer memória operacional espacial na taxa de sobrevivência neuronal.

3. Justificativa

O enriquecimento ambiental é um procedimento não invasivo usualmente associado ao bem estar do animal. Existem diversos estudos sobre os efeitos benéficos do enriquecimento, em curto prazo, nas funções cognitivas em animais de diferentes idades. Porém, resultados escassos são encontrados na literatura sobre os efeitos comportamentais do enriquecimento ambiental à longo prazo, principalmente quando relacionados ao envelhecimento.

O enriquecimento ambiental é um estímulo capaz de aumentar a neurogênese hipocampal. Por outro lado, a taxa de neurogênese sofre um declínio de 50 a 70% na meia-idade. Manobras como o enriquecimento, exercício físico e/ou estimulação cognitiva podem frear essa redução na taxa da neurogênese, com reflexos no desempenho cognitivo.

Com base nesses elementos, o presente trabalho avaliará dois aspectos que parecem importantes relacionados ao objetivo descrito acima.

1) Comparar o desempenho de ratos jovens e idosos expostos ao enriquecimento ambiental em testes de memória e ansiedade, e 2) Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental na memória operacional espacial e na neurogênese hipocampal em animais expostos ao enriquecimento ambiental até os 17 meses de idade.

4. Procedimentos Gerais

4.1. Animais

Foram utilizados 38 ratos Wistar machos, com 22 dias de idade (logo após o desmame) provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Os animais do grupo controle (n=19) foram alojados em gaiolas-padrão de laboratório, 3-4 animais por gaiola, e mantidos em ciclo de claro-escuro de 12h (luzes ligadas as 7h e desligadas as 19h). E os animais expostos ao ambiente enriquecido (n=19) foram mantidos juntos numa única gaiola maior (ver adiante). A temperatura foi mantida em $22^{\circ}\text{C} \pm 3$. Uma semana antes do experimento cada animal foi manuseado diariamente por três minutos. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IB (CEUA) 189/2013.

Um animal controle foi excluído do experimento apresentar doença de pele e um animal enriquecido e um controle faleceram, por motivos desconhecidos, durante os experimentos.

4.2. Enriquecimento ambiental

A gaiola de enriquecimento foi produzida no próprio laboratório e consiste numa caixa medindo 80 x 40 x 140 cm, confeccionada com madeira MDF nas laterais e áreas de ventilação feitas com malha de aço. A parte

frontal da gaiola é composta por 2 portas de acrílico, que permitem visão do ambiente externo à gaiola. A gaiola é dividida em quatro andares, conectados por túneis e escadas, que podem mudar de posição, sob controle do experimentador. A gaiola inclui uma roda de atividade medindo 30 cm de diâmetro, confeccionada em aço inoxidável, posicionada em um dos andares (Figura 3a). Os diferentes ambientes (andares) foram forrados com maravalha e/ou jornal. Durante todo o período de enriquecimento, os animais foram manipulados diariamente e a limpeza foi realizada conforme a necessidade. Ração e água são oferecidos livremente.

Os animais foram colocados na gaiola logo após o desmame e lá permaneceram até atingirem a idade adequada para os experimentos (ver Tabela 1). O número máximo de animais na gaiola foi 19 (quando jovens) e mínimo de 6 (idosos).

Tabela 1. Idade em que cada grupo de animais foi submetido às manipulações indicadas

Grupo	Idade
Início Enriquecimento	22 dias
Labirinto em Cruz Elevado	3 e 15 meses
Labirinto aquático de Morris	9 e 16 meses
Final do enriquecimento	17 meses

Duas vezes por semana os animais foram expostos a algum tipo de estimulação diferente, também considerado "enriquecimento ambiental". Por exemplo, foram apresentados alimentos (maçã, cenoura, banana, hortaliças), estímulos olfatórios (sachês de chá, manjeriço, orégano), estímulos tácteis

(objetos com texturas diferentes, como madeira, folhas de revista, papelão) e novos estímulos ou locais de apresentação dos mesmos (ex: alimentos presos no teto de um dos andares, caixas fechadas contendo alimentos dentro e objetos como brinquedos novos (Figura 3b). O enriquecimento ambiental foi planejado de modo que sempre houvesse alguma novidade ou algum desafio na gaiola, sendo oferecida também, a possibilidade do animal querer ou não interagir com os novos estímulos ou configurações de estímulos apresentados. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*, através de quatro comedouros e três potes de alumínio (125 ml), quatro garrafas de água de 250 ml e uma garrafa de 1000 ml.

Figura 3: (A) Fotografia da gaiola utilizada no enriquecimento ambiental. Divisão em quatro andares, conectados por túneis e escadas e uma roda de atividade (considerados enriquecimentos fixos). A rede e os demais brinquedos são alguns exemplos de enriquecimento adicional. (B) Enriquecimento (folhas de cenoura penduradas no teto da gaiola - estimulação sensorial)

Capítulo 1

Enriquecimento ambiental altera a ansiedade e a memória avaliadas por meio do labirinto em cruz elevado?

Resumo

Enriquecimento ambiental é um conjunto de estimulação sensorial, motora e social, que tem sido associado a melhoras cognitivas. No presente experimento, os animais do enriquecimento (ENR) e seus respectivos controles (CTL) passaram pelo labirinto em cruz elevado (LCE) com o objetivo de avaliar os efeitos do enriquecimento na ansiedade e memória. 19 animais enriquecidos e 19 animais controles com 3 meses de idade foram submetidos ao LCE, com protocolo teste/reteste. Um ano depois dessa primeira exposição, os animais de ambos os grupos (ENR n=6 e CTL n=5) foram novamente expostos ao LCE. Como resultado, foi encontrado efeito ansiolítico apenas nos animais enriquecidos jovens. No entanto, o comportamento de avaliação de risco, apareceu presente durante as duas tentativas dos animais jovens e também dos idosos. Houve uma mudança no comportamento dos ratos na primeira para a segunda tentativa, indicando que a presença da memória aversiva nos animais 15 meses.

Abstract

Environmental enrichment is the combination of sensorial, motor and social stimulation. It has been claimed that this kind of stimulation improves cognition. In the present experiment, the animals subjected to enriched environment and their respective controls were exposed to the elevated plus maze (EPM), in order to evaluate the effects of enrichment on anxiety and memory. To demonstrate this we used 38 rats in our study. After two months of enrichment, the elevated plus maze was performed using the test / retest protocol, with 5 minutes of interval. To verify and evaluate our hypothesis we exposed the same set of rats to EPM after twelve months. As a result, enrichment had an anxiolytic effect in young rats. The behavior of risk assessment appears to be influenced by enrichment in the young and, and also exist in elderly. Also in the study the behavior of rats in first and second trials have demonstrated presence of aversive memory until fifteen months of age.

5.1. Introdução

5.1.1. Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um teste amplamente utilizado em estudos sobre ansiedade, uma vez que permite mensurar comportamentos relacionados ao conflito entre explorar ambientes novos e evitar situações perigosas (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005).

O labirinto consiste em um aparelho (em forma de "+") com quatro braços, sendo dois braços com paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e dois braços com paredes de 1 cm de altura (braços abertos), estes últimos considerados aversivos para roedores (Figura 4), suspenso a 50 cm do assoalho. Esse ambiente gera, simultaneamente, curiosidade e medo, portanto o animal enfrenta a dúvida entre explorar o novo e se esquivar. Frente a essa situação o deslocamento do animal no labirinto é utilizado como indicador de processos subjacentes, por exemplo, o tempo despendido no quadrado central (TQC) indica aproximação cautelosa e avaliação de risco, com o objetivo de escanear cuidadosamente a área (OHL, 2003), a percentagem de tempo despendido (%TBA) e a percentagem de entradas (%EBA) nos braços abertos são consideradas indicativas (invertidos) de ansiedade, uma vez que os animais preferem ficar nos braços fechados (PELLOW, 1985; CRUZ *et al.*, 1994).

Além desses comportamentos, pode-se mensurar a atividade locomotora, por meio do número de entradas nos braços fechados (EBF) (RODGERS *et al.*, 1997).

O labirinto em cruz elevado também pode ser utilizado na avaliação da aprendizagem e memória, com base na comparação do desempenho numa primeira exposição ao mesmo em relação a uma segunda. A ideia de utilizar um protocolo que consiste no teste e reteste no labirinto em cruz elevado permite avaliar o conflito inicial entre “aproximar/evitar” num ambiente desconhecido (primeira sessão) e num ambiente conhecido (segunda sessão) (FILE *et al.*, 1993); isto é, durante a primeira exposição os animais têm a oportunidade de obter informações adicionais sobre a aversividade dos braços abertos, o que pode influenciar seu desempenho na segunda tentativa (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2003; BERTOGLIO & CAROBREZ 2000). Em outras palavras, na segunda tentativa, usualmente, os animais aumentam sua evitação aos braços abertos (CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005). Ou seja, o aprendizado aversivo em relação aos braços abertos fica evidente uma vez que na reexposição ao labirinto os animais reduzem a exploração aos mesmos (TREIT *et al.*, 1993; BERTOGLIO & CAROBREZ 2000).

Animais que recebem drogas ansiolíticas tendem a entrar e permanecer mais nos braços abertos do que animais controles, quando expostos apenas uma vez ao labirinto. No entanto, em uma segunda exposição esse mesmo efeito desaparece (BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000), corroborando

com as afirmações de que os comportamentos gerados nas duas exposições são motivados por fatores diferentes.

O presente experimento visa observar os efeitos do enriquecimento ambiental no comportamento de ratos no labirinto em cruz elevado, em animais de 3 e 15 meses.

5.2. Objetivos

Avaliar os efeitos do enriquecimento ambiental na ansiedade e memória, ambos no labirinto em cruz elevado, em ratos jovens aos 3 meses de idade.

Avaliar os efeitos da reexposição aos 15 meses ao labirinto em cruz elevado em animais mantidos em ambiente enriquecido e seus respectivos controles, mantidos nas gaiolas padrão.

5.3. Metodologia

5.3.1. Grupos experimentais

Foram utilizados 38 ratos Wistar, machos, com 3 meses de idade no início dos experimentos. Após cerca de 2 meses de exposição ao ambiente enriquecido, 19 animais do grupo enriquecido (ENR3), e 19 animais do grupo controle (CTL3) foram submetidos ao teste no labirinto em cruz elevado. Após

12 meses, 6 animais do grupo enriquecido (ENR15) e 5 animais do grupo controle (CTL15) foram expostos novamente ao LCE.

5.3.2. Aparelho

O labirinto em cruz elevado consiste de um aparelho construído em acrílico branco, com 4 braços, cada qual medindo 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, sendo 2 destes, opostos pelo centro, com paredes de 40 cm de altura, denominados braços fechados e 2 deles, também opostos pelo centro, com parede de 1 cm, denominados como braços abertos. Todo o aparelho fica apoiado em uma base de 50 cm de altura (ver figura 4 para mais detalhes). Uma câmera digital (Microsoft - LifeCam) foi posicionada em cima do aparelho e conectada a um computador para a gravação das sessões. Os vídeos foram analisados através do programa X-plo-rat 2005 (disponível em <http://scotty.ffclrp.usp.br>)

Figura 4: Representação esquemática do labirinto em cruz elevado

5.3.3. Procedimento

O experimento consistiu de duas sessões, teste e reteste. Na primeira sessão cada animal foi individualmente colocado no centro do labirinto, sendo permitida sua livre circulação por todos os braços durante 5 minutos. Após esse período, o animal foi transferido para uma gaiola padrão onde permaneceu por 5 minutos. Então, foi novamente exposto ao labirinto por outros 5 minutos. Durante o intervalo entre as duas exposições procedeu-se a limpeza do aparelho com álcool a 70%.

De cada uma dessas sessões, computou-se o número de entradas nos braços abertos e fechados, e o tempo de permanência nos braços abertos,

fechados e quadrado central. Então, foi calculada a percentagem de entrada nos braços abertos (número de entradas nos braços abertos divididos pela soma do número de entradas nos braços e fechados, multiplicados por 100) e a percentagem de tempo nos braços abertos (tempo despendido no braço aberto dividido pelo tempo total de permanência nos braços abertos e fechados, multiplicado por 100).

Foram excluídos animais que caíram ou saíram de alguma forma do labirinto antes ou durante as exposições.

5.3.4. Análise dos dados

A percentagem de entradas e de tempo despendido nos braços abertos, o tempo de permanência no quadrado central e o número de entradas nos braços fechados, foram submetidos a uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), tendo Grupo como fator entre-sujeitos e Sessão e Idade como fatores intra-sujeitos. Sempre que necessário realizou-se um teste *post hoc* de Newman-Keuls, utilizando o programa *Statistica 7.0*.

5.4. Resultados

A figura 5 mostra a percentagem de entradas nos braços abertos (5A), percentagem de tempo despendido nos braços abertos (5B), tempo no

quadrado central (5C) e a atividade locomotora (5D) dos animais enriquecidos e controles com 3 e 15 meses

Figura 5: Média (+E.P.M.) da percentagem de entradas (A) e da percentagem de tempo despendido (B), em ambos os casos nos braços abertos, número de entradas nos braços fechados (C) e tempo despendido no quadrado central (D), nas sessões de teste e reteste dos animais expostos ao ambiente enriquecido (ENR) e respectivos controles (CTL), aos 3 e 15 meses de idade.

5.4.1. Animais com 3 meses de idade

Em relação à percentagem de entradas nos braços abertos, a ANOVA (incluindo apenas os animais de 3 meses de idade) revelou diferenças

significantes entre os escores mensurados nas sessões de teste e reteste ($F_{(1,52)} = 5,34$, $p = 0,024$) e também em relação à interação Grupo x Sessão ($F_{(1,52)} = 7,02$, $p = 0,010$). A análise *post hoc* da %EBA confirmou a existência de diferenças significantes na segunda tentativa dos animais controles, porém, não dos animais submetidos ao enriquecimento ambiental (Figura 5A). Os resultados de %TBA costumam se correlacionar com os de %EBA. De fato, em relação ao escore %TBA a interação Grupo x Sessão revelou-se significativa ($F_{(1,52)} = 6,67$, $p = 0,012$), resultado que foi confirmado pela análise *post hoc* (Figura 5B). Esses resultados sugerem que os controles exibiram o esperado efeito de condicionamento aversivo aos braços abertos, denotando que esses animais exibiram um efeito de memória entre as sessões, uma vez que a %TBA diminui entre as tentativas. No entanto, esse mesmo efeito parece não ter ocorrido nos animais expostos ao ambiente enriquecido.

A Figura 5C mostra o tempo despendido no quadrado central, interpretado como comportamento de avaliação de risco. Houve uma diferença significativa entre os Grupos ($F_{(1,52)} = 39,63$, $p < 0,0001$), confirmado pelo teste *post hoc*. Em relação à atividade locomotora (Figura 5D), houve diferenças significantes entre Sessões ($F_{(1,52)} = 4,33$, $p < 0,042$) e Grupos ($F_{(1,52)} = 4,59$, $p < 0,036$), indicando que os animais expostos ao ambiente enriquecido exibiram maior atividade locomotora no aparelho em comparação com os controles, atividade esta que se reduz quando os animais são expostos pela segunda vez ao labirinto.

Os resultados apresentados pelos animais de 3 meses de idade expostos ao ambiente enriquecido sugerem que essa exposição produz efeito ansiolítico, visto que os animais exploram os braços abertos e o quadrado central por mais tempo. Ademais, esses animais apresentam maior atividade locomotora em relação aos controles.

5.4.2. Animais com 15 meses de idade

Doze meses depois do primeiro teste/re-teste no labirinto em cruz elevado, os animais (que continuaram sendo expostos ao ambiente enriquecido e seus respectivos controles) foram reexpostos a um segundo teste/re-teste nesse aparelho. Os mesmos parâmetros foram mensurados. Os resultados também estão apresentados na Figura 5.

A ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação ao fator Sessão nas comparações envolvendo os escores %EBA ($F_{(1,18)} = 10,93$, $p < 0,003$), %TBA ($F_{(1,18)} = 4,70$, $p < 0,043$) e TQC ($F_{(1,18)} = 4,62$, $p < 0,045$). Essas diferenças envolvendo o fator Sessão sugere que apesar do idoso, a memória aversiva desses animais continua preservada, independente do seu desenvolvimento em ambiente enriquecido ou em gaiolas padrão. Diferentemente, não houve efeito significativo do fator Sessão em relação aos escores de EBF ($F_{(1,18)} = 1,71$, $p < 0,207$).

A ANOVA revelou ausência de efeito significativo em relação ao fator Grupo ($F_{(1,18)} = 1,39$, $p = 0,253$), no entanto, mostrou uma tendência dos

animais enriquecidos a explorarem mais o quadrado central na segunda tentativa em comparação aos controles ($F(1,9) = 4,142$, $p = 0,072$), indicando que, o enriquecimento tende a estimular o comportamento dos animais mesmo quando o fator novidade está eliminado.

5.4.3. Re-exposição ao LCE

O efeito pode ser avaliado através da comparação do grupo Jovem x grupo Idoso. Nesse caso, em relação à percentagem de entrada nos braços abertos, houve diferença entre os grupos Jovens x Idosos na primeira sessão ($F_{(1,35)} = 4,28$, $p = 0,046$) e na segunda sessão ($F_{(1,35)} = 9,73$, $p = 0,003$), além de uma interação entre os fatores Sessão x Ambiente x Idade ($F_{(1,35)} = 4,32$, $p = 0,045$). A percentagem de tempo despendido no braço aberto corrobora com os resultados apresentados, havendo diferença entre os grupos na primeira sessão ($F_{(1,35)} = 5,73$, $p = 0,022$) e na segunda sessão ($F_{(1,35)} = 9,06$, $p = 0,004$), além da interação Ambiente x Idade ($F_{(1,35)} = 4,15$, $p = 0,049$). A princípio, esses dados sugerem um efeito ansiogênico do envelhecimento, ou a evocação de uma memória formada durante a primeira exposição ao LCE, quando jovens.

Em relação ao tempo no quadrado central, a ANOVA revelou uma interação Ambiente x Idade na segunda sessão ($F_{(1,35)} = 5,84$, $p = 0,022$), sugerindo efeitos diferentes do ambiente à idade.

A atividade locomotora, mensurada através das entradas nos braços abertos apresenta diferenças entre as sessões ($F_{(1,38)} = 6,67$, $p = 0,014$), porém não existem diferenças entre os grupos ($F_{(1,35)} = 0,41$, $p = 0,526$).

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que o enriquecimento ambiental a longo prazo não altera o comportamento dos animais idosos reexpostos ao LCE. Contudo, foi possível observar que as funções de memória desses animais ao ambiente aversivo, representado pelos braços abertos, encontram-se preservadas.

5.5. Discussão

O presente estudo mostrou que os animais, independente da idade e do ambiente em que foram criados, apresentam a memória aversiva preservada. No entanto, a exposição ao ambiente enriquecido gera efeito ansiolítico em animais testados aos 3 meses de idade, que parece estar relacionado a memória de medo condicionado que surge na segunda tentativa. Em relação aos animais idosos, o enriquecimento parece não influenciar a ansiedade e o medo condicionado.

Quando expostos pela primeira vez ao labirinto em cruz elevado os animais ainda não possuem uma representação espacial do ambiente. Consequentemente, tendem a explorar o aparelho, atribuindo valores as suas partes, optando por permanecer nas áreas mais protegidas (Roy *et al.*, 2008). Segundo Carobrez e Bertoglio (2005) os animais tendem a explorar igualmente

os braços fechados e abertos nos primeiros minutos da sessão e com o passar do tempo eles passam a evitar a entrada nos braços abertos e despendem mais tempo nos braços fechados. Quando reexpostos ao labirinto, a estratégia utilizada pelos animais é permanecer nos braços fechados, e evitar a entrada nos abertos, já que o braço apresenta componente aversivo e também porque a situação agora lhe é familiar (TREIT *et al.*, 1993). Esse aumento da esquia aos braços abertos não é acompanhado pelo aumento dos níveis de corticosterona no plasma (FILE *et al.*, 1994), indicando que existem comportamentos distintos associados as duas tentativas; enquanto na primeira tentativa se observa comportamento exploratório e ansiedade pela exposição ao novo, na segunda tentativa, comportamento encontrado envolve medo condicionado.

A literatura mostra que o enriquecimento ambiental produz um efeito ansiolítico em roedores expostos ao labirinto em cruz elevado (PENÄ *et al.*, 2009, HARATI *et al.*, 2012, FARES *et al.*, 2013), ao campo aberto (LEAL-GALICIA *et al.*, 2008) e ao labirinto em zero elevado (SAMPEDRO-PIQUERO *et al.*, 2013). Esse efeito ansiolítico, mensurado através da quantidade de entradas e no tempo despendido nos braços abertos em uma primeira exposição (PENÄ *et al.*, 2009). Diferentemente dos dados encontrados na literatura, os animais expostos ao ambiente enriquecido testados aos 3 meses não apresentaram diferenças nesses parâmetros em relação aos controles na primeira sessão, mas apenas na segunda sessão, em que a taxa de exploração nos braços abertos manteve-se elevada. Esses dados podem ser interpretados como uma

resposta ansiolítica decorrente do enriquecimento ambiental, uma vez que este poderia modular a ansiedade induzida pela memória do medo condicionado, geralmente expressa através da diminuição do tempo de exploração nos braços abertos na segunda tentativa. Curiosamente, quando os animais foram testados aos 15 meses de idade essas diferenças não se revelaram. Uma hipótese a ser levantada seria em relação à experiência de vida de ambos os grupos. Considerando que animais de 15 meses passaram por 14 meses de enriquecimento, incluído nesse período duas sessões nesse labirinto, o fator novidade estaria descartado, diferentemente dos animais com 3 meses, ou seja, a premissa do experimento que seria “explorar ou esquivar” já não seria mais válida nesse caso, o que contribuiu para o resultado encontrado.

Animais idosos tendem a ser mais ansiosos do que os jovens (BOGUSZEWSKI & ZAGRODZKA, 2002). No presente estudo, animais idosos passaram menos tempo explorando os braços abertos corroborando com essa literatura. No entanto, a longa exposição ao enriquecimento parece não apresentar o mesmo efeito encontrado no grupo dos jovens, visto que as taxas de exploração foram semelhantes aos grupos controles, sugerindo que o efeito idade poderia, no caso da ansiedade, pesar mais que o efeito enriquecimento ambiental.

O tempo no quadrado central, que mostrou-se significativamente mais alto nos animais jovens enriquecidos e tendencialmente mais elevado nos animais idosos enriquecidos, está relacionado ao comportamento de

avaliação de risco (HOGG, 1996) e a decisão em relação ao conflito de aproximação/evitação (LEE & RODGERS, 1990; TRULLAS & SKOLNICK, 1993). A avaliação de risco está relacionada à antecipação de situações que podem apresentar perigo (BLANCHARD et. al., 1990). É possível (talvez provável) que a exposição ao enriquecimento ambiental influencie a estratégia dos animais para lidar com ambientes, visto que estes exploram mais o quadrado central, avaliando os riscos e tomando decisões a cerca daquele novo ambiente, podendo construir uma representação mais consistente em relação àquela nova situação, ao passo que os animais controles optam por permanecer em ambiente mais seguro, como o representado pelos braços fechados.

O procedimento de teste/reteste no labirinto em cruz elevado permitiu também avaliar a memória aversiva dos animais (SHARMA & KULKARNI, 1991; ITOH *et al.*, 1991; FILE, 1993), a medida em que o comportamento dos animais é alterado de uma sessão para outra. Ou seja, conforme o desempenho dos animais entre as sessões se altera, pode-se deduzir que esse efeito esteja relacionado com a memória cerca da primeira exposição ao aparelho. O comportamento típico de animais controles na segunda sessão em relação à primeira, é diminuir a exploração dos braços abertos, assim como a locomoção, e aumentar o tempo de permanência nos braços fechados. Esse mesmo padrão de respostas foi observado quando os animais foram testados aos 3 e 15 meses de idade, sugerindo que processos de memória aversiva apresentam-se preservados apesar do envelhecimento, independentemente da exposição ou não ao ambiente enriquecido. Note-se, porém, que os animais

testados aos 3 meses diminuíram a taxa de locomoção e mantiveram altas taxas de exploração dos braços abertos. Considerando que houve alteração no comportamento dos animais testados aos 3 meses expostos ao ambiente enriquecido, pode-se inferir que a exposição a este ambiente parece gerar reações diferentes a ambientes recém conhecidos e portanto sobre a memória aversiva a esses ambientes, uma vez que esses animais estariam acostumados a ambientes dinâmicos, envolvendo altura. No entanto, o mesmo padrão de comportamento não foi encontrado nos animais enriquecidos de 15 meses. Uma possível explicação seria que a reexposição dos animais ao labirinto em cruz elevado pesasse mais que os efeitos do enriquecimento sobre o comportamento dos animais no LCE.

No geral, a exposição ao enriquecimento ambiental altera o comportamento dos animais expostos ao labirinto em cruz elevado, tanto nos níveis de ansiedade, quanto em relação à memória aversiva em animais jovens. Entretanto, esse efeito positivo parece não ser suficiente para contrapor os efeitos ansiogênicos do envelhecimento e da memória.

**Enriquecimento ambiental altera a memória operacional
e a neurogênese?**

Resumo

O enriquecimento ambiental aumenta a neurogênese hipocampal, que por sua vez, pode estar relacionada ao melhor desempenho cognitivo encontrado em animais enriquecidos. Nesse experimento foi avaliado os efeitos de 8 ou 15 meses de enriquecimento na tarefa de labirinto aquático de Morris (LAM) para a versão de memória operacional espacial. Além disso, foi avaliado os efeitos do enriquecimento e da tarefa na neurogênese hipocampal em animais com 9 meses de idade. Assim, depois dos 8 ou 15 meses de enriquecimento, os animais foram submetidos ao LAM durante 17 e 12 dias, respectivamente, com 2 tentativas por dia, com intervalo entre as tentativas de 10 minutos. Uma semana antes do início do LAM, os animais com 9 meses de idade receberam injeções de bromodeoxyuridina (BrdU) para análise da neurogênese. Como resultado, a estatística revelou que a queda da latência e do trajeto na segunda tentativa foi semelhante entre os grupos, indicando que não houve diferença na memória operacional. No entanto, os animais enriquecidos encontraram a plataforma mais rápido na primeira tentativa, em comparação aos seus respectivos controles. Em relação a neurogênese hipocampal, o enriquecimento aumento cerca de 1,8x a neurogênese e a tarefa foi capaz de modular a taxa de sobrevivência das novas células.

Abstract

Environmental enrichment induces hippocampal neurogenesis, which is related to cognitive improvement. This study investigates in male Wistar rats, the effects of either 8 or 15 months of exposure to enriched environment on performance of a working memory version of the Morris' water maze task and also neurogenesis in 9-months-old subjects. After either 8 or 15 months the subjects were trained on 17th and 12th day respectively, in a working memory version of the Morris Water Maze in which the platform was moved to a novel location everyday. Exposure to this task involved 2 trials per day, with an interval of 10 minutes each. After the behavioral task, the animals were perfused for immunohistochemistry. Statistical analysis has revealed that there is no difference in working memory in both of the experimental groups as the rate of decrease of latency and path length were same. In contrast, data showed that subjects raised in the enriched environment found the platform faster as compared to control subjects in the first trial. Concerning to the neurogenesis, the enrichment doubles hippocampal neurogenesis and working memory increases survival rates.

6.1. Introdução

6.1.1. Memória Operacional

Resolver contas matemáticas mentalmente, gravar temporariamente um número de telefone, ou ainda, conseguir armazenar as últimas palavras de um parágrafo para conseguir interpretar uma mensagem, são tarefas que dependem da memória operacional (IZQUIERDO, 2000).

O termo memória operacional refere-se ao armazenamento e manipulação temporária de informação(ões) com o objetivo de resolver tarefas cognitivas complexas (BADDELEY 1992; BADDELY 1998). No modelo inicialmente proposto para seres humanos, ela dispõe de um sistema de controle atencional, conhecido como executivo central, que opera conjuntamente com auxiliares: a alça fonológica e a alça visuoespacial. Esta está relacionada com a manutenção e manipulação da informação visual, enquanto aquela com a informação verbal. Recentemente foi adicionado ao sistema um novo componente, o Retentor Episódico, que permite que os elementos da memória operacional possam interagir tanto com a memória já armazenada quanto com as informações sensoriais presentes (BADDELEY, 2000).

A memória operacional parece ser a função cognitiva mais comprometida ao longo do envelhecimento (BADDELEY, 1998). Dentre os diversos fatores que concorrem para esse comprometimento, um deles pode envolver a queda da funcionalidade do hipocampo, resultado da diminuição

das sinapses, diminuição dos receptores NMDA, alterações da regulação do Ca^{2+} , além da dificuldade de manter o potencial de longa duração, (ROSENZWEIG & BARNES, 2003) o que poderia prejudicar o engajamento da formação hipocampal, por conseguinte, a memória operacional. Xavier e colaboradores (1999) mostraram que a perda de células granulares do giro denteado gera um prejuízo significativo no desempenho de ratos numa tarefa de memória operacional espacial no labirinto aquático de Morris. Nessa tarefa os ratos devem navegar em uma piscina que contém uma plataforma escondida, cuja localização é alterada diariamente. Como os animais não possuem pistas locais da localização da plataforma, faz-se necessário a utilização das pistas distais, engajando uma memória espacial. Da mesma forma, como a posição da plataforma é alterada a cada sessão mas permanece a mesma durante as tentativas ao longo do dia, para alcançar o objetivo da tarefa, escapar da água, os animais precisam valer-se da memória operacional, uma vez que devem manter a informação acerca da localização da plataforma obtida na primeira tentativa para localizá-la mais prontamente nas demais tentativas. O intervalo entre as tentativas pode ser alterado a fim de avaliar a manutenção temporal da informação espacial na memória (XAVIER *et al.*, 1999; VORHEES & WILLIAMS, 2006). Por esse motivo, a tarefa tem se mostrado eficiente para avaliar a memória operacional espacial em ratos (XAVIER *et al.*, 1999).

6.1.2. Neurogênese Hipocampal

A neurogênese envolve uma sequência de eventos que leva a geração de novos neurônios. Esse processo ocorre continuamente ao longo da vida e está presente no ecéfalo de mamíferos adultos, claramente demonstrado em duas regiões específicas: na zona subventricular (SVZ) e na zona subgranular do giro denteado (SGZ). Células progenitoras da SVZ migram para a região do bulbo olfatório tornando-se células granulares (ZHAO *et al.*,2008), enquanto células do SGZ migram para a camada granular do GD e se tornam células granulares do GD (DENG *et al.*,2010; ZHAO *et al.*,2008).

O desenvolvimento das novas células é estimulado tanto por fatores externos quanto internos (ZHAO *et al.*,2006). Nos primeiros sete dias de vida, as novas células ainda não exibem sinais da morfologia natural de um neurônio (ZHAO *et al.*,2006) e são irresponsivas a estimulação extracelular (ESPOSITO *et al.*,2005). Essa escassez de resposta sináptica pode ser resultado da falta de terminais sinápticos (ESPOSITO *et al.*,2005, DUPRET *et al.*,2007). A expressão de receptores para neurotransmissores e o início da excitabilidade são as primeiras características de diferenciação neuronal e acontecem antes da chegada das conexões aferentes (ESPOSITO *et al.*,2005).

Na segunda semana, ocorre o início da formação da árvore dendrítica e das primeiras projeções axonais, juntamente a esse processo, começam a se estabelecer as aferências GABAérgicas e posteriormente, glutaminérgicas (ESPOSITO *et al.*,2005; SANDOVAL *et al.*,2011, ZHAO *et al.*,2006). Com um mês de idade o processo maturacional das novas células está completo (ZHAO *et al.*,2006). Os novos neurônios apresentam projeção axonal

notável e as espinhas dendriticas proeminentes (ESPOSITO *et al.*,2005). Após o primeiro mês de idade, as novas células do GD apresentam todas as características necessárias para receber, processar e transmitir informações dentro da rede hipocampal (MONGIAT *et al.*,2011). Mesmo apresentando características fisiológicas semelhantes às células granulares adultas, diferem ainda por serem consideravelmente mais plásticas (AIMONE *et al.*,2010).

A ideia da existência de um período crítico para a integração das novas células na circuitaria hipocampal vem sendo investigada. Evidências indicam que existe um período durante o desenvolvimento dos novos neurônios em que eles são suscetíveis a serem recrutados durante a codificação da memória (KEE *et al.*,2007). Considerando que a partir da segunda semana de vida os novos neurônios começam a passar por mudanças morfológicas importantes, crescimento axonal e dendrítico, o recrutamento nesse período pode ser essencial para a sua sobrevivência (ZHAO *et al.*,2006; 2008).

Uma relação importante parece existir entre a neurogênese hipocampal e a função hipocampal. A neurogênese parece ser necessária para um melhor desempenho nas tarefas cognitivas (SHORS *et al.*,2001; KEE *et al.*,2007; DUPRET *et al.*,2008; JESSBERGER *et al.*,2009; SANDOVAL *et al.*,2010) e o aprendizado parece influenciar na taxa de sobrevivência das novas células (GOULD *et al.*,1999; DUPRET *et al.*,2007).

No presente experimento foram avaliados os efeitos da longa exposição ao enriquecimento ambiental, por meio do desempenho da

memória operacional no labirinto aquático de Morris, em ratos de 9 e 16 meses. Adicionalmente, a relação entre a neurogênese e o aprendizado e memória também foi investigado, com o objetivo de avaliar se a permanência no enriquecimento ambiental influencia na taxa de neurogênese e se o aprendizado pode contribuir para a sobrevivência das novas células.

6.2. Objetivos

O objetivo principal do presente trabalho é avaliar se a exposição prolongada ao enriquecimento ambiental altera o desempenho da memória operacional espacial de ratos. Isso será implementado pela avaliação de animais expostos ao enriquecimento ambiental e seus respectivos controles a uma tarefa de memória operacional no labirinto aquático de Morris, aos 9 meses de idade. Avaliaremos esses mesmos animais mantidos no ambiente enriquecido, e seus respectivos controles, também aos 16 meses, na mesma tarefa.

Ademais, avaliaremos os efeitos do enriquecimento ambiental na taxa de proliferação e sobrevivência de neurônios hipocampais, e as relações entre sobrevivência das novas células geradas com o enriquecimento ambiental e desempenho da tarefa de memória operacional espacial no labirinto aquático.

6.3. Metodologia

6.3.1. Grupos Experimentais

Como o experimento consiste em parte comportamental e anatômica, os animais com 9 meses foram distribuídos aleatoriamente em quatro grandes grupos. O grupo enriquecido (ENR, n=11) que passaria pelo labirinto aquático de Morris (LAM) e o seu respectivo controle (CTL, n=10), e o grupo ENR (n=8) e o CTL (n=8) que não passariam para a tarefa. Dentro desses grupos, os animais foram subdivididos a fim de avaliar os efeitos do enriquecimento e da tarefa na taxa de neurogênese, como mostra a tabela 2. Para a análise da proliferação pelo enriquecimento ambiental (tratamento “1”), os animais foram sacrificados 24h após a aplicação do BrdU. Para análise da sobrevivência influenciada pela tarefa (LAM) ou apenas pelo enriquecimento (ÑLAM) os animais foram sacrificados 30 dias após a administração do BrdU, tratamentos “2” e “3” respectivamente. Por fim, no tratamento “4”, dois grupos de animais receberam injeções de salina (ENR16 e CTL16) e foram expostos a tarefa juntamente com os demais. Diferentemente, animais expostos ao tratamento “4” foram mantidos nas suas respectivas gaiolas, enriquecida ou padrão, até completarem 16 meses, sendo então reexpostos ao LAM. Dessa forma, os grupos ENR9-LAM+ENR16-LAM compuseram o grupo dos enriquecidos que participaram do labirinto (n=11) e os grupos CTL9-LAM+CTL16-LAM os seus controles (n=10).

Assim, o desenho experimental adotado permite a comparação dos efeitos de 8 meses de exposição ao enriquecimento ambiental (ENR9-LAM) em

relação aos 8 meses passados em gaiola padrão (CTL9-LAM) na tarefa de memória operacional pelo labirinto aquático de Morris. Além disso, é possível comparar os efeitos do enriquecimento na proliferação (ENR9-PRO versus CTL9-PRO) e da tarefa dependente do hipocampo na sobrevivência dos novos neurônios (ENR9-LAM versus ENR9-ÑLAM e CTL9-LAM versus CTL9-ÑLAM). Por fim, o experimento permite avaliar os efeitos de 15 meses de exposição ao enriquecimento ambiental no desempenho do LAM (ENR16-LAM versus CTL16-LAM).

Tabela 2: Tratamentos realizados em cada grupo

Grupos	Trata- mento	n	BrdU	LAM	Grupos	Trata- mento	n	BrdU	LAM
ENR9-PRO	(1)	4	✓	--					
ENR9- LAM	(2)	4	✓	✓					
ENR9-ÑLAM	(3)	4	✓	--					
ENR16-LAM	(4)	7	--	✓	ENR16-LAM	(4)	6	--	✓
CTL9-PRO	(1)	4	✓	--					
CTL9- LAM	(2)	4	✓	✓					
CTL9-ÑLAM	(3)	4	✓	--					
CTL16-LAM	(4)	6	--	✓	CTL16-LAM	(4)	5	--	✓

6.3.2. Labirinto aquático de Morris

6.3.2.1. Aparelho

O labirinto aquático consiste de uma piscina de fibra de vidro, com 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, mantida em uma sala exclusiva. Estímulos visuais distais foram posicionadas nas paredes da sala com o objetivo de fornecer pistas para a orientação espacial do animal.

A cada dia de treino, a piscina era preenchida por água ($26^{\circ}\text{C}\pm 1$) e uma pequena quantidade de leite era adicionado (300 ml) com o intuito de deixá-la opaca. Uma plataforma era posicionada 1,5 cm abaixo da superfície da água e sua localização era alterada diariamente para uma das 4 localizações pré-estabelecidas (Figura 7).

Uma câmera de vídeo, posicionada 290 cm acima do centro da piscina, era conectada a um dispositivo de rastreamento por contraste (VP112, HVS Image Ltd., Hampton, UK) e a um computador que registrava e analisava o desempenho dos animais.

6.3.2.2. Procedimento

Cinco dias antes de iniciar a tarefa no labirinto aquático, os animais foram manipulados diariamente por 3 minutos.

Todos os dias, os animais eram levados para a sala do labirinto 30 minutos antes de iniciar a sessão. Cada sessão era composta por 2 tentativas de 2 minutos (no máximo) e o intervalo entre elas era de 10 minutos. Na primeira tentativa cada animal era colocado com o focinho voltado para a borda da piscina e liberado na água, onde podia nadar livremente até encontrar a plataforma. Se o animal não encontrasse a plataforma dentro dos 2 minutos, ele era levado pelo experimentador até a mesma, sobre a qual permanecia por 60 s. Após esse tempo o animal era colocado de volta na gaiola, durante o ITI e então o mesmo procedimento da primeira tentativa era realizado na segunda. Como a localização da plataforma foi alterada

diariamente, na primeira tentativa de cada sessão os animais desconheciam sua localização. Porém, na segunda e demais tentativas, podiam valer-se das informações espaciais sobre a localização da plataforma obtidas na tentativa anterior para encontrá-la mais prontamente.

O sistema de registro, um HVS *Image*, permitiu a mensuração da latência e do trajeto de cada animal na busca pela plataforma, o tempo de permanência em cada quadrante, em 3 anéis concêntricos medindo 33 cm de largura (central, intermediário e periférico) e em quatro contadores imaginários medindo 27 cm de diâmetro cujo centro correspondia ao centro das posições que a plataforma de 9 cm poderia ocupar, i.e., no centro de cada quadrante. Isso permitiu avaliar a memória operacional e também a estratégia de navegação utilizada pelos animais.

Uma semana após a administração do BrdU, o treino de memória operacional foi iniciado. Os animais com 9 meses de idade foram treinados utilizando 2 tentativas por dia, com a plataforma posicionada em locais diferentes a cada dia, ao longo de 17 dias. Nos primeiros 9 dias, 4 localizações de plataforma distintas, todas dentro do anel intermediário, foram utilizadas em sequência randômica. Nos 4 dias que se seguiram, locais totalmente distintos (e não necessariamente incluídos no anel intermediário) foram adotados. Ademais, o ITI passou de 10 para 20 minutos.

Nos testes realizados aos 16 meses de idade, o teste no labirinto aquático de Morris também envolveu 2 tentativas por dia, ao longo de 12 dias. Nos 3 primeiros dias a plataforma foi posicionada em locais previamente

utilizados nos testes realizados aos 9 meses. Nos 5 dias subsequentes, 4 locais totalmente novos foram escolhidos (repetiu-se 1 local no último dia). Ademais últimos 4 dias o ITI foi aumentado para 20 minutos (Figura 7 para detalhes).

Figura 6: Representação esquemática das divisões virtuais utilizadas na análise dos resultados obtidos. A piscina foi dividida em 4 quadrantes, sendo que o centro de cada quadrante corresponde a um dos os quatro locais pré-estabelecidos da plataforma (1,2,3,4). Em três anéis (periférico, intermediário e central) e em contadores críticos de cada plataforma (área correspondente a 3x o tamanho da plataforma - representado na figura em pontilhado circular o exemplo do contador 5). Os números 5-8 correspondem aos 4 novos locais em que a plataforma foi posicionada no experimento com animais aos 9 meses de idade. E os números de 9-13 os novos locais utilizados no experimento com animais aos 16 meses de idade.

6.3.3. Análise dos dados

Para analisar o desempenho dos animais de 9 meses, as 17 sessões foram distribuídas em 5 blocos de 3 ou 4 sessões. Os quatro primeiros blocos o ITI foi de 10 minutos, e o 5º bloco o ITI passou a ser de 20 minutos. Para os animais de 16 meses de idade, o experimento de 12 dias foi dividido em 4

blocos, contendo 3 sessões cada. Nos 3 primeiros blocos o ITI era de 10 minutos, enquanto que no 4º bloco o ITI passou a ser de 20 minutos.

6.3.4. Administração do BrdU

O *Bromo-2'-deoxyuridine* (BrdU- Sigma) é um análogo da timidina, com meia vida de 2 horas, que se incorpora no DNA durante a fase S do ciclo celular, marcando as células progenitoras e sua progênie (TAUPIN, 2008). O BrdU pode ser revelado posteriormente através da técnica imunohistoquímica indireta (ver item 6.3.6). Cada animal recebeu 4 injeções de BrdU (50mg/kg) a cada 2 horas, com o objetivo de maximizar a marcação durante o dia. A primeira injeção foi aplicada às 10h e a última às 16h.

6.3.5. Preparação do tecido

Vinte e quatro horas ou 30 dias após a administração do BrdU os animais dos grupos ENR9-PRO/CTL9-PRO e ENR9-LAM/ENR9-NLAM/CTL9-LAM/CTL9-NLAM, respectivamente, foram sacrificados. Para isso, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (30 mg/ml) + Lidocaína (10mg/ml) e então submetidos a perfusão intracardíaca com 500 ml de salina (temperatura ambiente), seguido de 500 ml de paraformoldeído 4% (a 4°C). Os encéfalos eram extraídos e pós-fixados em solução de paraformoldeído 4% (a 4°C) durante a noite. No dia seguinte os encéfalos foram incubados em solução Sacarose 30% para crioproteção até o momento do seccionamento.

O hipocampo foi seccionado em fatias de 40 μm (CM 1950, *Leica Bio systems, Wetzlar, Germany*), divididos em 12 séries, isto é, a primeira série consistia nos cortes n°1, n°13, n°25 (...) resultando em um intervalo de 480 μm entre os cortes. O material foi armazenado em solução *anti-freeze* em um freezer -20°C

6.3.6. Imunohistoquímica

Para a análise de proliferação e sobrevivência das novas células, foi realizada a imunohistoquímica das secções de encéfalos dos diferentes grupos. Com o intuito de observar a proliferação, as secções dos animais que foram sacrificados 24h após a aplicação do BrdU (ENR9-PRO e CTL9-PRO) foram processadas por imunofluorescência para BrdU. Para analisar a sobrevivência, foram utilizados os cortes dos animais sacrificados após 30 dias de BrdU (ENR9-LAM, ENR9-ÑLAM, CTL9-LAM, CTL9-ÑLAM), em que foi realizada a dupla marcação entre as células marcadas com BrdU e para NeuN, um marcador endógeno de neurônios maduros.

6.3.6.1. Brdu - Proliferação

Para revelar as células marcadas com BrdU, foi utilizada a técnica de imunofluorescência. Inicialmente os cortes foram lavados 3 x10 minutos em tampão fosfato 0,1M (PB) para a retirada do *anti-freeze*, e em seguida foram incubados em solução de paraformaldeído 4% por 20 minutos. As

secções foram novamente lavadas em tampão fosfato (PB) (3 x 10 minutos) para então serem incubados em ácido clorídrico 2N por 60 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, os cortes foram lavados 2 x 10 em tampão borato 0,1M e depois em 2 x 10 minutos em PB para só então serem incubados em solução "*blocking*" (PB + 0,3% Triton-X + 3% NGS) contendo "*anti mouse BrdU*" (Roche Laboratories, 1:500) por uma noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, as secções foram lavadas em 3 x 10 minutos em PB, em seguida incubadas em solução "*blocking*" + anticorpo secundário "*Cy3 goat x mouse*" (Jackson ImmunoResearch, 1:1000) por 120 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo as secções foram novamente lavadas e montadas em lâminas gelatinizadas. Após o tempo de secagem, foram colocadas as lamínulas com glicerol.

6.3.6.2. BrdU+NeuN - Sobrevivência dos neurônios

Foi realizada uma dupla marcação através da reação em imunofluorescência para revelar células que já expressavam NeuN e tinham sido marcadas com BrdU. Primeiramente foi realizada reação para NeuN, em que as secções foram lavadas 3 x 10 minutos em PB, depois foram incubadas em solução de "*blocking*" (PB + 0,1% Triton-X + 3% NGS) por 60 minutos e então incubadas em solução "*blocking*" + anticorpo NeuN "*anti-rabbit* (Merk-Millipore, 1:1000) durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, as secções foram lavadas (3 x 10 minutos) em PB, e incubadas em solução "*blocking*" + anticorpo secundário "*Dylight goat x rabbit* (Jackson

Immunoresearch, 1:200)" por 120 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo as secções foram lavadas 3 x 10 minutos em PB. Na revelação do BrdU, foi utilizado o mesmo procedimento descrito para avaliar a proliferação.

6.3.7. Estimativas de proliferação celular

O número de novas células geradas foi estimado por meio da análise quantitativa das células marcadas com BrdU e BrdU/NeuN em todo o giro denteado. 10 secções de cada animal foram analisadas, sendo seu resultado multiplicado por 12 para estimar toda a região do giro denteado. A contagem foi realizada através do microscópio Nikon Eclipse E1000 com módulo para fluorescência.

O número estimado de novas células em cada um dos grupos foi comparado por meio de uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) (*SAS Institute, Inc., Cary, NC*).

6.4. Resultados

6.4.1. Imunohistoquímica

Figura 7. Fotomicrografia de secção hipocampal o Painel A mostra uma célula granular do giro dentado marcada com BrdU (Cy3). O painel B mostra que a mesma célula marcada com um marcador de neurônio maduro NeuN (Dylight). E o painel C mostra a dupla marcação de BrdU e NeuN. (aumento de x1000)

Para a análise da proliferação celular induzida pelo enriquecimento ambiental, foi considerado o número de células marcadas com BrdU, enquanto que para a análise dos efeitos do enriquecimento e da tarefa, apenas as células que possuíam dupla marcação foram contabilizadas (Figura 7). Foi realizada análise distinta entre a lâmina superior e inferior do giro dentado. Assim, os principais fatores avaliados foram: exposição ao ambiente enriquecido "versus" gaiola padrão, tempo decorrido após a administração de BrDU (24h, ou 30 dias) (que permite avaliar a taxa de sobrevivência das células que proliferaram por ocasião da injeção, considerando os ambientes a que os animais foram expostos) e exposição ou não ao LAM, interagindo com esses fatores.

Figura 8: Média (+ D.P.M.) do número estimado de células geradas quando da administração de BrDU entre os grupos expostos ao enriquecimento ambiental e respectivos controles 24h (PRO) e 30 dias após a injeção, neste último caso, dos animais expostos ao LAM e também dos animais não expostos ao LAM (ÑLAM).

Como mostra a Figura 8, animais expostos ao ambiente enriquecido exibem maior quantidade de células BrDU-positivas nas lâminas, superior ($F_{(1,2)} = 137,40$, $p < 0,0001$) e inferior ($F_{(1,2)} = 23,28$, $p < 0,001$) do giro denteado, independentemente dos demais tratamentos. O teste de Duncan revelou diferenças entre os grupos ENR-PRO X CTL-PRO ($p < 0,05$), ENR-LAM X CTL-LAM ($p < 0,05$) e ENR-ÑLAM X CTL-ÑLAM ($p < 0,05$). Esses dados sugerem que, em relação aos números absolutos, o enriquecimento influencia tanto na taxa de proliferação, quanto na sobrevivência das novas células.

A ANOVA também mostrou diferenças entre os tratamentos nas lâminas superior ($F_{(1,2)} = 58,56$, $p < 0,0001$) e inferior ($F_{(1,2)} = 18,76$, $p < 0,001$), segundo o teste Duncan houve diferenças entre os grupos PRO X LAM ($p < 0,05$), PRO X ÑLAM ($p < 0,05$) e LAM X ÑLAM ($p < 0,05$).

A Figura 9 ilustra a percentagem de sobrevivência das novas células em relação a proliferação. Pode-se perceber que a tarefa teve efeito significativo (ENR-LAM versus ENR-ÑLAM: $F_{(1,6)} = 28,16$, $p = 0,001$ e CTL-LAM versus CTL-ÑLAM: $F_{(1,6)} = 20,54$, $p = 0,003$) na sobrevivência em ambos os grupos, porém o mesmo não foi encontrado em relação ao ambiente (ENR-LAM versus CTL-LAM: $F_{(1,6)} = 2,73$, $p < 0,149$; ENR-ÑLAM versus CTL-ÑLAM: $F_{(1,6)} = 2,08$, $p < 0,198$).

Tomados em conjuntos, esses dados sugerem que em números absolutos, o enriquecimento e a tarefa aumentam a taxa de neurogênese, no entanto, ao analisar a sobrevivência proporcionalmente a taxa de proliferação, apenas a tarefa tem um efeito modulador da taxa, isto é, o fato do provável recrutamento de novas células durante a execução da tarefa, poderia ser crucial para o destino da sua sobrevivência.

Figura 9: Percentagem média de células sobreviventes nos animais expostos ao ambiente enriquecido e respectivos controles, expostos (LAM) ou não (ÑLAM) ao labirinto aquático, em relação ao número estimado de células geradas nos respectivos grupos PRO.

6.4.2. Comportamental

Testes realizados aos 9 meses

A Figura 10 mostra o desempenho, em termos da latência para encontrar a plataforma no LAM, de animais expostos ao enriquecimento ambiental e respectivos controles ao longo de 9 sessões de treino (organizadas em blocos de 3 sessões com ITI igual a 10 minutos). A ANOVA revelou um efeito geral de Bloco ($F_{(3,57)} = 48,22$, $p < 0,0001$) e Tentativa ($F_{(1,19)} = 64,93$, $p < 0,0001$), além da interação Bloco x Tentativa ($F_{(3,57)} = 2,99$, $p = 0,0382$) e um efeito de interação Bloco x Tentativa x Grupo próximo da significância estatística ($F_{(3,57)} = 2,32$, $p = 0,085$). A análise post hoc revelou efeito de interação Grupo x Tentativa ($p=0,03$). De fato, a Figura 10 mostra que há uma redução das latências ao longo dos blocos, refletindo aprendizagem da tarefa. Ademais, as latências na primeira tentativa são maiores em relação ao parâmetro correspondente da segunda tentativa, indicando que os animais mantêm, na memória operacional, a informação sobre a localização da plataforma obtida na primeira tentativa, mesmo depois de decorridos 10 minutos.

Figura 10. Média das latências (+D.P.M.) dos animais expostos ao enriquecimento ambiental (ENR) e respectivos controles (CTL), para encontrar a plataforma na primeira (T1) e segunda (T2) tentativas, ao longo dos 4 blocos (cada bloco com 3-4 dias). No bloco 4 um novo conjunto de localizações de plataforma foi utilizado.

É relevante destacar que os animais do grupo ENR apresentaram latências significativamente menores na primeira tentativa (em que o local da plataforma era desconhecido) nos blocos 1 a 3, que envolviam os 4 locais pré estabelecidos de plataforma. Porém, quando ocorreu a alteração do posicionamento da plataforma para locais totalmente diferentes, esse efeito desapareceu, indicando que as diferenças nos blocos anteriores, de 1 a 3, estavam relacionadas com a rápida aprendizagem, por parte dos animais ENR, de que as localizações de plataforma embora variáveis de tentativa para tentativa, seguiram um padrão de distância em relação à borda (ver Figura 6) Portanto, o efeito da interação Grupo x Tentativa parece estar relacionado com a maior flexibilidade exibida pelo grupo ENR em identificar essa característica da tarefa. As latências observadas no quarto bloco, quando

novas localizações de plataforma foram empregadas, corroboram com essa interpretação, uma vez que tanto os animais ENR como os CTL exibiram o mesmo padrão de resposta.

A Figura 11 mostra o tempo despendido pelo grupo ENR e CTL nos anéis intermediário e periféricos do LAM ao longo do treino (é relevante lembrar que as quatro localizações iniciais pré-estabelecidas da plataforma encontravam-se exclusivamente no anel intermediário, enquanto as localizações finais não seguiam necessariamente essa mesma regra). A ANOVA referente ao tempo de permanência no anel intermediário revelou um efeito significativo na interação Bloco x Tentativa x Grupo ($F_{(3,57)} = 3.80$, $p = 0,014$). Em relação ao tempo de permanência no anel periférico, a ANOVA revelou efeito significativo na interação Bloco x Tentativa ($F_{(3,57)} = 7.20$, $p = 0,002$). Como ilustrado na Figura 11, a proporção de tempo despendida pelos animais ENR no anel intermediário foi maior do que no anel periférico durante segundo bloco, confirmando hipótese apresentada acima de que a estratégia adotada pelos animais era nadar no anel em que a plataforma costumava ser posicionada.

Figura 11: Média (+DP) do tempo despendido pelos grupos ENR e CTL no anel intermediário (A) e no anel periférico (B) da piscina na primeira (T1) e segunda (T2) tentativas, ao longo dos 4 blocos. No bloco 4 uma nova série de localizações de plataforma foi utilizada; assim, a localização não permaneceu necessariamente no anel intermediário. * $p < 0.02$

O desempenho dos animais também foi analisado quando o intervalo entre as tentativas subiu de 10 para 20 minutos, isto é, os animais precisariam manter a informação sobre a localização da plataforma, adquirida na primeira tentativa, por pelo menos 20 minutos, a fim de usa-la na segunda tentativa. A Figura 12 mostra as latências dos animais ENR e CTL em função da tentativa (primeira e segunda) e do ITI (10 ou 20 minutos). A ANOVA revelou um efeito geral de Tentativa ($F_{(1,19)} = 7,43$, $p < 0,0001$), indicando que os animais foram capazes de manter a informação sobre a localização espacial da plataforma, obtida na primeira tentativa, na memória operacional ao longo de 20 minutos e de utilizá-la para encontrá-la mais prontamente na segunda tentativa. A ANOVA também mostrou que a diferença entre os Grupos foi marginalmente significativa ($F_{(1,19)} = 3,50$, $p = 0,076$). Por outro lado, a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes na interação entre ITI x Tentativa

($F_{(1,19)} = 0,13$, $p = 0,72$) e ITI x Tentativa x Grupo ($F_{(1,19)} = 0,54$, $p = 0,54$), indicando que o aumento do ITI para 20 minutos não prejudicou o desempenho de ambos os grupos e que ambos mantiveram a capacidade de manter a informação espacial por 20 minutos.

Figura 12: Média (+DP) das latências dos animais ENR e CTL para encontrar a plataforma na primeira (T1) e segunda (T2) tentativa em blocos de 2 tentativas, com ITIs de 10 ou 20 minutos, com os animais testados aos 9 meses de idade.

Testes realizados aos 16 meses de idade

Nessa etapa, animais aos 16 meses de idade e que já haviam sido treinados (aos 9 meses de idade) foram submetidos a 8 sessões adicionais de treino na tarefa de memória operacional no labirinto aquático, com ITI de 10 minutos. Nos três primeiros dias do re-treino (Bloco 1), as posições escolhidas da plataforma foram as mesmas do treino anterior, localizadas no anel intermediário. Nos 5 dias seguintes, 4 posições inéditas de plataforma foram adotadas. Os resultados dos animais dos grupos ENR e CTL em relação a latência, comprimento de trajeto, frequência de entrada no contador crítico e tempo despendido no contador crítico são apresentados na Figura 13.

Em relação à latência (Figura 13A) a ANOVA revelou efeitos significantes em relação ao fator Grupo ($F_{(1,7)} = 14,02$, $p = 0,007$), Bloco ($F_{(1,7)} = 21,09$, $p = 0,002$) e Tentativa ($F_{(1,7)} = 21,32$, $p = 0,001$), além de interação significativa envolvendo Bloco x Grupo ($F_{(1,7)} = 7,37$, $p = 0,03$) e efeito próximo de significativo na interação Tentativa x Grupo ($F_{(1,7)} = 4,13$, $p = 0,081$). Similarmente, em relação ao comprimento do trajeto (Figura 13B) a ANOVA revelou efeito significativo em relação aos fatores Tentativa ($F_{(1,7)} = 7,92$, $p = 0,026$) e Bloco ($F_{(1,7)} = 13,82$, $p = 0,007$), além de interação significativa envolvendo os fatores Bloco x Grupo ($F_{(1,7)} = 5,70$, $p = 0,048$).

Figura 13: Média (+DP) da latência (A) e comprimento do trajeto (B) para encontrar a plataforma, da frequência de cruzamentos no contador da plataforma do dia anterior (C) e do tempo despendido no contador crítico do dia anterior (D), na primeira (T1) e segunda (T2) tentativas dos blocos 1-3. É relevante notar que no bloco 2 uma nova série de localizações de plataforma foi utilizada.

Em relação à frequência de cruzamentos no contador crítico do dia anterior (Figura 13C), a ANOVA revelou efeito significativo nos fatores Grupo ($F_{(1,7)} = 9,48$, $p = 0,017$), Bloco ($F_{(1,7)} = 25,67$, $p = 0,001$), Tentativa ($F_{(1,7)} = 33,94$, $p = 0,0006$), além de interação significativa envolvendo os fatores Bloco x Grupo ($F_{(1,7)} = 12,73$, $p = 0,009$) e Bloco x Tentativa ($F_{(1,7)} = 5,76$, $p = 0,047$).

Por fim, em relação ao tempo despendido no contador crítico do dia anterior (Figura 13D) a ANOVA revelou efeito significativo nos fatores Bloco ($F_{(1,7)} = 32,41$, $p = 0,0007$), Tentativa ($F_{(1,7)} = 20,69$, $p = 0,002$), e efeito próximo de significativo no fator Grupo ($F_{(1,7)} = 5,26$, $p = 0,055$). Além disso, a ANOVA revelou também efeitos significantes na interação Bloco x Grupo ($F_{(1,7)} = 8,6$, $p = 0,021$) e Bloco x Tentativa ($F_{(1,7)} = 7,54$, $p = 0,028$).

Como ilustrado na Figura 13, as maiores diferenças entre os animais ENR e CTL nessa fase de experimentos foram o aumento considerável da latência (Figura 13A) e do comprimento de trajeto (Figura 13B) do grupo CTL na primeira tentativa do bloco 2, comparado ao seu desempenho anterior e também em relação ao desempenho do grupo ENR. Interessante ressaltar que a partir desse bloco uma nova série de localizações da plataforma foi empregada. Essa nova condição pareceu ter interferido na estratégia de navegação adotada pelos CTL na primeira tentativa, quando a localização da plataforma é desconhecida. Essa mesma interferência não foi observada nos animais ENR que continuaram mantendo mesmo desempenho em relação ao bloco anterior, indicando, portanto uma maior flexibilidade para lidar com as mudanças no ambiente. Interessantemente, esse aumento na latência e no comprimento de trajeto do grupo CTL pareceu estar relacionado com o aumento da frequência de cruzamentos no contador do dia anterior (Figura 13C) e do tempo despendido (Figura 13D) no contador crítico do dia anterior, parâmetros estes que refletem a persistência dos animais na busca por um local outrora reforçado.

Tomados em conjunto, esses resultados dos testes realizados aos 16 meses de idade sugerem que enquanto animais ENR rapidamente se adaptam a mudanças no ambiente, animais CTL continuam presos a sua estratégia inicial, que fora bem sucedida anteriormente, demorando mais para alterar estratégias para lidar com mudanças ambientais.

A última etapa de teste realizada com esses animais constituiu no aumento do intervalo de tempo entre as tentativas (ITI, que passou a ser de 20 minutos). Os resultados são apresentados na Figura 14. A ANOVA indicou que apesar do aumento do intervalo entre as tentativas os animais de ambos os grupos melhoram significativamente seu desempenho entre as tentativas ($F_{(1,7)} = 46,26$, $p = 0,003$), havendo ainda efeito significativo de ITI ($F_{(1,7)} = 7,86$, $p = 0,025$), indicando que o prosseguimento dos treinos com um ITI maior favoreceu a manutenção da informação na memória operacional por pelo menos 20 minutos.

Figura 14: Média (+DP) da latência para encontrar a plataforma na primeira (T1) e segunda (T2) tentativas, dos animais ENR e CTL testados aos 16 meses de idade, com ITIs de 10 ou 20 minutos.

6.5. Discussão

O enriquecimento ambiental gerou alterações significantes tanto na proliferação de células e sobrevivência neuronal quanto no desempenho comportamental. Animais enriquecidos exibiram maior taxa de neurogênese hipocampal em relação aos animais controles e, adicionalmente a isso, tarefa de labirinto aquático de Morris influenciou a taxa de sobrevivência das novas células em ambos os grupos. Em relação ao comportamento, animais enriquecidos testados aos 9 meses apresentaram um melhor desempenho no LAM no sentido de aprenderem mais rápido a tarefa e elaborarem uma estratégia eficiente para executarem-na; porém, a capacidade da memória operacional permaneceu semelhante ao grupo controle. Já animais expostos ao ambiente enriquecido testados aos 16 meses se mostraram mais flexíveis e adaptáveis às novas situações, enquanto que os controles mostraram-se resistentes a mudanças.

O hipocampo exhibe neurogênese em idade adulta e até mesmo em idade avançada (KEMPERMANN *et al.*,1998, JINNO, 2011), embora a taxa de proliferação nesta última fase seja reduzida (RIDDLE & LICHENWALNER, 2007).

Diversos fatores parecem influenciar a neurogênese ao longo do desenvolvimento, de modo que pode ocorrer aumento ou diminuição da sua taxa dependendo do histórico do animal. O enriquecimento ambiental, por exemplo, é um fator que está relacionado ao aumento da taxa de neurogênese (NILSSON, *et al.*,1999; KEMPERMANN, GAST & GAGE, 2002; BRUEL-

JUNGERMAN *et al.*, 2005), tal qual o envelhecimento tem-se mostrado como um fator que diminui essa taxa (KUHN *et al.*, 1996; SIWAK-TAPP 2008). Assim a ideia de que animais criados em ambiente enriquecido poderiam apresentar menor queda da neurogênese foi um dos aspectos investigados nesse trabalho.

Os resultados do presente estudo mostraram que a taxa de neurogênese nos animais expostos ao ambiente enriquecido foi cerca de duas vezes maior que a dos animais do grupo controle mantidos em gaiolas padrão. Os resultados mostraram ainda que esse efeito não se relaciona apenas com a sobrevivência, mas também com a proliferação celular que está aumentada. De fato, a literatura aponta o que o enriquecimento ambiental combinado com o exercício físico tem efeito tanto na proliferação (FABEL & KEMPERMANN, 2008, FABEL *et al.*, 2009) quanto na sobrevivência das novas células em animais jovens (VAN PRAAG *et al.*, 2000).

Embora a função da neurogênese hipocampal ainda não tenha sido esclarecida, a sua relação com o aprendizado e memória vem sendo muito investigada. Existem pelo menos duas maneiras pelas quais essa relação pode ser estudada: 1) tarefas de memória podem aumentar a taxa de neurogênese global pelo aumento da sobrevivência, 2) a taxa de neurogênese como determinante no desempenho em testes de aprendizagem e memória (ABROUS & WOJTOWICS, 2008).

Em relação a primeira proposição, dados do presente estudo mostram que animais expostos a tarefa de memória operacional durante o processo de maturação das novas células mantiveram um número de células

marcadas superior aqueles que não foram expostos à tarefa. De fato, a literatura mostra que ocorre aumento da neurogênese quando os animais são expostos a tarefas dependentes da formação hipocampal, com treinamento iniciado durante o processo de desenvolvimento (GOULD *et al.*, 1999; AMBROGINI *et al.*, 2000; EPP, *et al.*, 2007; EPP *et al.*, 2013).

Em relação a segunda proposição, existem estudos mostrando que a taxa de neurogênese influencia o desempenho de animais em tarefas dependentes da formação hipocampal. Por exemplo, estudos envolvendo o bloqueio da neurogênese prejudica o desempenho em testes de memória espacial (SAXE *et al.*, 2006; DUPRET *et al.*, 2008; JESSBERGER *et al.*, 2009), assim como existem estudos que relacionam uma alta taxa de neurogênese em um melhor desempenho (DRAPEAU *et al.*, 2003; GIL-MOHAPEL *et al.*, 2013). Resultados do presente estudo mostram que animais expostos ao ambiente enriquecido apresentam maiores taxas de neurogênese (cerca de duas vezes maiores que as do controle) associadas a um desempenho comportamental diferenciado no labirinto aquático de Morris (mais detalhes a seguir). Mesmo assim, não se pode afirmar sobre a existência de uma relação causal entre esses fatores, uma vez que o enriquecimento ambiental pode contribuir para essas duas observações separadamente, isto é, atuar no aumento da neurogênese e, paralelamente, contribuir na melhora da função cognitiva (ver ABROUS & WOJTOWICS, 2008).

Uma análise de distribuição topográfica na neurogênese foi realizada a fim de analisar se existe diferenças entre as lâminas do giro

denteado. Os dados presentes na literatura ainda apresentam-se inconsistentes. Alguns estudos em animais jovens indicaram uma maior taxa de novas células na lâmina inferior (SNYDER, *et al.*,2009; CHOI *et al.*,2003, KLOMP *et al.*,2014), enquanto outros encontraram uma maior porção de células marcadas na lâmina superior (AMBROGINI *et al.*,2000; JINNO, 2011). No entanto, animais que passaram por algum tipo de estímulo, como o exercício físico ou enriquecimento ambiental, não apresentam diferenças entre as lâminas (TASHIRO *et al.*,2007; MARLATT *et al.*,2012), tais quais trabalhos envolvendo animais entre 10 e 13 meses que também não encontraram diferenças entre as lâminas (JINNO, 2010; SNYDER *et al.*,2011). Snyder e colaboradores (2012) ainda argumentou que na verdade, existe uma maior proliferação direcionada para a lâmina inferior, no entanto, existe também uma maior taxa de morte nessa lâmina, o que resultaria em um quadro balanceado entre as duas lâminas. Contudo, o presente estudo mostrou que existe uma maior quantidade de células marcadas com BrdU na lâmina superior, independente do tipo de ambiente ao qual os animais foram expostos. Possivelmente essa diferença tenha aparecido porque no momento da aplicação do BrdU os animais já haviam passado por outras experiências comportamentais, que poderiam influenciar, de alguma forma, essa distribuição, uma vez que existe um recrutamento preferencial da lâmina superior em tarefas comportamentais em relação a inferior (SNYDER *et al.*,2010; SCHMIDT *et al.*, 2012).

Na tarefa dependente de memória operacional no labirinto aquático a localização da plataforma muda diariamente, mantendo-se constante durante as tentativas realizadas numa mesma sessão. Assim, na primeira tentativa de cada dia os animais encontram a plataforma através do escaneamento da piscina, e caso não tenham sucesso, são levados até a plataforma pelo experimentador. Já na segunda tentativa, os animais podem se beneficiar do conhecimento sobre a localização da plataforma obtido durante a primeira tentativa, quando são capazes de manter essa informação na memória operacional durante o ITI imposto. Como a posição de largada dos animais é alterada entre as tentativas, os animais devem não só recordar a localização alvo, mas também manipular a informação armazenada para aquele novo ponto de largada, para alcançar o objetivo com maior eficiência. Assim, a diminuição da latência e do comprimento do trajeto para encontrar a plataforma na segunda tentativa em relação a primeira indica que os animais são capazes de manter a informação sobre a localização da plataforma em sua memória operacional.

Os resultados encontrados neste estudo revelaram que os animais expostos ao ambiente enriquecido, quando testados no labirinto aquático aos 9 meses de idade, encontraram a plataforma, na primeira tentativa, mais rapidamente em relação aos animais controle (Figura 10), indicando que aqueles animais aprendem mais rapidamente o objetivo da tarefa e detectam mais prontamente a regra de funcionamento do ambiente. De fato, o maior tempo despendido pelos animais expostos ao ambiente enriquecido no anel

intermediário da piscina (Figura 11) revela que esses animais desenvolveram uma estratégia de navegação mais eficiente para encontrar a plataforma, diferentemente dos animais controle que insistiam em nadar próximo à borda. Essa interpretação recebeu apoio adicional dos resultados envolvendo a adoção das novas localizações de plataforma. Isto é, os animais expostos ao ambiente enriquecido exibiram aumento da latência e comprimento de trajeto na primeira tentativa em relação ao seu próprio desempenho anterior e ao desempenho dos controles (Figura 10). Os dados encontrados complementam os dados da literatura mostram que animais jovens enriquecidos apresentam uma estratégia de navegação mais eficiente do que os controles em tarefa de labirinto aquático de Morris (LEGGIO *et al.*, 2005).

Não obstante a estratégia de navegação tenha sido mais eficiente nos animais expostos ao ambiente enriquecido, em relação ao funcionamento da memória operacional não foram encontradas diferenças significantes entre os animais ENR e CTL. Isto é, as taxas de redução da latência e do comprimento de trajeto não diferiram significativamente entre esses grupos.

Em relação aos testes realizados com os animais aos 16 meses, tanto os animais expostos ao enriquecimento ambiental como os controles apresentaram desempenho similar nos três primeiros dias de experimento, em que as localizações da plataforma foram familiares, i.e., já experienciadas nos testes anteriores realizados aos 9 meses de idade, indicando que ambos os grupos foram capazes de lembrar a posição apresentada 7 meses antes. Entretanto, quando essas localizações foram alteradas o grupo CTL apresentou

um aumento considerável da latência para encontrar a plataforma comparado com seu próprio desempenho no bloco anterior e com o desempenho do grupo exposto ao enriquecimento ambiental. Além disso, quando comparado com o bloco anterior, os animais controles passaram mais tempo no contador crítico do dia anterior, sugerindo uma dificuldade em abandonar sua estratégia inicial de busca.

Utilizando uma tarefa envolvendo “reversão da aprendizagem espacial”, em que após a aprendizagem inicial da tarefa a plataforma é reposicionada para outro quadrante, Vorhees e William (2006) mostraram que animais jovens rapidamente mudam sua estratégia de navegação quando percebem que a anterior não é mais efetiva, retornando para o local anterior apenas por acaso (25%). É tentador extrapolar essas observações e conclusões para os resultados do presente estudo, e interpretá-los como evidência a favor da noção de que a exposição prolongada ao enriquecimento ambiental preserva habilidades cognitivas presentes em animais jovens nos animais idosos. Mas evidentemente uma tal conclusão requereria mais estudos.

Assim como em animais com 9 meses, os animais de 16 meses não exibiram prejuízo na memória operacional o intervalo entre as tentativas aumentou para 20 minutos.

As alterações cognitivas relacionadas ao envelhecimento podem estar relacionadas à perda de células hipocâmpais e a redução do volume hipocâmpal (MATTISON *et al.*, 2006, DRISCOLL *et al.*, 2006), e com a queda na taxa de neurogênese (DRAPEAU *et al.*, 2003, DRISCOLL *et al.*, 2006). Tratamentos que

atenuem essas reduções podem trazer benefícios para a função cognitiva. Estudos envolvendo enriquecimento ambiental e envelhecimento mostram que ocorre aumento na liberação de fatores neurotróficos em associação com o enriquecimento (ICKES *et al.*,2000, MORA, 2013, KEMPERMAN *et al.*,2002) e aumento da taxa da neurogênese (KEMPERMAN *et al.*,2002, BRUEL-JUNGERMAN *et al.*,2005), contribuindo para diminuir deficiências de memória. Além disso, é sabido que o encéfalo mantém alguma capacidade plástica durante o envelhecimento (MOHAMMED *et al.*,2002, MORA *et al.*,2007). No presente trabalho, é possível que ao menos parte do resultado encontrado tenha relação com o tipo de enriquecimento ambiental utilizado que também facultou um aumento das atividades físicas em decorrência da existência de rodas e escadas no ambiente enriquecido. Os resultados comportamentais mostraram claramente que a exposição prolongada ao enriquecimento resulta em (1) aprendizado mais rápido das regras da tarefa, (2) desenvolvimento de estratégias de navegação mais eficientes e (3) maior desenvoltura para enfrentar novas situações. A tarefa, por sua vez, contribuiu para uma maior sobrevivência das novas células, independente do tipo de ambiente em que os animais foram criados, apesar dos animais enriquecidos terem uma maior taxa de proliferação celular em comparação aos animais do controle. Tomados em conjunto, pode-se concluir que animais criados em ambiente enriquecido durante a vida, não só apresentaram um comportamento mais flexível e eficiente para resolver a tarefa de labirinto aquático, como também apresentaram altas taxa de neurogênese em relação aos controles, dessa forma, pode-se extrapolar que o enriquecimento poderia diminuir a

progressão do declínio de certas funções cognitivas em animais de meia idade e idosos. Outro achado importante é a participação da tarefa como fator crucial para o futuro das novas células, indicando que é possível que haja um recrutamento importante das novas células mesmo em idades avançadas.

7. Discussão Geral

No presente estudo, o enriquecimento ambiental propiciou mudanças comportamentais e anatômicas. Em curto prazo, o enriquecimento foi (1) capaz de reduzir a ansiedade dos animais jovens em relação aos controles. Já em longo prazo, o enriquecimento favoreceu a (2) adoção de uma estratégia eficiente, baseada no entendimento do objetivo da tarefa e na observação da existência um padrão de posicionamento da plataforma. E, com 16 meses de idade o enriquecimento (3) gerou uma flexibilidade para lidar com a nova situação, enquanto que os controles não persistiam na estratégia antiga, obsoleta na condição atual. Além dos efeitos comportamentais, animais enriquecidos apresentaram (4) maior taxa de neurogênese em relação aos controles, além disso, (5) a tarefa de LAM foi capaz de modular positivamente a taxa de sobrevivência das novas células.

O hipocampo é uma peça cerebral fundamental para funções cognitivas (BANNERMAN *et al.*, 2004; SWEAT, 2004). Sua posição anatomicamente estratégica, no lobo temporal medial, o coloca em vantagem na comunicação com diversas áreas. Sua própria anatomia favorece essas ligações, pois sabe-se que sua parte dorsal recebe e envia projeções para as áreas sensoriomotoras e associativas do córtex, assim como sua região ventral comunica-se com a amígdala e o hipotálamo (MOSER & MOSER, 1998). É válido destacar que essas subregiões trocam informações entre si (TANNENHOLZ *et al.*, 2014), tornando o processamento da informação mais rico.

O hipocampo recebe estímulos multimodais, conferindo a eles uma significância (EICHENBAUM *et al.*,1992) antes de se tornarem (ou não) uma memória, e o conjunto de memórias formadas a partir dessas experiências vivenciadas não só modelam a individualidade de cada ser (CAMPOS *et al.*,1997), como também contribuem para um maior leque de opções a ser consultado frente a um problema. Em outras palavras, quanto mais experiências o indivíduo coleta, mais desenvoltura ele terá para enfrentar situações adversas.

O intuito de trabalhar com o enriquecimento ambiental era proporcionar experiências extras aos animais ao longo de sua vida, e conferir através do comportamento e da neurogênese o seu resultado. As tarefas escolhidas (labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris) são amplamente utilizadas na literatura para avaliar ansiedade e memória espacial, respectivamente (PELLOW, 1985, HOGG, 1996, TREIT *et al.*,1993, VORHESS & WILLIAMS, 2006). O esperado era que os efeitos do enriquecimento alterassem de alguma forma esses comportamentos, quando comparado ao desempenho dos controles.

Pelo fato do grupo controle ser composto justamente por animais, que segundo a literatura, exibem um comportamento padrão em relação ao LCE e ao LAM, fez-se necessário não observar somente o resultado final, isto é, somente analisar os parâmetros que correspondem à ansiedade e memória, mas também os demais parâmetros oferecidos pelos experimentos. O resultado encontrado foi a análise dos parâmetros em conjunto durante a

execução da tarefa, o que poderia refletir, ou não, na alteração do comportamento.

Na análise do LCE, o enriquecimento pareceu modular o componente ansiedade presente na memória aversiva de animais jovens, além disso, também influenciou a avaliação de risco, tanto em animais jovens quanto em idosos (este último mesmo de tendencialmente), esse comportamento permite aos animais coletar mais informações sobre o ambiente, o que os tornariam mais aptos a tomar uma decisão. Diferentemente, os controles optam por permanecer no local mais seguro. Como os animais enriquecidos estavam habituados a explorar sua própria gaiola, uma vez que a chance de haver uma novidade no seu ambiente era grande, é provável que o tempo despendido no quadrado central pudesse exprimir esse comportamento desencadeado pela experiência do enriquecimento.

Já no LAM, os animais enriquecidos de 9 meses foram capazes de encontrar uma estratégia eficiente para encontrar a plataforma logo na primeira tentativa, cuja localização era desconhecida, mostrando assim que para localizar a plataforma, eles coletaram as informações referentes aos dias anteriores e aplicaram na situação atual, concluindo que a plataforma estaria sempre a uma determinada distancia da borda. Os animais com 16 meses que voltaram ao LAM mostraram que a memória referente ao experimento estava preservada, no entanto, quando a situação mudava, isto é, quando a plataforma era inédita, apenas os animais enriquecidos apresentavam maior

desenvoltura para lidar a nova situação, enquanto os controles insistiam em nadar próximo ao local de onde a plataforma estava no dia anterior. A habilidade de manter na memória operacional o posicionamento da plataforma por 10 ou 20 minutos esteve preservada em todo o momento em todos os grupos.

Apesar de da sua extensa utilização na literatura, talvez a tarefa de LAM não tenha sido suficientemente sensível a ponto de captar os efeitos do enriquecimento na memória dos animais, tornando-se necessário extrapolar da interpretação de outros parâmetros para enxergar os efeitos.

As mudanças anatômicas, relacionadas à neurogênese foram mais evidentes entre os grupos de animais. O ambiente enriquecido teve grande influencia na proliferação e sobrevivência dos novos neurônios, este último refletido na quantidade de novas células que permaneceram vivas 30 dias depois do nascimento. Quando associado ao LAM, o número de novas células que sobreviveram foi ainda maior. De fato, existe uma literatura robusta sobre os efeitos do enriquecimento (NILSSON *et al.*,1999; BRUEL-JUNGERMANN *et al.*,2005; RIZZI *et al.*,2011; VAN PRAAG & KEMPERMANN, 2000) e do aprendizado (GOULD *et al.*,1999; AMBROGINI *et al.*,2000; EPP, *et al.*,2007; EPP, *et al.*,2013) na neurogênese. Diferentemente do que se imaginava, o enriquecimento não alterou a taxa sobrevivência, isto é, a proporção do número de células que permaneceram vivas 30 dias depois, foi semelhante em enriquecidos e controles. Entretanto, a tarefa foi capaz de modular esse efeito, aumentando a taxa de sobrevivência nos grupos enriquecido e controle que passaram pelo

LAM. Pode-se inferir então que para aumentar essa taxa de sobrevivência o estímulo de recrutamento deve ser mais intenso (como acontece em aprendizagem) do que acontece no enriquecimento. Em outras palavras, é provável que o engajamento de células hipocampais em tarefas que envolvem memória e aprendizado seja maior, considerando a complexidade do estímulo, enquanto uma situação em que sejam apresentados estímulos sensoriais não requeira tal nível de engajamento hipocampal. O que refletiria na diferença nas taxas de sobrevivência.

O enriquecimento é manobra experimental não invasiva, geralmente associada ao bem-estar animal. No presente trabalho foi encontrado que o enriquecimento tem efeito ansiolítico em animais jovens e também altera o comportamento de avaliação de risco em jovens e em idosos, além disso, melhora a estratégia de execução de tarefas em animais de meia idade e idosos, mesmo essa melhora estratégia não tenha sido expressa nos resultados de memória operacional espacial. O enriquecimento e a tarefa também contribuem para o aumento da taxa de neurogênese.

8. Conclusões

O enriquecimento ambiental:

- Gerou efeito ansiolítico em animais testados aos 3 meses de idade
- Influenciou o comportamento de avaliação de risco / tomada de decisão em animais jovens
- Não alterou a memória aversiva em animais com 15 meses
- Facilitou a adoção de uma estratégia eficiente para desempenhar uma tarefa envolvendo memória operacional
- Proporcionou uma maior adaptabilidade as mudanças de ambiente
- Não alterou o desempenho da memória operacional espacial
- Aumentou cerca 1,8x o número de células geradas no giro denteado do hipocampo
- Não alterou a taxa de sobrevivência das novas células. No entanto, a tarefa de labirinto aquático de Morris, alterou a porcentagem de células sobreviventes.

Resumo Geral

O enriquecimento ambiental pode ser considerado uma condição que proporciona aumento da estimulação sensorial, cognitiva e motora, que levaria, a curto e longo prazos, a mudanças comportamentais importantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental (1) na ansiedade e memória aversiva, ambos no labirinto em cruz elevado, (2) na memória operacional espacial no labirinto aquático de Morris, e (3) na neurogênese hipocampal, em ratos. Os animais foram expostos ao enriquecimento ambiental a partir do desmame (22 dias), onde permaneceram até o último dia de teste (17º mês). Nesse período, foram submetidos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) no 3º e 15º mês, e ao Labirinto Aquático de Morris (LAM) no 9º e 16º mês. Uma semana antes da exposição ao labirinto aquático, receberam uma injeção intraperitoneal de bromodeoxyuridina (BrdU). Vinte e quatro horas e trinta dias após essa injeção grupos independentes de animais foram sacrificados e seus encéfalos processados imunohistoquimicamente para revelar o BrdU. O enriquecimento ambiental produziu um efeito ansiolítico em animais jovens, mas não nos idosos. A memória aversiva de animais jovens e idosos não se alterou. No labirinto aquático, enquanto os animais expostos ao ambiente enriquecido por 9 meses apresentaram uma estratégia mais eficiente de busca em relação aos respectivos controles, os animais expostos ao ambiente enriquecido por 15 meses apresentaram mais flexibilidade para se adaptar as novas situações; no entanto, o enriquecimento ambiental parece não alterar diretamente o desempenho na memória operacional espacial. Em relação a neurogênese hipocampal, o enriquecimento foi capaz de aumentar cerca de 2 vezes o número de novas células; no entanto, a exposição ao labirinto aquático foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência de novos neurônios.

Abstract

Environmental enrichment in laboratory animals is a housing condition that provides enhanced sensorial, motor and social stimulation as compared to maintenance in standard laboratory cages. It has been claimed that this kind of stimulation improves cognition. The aim of this study was to investigate the effects of exposure to environmental enrichment on anxiety and aversive memory in the elevated plus maze, spatial working memory in the Morris' water maze, and hippocampal neurogenesis. The animals were subjected to environmental enrichment from weaning (22 days) up to the last test (17 months). During this period, they were tested in the 3rd and 15th months of life in the elevated plus maze, and in the 9th and 16th months of life in the Morris' water maze. A week before exposure to the water maze, the animals received an intraperitoneal injection of BrdU. Twenty-four hours and 30 days after the injection independent groups of animals were sacrificed for performing immunohistochemistry. Exposure to the enriched environment rendered young animals, but not elderly, less anxious. In addition, the aversive memory of both groups remained unchanged along aging. In the Morris' water maze, animals exposed to the enriched environment showed a more effective searching strategy to find the hidden platform on the first trial than the controls, when tested at 9 months. In addition, the flexibility to deal with novel situations at 15 months was greater for animals exposed to the enriched environment. Even though, exposure to the enriched environment did not alter performance of spatial working memory. Environmental enrichment doubled hippocampal neurogenesis, and the survival of the new neurons was greater when the subjects were exposed to the Morris' water maze task.

9. Referências

AIZAWA, K.; AGEYAMA, N.; YOKOYAMA, C.; HISATSUNE, T. Age-dependent alteration in hippocampal neurogenesis correlates with learning performance of macaque monkeys. **Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 58, n. 4, p. 403-7, jul 2009.

ABROUS, D. N.; KOEHL, M.; MOAL, M. L. E. Adult Neurogenesis: From Precursors to Network and Physiology. **Physiological Reviews**, n. 322, p. 523-569, 2005.

ABROUS, D. N.; WOJTOWICZ, J.M., Neurogenesis and Hippocampal Memory System. In Adult Neurogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, p 667, 2008

AIMONE, James B; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. **Trends in cognitive sciences**, v. 14, n. 7, p. 325-337, 2010.

AMBROGINI, P. et al. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. **Neuroscience letters**, v. 286, n. 1, p. 21-4, 2000.

BADDELEY, A. Working Memory. **Science**, v. 255, n. ii, 1992.

BADDELEY, A. Recent developments in working memory. **Current opinion in neurobiology**, v. 8, p. 234-238, 1998.

BADDELEY, A. The episodic buffer: a new component of working memory? **Trends in cognitive sciences**, v. 4, n. 11, p. 417-423, 2000.

BALDINI, S.; RESTANI, L.; BARONCELLI, L.; *et al.* Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 28, p. 11715-23, 10 jul 2013.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1-2, p. 141-9, 1 nov 2001.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 273-83, maio 2004.

BENNETT, E. L.; DIAMOND, M. C.; KRECH, D.; ROSENZWEIG, M. R. Chemical and anatomical plasticity of brain. 1964. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 8, n. 4, p. 459-70, jan 1996.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural brain research**, v. 108, n. 2, p. 197-203, mar 2000.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology**, v. 170, n. 4, p. 335-42, dez 2003.

BILLARD, J. M. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. **Magnesium research : official organ of the International Society for the Development of Research on Magnesium**, v. 19, n. 3, p. 199-215, set 2006.

BIZON, J. L., LASARGE, C.L., MONTGOMERY, K.S., DERMOTT, A.N., SETLOW, B., GRIFFITH, W. H. Spatial reference and working memory across the lifespan of male Fischer 344 rats. **Neurobiology of aging**, v. 30, n. 4, p. 646-655, 2009.

BLANCHARD, D C; BLANCHARD, R J; TOM, P. Psychopharmacology Diazepam changes risk assessment in an anxiety / defense test battery *. **Psychopharmacology**, p. 511-518, 1990.

BOGUSZEWSKI, Pawel; ZAGRODZKA, Jolanta. Emotional changes related to age in rats * a behavioral analysis. **Behavioural brain research**, v. 133, 2002.

BROWN, R. E.; MILNER, P. M. The legacy of Donald O. Hebb: more than the Hebb synapse. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1013-9, dez 2003.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; LAROCHE, S.; RAMPON, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **The European journal of neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 513-21, jan 2005.

BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 30-40, jan 2006.

CAMPOS, A; SANTOS, A. M. G.; XAVIER, G. F. A Consciência Como Fruto da Evolução e do Funcionamento do Sistema Nervoso. **Psicol. USP**, São Paulo , v. 8, n. 2, 1997

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, jan 2005.

DENG, Wei; AIMONE, James B; GAGE, Fred H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 339-50, 2010.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 2, p. 211-20, jun 2001.

DRAPEAU, E.; MAYO, W.; AUROUSSEAU, C.; *et al.* Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14385-90, 25 nov 2003.

DRISCOLL, I.; HOWARD, S. R.; STONE, J. C.; *et al.* The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. **Neuroscience**, v. 139, n. 4, p. 1173-85, jan 2006.

DUPRET, David; FABRE, Annabelle; DÖBRÖSSY, Mátè Dàniele *et al.* Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. **PLoS biology**, v. 5, n. 8, p. e214, 2007.

DUPRET, D.; REVEST, J.-M.; KOEHL, M.; *et al.* Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1959, jan 2008.

ECKERT, M. J.; ABRAHAM, W. C. Effects of Environmental Enrichment Exposure on Synaptic Transmission and Plasticity in the Hippocampus. 2012.

ECKERT, M. J.; BILKEY, D. K.; ABRAHAM, W. C. Altered plasticity in hippocampal CA1, but not dentate gyrus, following long-term environmental enrichment. **Journal of neurophysiology**, v. 103, n. 6, p. 3320-9, jun 2010.

EICHENBAUM, H.; OTTO, T. & COHEN, N. J. The Hippocampus What Does It Do? **behavioral and neural Biology**, v. 36, p. 1-35, 1992.

EPP, J. R.; SPRITZER, M. D. e GALEA, L. a M. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. **Neuroscience**, v. 149, n. 2, p. 273-85, 2007.

EPP, J. R.; CHOW, C. e GALEA, L. a M. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, n. April, p. 57, doi:10.3389/fnins.2013.00057, 2013.

ESPÓSITO, M Soledad; PIATTI, Verónica C; LAPLAGNE, Diego. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 44, p. 10074-86, 2005.

FABEL, K.; WOLF, S. A; EHNINGER, D. *et al.* Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. **Frontiers in neuroscience**, v. 3, n. November, p. 50, jan 2009.

FABEL, Klaus; KEMPERMANN, Gerd. Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. **Neuromolecular medicine**, v. 10, n. 2, p. 59-66, 2008.

FANSELOW, M. S. & DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron** 65, 7-19, 2010.

FARES, R. P.; BELMEGUENAI, A.; SANCHEZ, P. E.; *et al.* Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e53888, jan 2013.

FILE, S E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 58, n. 1-2, p. 199-202, 1993.

FILE, S. E.; ZANGROSSI, H.; SANDERS, F. L.; MABBUTT, P. S. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 3-4, p. 543-6, jan 1994.

FRICK, K. M.; STEARNS, N. A; PAN, J.-Y.; BERGER-SWEENEY, J. Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 10, n. 3, p. 187-98, 2003.

GIL-MOHAPEL, J.; BROCARD, P. S.; CHOQUETTE, W.; *et al.* Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75125, jan 2013.

GOULD, E.; BEYLIN, A; TANAPAT, P.; REEVES, A; SHORS, T. J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 260-5, mar 1999.

HARATI, H.; MAJCHRZAK, M.; COSQUER, B.; *et al.* Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. **Neurobiology of aging**, v. 32, n. 4, p. 718-36, abr 2011.

HARATI, H.; BARBELIVIEN, A.; HERBEAUX, K.; *et al.* Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, p. 1-17, 17 maio 2012.

HEBB, D. O. The growth and decline of intelligence. The Organization of behavior: A neuropsychological theory. New York: Wiley, 1949. p. 335.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996.

ICKES, B. R.; PHAM, T. M.; SANDERS, L. A; *et al.* Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. **Experimental neurology**, v. 164, n. 1, p. 45-52, jul 2000.

ITOH, J; NABESHIMA, T; KAMEYAMA, T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. **European journal of pharmacology**, v. 194, n. 1, p. 71-6, 1991.

IZQUIERDO, I. *Memória*, 2ed., revamp - Porto Alegre: Artmed, p. 133, 2011

JESSBERGER, S.; CLARK, R. E; BROADBENT, N. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. **Learning & Memory**, p. 147-154, 2009.

JINNO, S. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: A stereology-based study using endogenous markers. **Hippocampus**, v. 000, n. November 2009, jan 2010.

JINNO, S. Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus. **The Journal of comparative neurology**, v. 519, n. 3, p. 451-66, 2011.

JOHANSSON, B. B.; BELICHENKO, P. V. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 22, n. 1, p. 89-96, jan 2002

KEE, Nohjin; TEIXEIRA, Cátia M; WANG, Afra H. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 355-62, 2007.

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; GAGE, F. H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Annals of neurology**, v. 52, n. 2, p. 135-43, ago 2002.

KEMPERMANN, G; KUHN, H G; GAGE, F H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, n. 9, p. 3206-12, 1998.

KLOMP, A. *et al.* Effects of chronic fluoxetine treatment on neurogenesis and tryptophan hydroxylase expression in adolescent and adult rats. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97603, doi:10.1371/journal.pone.0097603, 2014.

KOBAYASHI, S.; OHASHI, Y.; ANDO, S. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams

maze task. **Journal of neuroscience research**, v. 70, n. 3, p. 340-6, 1 nov 2002.

KRONENBERG, G.; BICK-SANDER, A.; BUNK, E.; *et al.* Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. **Neurobiology of aging**, v. 27, n. 10, p. 1505-13, out 2006.

KUHN, H.-G.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation Rat : Age-Related. , v. 76, n. 6, p. 2027-2033, 1996.

LAZAROV, O.; MATTSON, M. P.; PETERSON, D. A; PIMPLIKAR, S. W.; PRAAG, H. VAN. When neurogenesis encounters aging and disease. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 12, p. 569-579, 2010

LEAL-GALICIA, P.; CASTAÑEDA-BUENO, M.; QUIROZ-BAEZ, R.; ARIAS, C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. **Neurobiology of learning and memory**, v. 90, n. 3, p. 511-8, out 2008.

LEE, C. e RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology**, v. 102, n. 4, p. 507-513, doi:10.1007/BF02247133, 1990.

LEGER, M.; QUIEDEVILLE, A.; PAIZANIS, E. Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e48043, jan 2012.

LEGGIO, M. G.; MANDOLESI, L.; FEDERICO, F. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behavioural brain research**, v. 163, n. 1, p. 78-90, 30 ago 2005.

LINDNER, M. D; BALCH, A. H; VANDERMAELEN, C A M P. Short Forms of the “ Reference- ” and “ Working-Memory ” Morris Water Maze for Assessing Age-Related Deficits. **Behavioral and neural Biology** v. 2, 1992.

MARLATT, M.; POTTER, M.; LUCASSEN, P.; VAN PRAAG, H. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis and BDNF levels in female C57Bl/6J mice. **Developmental neurobiology**, v. 72, n. 6, p. 943-952, doi:10.1002/dneu.22009. Running, 2013.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278-94, abr 2006.

LEAL-GALICIA, P.; CASTAÑEDA-BUENO, M.; QUIROZ-BAEZ, R.; ARIAS, C. Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents

recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. **Neurobiology of learning and memory**, v. 90, n. 3, p. 511-8, out 2008.

MATTSON, M. P. e MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278-94, 2006.

MESHI, Dar; DREW, Michael R; SAXE, Michael et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 729-31, 2006.

MOHAMMED, A. H.; ZHU, S. W.; DARMOPIL, S. I. *et al.* Environmental enrichment and the brain '. v. 138, n. 1949, 2002.

MONGIAT, Lucas a; SCHINDER, Alejandro F. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. **The European journal of neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1055-61, 2011.

MORA, F.; SEGOVIA, G.; ARCO, A. DEL. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain research reviews**, v. 55, n. 1, p. 78-88, ago 2007.

MORA, F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, n. 01, p. 45-52, 2013.

MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, n. 6, p. 608-19, jan. 1998.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697-709, set 2006.

NILSSON, M.; PERFILIEVA, E.; JOHANSSON, U.; ORWAR, O.; ERIKSSON, P. S. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. **Journal of neurobiology**, v. 39, n. 4, p. 569-78, 15 jun 1999.

OHL, F. Testing for anxiety. **Clinical Neuroscience Research**, v. 3, n. 4-5, p. 233-238, dez 2003.

O'KEEFE, J. A., & NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. London: **Oxford University Press**, 1978

OLSON, A. K.; EADIE, B. D.; ERNST, C.; CHRISTIE, B. R. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 250-60, jan 2006.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, ago 1985.

PEÑA, Y.; PRUNELL, M.; ROTLLANT, D.; ARMARIO, A.; ESCORIHUELA, R. M. Enduring effects of environmental enrichment from weaning to adulthood on pituitary-adrenal function, pre-pulse inhibition and learning in male and female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 9, p. 1390-404, out 2009.

RIDDLE, D. R & LICHTENWALNER, R. J. Neurogenesis in the Adult and Aging Brain. In: *Brain Aging: Models, Methods and Mechanisms*, Frontiers In Neuroscience, CRC Press, p. 384, 2007

RIZZI, S.; BIANCHI, P.; GUIDI, S.; CIANI, E.; BARTESAGHI, R. Impact of environmental enrichment on neurogenesis in the dentate gyrus during the early postnatal period. **Brain research**, v. 1415, p. 23-33, 30 set 2011.

RODGERS, R. J.; CAO, B. J.; DALVI, A; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 30, n. 3, p. 289-304, mar 1997.

ROSENZWEIG, E. S. e BARNES, C. a. **Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition**. v. 69p. 143-179, 2003

ROSENZWEIG, M. R.; KRECH, D.; BENNETT, E. L.; DIAMOND, M. C. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy : v. 55, n. 4, p. 429-437, 1962.

ROY, V.; CHAPILLON, P.; JELJELI, M.; CASTON, J.; BELZUNG, C. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 1, p. 131-141, 8 nov 2008.

SALUM, C; MORATO, S; ROQUE-DA-SILVA, a C. Anxiety-like behavior in rats: a computational model. **Neural networks: the official journal of the International Neural Network Society**, v. 13, n. 1, p. 21-9, 2000.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; ZANCADA-MENENDEZ, C.; BEGEGA, A.; RUBIO, S.; ARIAS, J. L. Effects of environmental enrichment on anxiety responses, spatial memory and cytochrome c oxidase activity in adult rats. **Brain research bulletin**, v. 98C, p. 1-9, 4 jul 2013.

SANDOVAL, C Jimena; MARTÍNEZ-CLAROS, Marisela; BELLO-MEDINA, Paola *Cet al.* When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17689, 2011.

SAXE, M. D. et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17501-6, doi:10.1073/pnas.0607207103, 2006.

SCHMIDT, B.; MARRONE, D. F. e MARKUS, E. J. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. **Behavioural brain research**, v. 226, n. 1, p. 56-65, doi:10.1016/j.bbr.2011.08.039, 2012.

SHARMA, a C; KULKARNI, S K. Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 117-25, 1992.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats--behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural brain research**, v. 222, n. 1, p. 246-64, 12 set 2011.

SIWAK-TAPP, C. T.; HEAD, E.; MUGGENBURG, B. A.; MILGRAM, N. W.; COTMAN, C. W. and Correlates with Cognitive Function. , v. 88, n. 2, p. 249-259, 2008.

SHORS, T. J.; MIESEGAES, G.; BEYLIN, A.; *et al.* Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature**, v. 410, n. 6826, p. 372-6, mar 2001.

SNYDER, J. S. et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14484-95, doi:10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009, 2009.

SNYDER, JASON S; RADIK, RUVIM; WOJOWICTZ, J. MARTIM; CAMERON, H. A. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. **Hippocampus**, v. 19, n. 4, p. 360-370, doi:10.1002/hipo.20525, Anatomical, 2010.

SNYDER, JASON S; RAMCHAND, P.; RABBEIT, S.; RADIK, R., WOJTOWICZ, M.; CAMERON, H. Septo-temporal gradients of neurogenesis and activity in 13- month-old rats. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 6, p. 1149-1156, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.05.022, Septo-temporal, 2011.

SNYDER, J. S.; FERRANTE, S. C. e CAMERON, H. a. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48757, doi:10.1371/journal.pone.0048757, 2012.

SWEATT, J. D. Hippocampal function in cognition. **Psychopharmacology**, v. 174, n. 1, p. 99-110, 2004.

TANNENHOLZ, L.; JIMENEZ, J. C.; KHEIRBEK, M. A. Local and regional heterogeneity underlying hippocampal modulation of cognition and mood. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. May, p. 147, jan. 2014.

TASHIRO, A.; MAKINO, H.; GAGE, F. H. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 12, p. 3252-9, mar 2007.

TAUPIN, P. **Stem cells and regenerative medicine**. New York: Nova Science Publishers v. 1p. 180 , 2008.

TREIT, DALLAS; MENARD JANET, R. C. Anxiogenic Stimuli in the Elevated Plus-Maze. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 44, p. 463-469, 1993.

TRULLAS, R. e SKOLNICK, P. Psychopharmacology Differences in fear motivated behaviors among inbred mouse strains. p. 323-331, 1993.

Van PRAAG, H. VAN; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191-8, dez 2000.

VORHEES V CHARLES; WILLIAMS, M. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat protocol**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2006.

WIESCHOLLECK, V.; EMMA ANDRÉ, M. A.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Early age-dependent impairments of context-dependent extinction learning, object recognition, and object-place learning occur in rats. **Hippocampus**, v. 24, n. 3, p. 270-9, mar 2014.

WILLIAMS, B. M.; LUO, Y.; WARD, C. *et al.* Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. **Physiology & behavior**, v. 73, n. 4, p. 649-58, jul 2001.

WIMMER, M.; HERNANDEZ, P.; BLACKWELL, J., ABEL, T. Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 9, p. 2220-2224, 2013.

XAVIER, G. F. A Modularidade da Memória e o Sistema Nervoso.pdf. **Psicologia USP**, v. 4(1/2), p. 61-115, 1993.

XAVIER, G. F.; OLIVEIRA-FILHO, F. J.; SANTOS, A M. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v. 9, n. 6, p. 668-81, jan 1999.

YOUNG, D.; LAWLOR, P. A; LEONE, P.; DRAGUNOW, M.; DURING, M. J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. **Nature medicine**, v. 5, n. 4, p. 448-53, abr 1999.

ZHAO, C.; TENG, E M.; SUMMERS, R. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3-11, 2006.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-60, 2008