Aline Vilar Machado Nils

Treinamento em memória operacional espacial em
ratos idosos: efeitos na ansiedade, habituação e
densidade de células no hipocampo.

Spatial working memory training in aged rats:
effects in anxiety, habituation and density of cells in
the hippocampus.

São Paulo

2015

Aline Vilar Machado Nils

Treinamento em memória operacional espacial em
ratos idosos: efeitos na ansiedade, habituação e
densidade de células no hipocampo.

Spatial working memory training in aged rats:
effects in anxiety, habituation and density of cells in
the hippocampus.

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para obtenção de título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientador: Gilberto Fernando Xavier

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Machado-Nils, Aline Vilar

Treinamento de memória operacional espacial em ratos idosos: efeitos na ansiedade, habituação e número de células no hipocampo / Aline Vilar Machado Nils; orientador: Gilberto Fernando Xavier. São Paulo, 2015.

87 f.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, 2015.

1. Memória operacional espacial. 2. Envelhecimento. 3. Ansiedade. 4. Habituação. 5. Hipocampo. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II Título.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.(a) Dr (a) Gilberto Fernando Xavier

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura_____

Prof.(a) Dr (a) Miriam mendonça Morato de Andrade

Instituição: Universidade Estadual Paulista/FCL-Assis Assinatura_____

Prof.(a) Dr (a) Simone Cristina Mota

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura_____

Prof.(a) Dr (a) Fernando Canova

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

Assinatura_____

Tese defendida e aprovada em: 07/12/2015

À minha mãe

Sueli Aparecida Vilar Machado

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito ao meu esposo André, pela paciência e compreensão por minhas noites e madrugadas de ausência durante os experimentos e pela ajuda em alguns desses experimentos.

A meus pais Sueli e Adécio que sempre me incentivaram em todas as escolhas que fiz, o suporte emocional e por vezes financeiro que me deram me ajudou a sempre seguir em busca dos meus sonhos.

Muito obrigada a minha amiga, co-autora e companheira de madrugadas Livia Clemente, sua amizade, auxílio nos experimentos, ensinamentos e simplesmente as boas conversas e risadas tornaram essa jornada um pouco mais suave.

Minha gratidão a todos os colegas que passaram pelo laboratório de Neurociências e Comportamento-IB e pelo laboratório de Neurociências – ICB: Amrita Kumar, Amyres Ribeiro, Antônio Jaeger, Bárbara Onishi, Carolina Goulart, Cyrus Villas Boas, Diego Carvalho, Leopoldo Barletta, Kátia Yuahasi, Karen Rubim, Yasmin Rana. Cada momento de discussão contribuiu para minha formação e conclusão desse trabalho. Em especial aos amigos Daniel Giura, Elisa Jordão, Matheus Cruz, Silvia Honda, Victor Matsuda, Vitor Lee, cada contribuição e ajuda de vocês enriqueceu não somente o trabalho, mas a minha vida.

A Prof. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, obrigada por ter me auxiliado nos primeiros passos nesse projeto de doutorado e incentivado a saída do ninho, sinto saudades, espero que se orgulhe da sua antiga orientanda de onde estiver.

Aos técnicos Manoel Brito e Kelly Patrícia pelo suporte no cuidado com os animais e na realização das histologias, e pelo respeito e a amizade.

À Prof. Maria Inês Nogueira, pela colaboração, espaço em seu laboratório e pela atenção sempre solicita que me dedicou.

Ao Prof. Jackson Cioni Bittencourt pelo apoio me permitindo o uso dos equipamentos de seu laboratório, especialmente o criostato e o microscópio com o computador para a análise estereológica.

Ao meu orientador Prof. Gilberto Fernando Xavier, pela oportunidade e liberdade para pesquisar. As discussões e sugestões me auxiliaram muito no desenvolvimento do projeto. E, te observar como professor e orientador me modificaram como pessoa e profissional, muito obrigada pelos ensinamentos diretos e indiretos.

Agradeço a Fapesp e ao CNPq pelo suporte financeiro ao projeto.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Memória	1
1.2 Memoria Espacial	2
1.3 Memória e Envelhecimento	5
1.4 Envelhecimento e ansiedade	7
1.5 Treinamento cognitivo	8
2. OBJETIVO GERAL	11
2.1 Objetivos específicos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Sujeitos.....	12
3.2 Labirinto aquático de Morris.....	13
3.3 Labirinto em cruz elevado	17
3.4 Teste de Campo Aberto.....	19
3.5 Perfusão	21
3.6 Coloração de Nissl	21
3.7 Quantificação estereológica de densidade de células no hipocampo	22
3.8 Análise dos resultados.....	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Labirinto aquático de Morris.....	26
4.2 Teste e re-teste no Labirinto em cruz elevado.....	35
4.3 Teste de Campo Aberto.....	40
4.4 Quantificação de densidade células no hipocampo.....	46
5. DISCUSSÃO	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ANEXOS	74

RESUMO

O envelhecimento torna a memória particularmente vulnerável e em roedores, induz déficits no desempenho de tarefas que envolvem memória espacial e operacional. Além disso, o envelhecimento está associado a uma diminuição dos comportamentos exploratórios e com aumento na linha de base da ansiedade. Estratégias que visem à prevenção dos transtornos de ansiedade e deficiências cognitivas proporcionando a melhoria da qualidade de vida de idosos são de grande valia. O treinamento cognitivo previne processos de neurodegeneração e perdas da função hipocampal, promovendo uma melhora no desempenho de habilidades cognitivas. Porém, pouco se sabe como o treino em uma tarefa específica afeta outros aspectos cognitivos e emocionais.

Para testar os efeitos do treinamento em uma tarefa de memória operacional espacial na ansiedade, habituação e na densidade de células no hipocampo de ratos foram utilizados quatro grupos de animais. Ratos idosos e jovens treinados na tarefa de memória operacional (dependente do hipocampo) e idosos e jovens treinados em uma tarefa com pista visível (independente do hipocampo) no labirinto aquático de Morris (LAM). Após o término dos treinos os animais foram expostos ao teste e re-teste no labirinto em cruz elevado (LCE) e ao teste em campo aberto (TCA). Outros animais após os treinos foram perfundidos e os hipocampus foram processados em coloração de Nissl para quantificação da densidade de células no hipocampo.

Ocorreu um prejuízo na aquisição no LAM, nos animais idosos submetidos à tarefa de memória operacional e na tarefa com a pista visível, porém com o decorrer das sessões em ambas as tarefas os animais idosos apresentam níveis de desempenho semelhantes a dos jovens. O treinamento cognitivo em memória operacional espacial resulta em efeitos significativos sobre a diminuição de comportamentos similares a

ansiedade no LCE e a altera taxa de habituação no TCA em ratos idosos comparado aos animais idosos expostos a tarefa com a pista visível, entretanto não altera a densidade de células no hipocampo entre grupos jovens e idosos e entre os diferentes treinamentos.

O treinamento cognitivo em memória operacional no LAM tem efeitos significativos sobre níveis de ansiedade e taxa de habituação em animais idosos e parece ser uma tarefa promissora para investigações a natureza das modificações plásticas neurais resultantes do treinamento.

PALAVRAS-CHAVE: Memória operacional; Envelhecimento; Ansiedade; Habituação; Hipocampo.

ABSTRACT

Decline in memory functions are related to aging process. Spatial learning and memory deficits are induced by aging in rodents. Elderly also correlates with decreases in exploratory behaviour and increments in baseline anxiety. The development of strategies that focus on the prevention of anxiety disorders and cognitive disabilities are needed to improve the welfare. Cognitive training prevents neurodegeneration processes and loss of hippocampal function, and provides improvements on performance of cognitive skills. However, remains unclear how training on a specific task affects another cognitive and emotional aspects.

To evaluate the effects of training on spatial working memory task on anxiety, habituation and cell density in the hippocampus, we used aged and young rats trained in the working memory task (dependent of the hippocampus) or in a task with visible track (independent of the hippocampus) in the Morris water maze (MWM). After MWM training clousure the animals were exposed to the test and re-test in the elevated plus maze and the open field test. Subsequently to behavioural tests animals were perfused and the hippocampus was processed for Nissl staining to quantify the density of hippocampal cells.

The acquisition of the MWM task was disrupted in aged animals submitted to working memory task and visible platform task, however the aged animals were capable to learn the task during the training and exhibit similar performance to youngest. Cognitive training on spatial working memory leads to reduction of anxiety-like behaviours in the elevated plus maze and modify habituation rate in the open field in aged rats compared to animals that were exposed to visible task. Although no

differences were found in the hippocampus cell density between young and aged rats and also for different training.

Cognitive training on the working memory version of MWM leads to decrease of anxiety levels and habituation rate in aged animals and could be an important tool to investigate plastic neural changes induced by training.

KEY-WORDS: Working memory; Aging; Anxiety; Habituation, Hippocampus.

Lista de Abreviações

ANOVA	Análise de variância
CA	Corno de Ammon
EPM	Erro padrão da média
GD	Giro denteado
ITI	tempo de intervalo entre as tentativas
LAM	Labirinto aquático de Morris
LCE	Labirinto em cruz elevado
MWM	Morris Water Maze
TCA	Teste de campo aberto

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória

A aprendizagem corresponde à aquisição de informações que gera mudanças do comportamento. Memória envolve codificação, armazenamento (BONINI et al., 2007; KANDEL et al., 2000,), persistência e evocação das informações adquiridas. Cada uma dessas etapas pode ser caracterizada por alterações nos níveis celular, molecular e comportamental (CAMMAROTA et al., 2007; KANDEL et al., 2001).

Diferentes classificações vêm sendo propostas para as memórias, considerando sua função, conteúdo e tempo de duração. Em relação ao tempo algumas memórias podem durar somente alguns segundos, enquanto outras podem durar horas, dias, meses ou anos (SQUIRE & ZOLA, 1996). Em relação a este aspecto, as memórias são descritas como operacionais (ou “de trabalho” como preferem alguns) ou de curta duração, ou de longa duração.

A memória de longa duração se refere à retenção de informações por prolongados períodos de tempo. Em seres humanos ela vem sendo classificada em duas categorias principais: memórias explícitas ou declarativas, e aquelas que não são passíveis de verbalização, classificadas como memórias implícitas (SQUIRE & ZOLA, 1996).

A memória explícita está envolvida no conhecimento de fatos, pessoas e objetos, sendo passível de relato verbal (em humanos). A memória explícita inclui memória episódica, referente a experiências cujo contexto espacial e temporal são específicos, correspondendo a memórias autobiográficas, e memória semântica que envolve conhecimento factual independente do contexto espacial e temporal em que foi aprendido (TULVING, 1972).

A memória implícita, adquirida gradualmente por treinamento repetitivo, relaciona-se a habilidades percepto-motoras e hábitos (KANDEL, 2009) e pode ser avaliada por meio da execução habilidosa de uma tarefa. A evocação desse tipo de memória não raro requer poucos recursos atencionais, ou seja, pode-se executar uma ação habilmente sem ter de necessariamente prestar muita atenção ao mesmo.

1.2 Memória Espacial

A memória espacial é crítica para a sobrevivência, pois está relacionada com sua habilidade para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizações no ambiente. Essas informações permitem ao indivíduo localizar alimento e água em determinado hábitat, lembrar se esse local já foi forrageado, e recordar se há a presença de coespecífico ou predadores na área (HELENE & XAVIER, 2006).

Segundo O'keefe e Nadel (1978) o hipocampo é crucial para a aprendizagem e formação da memória espacial em diferentes grupos de mamíferos, além de estar envolvido na memória declarativa, contextual e episódica em seres humanos (JACOBS & SCHENK, 2003).

A Formação Hipocampal, consiste de um conjunto de estruturas prosencefálicas presentes em ambos os lobos temporais que, em mamíferos, inclui o Hipocampo propriamente dito [corno de Ammon (CA)], o Giro Denteado (GD), o Subículo e o córtex entorrinal (BUTLER & HODOS, 1996), e parece fundamental para a orientação espacial. O Hipocampo propriamente dito inclui pelo menos quatro populações distintas de neurônios: o CA1 que ocupa a maior parte da região dorsal, o CA3 que se estabelece na porção ventral, o CA2 situado entre o CA1 e o CA3, e o CA4 situado na transição entre o CA3 e o GD (BEAR et al., 2002; CARLSON, 2001; KANDEL et al., 2000). As

estruturas constituintes da formação hipocampal estão interligadas por um circuito excitatório preponderantemente unidirecional, com três projeções principais: (1) a via perfurante, constituída por fibras do córtex entorrinal que estabelecem sinapses com células granulares do giro denteado (2) das fibras musgosas, que se estendem das células granulares do GD e realizam sinapses com células piramidais da região CA3 do hipocampo e (3) os colaterais de Schaffer, constituídos por axônios da região CA3 que se conectam as células piramidais do CA1. Esse circuito é referido como circuito tri-sináptico do hipocampo (CARLSON, 2001; DOLLER & WEIGHT, 1982; HERRERAS et al., 1987; KANDEL et al., 2000).

Em roedores, a manutenção temporária de informações espaciais na memória, por envolver informações referentes a espaço e tempo, é considerada análoga à memória episódica dos seres humanos (O'KEEFE & NADEL, 1978). Essa manutenção temporária ativa de informações recém adquiridas ou reativadas da memória de longa duração, é identificada como memória operacional (BECKER & MORRIS, 1999).

O conceito de memória operacional foi desenvolvido separadamente por Honig (1978), em estudos envolvendo animais, e por Baddeley e Hitch (1974) em estudos envolvendo humanos (BADDELEY, 1986; BADDELEY, 1992; BADDELEY & HITCH, 1974).

O modelo de memória operacional descrito por Baddelay e Hitch (1974) consiste de um executivo central que se integra a um sistema de apoio especializado em informação verbal, a alça fonológica, e a outro sistema de apoio especializado em informações visuo-espaciais responsável pela execução de tarefas lógico-matemáticas. Acredita-se que o executivo central estaria relacionado ao funcionamento dos lobos frontais, a alça fonológica aos giros supra-marginal e angular do hemisfério esquerdo e cerebelo e a alça visuo-espacial ao funcionamento das regiões corticais visuais,

incluindo o córtex parietal posterior.

De acordo com Honig (1978), memória operacional se refere a informação que o animal mantém temporariamente para executar com êxito uma escolha em uma tarefa; posteriormente ao uso da informação, o animal deve esquecer essa informação para que ela não interfira no desempenho subsequente na tarefa.

Por exemplo, no labirinto radial de 8 braços (OLTON & SAMUELSON, 1976), os animais são colocados em uma área central de onde irradiam 8 braços, na extremidade de cada braço é depositado algum alimento. Na versão *delay-matching-to-sample*, um alimento é depositado na extremidade de um dos braços, o animal é colocado no centro da arena afim de escaneá-la até encontrar o braço que contém o reforço, essa é a fase de aquisição. Nela o animal deve se utilizar da memória operacional para reter a informação dos braços visitados que não contiam o reforço para não revisitá-los. Após encontrar o reforço o animal é retirado da arena por um intervalo de tempo de retenção estipulado pelo experimentador. Após o intervalo o animal é reapresentado ao labirinto que contém o alimento no mesmo braço, espera-se que ele utilize da memória operacional retendo a informação durante o intervalo do braço que continha o reforço para então revisitá-lo (CAMPOS & SAITO, 1999).

Manipulando-se os tempos de intervalo espera-se que os animais aprendam a manter a informação da localização do reforço na memória operacional enquanto essa informação for útil e em uma segunda exposição ao labirinto em uma nova sessão a informação deve ser descartada e uma nova informação deve ser adquirida, dessa maneira a informação retida na memória operacional depende de um contexto temporal em que é válida, não simplesmente decaindo com a passagem do tempo (OLTON, 1990; XAVIER, 1993).

Outros aspectos da tarefa são armazenados na memória de referência, como a

existência do alimento no final do braço, quantas tentativas o animal será exposto, qual regra seguir na tentativa de escolha. A memória de referência não depende de uma distinção temporal dos eventos, pois a informação adquirida aplica-se sempre a todos os eventos envolvendo aquela condição (KESNER, 1986; OLTON, 1990).

Lesões na fimbria-fornix, principal via de conexão do hipocampo com outras regiões nervosas, prejudicam a memória operacional, tanto em tarefas de localização espacial como de discriminação e reconhecimento de objetos (não espaciais), mas não prejudica a memória de referência (OLTON & FEUSTLE, 1981; OLTON & PAPAS, 1979), enfatizando a importância da função hipocampal para memória operacional.

Ambos os modelos de memória operacional de Baddeley e Hitch (1974) e Honig (1978) são válidos e trazem contribuições importantes para a compreensão da sobre o armazenamento temporário de informação, mas eles apresentam organização e funções cognitivas distintas, além da localização anatômica diferente (BECKER & MORRIS, 1999). No presente trabalho foi utilizado o conceito de memória operacional de Honig (1978) como base para a compreensão dos processos de treinamento em memória operacional e sua influência em outros comportamentos, como ansiedade e habituação e no processo de envelhecimento.

1.3 Memória e Envelhecimento

MEDAWAR (1955) definiu o envelhecimento como um conjunto de processos biológicos que aumenta progressivamente a probabilidade do organismo vivo morrer. Esses processos biológicos incluem um declínio progressivo das funções normais do organismo e o torna mais susceptível a doenças, aumentando assim sua probabilidade de morte. O declínio cognitivo é uma das alterações que mais influencia a qualidade de vida e a independência de indivíduos idosos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE

SAÚDE, 2002).

O envelhecimento torna a memória episódica particularmente vulnerável, isto é, pessoas idosas são mais suscetíveis a esquecerem do contexto de ocorrência de um evento do que o evento propriamente dito (MCLNTYRE & CRAIK, 1987; SHARMA et al., 2010). Em roedores, o envelhecimento induz déficits no desempenho de tarefas que envolvem memória espacial e operacional (AGGLETON et al., 1989; BATUECAS et al., 1998; GALLAGHER & PELLEYMOUNTER, 1988; LINDNER et al, 1992).

Aggleton e colaboradores (1989) investigaram o desempenho de ratos idosos em tarefas que requerem memória operacional espacial e memória operacional não espacial e observaram prejuízos nas tarefas espaciais, mas não nas tarefas não espaciais. O envelhecimento gera também maior prejuízo na habituação, considerada uma das formas mais simples de aprendizagem não associativa, na qual ocorre a atenuação da percepção a estímulos repetitivos inicialmente neutros, de extrema importância para a interação do organismo com o ambiente (RANKIN et al., 2009), a componentes espaciais em relação a componentes não espaciais (SHUKITT-HALE et al, 2001).

O envelhecimento está associado a uma diminuição dos comportamentos exploratórios (ADRIANI et al, 1998; MORA-GALLEGOS et al., 2015; SEGOVIA et al, 2009), mas não necessariamente uma redução da locomoção em si (AMASSARI-TEULE et al, 1994; MORA-GALLEGOS et al., 2015) no teste de campo aberto (TCA), o que pode ser interpretado como reflexo da integridade da memória não associativa durante o envelhecimento ou da integridade da motricidade dos animais envelhecidos (AMASSARI-TEULE et al., 1994; MORA-GALLEGOS et al., 2015).

Essas deficiências comportamentais associadas ao envelhecimento parecem estar ligadas a mudanças na fisiologia sináptica hipocampal, na sua organização

neuroquímica, na micro-anatomia das conexões e na capacidade em manter a potenciação de longo prazo, prejudicadas com o envelhecimento (BANERS, 1994; BANERS et al., 1997; FARRELL, 2012; GEINISMAN et al., 1995; KENNARD et al., 2013; LANDFIELD, 1988; SAMSON & BARNES, 2013).

1.4 Envelhecimento e ansiedade

Além das alterações cognitivas ao longo do envelhecimento, parece ocorrer também aumento da ansiedade (GALLAGHER & BURWELL, 1989; MARKOWSKA et al, 1989). A ansiedade é uma emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco, quando o estímulo aversivo é incerto (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988). Ratos adultos a partir de 120 dias apresentam redução do número de entradas nos braços abertos em um labirinto em cruz elevado (LCE), comportamento indicativo de maior ansiedade a partir dessa idade (IMHOF et al, 1993). Esse comportamento é usualmente relacionado ao instinto de explorar lugares novos, se contrapondo ao seu medo inato de lugares abertos e altos.

Transtornos de ansiedade em humanos idosos são relacionados à doença arterial coronariana, perda da independência, distúrbios do sono e depressão, prejudicando assim a qualidade de vida global (DE BEURS et al, 1999; GELLIS, 2006; LENZE et al, 2000; POTVIN et al, 2014).

Um dos tratamentos eficazes para a ansiedade em idosos é a terapia cognitivo-comportamental (WETHERELL et al, 2003). No entanto, essa melhora é restrita em indivíduos com déficits em funções executivas, como atenção, controle e planejamento de estratégias (MOHLMAN & GORMAN, 2005).

A terapêutica farmacológica sobre os sintomas dos transtornos de ansiedade não é totalmente eficaz em indivíduos idosos, tendo muitas contraindicações (ANDREWS et al, 2004). Considerando que terapias farmacológicas e psico-comportamentais, não são totalmente eficazes, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias que visem a prevenção dos transtornos de ansiedade associados ao envelhecimento proporcionando a melhoria da qualidade de vida de idosos.

1.5 Treinamento cognitivo

Atividade física, enriquecimento ambiental e treinamento cognitivo vêm sendo utilizados para combater os efeitos do processo neurodegenerativo e perda da função hipocampal em indivíduos jovens e idosos (KEMPERMANN et al., 1998, 1997; LANDERS et al, 2011; LIU & HE, 2012; LÖVDÉN et al., 2012; NITHIANANTHARAJAH & HANNAN, 2009)

Idosos fisicamente ativos tem risco reduzido de declínio cognitivo e demência (HAMER & CHIDA, 2009; SOFI et al, 2011). A atividade física está associada a um melhor condicionamento cardiovascular, que resulta em melhora em funções executivas e memória (BARNES et al, 2003; CASSILHAS et al, 2007; GORDON et al, 2008). O exercício físico induz o aumento de fatores neurotróficos no cérebro, possibilitando aumento da plasticidade neuronal, como neurogênese, sinaptogênese e angiogênese (COTMAN et al, 2007; NEEPER et al, 1995; PARK et al, 2013).

O enriquecimento ambiental parece ter um efeito semelhante à atividade física sobre os fatores que geram a plasticidade neuronal em idosos (KEMPERMANN et al, 1998; MORA et al, 2007; MORA 2013). Iniciado o enriquecimento na infância ou na

velhice, mantendo-o por uma fase prolongada ou curta de vida, os efeitos benéficos parecem ser equivalentes sobre as taxas de neurogênese e a melhora cognitiva (HARATI et al, 2011; KEMPERMANN et al, 1998; KEMPERMANN et al, 2002; LEAL-GALICIA et al, 2008). Portanto, alterações ambientais podem contribuir para a plasticidade neural moldando estruturas e funções cerebrais (HANNAN, 2014; HERRING et al, 2009; LANDAU et al, 2012; ROBERTSON, 2014)

O treinamento cognitivo, por sua vez, pode minimizar sinais de degeneração, aumentando volume cerebral, espessura e densidade cortical (ENGVIG et al., 2010; LUSTIG et al., 2009), além de melhorar o desempenho em tarefas cognitivas (BERARDI et al, 2007; HARATI et al, 2011; JANKOWSKY et al, 2005).

Dado que os componentes atencionais e a própria memória operacional espacial são as funções cognitivas mais prejudicadas pelo processo de envelhecimento (BADDELEY, 1998). Intervenções que se foquem na reabilitação dessas funções cognitivas podem ter maior eficácia em indivíduos idosos.

O treinamento cognitivo de memória operacional vem se mostrando eficaz em promover melhora no desempenho de habilidades cognitivas, como atenção, funções executivas e velocidade do processamento (ANGUERA et al., 2013; BALLETT et al., 2010; EDWARDS et al., 2005; MOZOLIC et al., 2011; NOUCHI et al., 2012; SZELAG & SKOLIMOWSKA, 2012; TORIL et al., 2014; WILLIS et al., 2006). Mudanças induzidas pelo treino como aumento da capacidade da própria memória operacional, podem produzir aumento de desempenho em outras habilidades cognitivas por aproveitarem dos mesmos recursos estruturais que a memória de trabalho (BORELLA et al, 2010; DAHLIN et al, 2008).

O treinamento cognitivo pode ter efeitos a níveis de remodelação local de

proteínas e sinapses, que também contribui para uma reorganização global com reorganização das fibras neuronais, ampliando a rede de conexões (FOSTER, 2015). Além disso, treinamento no LAM na tarefa que requer memória operacional promove um aumento da sobrevivência de novos neurônios no hipocampo de ratos adultos jovens (TEIXEIRA, 2013). E o treinamento ativa mais áreas encefálicas permitindo uma compensação no desempenho dos animais idosos na execução das tarefas (EYLER et al, 2011; HEUNINCKX et al, 2008; KAMAGOE et al, 2015). É concebível que a plasticidade neural, promovida pelo treinamento cognitivo, seja dependente da arquitetura flexível das redes sinápticas e da neurogênese, promovendo maior conectividade, facilitando caminhos de transmissão e, portanto, aumentando a eficiência cognitiva global (GARD et al., 2014).

Porém, pouco se sabe como capacidades cognitivas treinadas são transferidas para capacidades não treinadas e como o treino em uma tarefa específica afeta outros aspectos cognitivos e emocionais (GREEN & BAVELIER, 2008; MARTIN et al., 2011). Em humanos diversos fatores como motivação, desejo de ser reconhecido ou agradar o treinador podem estimular melhora de desempenho e modificar fatores cognitivos e emocionais que não originários propriamente do treinamento específico na tarefa (GREEN & BAVELIER, 2008). Desse modo parece relevante identificar modelos que ajudem a caracterização do contexto de treinamento que resultem em melhorias globais para o indivíduo, além de se constituírem modelos potenciais para a compreensão de que fatores contribuem para as modificações geradas pela aprendizagem.

No presente estudo investigou-se os efeitos do treinamento em tarefa que requer memória operacional sobre a ansiedade, habituação e densidade de células hipocampais em ratos jovens e idosos.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar em que extensão o treinamento numa tarefa que requer memória operacional altera os níveis de ansiedade e habituação, e a densidade de células no hipocampo em ratos idosos em comparação a animais jovens.

2.1 *Objetivos específicos*

- a) Analisar o desempenho da memória operacional espacial (que é dependente da função hipocampal) de animais idosos, em comparação a animais jovens, e também o desempenho desses animais em tarefa independente da função hipocampal, ambas no Labirinto Aquático de Morris
- b) Avaliar eventuais alterações comportamentais relacionadas à ansiedade na tarefa do Labirinto em Cruz Elevado, em ratos idosos e jovens expostos previamente ao treinamento em versões dependentes e independentes da função hipocampal, ambas no Labirinto aquático de Morris.
- c) Avaliar eventuais alterações comportamentais relacionadas à habituação na tarefa do Campo Aberto, em ratos idosos e jovens expostos previamente ao treinamento em versões dependentes e independentes da função hipocampal, ambas no Labirinto Aquático de Morris.
- d) Avaliar eventuais alterações na quantidade de células nas áreas CA1, CA3 e giro denteado no hipocampo de ratos jovens e idosos expostos ao treinamento em versões dependentes e independentes da função hipocampal, por meio de

análise esterereológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Sujeitos*

Foram utilizados 48 ratos da linhagem *Wistar*, machos, jovens (3 a 4 meses) e idosos (18 a 19 meses), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP. Os animais foram inicialmente mantidos sob ciclo claro/escuro com 12h claro/12h escuro, com a luz se acendendo as 07h 00.

Posteriormente, a iluminação foi alterada para esquema de foto-período-esqueleto, com 11h30 de luz tênue (5 lux) e 30 min de luz intensa (1000 lux). Esse esquema de iluminação visa propiciar que ao serem deslocados para o ambiente de experimentação os animais não passem por modificações de intensidade luminosa, garantindo a manutenção do seu ritmo sono/vigília. O foto-período-esqueleto foi mantido até o termino dos experimentos comportamentais e da perfusão dos animais.

Os animais foram mantidos em caixa individuais, com temperatura de $23^{\circ}\text{C}\pm 2$, e com fornecimento de alimentação e água *ad libitum*. O protocolo experimental, que atende às exigências legais e éticas presentemente vigentes, foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Vertebrados em Experimentação, do Instituto de Biociências da USP (protocolo nº. 131/2011).

3.2 *Labirinto aquático de Morris (LAM)*

O desenho experimental adotado envolve um arranjo 2 x 2, tendo como um dos fatores a idade, incluindo (1) animais jovens e (2) animais idosos, sendo o outro fator o tipo de treino no Labirinto Aquático de Morris, incluindo (3) tarefa espacial, em que a plataforma fica submersa e sua execução requer o uso de memória operacional espacial (SANTOS, 1999), cujo desempenho é dependente da integridade da função hipocampal (XAVIER et al., 1999) e (4) tarefa visual, em que a plataforma é visível (ver adiante), condição que não demanda orientação espacial e não requer integridade do hipocampo para seu desempenho (DA CUNHA et al., 2007). A lógica para esse arranjo experimental é que os animais expostos à tarefa visual representem um grupo controle exposto a todas as estimulações proporcionadas pela exposição ao labirinto aquático (manipulação pelo experimentador, imersão na água e esforço físico durante a atividade de nadar, entre outras), exceto a orientação espacial. Dessa forma, o experimento incluiu 4 grupos experimentais:

- a) **Jovem Espacial (JE):** ratos de 3 a 4 meses expostos ao treinamento na versão que requer **memória operacional espacial no LAM;**
- b) **Jovem Visual (JV):** ratos de 3 a 4 meses expostos ao treinamento na versão com a **plataforma visível no LAM;**
- c) **Idoso Espacial (IE):** rato de 18 a 19 meses exposto ao treinamento na versão que requer **memória operacional espacial no LAM; e**
- d) **Idoso Visual (IV):** rato de 18 a 19 meses exposto ao treinamento na versão com a **plataforma visível no LAM.**

Aparelho

O LAM consiste de uma piscina circular com 200 cm de diâmetro e 50 cm de altura, preenchida com água (a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$) até a altura de 30 cm; a água é tornada opaca pela adição de 200-300 ml de leite integral (Figura 1). As paredes internas da piscina são pretas. Uma plataforma móvel de acrílico transparente medindo 9 cm de diâmetro é colocada em locais definidos da piscina, 1-2 cm abaixo do nível da água, permitindo ao animal subir nela como forma de fuga da água. Nas paredes da sala são colocadas pistas salientes, que servem de referência para orientação espacial do animal durante os treinos.

A piscina foi virtualmente dividida em 4 quadrantes, no centro de cada quadrante havia um local para posicionamento da plataforma, e foi delimitada uma área virtual circular concêntrica à plataforma, com diâmetro de 3 vezes maior ao da plataforma chamada de contador crítico. Essas divisões tem o objetivo facilitar a análise e verificar como ocorre a busca pela plataforma realizada pelos animais. Há uma câmera centralizada acima da piscina ligada a um microcomputador para registro da tarefa.

Figura 1. Esquema representativo do Labirinto Aquático de Morris, utilizado para a realização dos testes. As linhas cinza representam as divisões virtuais dos quadrantes. A área circular representada em azul escuro, concêntrica a área da plataforma, representa o contador crítico. As setas com letras W, T, N, R, E, D, S, O indicam os pontos de inserção do animal na água.

Protocolo experimental

Foi realizada uma sessão de treino por dia, com três tentativas por sessão; o intervalo de tempo entre as tentativas (ITI – “*intertrial interval*”, do inglês) foi inicialmente de 10 minutos (ITI 10). A cada nova sessão a plataforma foi inserida numa localização distinta, sendo mantida constante nas demais tentativas do dia. Isso exige que o animal encontre a plataforma na primeira tentativa. Nas demais tentativas essa informação pode ser utilizada para chegar mais rapidamente a plataforma. Esse esquema foi mantido por 10 dias. Posteriormente o ITI passou a ser 30 minutos (ITI 30) por 5 dias e para 60 minutos (ITI 60) por 5 dias adicionais, sempre alterando a localização da plataforma a cada nova sessão. Esse aumento no ITI requer que o animal mantenha a

informação sobre a localização da plataforma em cada dia por mais tempo na memória operacional, dificultando progressivamente a manutenção da informação sobre a localização da plataforma. As sessões foram sempre realizadas às 22hs (3 horas após o apagar das luzes), com a sala experimental mantida com iluminação de 5 lux na altura dos olhos do animal que correspondia a mesma luminosidade utilizada nas caixas de manutenção. Assim, em decorrência do uso do foto-período esqueleto, ao realizar a tarefa em um horário em que os animais estavam em sua fase ativa, não prejudicamos suas horas de sono por mudanças de luminosidade e evitamos os prejuízos que a privação de sono usualmente causa sobre a aprendizagem.

Na tarefa de memória operacional espacial a localização da plataforma foi diferente a cada sessão, mas foi mantida constante ao longo das tentativas de uma mesma sessão. Assim, na primeira tentativa de cada sessão, os animais desconheciam a localização da plataforma, e deveriam encontrá-la por busca e esquadrinhamento. Então, nas demais tentativas da mesma sessão, poderiam valer-se da memória operacional espacial sobre a localização da plataforma naquele dia para escapar da água mais rapidamente (para detalhes, ver SANTOS, 1999). O desempenho dessa tarefa é dependente da integridade do hipocampo.

Na tarefa envolvendo a plataforma visível foi semelhante à descrita acima, mas havia uma bola de isopor medindo 7 cm de diâmetro 15 cm acima da plataforma submersa, indicando assim seu local. A plataforma foi apresentada num novo local a cada tentativa, para minimizar o engajamento da memória espacial. A cada tentativa o animal foi liberado de um ponto diferente da borda da piscina, numa ordem aleatória, valendo-se da visualização da plataforma para dirigir-se a ela, o que determina que a tarefa envolva apenas um guiamento visual e não a orientação espacial no ambiente.

O uso da plataforma submersa (portanto invisível) em associação com a liberação dos animais em pontos distintos da borda a cada nova tentativa, força os animais a adotarem estratégias espaciais, envolvendo mapas cognitivos, na orientação. No caso da plataforma visível, a orientação espacial não gera qualquer benefício de desempenho, restando ao animal abandoná-la.

Cada tentativa teve uma duração máxima de 120 segundos. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo máximo, ele era manualmente guiado pelo experimentador até ela, onde permaneceu por 15 segundos.

A câmera de vídeo posicionada sobre o labirinto permitiu registrar (1) a latência, isto é, o tempo decorrido desde a liberação do animal na borda até este encontrar a plataforma, (2) o comprimento do trajeto na piscina, (3) o tempo de permanência em cada um dos quadrantes da piscina, (4) o tempo de permanência em cada um dos “contadores” e (5) velocidade média do nado, por meio do programa Ethovision (Noldus, versão 3).

3.3 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Sujeitos

Oito dos animais de cada grupo previamente treinado no LAM nas tarefas dependente e independente do hipocampo, foram submetidos ao teste no labirinto em cruz elevado (LCE) um dia após o término das sessões de treino.

Aparelho

O LCE é confeccionado com acrílico branco, possui dois braços abertos (50 x 10

x 1 cm – note que as paredes medem 1 cm de altura) opostos pelo centro e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm - note que as paredes medem 40 cm de altura) também opostos pelo centro (Figura 2). O labirinto é montado sobre uma plataforma elevada 50 cm do assoalho. Os braços se cruzam perpendicularmente formando uma cruz, com uma área central de 10 x 10 cm, chamado de quadrado central.

Figura 2. Esquema representativo do labirinto em cruz elevado, contendo dois braços abertos e dois braços fechados, elevado 50 cm do chão.

Protocolo experimental

Os testes foram realizados entre as 15:00 e 16:00 h no dia que se seguiu ao término do treinamento no LAM. Cada animal foi colocado no quadrado central do LCE com a cabeça voltada para o braço fechado. O animal explorou livremente o labirinto por 5 minutos. Foi então retirado do labirinto e ficou em sua gaiola por 5 minutos. Após esse intervalo, retornou ao labirinto para uma segunda sessão de mais 5 minutos de livre exploração. Antes e após as sessões o labirinto foi limpo com uma solução de álcool a 10%. As sessões foram gravadas por meio de uma câmera de vídeo

posicionada acima do labirinto ligada a um microcomputador. Posteriormente, procedeu-se a quantificação a frequência de entradas e o tempo de permanência em cada braço e também no quadrado central, por meio do no programa X-plo-rat (2005). Com base nesses parâmetros foram calculadas a percentagem de *entradas* nos braços abertos e a percentagem de *tempo* nos braços abertos, parâmetros usualmente tomados como refletindo (inversamente) os níveis de ansiedade dos animais. Também foram mensurados o tempo no quadrado central, medida usualmente relacionada a avaliação de risco, o tempo de permanência na extremidade do braço fechado, relacionado à evitação de conflito, e número de entradas nos braços fechados, relacionado com a atividade locomotora.

3.4 Teste de Campo Aberto (TCA)

Sujeitos

Os mesmos animais expostos ao LCE foram, no dia seguinte, expostos às sessões do teste de campo aberto (TCA).

Aparelho

O TCA é realizado numa arena circular com 1 m de diâmetro, com paredes de acrílico preto com 60 cm de altura. Em suas paredes internas são realizadas marcações que servem como pistas espaciais (Figura 3). A arena foi virtualmente dividida em quadrados de 20 x 20cm, a fim de contabilizar a locomoção do animal.

Figura 3. Esquema representativo da arena utilizada no teste do campo aberto com as linhas, em azul, representando as divisões virtuais para mensuração da atividade locomotora.

Protocolo experimental

Os testes foram realizados em uma sala iluminada com 5 lux, entre as 20 e 22h. Cada animal foi colocado na arena próximo a borda com a cabeça voltada para a parede. Então pode explorá-la livremente, ao longo de 5 minutos, numa primeira sessão. Vinte e quatro horas depois os animais foram reexpostos à arena, nas mesmas condições de teste, por 5 minutos adicionais. As sessões foram gravadas por uma câmera posicionada acima da arena e ligada a um computador. Para fins de análise a sessão foi dividida em 5 blocos de 1 minuto cada.

Posteriormente os comportamentos foram analisados utilizando o programa Etholog 2.2.5 (OTTONI, 1999). Foram computados o tempo de execução e a frequência de ocorrência dos comportamentos: **Locomoção**, que se caracteriza pela movimentação total do corpo pela arena; **Ficar em pé** ação em que o animal levantar-se sobre as patas posteriores e **Cheirar**, caracteriza-se pela movimentação parcial do corpo com direcionamento do focinho em diferentes regiões da arena. Também foi computado o

número de vezes que o animal cruzou um quadrado durante uma sessão. Esses primeiros classificados como **comportamentos exploratórios**. E também foram computados os comportamentos de **autolimpeza**, caracterizado por lambidas em partes do corpo; **coçar**, quando o animal fricciona uma pata sob seu corpo e **parado**, incluindo os comportamentos de congelamento, imobilidade e sono (NAHAS, 1999).

3.5 Perfusão

Após o término das sessões de treinamento, quatro animais de cada grupo foram anestesiados com uma mistura de quetamina (20 mg/Kg) e xilasina (10 mg/Kg). Então, foram submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente, com solução tamponada de paraformaldeído a 4%, para fixação do tecido nervoso. A seguir os encéfalos foram processados envolvendo procedimentos de criopreservação em sacarose a 30% tamponado por 72 horas a 4 °C. Após esse processo os encéfalos foram congelados em isopentano resfriado com gelo seco e mantidos em *freezer* -80 °C até serem seccionados.

3.6 Coloração de Nissl

Os encéfalos foram seccionados em criostato com espessura de 40 µm. As secções foram fixadas em lâminas gelatinizadas e ficaram secando por 24 horas em estufa a 40 °C. As secções foram coradas no método de Violeta de Cresil para facilitar a visualização dos corpúsculos de Nissl dos corpos de neurônios e assim possibilitar a contagem das células na região hipocampal. O processo de coloração consistiu em imergir as secções primeiramente em duas soluções de Xilol. Em seguida foram

submersas numa sequência decrescente de soluções alcoólicas (100%, 100%, 95%, 70%, 50%), água destilada, por 2 minutos em cada solução, para reidratação. Posteriormente foi imersa no corante Violeta de Cresil por 4 minutos e logo depois as secções foram imersas em água destilada por 30 segundos e começou o processo de desidratação primeiramente com álcool 50% e 70% por 30 segundos cada, e submetidas ao processo de diferenciação com álcool 70% com 1% de ácido acético por 5 segundos. Após essa etapa as secções foram desidratadas com álcool 95%, álcool 100%, e diafanizadas com xilol, por 1 minuto em cada solução. Em seguida as lâminas foram montadas com permount e lamínulas.

3.7 Quantificação estereológica de densidade de células no hipocampo

A quantificação estereológica das células hipocampais foi realizada com o software Stereo Investigator versão 10, a análise quantitativa estereológica foi realizada nas dependências do Departamento de Anatomia no ICB-USP em colaboração com o Professor Doutor Jackson Cioni Bittencourt.

Foram utilizadas 4 secções por animal, n=4/grupo, foi analisada uma secção a cada 320 µm, unilateralmente no hipocampo. A primeira secção hipocampal utilizada foi corresponde à coordenada estereológica interaural 6.60 mm, bregma -2.40 mm, onde ocorre a divisão da camada granular do giro denteado (PAXINOS & WATSON, 1997). As secções foram coradas com violeta de cresil, permitindo a delimitação das estruturas em microscópio óptico acoplado a sistema de estereologia constituído por uma platina motorizada (LudlElectronicProducts, Hawthorne, NY), câmara para captura (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) e o software StereoInvestigator (MBF Biosciences, Williston, VT). Para a delimitação das estruturas hipocampais foi utilizada a objetiva de 4x. A delimitação das regiões CA1, CA3 e GD, foi realizada de forma a padronizar as

regiões nos diferentes níveis ao longo do eixo rostro-caudal. Os critérios utilizados para sub-divisões do hipocampo se basearam nas seguintes características anatômicas: a fissura hipocampal separa o GD de CA1, além disso os corpos celulares das células granulares de GD tem diâmetro aproximadamente de 7 μm (CLAIBORNE et al, 1986). Os corpos celulares das células piramidais se diferenciam em CA1 e CA3 medindo de 40 a 60 μm em CA3, enquanto que em CA1 medem de 20 a 40 μm . A camada molecular do CA contém os dendritos apicais das células piramidais, sendo em CA3 mais espessos e curtos que em CA1 (TAUPIN, 2007). Desta forma, a região delimitada como CA3 englobou também CA2 e CA4 (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicroscopia de campo claro de corte coronal do encéfalo de rato (3 meses) com representação das delimitações no hipocampo para realização da análise estereológica das regiões CA1 (linha azul), CA3 (linha verde), GD (linha vermelha), em secção processada por técnica coloração de Nissl. Aumento de 4 x. Barra 500 μm .

Após definida a área de interesse, foi realizado estudo-piloto para determinação do tamanho do “grid size”, quantidade e tamanho das “counting frames” de acordo com a idade do animal e tamanho da estrutura, tendo em mente atingir um valor de coeficiente de erro de Gundersen ($m=1$) menor que 0,10. Os mesmos parâmetros foram

mantidos em todas as regiões e ao longo das secções no eixo rostro-caudal (Tabela 1). A contagem foi realizada com o recurso “Optical Fractionator” do software, tendo sido utilizada a focalização do nucléolo.

Tabela 1. Parâmetros utilizados para a estimativa estereológica das células marcadas na coloração de Nissl no hipocampo de ratos *.

Parâmetros/grupo	Jovem	Idoso
Counting Frame Area (XY) (μm^2)	1,6	1,6
Disector Height (Z) (μm)	10	10
Guard Zone Distance (μm)	01	01
Counting Frame Width (X) (μm)	40	40
Counting Frame Height (Y) (μm)	40	40
Sampling Grid (X) (μm)	245	245
Sampling Grid (Y) (μm)	136	136
Section Evaluation Interval	8	8

*Tabela mostrando os parâmetros utilizados para a estimativa estereológica utilizando o recurso “Optical Fractionator” do software Stereo Investigator, versão 10. Tais parâmetros foram identificados almejando-se obter coeficientes de erro de Gundersen ($m=1$) menores que 0,10.

Devido à característica da marcação de células na coloração de Nissl em diferentes tonalidades, foi padronizado a faixa de intensidade mínima de coloração a ser considerada na contagem, intensidade de azul claro não foram consideradas na contagem, como indicado na Figura 5.

Figura 5 – Fotomicroscopia de campo claro de corte coronal do encéfalo de rato (3 meses) da região CA3. Representação das células que foram contabilizadas indicadas pelas setas pretas e de células não contabilizadas indicadas pelas células brancas. Aumento de 40x. Barra 100 μ m.

3.8 Análise dos resultados

Para fins de análise do desempenho no teste de memória operacional foram incluídas as sessões 6 a 10 com ITI10, 11 a 15 com ITI30, e 16 a 20 com ITI60. A exclusão das 5 sessões iniciais da análise almejou analisar o desempenho dos animais numa fase já mais estável do desempenho, depois que a tarefa já havia sido adquirida, proporcionando assim uma comparação mais fidedigna do impacto do aumento do ITI sobre o desempenho dos animais. Para facilitar a visualização dos resultados, foram calculadas médias por tentativa, em função do ITI.

Os resultados do teste de memória operacional espacial e do teste da plataforma visível no LAM foram analisadas utilizando ANOVAs para medidas repetidas (doravante chamada simplesmente ANOVA), com grupos como fatores entre sujeitos e

ITI e tentativas como fatores intra-sujeito. O teste de Tukey-Kramer foi utilizado como teste *post-hoc*.

Os resultados obtidos no LCE foram analisados utilizando uma ANOVA para medidas repetidas, com grupo como fator entre-sujeitos e sessões como fatores intra-sujeito. O teste de Fisher foi utilizado como teste *post-hoc*.

Os resultados do TCA foram analisados utilizando uma ANOVA para medidas repetidas com grupo como fatores entre-sujeitos e blocos e sessões como fatores intra-sujeitos e o teste de Fisher foi utilizado como teste *post-hoc*.

As estimativas estereológicas do número de células nas diferentes regiões hipocâmpais foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, posteriormente, a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis.

Em todas as análises estatísticas considerou-se haver diferença significativa quando os P-valores foram menores que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Labirinto aquático de Morris

Memória operacional espacial

Os resultados são apresentados na Figura 6.

Em relação a latência (Figura 6A), a ANOVA revelou efeitos significativos envolvendo os fatores Grupo, ITI e Tentativa (Tabela 2). Isto é, os animais jovens consomem menos tempo para encontrar a plataforma em relação aos animais idosos.

Embora ambos os grupos apresentem melhora de desempenho ao longo das tentativas (Figura 6), houve interação significativa entre Grupo e ITI (Tabela 2), indicando que a melhora exibida pelo grupo jovem ao longo do treinamento com diferentes ITIs foi mais acelerada em relação aos animais idosos. Note ainda que os animais idosos também exibem melhora de desempenho nos diferentes ITIs, indicando que mesmo havendo um aumento da dificuldade da tarefa pelo aumento do tempo crítico durante o qual a informação sobre a localização da plataforma deve ser mantida na memória operacional, os animais melhoraram seu desempenho ao longo das sessões de treino. No conjunto, esses resultados refletem que a aquisição da tarefa, embora mais lenta nos animais idosos, ocorre se houver quantidade suficiente de treinamento.

Em relação ao percurso (Figura 6B), a ANOVA revelou diferenças significativas envolvendo os fatores Grupo, ITI e Tentativa (Tabela 2). Os animais jovens apresentam percursos menores, portanto mais eficientes, para encontrar a plataforma em relação aos animais idosos. Ambos os grupos exibiram melhora de desempenho ao longo das tentativas, apresentando trajetos menores para encontrar a plataforma (Figura 6B), efeito também observado nos diferentes ITIs, apesar do seu aumento (Tabela 2). Assim como na latência, o percurso também revelou interações significantes envolvendo os fatores Grupo e ITI (Tabela 2). De fato, a Figura 6B denota que a melhora de desempenho foi mais rápida nos animais jovens do que nos idosos. O teste post-hoc confirmou a existência de diferença significativa entre os grupos jovens e idosos.

Figura 6. Médias ($\pm$ E.P.M.) da latência expressa em segundos (A) e dos trajetos expressos em centímetros (B), em função das três tentativas, considerados os blocos de 5 sessões nos ITI 10, 30 e 60 para os grupos jovem e idoso na tarefa de memória operacional espacial.

Tabela 2. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e respectivos p-valores, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão que requer memória operacional, para os animais jovens e idosos.

<i>Variáveis</i>	<i>Grupo</i>	<i>ITI</i>	<i>Tentativa</i>	
Latência	F_(1,732)=43,10; p < 0,05	F_(2,732)=5,41; p < 0,05	F_(2,732)= 42,80; p < 0,05	
Percurso	F_(1,732)=10,17; p < 0,05	F_(3,980)=4,33; p < 0,05	F_(2,732)= 41,71; p < 0,05	
Velocidade	F_(1,732)=407,43; p < 0,05	F _(3,980) =1,56; p = 0,20	F_(2,732)= 12,20; p < 0,05	
%FQCant*	F _(1,781) =0,07; p = 0,78	F _(2,781) =0,39; p = 0,67	F_(2,781)= 5,83; p < 0,05	
%TQCant*	F _(1,781) =0,45; p = 0,50	F _(2,781) =0,02; p = 0,97	F_(2,781)=4,46; p < 0,05	
%FCCant*	F _(1,781) =2,01; p = 0,15	F _(2,781) =1,09; p = 0,33	F_(2,781)=18,10; p < 0,05	
%TCCant*	F _(1,781) =1,72; p = 0,18	F _(2,781) =1,04; p = 0,35	F_(2,781)=21,19; p < 0,05	
<i>Interações</i>				
	<i>Grupo x ITI</i>	<i>Grupo x Tentativa</i>	<i>ITI x Tentativa</i>	<i>Gr x ITI x Tent</i>
Latência	F_(2,732)=6,85; p < 0,05	F _(2,732) = 1,94; p = 0,14	F _(4,732) = 1,90; p = 0,10	F _(4,732) = 0,69; p = 0,59
Percurso	F_(2,732)=8,62; p < 0,05	F _(2,732) = 2,23; p = 0,10	F _(4,732) =2,33; p = 0,054	F _(4,732) = 0,67; p = 0,60
Velocidade	F _(2,732) =0,89; p = 0,40	F _(2,732) =0,92; p = 0,39	F _(4,732) =1,91; p = 0,10	F _(4,732) = 1,90; p = 0,10
%FQCant*	F _(2,781) =0,42; p = 0,65	F _(2,781) =0,47; p = 0,62	F _(4,781) =0,08; p = 0,98	F _(4,781) =0,14; p = 0,96
%TQCant*	F _(2,781) =2,24; p = 0,10	F _(2,781) =0,45; p = 0,63	F _(4,781) =0,39; p = 0,80	F _(4,781) =0,85; p = 0,48
%FCCant*	F _(2,781) =0,53; p = 0,58	F _(2,781) =2,73; p = 0,06	F _(4,781) =1,05; p = 0,37	F _(4,781) =1,07; p = 0,36
%TCCant*	F _(2,781) =0,03; p = 0,96	F _(2,781) =1,54; p = 0,21	F _(4,781) =0,42; p = 0,78	F _(4,781) =1,17; p = 0,31

* %FQCant = percentagem de entradas no quadrante onde estava a plataforma no dia anterior. %TQCant = percentagem de tempo de permanência no quadrante onde estava a plataforma no dia anterior. %FCC = percentagem de entradas no contador crítico do dia anterior. %TCC = percentagem de tempo de permanência no contador crítico do dia anterior.

Em relação à velocidade média de nado (Figura 7), a ANOVA revelou efeito significativo para os fatores principais Grupo, e Tentativa (Tabela 2). Como esperado, os animais jovens apresentam velocidade de nado maiores do que os animais idosos em todas as fases do teste (Figura 7). A velocidade média de nado aumenta a medida que a quantidade de treino aumenta (o que, neste experimento, ocorre em paralelo ao aumento do ITI) e também ao longo das tentativas em ambos os grupos, com o grupo jovem chegando a um platô de desempenho nas últimas sessões.

Figura 7. Médias ($\pm$ E.P.M.) da velocidade média de nado, expressa em centímetros por segundo, em função das três tentativas, organizadas em Blocos de 5 sessões, nos ITI 10, 30 e 60 para os grupos jovem e idoso na tarefa de memória operacional. ANOVA com teste post hoc Tukey-Kramer ($n=8$ por grupo).

As medidas da frequência e tempo de permanência no quadrante (Figura 8) e contador (Figura 9) críticos do dia anterior, isto é, o quadrante e o contador onde a plataforma foi apresentada na sessão do dia anterior, foram incluídas a fim de avaliar a memória sobre a localização da plataforma 24h depois, e a flexibilidade comportamental do animal em deixar de realizar a busca do local onde a plataforma estava previamente e buscar a nova localização. Não houve efeitos significantes em relação aos fatores Grupo e ITI (ver Tabela 2). Porém, como esperado, houve efeito significativo em relação a Tentativa. Como o esperado os animais permanecem mais tempo e entram mais nas áreas do quadrante e contador crítico onde a plataforma se encontrava no dia anterior, na primeira tentativa de cada sessão. No entanto, com a repetição das tentativas os animais deixam de buscar pela plataforma nesse local e para a procura-la em outros setores do labirinto.

Esses resultados refletem que os animais jovens e idosos se recordam da localização da plataforma no dia anterior, demonstrado pela preferência da exploração

com maior número de entradas e maior tempo de permanência no quadrante e no contador crítico do dia anterior na primeira tentativa em todos os ITI. A medida que a plataforma não é encontrada nesse local, os animais abandonam essa estratégia de busca e passam a procurar em outros locais, indicando uma mudança flexível do comportamento.

Figura 8. Médias ($\pm$ E.P.M.) da percentagem frequência de entradas no contador crítico do dia anterior (A) e percentagem do tempo de permanência no contador crítico do dia anterior (B), em função das três tentativas, considerados os blocos de 5 sessões nos ITI 10, 30 e 60 para os grupos jovem e idoso na tarefa de memória operacional espacial.

Figura 9. Médias ($\pm$ E.P.M.) da percentagem frequência de entradas no quadrante crítico do dia anterior (A) e percentagem do tempo de permanência no quadrante crítico do dia anterior (B), em função das três tentativas, considerados os blocos de 5 sessões nos ITI 10, 30 e 60 para os grupos jovem e idoso na tarefa de memória operacional espacial.

Tarefa com plataforma visível

Os resultados são apresentados na Figura 10.

Em relação a latência (Figura 10A), a ANOVA revelou efeitos significativos dos fatores Grupo e ITI, mas não do fator Tentativa (Tabela 3). Como esperado, os animais jovens apresentaram menores tempos para encontrar a plataforma visível que os animais idosos. A ANOVA revelou também interação significativa envolvendo Grupo e ITI. De

fato, ambos o grupo idoso apresenta melhora de desempenho ao longo dos ITIs (Figura 10A), refletindo sua melhora ao longo do treinamento repetitivo na tarefa, apesar do aumento do intervalo de tempo entre as tentativas. O Grupo jovem já apresenta um desempenho ótimo desde o início da tarefa.

Figura 10. Médias ($\pm$ E.P.M.) da latência expressa em segundos (A) e dos trajetos expressos em centímetros (B), em função das três tentativas, considerados os blocos de 5 sessões nos ITI 10, 30 e 60 para os grupos jovem e idoso na tarefa com a plataforma visível.

Tabela 3. Resultados da ANOVA para medidas repetidas e p-valores correspondentes, envolvendo os parâmetros coligidos no labirinto aquático de Morris, versão de plataforma visível, para os animais jovens e idosos.

<i>Variáveis</i>	<i>Grupo</i>	<i>ITI</i>	<i>Tentativa</i>	
Latência	F_(1,667)=77,96; p < 0,05	F_(2,667)=5,54; p < 0,05	F _(2,667) = 1,42; p = 0,24	
Percurso	F_(1,667)=66,36; p < 0,05	F_(2,667)=5,32; p < 0,05	F _(2,667) = 0,92; p = 0,39	
Velocidade	F_(1,667) = 251,03; p < 0,05	F_(2,667)=7,05; p < 0,05	F _(2,667) = 0,90; p = 0,40	
<i>Interações</i>				
	<i>Grupo x ITI</i>	<i>Grupo x Tentativa</i>	<i>ITI x Tentativa</i>	<i>Gr x ITI x Tent</i>
Latência	F_(2,667)=3,48; p < 0,05	F _(2,667) = 2,37; p = 0,09	F _(4,667) = 0,34; p = 0,84	F _(4,667) = 0,12; p = 0,97
Percurso	F_(2,667)=3,08; p < 0,05	F _(2,667) = 1,65; p = 0,19	F _(4,667) =0,24; p=0,91	F _(4,667) = 0,04; p = 0,99
Velocidade	F _(2,667) =0,16; p = 0,85	F _(2,667) =2,00; p = 0,13	F_(4,667)=2,62; p < 0,05	F _(4,667) = 0,39; p = 0,81

Em relação ao percurso, a ANOVA revelou efeitos significativos de Grupo e ITI, mas não de Tentativa (Tabela 3), e revelou ainda interações significantes envolvendo os fatores Grupo e ITI (Tabela 3). Os animais jovens apresentam percursos menores para encontrar a plataforma em relação aos animais idosos (Figura 10B). Ambos os grupos melhoram progressivamente ao longo das sessões, mas não das tentativas, apresentando trajetos menores para encontrar a plataforma (Figura 10B).

Cabe ressaltar, neste contexto, que a localização da plataforma mudava a cada tentativa. Congruentemente, não foram observados efeitos de melhora de desempenho ao longo das tentativas, pois a plataforma visível se encontrava numa nova localização a cada tentativa.

No conjunto esses resultados refletem que os animais idosos são mais lentos para encontrarem a plataforma e melhoram seu desempenho ao longo das sessões de treino (refletidos aqui numa melhora de desempenho ao longo dos ITIs).

Em relação à velocidade do nado (Figura 11), a ANOVA revelou efeito significativo em relação aos fatores Grupo e ITI (ver Tabela 3). Também ocorreu interação significativa entre ITI e Tentativa. Como esperado, os animais jovens apresentaram velocidade de nado maior do que os animais idosos. A velocidade de nado tende a aumentar ao longo das sessões de treino em ambos os grupos, o que ocorre nos

ITI10 e 30, porém no ITI60 ocorre uma redução da velocidade de nado ao longo das tentativas, principalmente no grupo idoso, podendo estar relacionado a fatores motivacionais, já que o tempo e o comprimento do trajeto não se alteram no ITI60.

Figura 11. Médias ($\pm$ E.P.M.) da velocidade média de nado, expressa em centímetros por segundo, em função de três tentativas divididas nos ITI 10,30 e 60 para os grupos jovem e idoso na tarefa com a plataforma visível. ANOVA com teste post hoc Tukey-Kramer (n= 8 por grupo).

4.2 Teste e re-teste no Labirinto em cruz elevado

O desempenho dos animais idosos (I) e jovens (J) previamente expostos ao treinamento na tarefa que requer memória operacional espacial (E) ou na tarefa envolvendo pista visual (V) sobre o desempenho no labirinto em cruz elevado é apresentado na Figura 12.

Quanto a percentagem de tempo de permanência nos braços abertos, a ANOVA revelou efeitos significantes em relação aos fatores Grupo [$F_{(3,56)} = 3,68$; $p < 0,05$] e Sessão [$F_{(1,56)} = 24,75$; $p < 0,05$]. A ANOVA revelou ainda ausência de interação significativa envolvendo Grupo e Sessão [$F_{(3,56)} = 2,26$; $p = 0,09$].

Na primeira sessão de teste, não houve diferenças significantes entre os grupos de animais jovens. No entanto, segundo teste *post hoc* de Fisher, os animais idosos apresentaram diferença significativa nesta sessão, sendo que o grupo IE apresentou maior percentagem de tempo nos braços abertos ($p < 0,05$), denotando um comportamento menos ansioso quando comparado ao dos animais idosos previamente expostos ao treinamento com a plataforma visível no labirinto aquático (Grupo IV).

Em relação à segunda sessão de testes, os grupos idosos, exibiram redução da percentagem de tempo de entrada nos braços abertos, indicando que além da ansiedade natural ao ambiente aberto e elevado, os animais se recordam da experiência aversiva neste aparelho durante a primeira tentativa, refletindo-se num aumento da esquivas aos braços abertos. Os animais jovens não exibem uma redução significativa da percentagem de tempo de permanência nos braços abertos.

Durante a segunda sessão os animais idosos de ambos os grupos diferenciaram significativamente dos seus controles jovens, ficando menos tempo nos braços abertos.

Figura 12. Média (+E.P.M.) da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos nas sessões 1 e 2 no teste do labirinto em cruz elevado. * indica diferenças entre grupos. # indica diferença significativa entre as sessões.

Em relação à percentagem de entradas nos braços abertos (Figura 13), a ANOVA revelou ausência de efeito significativo em relação ao fator Grupo [$F_{(3,56)} = 1,36$; $p = 0,26$], mas diferenças significativas em relação a Sessões [$F_{(1,56)} = 26,06$; $p < 0,05$] e também em relação à interação envolvendo Grupo e Sessões [$F_{(3,56)} = 3,71$; $p < 0,05$].

Como ilustrado pela Figura 13, os grupos JV, IV, e IE exibiram redução na percentagem de entradas nos braços abertos na segunda tentativa em relação à primeira, indicando, novamente, sua maior esquia em relação aos braços abertos na segunda sessão, denotando que se recordam dessa experiência aversiva. A uma tendência maior a essa esquia por parte dos animais idosos.

Figura 13. Média (+E.P.M.) da percentagem de entradas nos braços abertos nas sessões 1 e 2 no teste do labirinto em cruz elevado.* diferença significativa entre grupos; # diferença significativa entre sessões. Anova com teste de Fisher ($p < 0,05$) ($n=8$ por grupo).

A percentagem de tempo e percentagem de entradas nos braços abertos refletem, inversamente, a ansiedade. Há uma diferença significativa na percentagem de tempo, mas não na percentagem de entradas nos braços abertos entre os grupos IE e IV. Porém

na medida de percentagem de entradas o grupo IE se diferencia do seu controle JE, com maior percentagem de entradas, e o mesmo não acontece ao grupo IV, que não se diferencia do seu controle JV. No conjunto, os resultados revelam que os animais idosos que passaram pelo treinamento na tarefa de memória operacional apresentam comportamento menos ansioso em comparação aos animais idosos que passaram pelo treinamento com a plataforma visível.

O número de entradas nos braços fechados (Figura 14) é considerada uma medida clássica de atividade locomotora no labirinto em cruz elevado. A ANOVA revelou efeito significativo em relação aos fatores principais Grupo [$F_{(3,56)} = 4,35$; $p < 0,05$] e Sessão [$F_{(3,56)} = 6,88$; $p < 0,05$], mas não em relação a interação entre Grupo e Sessão [$F_{(3,56)} = 0,40$; $p = 0,74$]. O teste post-hoc de Fisher revelou uma diminuição significativa do número de entradas nos braços fechados pelos animais do grupo IE em comparação a JE, revelando uma menor atividade locomotora nos animais idosos.

Figura 14. Média (+E.P.M.) de entradas no braço fechado na sessão 1 e 2 no teste do labirinto em cruz elevado. * diferença significativa entre grupos; # diferença significativa entre sessões. Anova com teste de Fisher ($p < 0,05$) ($n=8$ por grupo).

O tempo de permanência na extremidade do braço fechado na sessão 1 (Figura

15), é usualmente tomada como comportamento de evitação de conflito, pois o animal hesita em deixar uma área mais protegida do labirinto (ROY & CHAPILLON, 2004), fazendo parte do repertório de comportamentos de defesa em roedores (BLANCHARD et al., 1993). Esse parâmetro apresentou efeito significativo em relação ao fator principal Grupo [$F_{(3,28)} = 4,07$; $p < 0,05$], com os animais idosos do grupo IV apresentando escores significativamente maiores em relação ao seu respectivo controle JV. Essa diferença não ocorre entre os grupos IE e JE. Depreende-se, assim, que os animais idosos expostos ao treinamento na versão espacial do labirinto aquático de Morris exibem resultados mais próximos aos jovens treinados na mesma condição em relação aos animais idosos treinados na versão visual do LAM.

Figura 15. Média (+E.P.M.) tempo de permanência na extremidade do braço fechado na sessão 1 do teste no labirinto em cruz elevado. * diferença significativa entre grupos. ANOVA complementado pelo teste de Fisher ($p < 0,05$) ($n=8$ por grupo).

Em relação ao tempo despendido no quadrado central, classicamente considerado um comportamento de avaliação de risco, a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação aos fatores principais Grupo [$F_{(3,56)} = 1,53$; $p = 0,21$]

e Sessão [$F_{(1,56)} = 0,30$; $p = 0,58$] e também ausência de efeito significativo na interação envolvendo Grupo e Sessão [$F_{(3,56)} = 0,38$; $p = 0,76$].

4.3 *Teste de Campo Aberto*

Os comportamentos de locomoção, cheirar (sniffing) e levantar-se nas patas posteriores (rearing), foram medidos em função do tempo de execução e somados como medidas de atividade exploratória. Foram analisados considerando 5 blocos de um minuto cada em cada sessão, ao longo de duas sessões. Similarmente, foram analisados os comportamentos de autolimpeza (grooming), coçar e inatividade (este último usualmente incluindo comportamentos de congelamento, imobilidade e sono) (NAHAS, 1999).

Os resultados obtidos no TCA são apresentados na Figura 16.

Em relação à atividade exploratória (Figura 16A), a ANOVA revelou diferenças significantes em relação aos fatores principais Grupo [$F_{(3,280)} = 10,95$; $p < 0,05$] e Blocos [$F_{(4,280)} = 4,50$; $p < 0,05$], mas não Sessão [$F_{(1,280)} = 0,42$; $p = 0,51$]. A ANOVA revelou ainda interação significativa envolvendo os fatores Grupo e Bloco [$F_{(12,280)} = 2,76$; $p < 0,05$]. Os resultados sugerem que os animais idosos expostos previamente ao treinamento na tarefa de memória operacional espacial (Grupo IE), exibem maior atividade exploratória em relação aos animais idosos expostos ao treinamento com a plataforma visível (IV), indicando que esse tipo de treinamento altera seu desempenho.

Em relação a atividade locomotora (Figura 16B), a ANOVA revelou diferenças significantes em relação aos fatores principais Grupo [$F_{(3,280)} = 12,61$; $p < 0,05$], Sessão [$F_{(1,280)} = 37,44$; $p < 0,05$] e Blocos [$F_{(4,280)} = 43,16$; $p < 0,05$]. A ANOVA revelou ainda

interações significantes envolvendo Grupo e Bloco [$F_{(12,280)} = 1,88$; $p < 0,05$] e Sessão e Bloco [$F_{(4,280)} = 6,12$; $p < 0,05$]. Observe-se na Figura 16B que ocorre diferença significativa entre IV e os demais grupos no quinto Bloco, novamente com os animais IE exibindo maior locomoção em relação aos animais IV. Interessantemente, não houve diferença significativa entre os escores dos animais IE em relação aos animais jovens.

Em relação ao comportamento de cheirar (Figura 16C), a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes para o fator principal Grupo [$F_{(3,280)} = 2,14$; $p = 0,09$], mas revelou diferença significativa para os fatores principais Sessão [$F_{(1,280)} = 23,93$; $p < 0,05$] e Blocos [$F_{(4,280)} = 5,08$; $p < 0,05$]. A ANOVA revelou ainda ausência de efeitos significantes em relação a esse parâmetro, exceto pelo bloco 5 da sessão 1 em que o grupo IV apresentou uma diminuição na expressão do comportamento de cheirar em relação aos outros grupos.

Em relação ao tempo despendido no comportamento de levantar-se apoiado nas patas posteriores (Figura 16D) a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes para os fatores principais Grupo [$F_{(3,280)} = 1,34$; $p = 0,26$] e Bloco [$F_{(4,280)} = 1,23$; $p = 0,29$], mas revelou diferença significativa para o fator Sessão [$F_{(1,280)} = 17,51$; $p < 0,05$]. Houve ainda interação significativa entre os fatores Grupo e Bloco [$F_{(12,280)} = 2,26$; $p < 0,05$].

Figura 16. Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo despendido em atividades exploratórias (A), na locomoção (B), no comportamento de cheirar (C) e no de levantar-se sob as patas posteriores (D) divididos em 5 blocos de 1 minuto cada, ao longo de duas sessões. Anova para medidas repetidas com teste post-hoc de Fisher ($n=8$ por grupo).

A arena foi dividida em quadrados virtuais para realização da medida de atividade locomotora dos animais, sendo contabilizado cada vez que o animal cruzava por um dos quadrados ao longo de toda a sessão (Figura 17). Em relação a esse score, a ANOVA revelou um efeito significativo do fator principal Grupo [$F_{(3,56)} = 5,89$; $p < 0,05$], com os grupos de animais jovens se locomovendo mais no total que os grupos idosos. Houve também um efeito significativo em relação ao fator Sessão [$F_{(3,56)} = 15,84$; $p < 0,05$]. Como ilustrado na Figura 17, todos os grupos se locomoveram mais na sessão 1 em relação a sessão 2, denotando que os animais se recordam do ambiente. Não ocorreu interação entre os fatores [$F_{(3,56)} = 0,45$; $p = 0,71$].

Figura 17. Média (+E.P.M.) do número de cruzamentos nos quadrados da arena em duas sessões no teste de campo aberto. # diferença significativa entre sessões 1 e 2; * JV é significativamente diferente de IV; ** JE é significativamente diferente de IE. Anova para medidas repetidas com teste post-hoc de Fisher ($p < 0,05$) ($n=8$ por grupo).

Em relação ao comportamento de levanta-se nas patas posteriores (Figura 18), a ANOVA revelou ausência de diferença significativa para o fator Grupos [$F_{(3,56)} = 2,52$; $p = 0,06$], mas revelou diferença significativa para Sessões [$F_{(1,56)} = 39,82$; $p < 0,05$]. Não houve interações significativas. Esse comportamento é classicamente associado ao nível de excitabilidade e é um índice de atividade (WALSH & CUMMINS, 1976). Portanto, não há uma diferença significativa da excitabilidade e da atividade desses animais nos diferentes grupos. Observa-se, porém, escores menores na sessão 2 em relação a sessão 1, sugerindo, novamente, que os animais exibem habituação a exposição ao ambiente.

Figura 18. Média (+E.P.M.) do número de ocorrência do comportamento de levantar-se apoiado sobre as patas posteriores em duas sessões no teste de campo aberto. # diferença significativa sessões. Anova para medidas repetidas com teste post-hoc de Fisher ($p < 0,05$) ($n=8$ por grupo).

Em relação ao tempo despendido no comportamento de autolimpeza (Figura 19A) a ANOVA revelou diferenças significantes para o fator Grupo [$F_{(3,56)} = 12,99$; $p < 0,05$] e para Sessões [$F_{(1,56)} = 19,13$; $p < 0,05$] e também revelou interação significativa entre os fatores Grupo e Sessões [$F_{(3,56)} = 3,01$; $p < 0,05$].

Em relação a frequência do comportamento de autolimpeza (Figura 19B) a ANOVA revelou diferenças significantes para os fatores Grupo [$F_{(3,56)} = 4,01$; $p < 0,05$] e Sessões [$F_{(1,56)} = 10,68$; $p < 0,05$], e ausência de interações significantes em relação a esses fatores. A autolimpeza é considerada um índice de adaptação comportamental em uma situação de estresse (KAMETANI, 1988). Na primeira sessão, o tempo de dispensado no comportamento de autolimpeza foi maior nos indivíduos do grupo IV e IE em comparação aos seus controles jovens, JV e JE. Além disso, o grupo IV passou mais tempo que o grupo IE realizando a autolimpeza. Portanto, o treinamento na tarefa que requer memória operacional espacial proporcionou uma mudança comportamental

nos animais idosos do grupo IE, em direção a diminuir comportamentos relacionados ao estresse a um ambiente novo.

Os compartamentos de coçar e parado não apresentaram diferenças significativas.

Figura 19. Média (+E.P.M.) do tempo dispensado na autolimpeza (A) e número de comportamento de autolimpeza (B) em duas sessões no teste de campo aberto. ** diferença significativa entre sessões 1 e 2; * IV é significativamente diferente de IE e JV; # IE é significativamente diferente de IV e JE; \$ IE é significativamente diferente de JE. Anova para medidas repetidas com teste post-hoc de Fisher ($p < 0,05$) (n=8 por grupo).

4.4 Quantificação de densidade células no hipocampo

Encéfalos de animais incluídos no estudo foram submetidos a seccionamento e colocação de Nissl para quantificar estereologicamente a quantidade de neurônios (Figura 20). A densidade de células nas regiões CA1, CA3 e GD foi expressa em células por milímetro cúbico (mm^3) com volume estimado por meio do princípio de Cavalieri.

Primeiramente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar a distribuição do conjunto de dados, para cada uma das regiões. Para hipocampo total o valor de $[W = 0,91; p = 0,13]$, para CA1 $[W = 0,96; p = 0,66]$, para CA3 $[W = 0,97; p = 0,95]$ e para GD $[W = 0,95; p = 0,50]$. Dada a natureza dos dados, optou-se por realizar uma análise de variância não paramétrica, i.e., o teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de comparações múltiplas, envolvendo o número de células marcadas, por milímetro cúbico (mm^3). Não houve diferenças significantes para qualquer das regiões analisadas, incluindo hipocampo total $[H(3,n=16) = 2,86; 0,41]$, CA1 $[H(3,n=16) = 2,13; 0,54]$, CA3 $[H(3,n=16) = 1,03; 0,79]$, e GD $[H(3,n=16) = 4,69; 0,19]$. Portanto, a densidade volumétrica estimada de neurônios em animais jovens e idosos são equivalentes, indicando que o treinamento na tarefa que requer memória operacional espacial, na tarefa envolvendo navegação para uma pista visual, não altera a quantidade de neurônios nas regiões investigadas.

Figura 20. Densidade volumétrica estimada de células (células/mm³) no hipocampo total (A), sub-campo CA1 (B), sub-campo CA3 (C) e Giro denteado (GD) (n = 4 por grupo). Atenção a diferença de escala nos gráficos.

5. DISCUSSÃO

Labirinto Aquático de Morris

Os resultados do presente estudo revelam que animais idosos exibem, em relação a animais jovens, como esperado, prejuízo da memória operacional espacial. Os animais idosos apresentam uma dificuldade na aquisição da tarefa, apesar de haver uma melhora de desempenho ao longo das sessões, expressas pela latência e percurso. Esse prejuízo no grupo idoso não pode ser atribuído a comprometimentos sensoriais e motores, uma vez que com o treinamento repetitivo ao longo das sessões esses animais alcançaram níveis de desempenho semelhantes aos do grupo jovem. Interessantemente, mesmo a imposição de ITI maiores, que usualmente dificultam o desempenho dessa

tarefa, não prejudicaram o desempenho dos animais idosos.

Esses resultados corroboram dados da literatura que indicam prejuízo na aquisição na versão de memória operacional espacial no LAM em ratos a partir dos 16 meses de idade (AGGLETON et al, 1989; FRICK et al., 1995; GALLAGHNER et al., 1993; LINDNER et al., 1992; MEANS et al., 1991; SHUKITT-HALE et al., 1998).

Animais jovens e idosos não apresentaram diferenças em relação à flexibilidade comportamental e mudança de estratégia na busca pela plataforma como evidenciado pelos parâmetros de percentagem de frequência e tempo de permanência no quadrante e contador crítico do dia anterior, o que sugere uma integridade do funcionamento de sua memória para intervalos de tempo de 24h (BECKER et al., 1981; KYD & BILKEY, 2003).

Na tarefa com a plataforma visível apesar de haver uma diferença significativa entre os grupos nos parâmetros latência e percurso, essa diferença significativa ocorre somente nas primeiras sessões, nas quais os animais idosos demandam maior tempo para adquirir a tarefa. No entanto, com o prosseguimento do treino, a taxa de aprendizagem torna-se semelhante a dos animais jovens, o que se revela nos ITIs de 30 e 60 minutos. Assim, apesar da dificuldade inicial maior na aquisição da tarefa por parte dos animais idosos, essa aquisição acaba ocorrendo com o treinamento repetitivo, chegando a valores que tendem a uma assíntota que se aproxima a exibida pelos animais jovens.

Componentes espaciais são usualmente mais afetados com o envelhecimento em tarefas de memória operacional em relação a componentes não espaciais, e.g., discriminação e identificação de objetos (AGGLETON et al, 1989). Esse resultado é congruente com relatos de que o envelhecimento afeta os componentes estruturais e

funcionais da formação hipocampal. Por exemplo, no hipocampo há diminuição do número de células no subículo e no hilo do giro denteado (WEST, 1993), funções celulares alteram-se como o potencial e resistência da membrana, afetando assim algumas características dos potenciais pós-sinápticos excitatórios (BARNES, 1979; BARNES et al, 1980). Essas e outras alterações podem ser responsáveis pelos prejuízos na execução do processamento espacial (FARRELL, 2012; KENNARD et al., 2013; SAMSON & BARNES, 2013), com reflexos no desempenho comportamental.

Os dados do presente estudo revelam que o prejuízo com o envelhecimento ocorre principalmente na fase de aquisição em ambas as tarefas, porém com maiores efeitos sobre a tarefa com treinamento em memória espacial. Ao longo da aprendizagem com as sessões de treino mesmo animais idosos apresentam desempenho semelhantes ao dos animais jovens.

A aprendizagem espacial parece estimular alterações nas estruturas hipocampais, com mudanças nas ligações sinápticas (MARTIN & MORRIS, 2002; NEVES et al, 2008), sobrevivência e integração de novos neurônios à rede sináptica, mesmo em animais idosos (DRAPEAU et al, 2003), podendo então colaborar amenizando esses prejuízos causados pelo envelhecimento.

Labirinto em cruz elevado

Ratos idosos usualmente exibem maior quantidade de comportamentos que refletem ansiedade no teste do LCE, incluindo menor percentagem de permanência e de entradas nos braços abertos em comparação aos ratos jovens (FRUSSA-FILHO et al, 1991; YAU et al, 2002).

O desempenho dos animais idosos no LCE após o treinamento cognitivo na tarefa de memória operacional espacial (grupo IE) denota menores níveis de ansiedade em comparação com animais idosos do grupo IV treinados numa tarefa guiada por pista visual em tudo similar à primeira, exceto pela demanda cognitiva envolvendo a memória operacional espacial. Em outras palavras, os animais do grupo IV mesmo tendo sido expostos aos mesmos elementos fundamentais da tarefa em aprendizagem espacial (i.e., foram expostos à atividade física do nado no mesmo ambiente, a manipulação pelo experimentador, exposição à água numa dada temperatura etc) não apresentaram alterações comportamentais no LCE, apresentando um padrão semelhante à de ratos idosos descritos na literatura. (FRUSSA-FILHO et al, 1991; YAU et al, 2002).

Em outras palavras, o presente conjunto de resultados indica que a exposição de ratos idosos ao treinamento numa tarefa que demanda a função hipocampal leva a uma redução de comportamentos associados à ansiedade.

Darwish et al. (2001) demonstrou que estímulos prévios ao LCE podem alterar os comportamentos associados a ansiedade em animais idosos. Ao expor ratos idosos isolados a um objeto novo previamente à tarefa do LCE, esses aumentaram a percentagem de permanência nos braços abertos. Considera-se que a exposição a um objeto inanimado corresponderia a uma interação social para ratos socialmente isolados, resultando em um estímulo significativo para alterar os padrões de ansiedade.

A atividade locomotora no LCE se mostrou reduzida nos grupos idosos em comparação aos jovens, como verificado pelo número de entradas nos braços fechados. Mesmo com a atividade locomotora reduzida igualmente entre os grupos IE e IV, o grupo IE não apresentou os mesmos padrões na exploração dos braços abertos, evidenciando mais uma vez o efeito da tarefa de aprendizagem dependente do

hipocampo sobre a ansiedade.

Os animais IV também apresentaram um comportamento de maior hesitação, evitando o conflito de explorar as áreas abertas quando comparado a seu controle jovem permanecendo mais tempo na extremidade do braço fechado, essa diferença não ocorre nos grupos submetidos à tarefa espacial. A hesitação faz parte da gama de comportamentos de defesa expressos pelos animais no LCE (BLANCHARD et al, 1993) que apresentam um aumento de sua expressão com o envelhecimento (IMHOF et al, 1993).

Na re-exposição ao LCE todos os grupos apresentam uma redução da percentagem de permanência e entradas nos braços abertos, comportamento que reflete a recordação da aversão aos ambientes abertos adquirida na primeira sessão de teste (HOLMES & ROGERS, 1998; BERTOGLIO & CAROBREZ, 2000). Os animais idosos entram com menor frequência relativa e permanecem relativamente menos tempo nos braços abertos do que os animais jovens.

Bessa et al. (2005), relatou um aumento na percentagem de tempo nos braços abertos do LCE durante a segunda sessão em ratos de 12 e 18 meses. Porém, o intervalo entre a primeira e segunda sessão neste estudo foi de 24 horas, evidenciando um prejuízo na memória aversiva condicionada.

Em contraste, no presente experimento a re-exposição ao LCE foi realizada após um intervalo de 5 minutos entre as sessões. Os animais idosos apresentaram uma diminuição mais acentuada nas visitas aos braços abertos na re-exposição em comparação aos animais jovens. A amostra de animais estudada não apresentou déficits de memória acentuados, além da fase de aquisição no LAM, portanto podemos considerar que há uma integridade da memória de medo condicionado nos animais

idosos. Em humanos é relatado que não há efeitos significativos do envelhecimento sobre o medo condicionado (LABAR et al, 2004), enquanto que os estudos em animais ainda são controversos (BELLEBAUM & DAUM, 2004).

Levando em consideração que o LAM é um teste de aprendizagem que envolve uma motivação aversiva, que é a fuga da água, mesmo minimizando os fatores aversivos, a aquisição nesse ambiente é um evento estressante para os animais, o que pode causar efeitos no desempenho dos animais, além de ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GALLAGHER & BURWELL, 1989; SANDI, 1998).

Enfatizando que o teste no LCE ocorreu apenas 15 horas após o término dos treinamentos no LAM. Assim, era esperado que esse ambiente estressante, resultasse em maiores níveis de ansiedade, em animais jovens e idosos, uma vez que o processo de ansiedade requer a ativação do mesmo eixo (MASON, 1975; SORAVIA et al, 2006), porém nossos resultados demonstram que o treinamento em memória operacional espacial, mesmo em um ambiente minimamente aversivo, pode resultar em redução da linha basal da ansiedade em animais idosos.

Considerando-se que a aprendizagem promove modificações plásticas no sistema nervoso, intervenções que incluem treinamento cognitivo vêm sendo utilizadas em humanos como tratamento e prevenção não-farmacológica para o declínio cognitivo associado ao envelhecimento (HERTZOG et al., 2008; HULTSCH et al., 1999; MAHNCKE et al., 2006).

O treinamento repetitivo em tarefas que requerem engajamentos cognitivos específicos leva a alterações não somente no desempenho daquela tarefa treinada, mas também pode beneficiar o desempenho de outras habilidades e tarefas (JAEGGI et al, 2010; SCHMIEDEK et al, 2010; SCHWEIZER et al, 2011).

Treinamento da memória operacional espacial depende também de circuitos neurais que incluem a região septal (RAWLINS & OLTON 1982; THOMAS et al, 1982), e o funcionamento do eixo septo-hipocampal também está relacionado ao processamento de afetividade negativa, sinalizando a valência da informação, tendo implicações sobre a ansiedade (GRAY & McNAUGHTON, 1983; GRAY & McNAUGHTON, 2000).

Assim, modificações plásticas nessa região induzidas pelo treinamento cognitivo em memória operacional espacial podem ter alterado o funcionamento neural que se refletiram em alterações na ansiedade do animal idoso. Por exemplo, o treinamento cognitivo pode ter mobilizado a maior atividade neural nos ratos idosos, como postulado pelo modelo de compensação neural, quando ineficiências no processamento fazem com que o cérebro recrute mais recursos neurais para alcançar a eficiência e desempenho do organismo como em jovens (EYLER et al, 2011; HEUNINCKX et al, 2008; KAMAGOE et al, 2015). Por outro lado, animais jovens não exibiram o mesmo padrão de resultados por já se encontrarem numa assíntota de desempenho ótimo para os padrões da espécie.

Teste de Campo Aberto

Em relação à habituação no TCA, observamos que grupos jovens não apresentaram diferenças entre si, mas os grupos idosos apresentaram diferenças significativas no tempo de expressão de atividade exploratória e de locomoção, particularmente no Bloco 5 das sessões 1 e 2. O grupo IV apresentou o padrão típico de um animal idoso nessa tarefa: redução no tempo das atividades exploratórias e de locomoção como já descrito na literatura (ROWE et al., 1998; SOFFI E et al., 1992).

Em contrapartida, os animais IE exibiram padrão de desempenho semelhante aos grupos jovens. O número de cruzamentos também mostra diferença significativa entre grupos jovens e idosos na sessão 1. Como o desempenho desta tarefa é usualmente associado ao forrageamento, admite-se que ela também envolva o funcionamento da formação hipocampal (SCHRÖDER et al., 1999; THIEL et al., 1998; THIEL et al., 1999).

Ao realizar a re-exposição do animal ao mesmo ambiente com um intervalo de 24 horas, se espera uma diminuição da atividade exploratória, o que permite inferir que houve formação de memórias (THIEL et al., 1998; THIEL et al., 1999). No presente estudo utilizamos como medida de atividade exploratória a somatória dos tempos dispensados nas atividades de locomoção, cheirar, e levantar-se sobre as patas posteriores em que não foram encontradas diferenças significativas entre as sessões.

No entanto, ao analisarmos esses comportamentos separadamente observamos diferenças entre as sessões, com redução do tempo de locomoção e de levantar-se sobre as patas posteriores na sessão 2, e um aumento do comportamento de cheirar.

A locomoção e levantar-se sob as patas posteriores são comportamentos que refletem maior excitabilidade ao se deparar com um ambiente novo. Essa excitabilidade diminui quando o animal é reexposto ao ambiente refletindo, portanto, um índice de habituação relacionada a memória. Quanto ao comportamento de cheirar, alguns estudos indicam que sua análise isolada não é um parâmetro confiável para estudos de habituação, pois ele está associado a uma exploração com menor atividade e excitabilidade não específica (MARTINEK & LÁT, 1969; PRESCOTT, 1970; WALSH & CUMMINS, 1979).

Em relação aos resultados envolvendo o comportamento de levantar-se sobre as patas posteriores, que pode nos levar a inferências sobre a formação de memória

(NAHAS, 1999), no presente estudo ocorreu diferença significativa entre JE e IE, como menor número de levantamentos realizados por IE. O tempo despendido nesse comportamento no bloco 5 pelos grupos IE e IV é menor em relação aos seus respectivos grupos jovens. O comportamento de levantar-se está associado à motivação e excitabilidade a exploração de novos ambientes, sendo prejudicado com o envelhecimento (BACKMAN et al, 2006). A comparação da primeira com a segunda sessão relevou, em todos os grupos, diminuição do número de vezes que os animais realizaram o comportamento, portanto podemos inferir que ocorreu formação de memória em todos os grupos.

A reexposição ao LCE e ao TCA, que nos remetem a medidas de formação de memória, não revelaram prejuízos associados ao envelhecimento. Por não haver prejuízo acentuado associado ao envelhecimento, reduziram-se as chances de revelar potenciais efeitos do treinamento em tarefa que depende da memória de operacional espacial no desempenho cognitivo dos animais. Especulativamente, pode-se supor que efeitos do treinamento cognitivo sobre o desempenho da memória de longa duração dependa de treinamentos prolongados e intensivos, ou combinações de tipos diferentes de treinamentos, incluindo reabilitação cognitiva e atividade física (BAMIDIS et al., 2014).

Densidade de células no hipocampo

As densidades de células nas regiões CA1, CA3 e GD da formação hipocampal nos diferentes grupos jovens e idosos não apresentaram diferenças significativas independentemente do tipo de treinamento a que os animais foram expostos. Em estudo realizado com ratos da linhagem Sprague-Dawley, envolvendo animais com 24 meses,

apresentaram redução significativa no volume e número de células nas três regiões hipocampais (BRONZETTI et al, 1991). No presente estudo utilizamos animais da linhagem *Wistar* com 18 meses de vida. É possível que nessa idade os animais ainda não exibam perda celular detectável do ponto de vista estatístico.

Outra hipótese que pode ser considerada em nossos resultados é que a atividade física realizada pelos animais idosos tenha estimulado a proliferação de células hipocampais, fazendo com que não houve diferenças significativas entre jovens e idosos. Para confirmar tal hipótese, no entanto é necessária a realização de experimento com a adição de um grupo controle de não realize atividade física do nado para comparação do número de células hipocampais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo mostram claramente que animais idosos exibem prejuízo na aquisição da tarefa que requer memória operacional espacial. Ratos idosos também apresentam maiores índices de ansiedade e menores taxas de locomoção quando comparados a animais jovens.

Ademais, os resultados mostram que o treinamento cognitivo envolvendo a memória operacional espacial resulta em redução significativa de comportamentos que denotam ansiedade, além de alterar a taxa de habituação em ratos idosos.

Por outro lado, esse treinamento não resultou em alterações detectáveis (do ponto de vista estatístico) na densidade de células no hipocampo, mesmo não havendo uma diferença significativa esperada entre animais jovens e idosos.

Esses resultados enfatizam a vantagem de se utilizar ratos como modelo para o

estudo de mecanismos subjacentes à alteração das funções de memória relacionados com o envelhecimento. O treinamento cognitivo em tarefa que requer memória operacional espacial no labirinto aquático de Morris parece promissor para investigações sobre a natureza das modificações plásticas neurais resultantes do treinamento, podendo representar um modelo útil para investigações sobre a prevenção das perdas cognitivas associadas aos processos de envelhecimento, em associação com alterações nervosas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADRIANI W, FELICI A, SARGOLINI F, ROULLET P, USIELLO A, OLIVERIO A, MELE A. N-methyl-D-aspartate and dopamine receptor involvement in the modulation of locomotor activity and memory processes. *Exp Brain Res*. 123(1-2):52-59, 1998.
2. AGGLETON JP, BLINDT HS, CANDY M. Working memory in aged rats. *Behav. Neurosc.* 103(5): 975-983, 1989.
3. AMMASSARI-TEULE M, FAGIOLI S, ROSSI-ARNAUD C. Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: further evidence for preserved cognitive abilities during senescence. *Physiol Behav*. 55(2):341-345, 1994.
4. ANDREWS G, ISSAKIDIS C, SANDERSON K, CORRY J, LAPSLEY H. Utilising survey data to inform public policy: comparison of the cost-effectiveness of treatment of ten mental disorders. *Br J Psychiatry*. 184:526-533, 2004.
5. ANGUERA JÁ, BOCCANFUSO J, RINTOUL JL, AL-HASHIMI O, FARAJI F, JANOWICH J, KONG E, LARRABURO Y, ROLLE C, JOHNSTON E, GAZZALEY A. Video game training enhances cognitive control in older adults.

- Nature 501, 97–101, 2013.
6. BACKMAN L, NYBERG L, LINDENBERGER U, LI SC, FARDE L. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30: 791-807, 2006.
 7. BADDELEY AD. *Working memory*. Oxford: Clarendon, 1986.
 8. BADDELEY AD. *Working memory*. *Science*, 255, 556–559, 1992.
 9. BADDELEY AD, HITCH G. *Working memory*. In G. H. Bower (Ed.), *The psychology of learning and motivation*. San Diego: Academic Press, 8: 47–90., 1974.
 10. BALL K, EDWARDS JD, ROSS LA, MCGWIN JR G. Cognitive training decreases motor vehicle collision involvement of older drivers. *J. Am. Geriatr. Soc.* 58, 2107–2113, 2010.
 11. BARMIDIS PD, VIVAS AB, STYLIADIS C, FRANTZIDIS C, KLADOS M, SCHLEE W, SIOUNTAS A, PAPAGEORGIOU SG. A review of physical and cognitive interventions in aging. *Neurosci. Behav. Res.* 44: 206-220, 2014.
 12. BARNES CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 93(1):74-104, 1979.
 13. BARNES CA. Normal aging: Regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 17: 13–18, 1994.
 14. BARNES CA, MCNAUGHTON BL. Physiological compensation for loss of afferent synapses in rat hippocampal granule cells during senescence. *J Physiol.* 309:473-485, 1980.
 15. BARNES CA, SUSTER MS, SHEN J, MCNAUGHTON BL. Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature.* 388: 272-275, 1997.
 16. BARONCELLI L, BONACCORSI J, MILANESE M, BONIFACINO T, GIRIBALDI F, MANNO I, CENNI MC, BERARDI N, BONANNO G, MAFFEI L,

- SALE A. Enriched experience and recovery from amblyopia in adult rats: impact on motor, social and sensory components. *Neuropharmacology*. 62(7):2388-2397, 2012.
17. BATUECAS A, PEREIRA R, CENTENO C, PULIDO JÁ, HERNÁNDEZ M, BOLLATI A, BOGÓNEZ E, SATRÚSTEGUI J. Effects of chronic nimodipine on working memory of old rats in relation to defects in synaptosomal calcium homeostasis. *Eur J Pharmacol*. 350(2-3):141-150, 1998.
 18. BEAR MF, CONNORS BWE, PARADISO MA. *Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso*. Artmed Editora, 2a. Edição, 2002.
 19. BECKER JT, MORRIS RG. Working memory(s). *Brain Cogn*. 41(1): 1-8, 1999.
 20. BECKER JT, OLTON DS, ANDERSON CA, BREITINGER ER. Cognitive mapping in rats: the role of the hippocampal and frontal system in retention and reversal. *Behav Brain Res*. 3(1):1-22, 1981.
 21. BELLEBAUM C, DAUM I. Fear, conditioning and aging: theoretical comment on LaBar et al. (2004). *Behav Neurosci*. 118(5): 1137-1139, 2004.
 22. BESSA JM, OLIVEIRA M, CERQUEIRA JJ, ALMEIDA OFX, SOUZA N. Age-related qualitative shift in emotional behaviour: Paradoxal findings after re-exposure of rats in the elevated plus maze. *Behav Brain Res*. 162(1): 135-142, 2005.
 23. BERARDI N, BRASCHI C, CAPSONI S, CATTANEO A, MAFFEI L. Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis*. 11, 359–370, 2007.
 24. BERTOGLIO LJ, CAROBREZ AP. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus maze model of anxiety. *Behav Brain Res*. 108:197–203, 2000.

25. BLANCHARD DC, BLANCHARD RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Ver Psychol.* 39(1): 43-68, 1988.
26. BLANCHARD RJ, YUDKO EB, RODGERS RJ, BLANCHARD DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Beh Brain Res.* 58: 155-165, 1993.
27. BONINI JS, DA SILVA WC, BEVILAQUA LR, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neurosc.* 147(1):37-45, 2007.
28. BRONZETTI E, FELICI L, ZACCHEO D, AMENTA F. Age-related anatomical changes in the rat hippocampus: retardation by choline alfoscerate treatment. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 13: 167-178, 1991.
29. BUTLER AB, HODOS W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: evolution and adaptation.* Wiley-Liss, NY, USA, 1996.
30. CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, MEDINA JH, IZQUIERDO I. ERK1/2 and CaMKII-mediated events in memory formation: is 5HT regulation involved? *Behav Brain Res.* 195(1):120-128, 2007.
31. CAMPOS A, SAITO AIP. Aprendizagem e memória no labirinto radial de 8 braços. In: XAVIER GF (orgs.) *Técnicas para o estudo do sistema nervoso.* Plêiade, 1a. ed. São Paulo, 1999.
32. CARLSON NR. *Physiology of Behavior.* Boston, London, Toronto, Sydney, Tokyo and Singapore: Allyn and Bacon, 409-450 p., 2001.
33. CLAIBORNE BJ, AMARAL DG, COWAN WM. A light and electron microscopic analysis of mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 246(4): 435-458, 1986.
34. DARWISH M, KORÁNYI L, NYAKAS C, ALMEIDA OF. Exposure to a novel

- stimulus reduces anxiety level in adult and aging rats. *Physiol Behav.* 72(3):403-407, 2001.
35. DA CUNHA C, WIETZIKOSKI S, WIETZIKOSKI EC, SILVA MHC, CHANDLER JUNIOR J, FERRO MF, ANDREATINI R, CANTERAS NS. Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of learning and memory.* 87: 451-463, 2007.
 36. DE BEURS E, BEEKMAN AT, VAN BALKON AJ, DEEG DJ, VAN DYCK R, VAN TILBURG W. Consequences of anxiety in older persons: its effect on disability, well-being and use of health services. *Psychol Med.* 29(3): 583-593, 1999.
 37. DOLLER HJ, WEIGHT FF. Perforant pathway activation of hippocampal CA1 stratum pyramidale neurons: electrophysiological evidence for a direct pathway. *Brain Res.* 237(1):1-13, 1982.
 38. DRAPEAU E, MAYO W, AUROUSSEAU C, LE MOAL M, PIAZZA PV, ABROUS DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:14385–14390, 2003.
 39. EDWARDS JD, WADLEY VG, VANCE DE, WOOD K, ROENKER DL, BALL KK. The impact of speed of processing training on cognitive and everyday performance. *Aging Amp. Ment. Health.* 9, 262–271, 2005.
 40. ENGVIG A, FJELL AM, WESTLYE LT, MOBERGET T, SUNDSETH O, LARSEN VA, WALHOVD KB. Effects of memory training on cortical thickness in the elderly. *Neuroimage.* 52(4):1667-1676, 2010.
 41. EYLER LT, SHERZAI A, KAUO AR, JESTE DV. A review of functional brain imaging correlates of successful cognitive aging. *Biol Psychiatry.* 70: 115-122, 2011.

42. FARRELL MJ. Age-related changes in the structural and function of brain regions involved in pain processing. *Pain Med.* April 13, 2012.
43. FOSTER PP. Role of physical and mental training in brain network configuration. *Front in Aging Neurosci.* 7(117):1-13, 2015.
44. FRICK KM, BAXTER MG, MARKOWSKA AL, OLTON DS, PRICE DL. Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in the water maze. *Neurobiol. of aging.* 16(2): 149-160, 1995.
45. FRUSSA-FILHO R, OTOBONI JR, UEMA FT, SÁ-ROCHA LC. Evaluation of memory and anxiety in rats observed in the elevated plus maze: effects of age and isolation. 24(7): 725-728, 1991.
46. GALLAGHER M, BURWELL R. Relationship of age-related decline across several behavioral domains. *Neurobiology of Aging.* 10:691–708, 1989.
47. GALLAGHER M, BURWELL R, BURCHINAL M. Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris Water Maze. *Behav. Neurosci.* 107(4): 618-626, 1993.
48. GALLAGHER M, PELLEYMOUNTER MA. Spatial learning deficits in old rats a model for memory decline in aged. *Neurobiol aging.* 9(5-6):549-556, 1988.
49. GARD T, TAQUET M, DIXIT R, HOLZEL B, DE MONTJOYE YA, BRACH N, SALAT DH, DICKERSON BC, GRAY JR, LAZAR SW. Fluid intelligence and brain functional organization in aging yoga and meditation practitioners. *Front. Aging Neurosci.* 6(76):1-12, 2014.
50. GEINISMAN Y, DETOLEDO-MORRELL L, MORRELL F, HELLER RE. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: Behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Process Neurobiol.* 45(3): 223-239, 1995.

51. GELLIS ZD. Older adults with mental and emotional problems. In B. Berkman (Ed.), *Handbook of Social Work in Health and Aging* (pp. 129–139). New York, NY: Oxford University Press, 2006.
52. GRAY JA, McNAUGHTON N. Comparison between the behavioral effects of septal and hippocampal lesion: a review. *Neuros Biobehav Rev.* 7:118-119, 1983.
53. GRAY JA, McNAUGHTON N. *The neuropsychology of anxiety*. 2 end. Oxford University Press, 2000.
54. GREEN SC, BAVELIER D. Exercising your brain: a review of human brain plasticity and training-induced learning. *Psychol. Aging* 23, 692–701, 2008.
55. HANNAN AJ. Review: environmental enrichment and brain repair: harnessing the therapeutic effects of cognitive stimulation and physical activity to enhance experience-dependent plasticity. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 40, 13–25, 2014.
56. HARATI H, MAJCHZRAK M, COSQUER B, GALANI R, KELCHE C, CASSEL J-C, BARBELIVIEN A. Attention and memory in aged rats: impact of lifelong environmental enrichment. *Neurobiol. Aging* 32, 718–736, 2011.
57. HELENE AF, XAVIER GF. Working memory and acquisition of implicit knowledge by imagery training, without actual task performance. *Neuroscience.* 139(1):401-413, 2006.
58. HERRERAS O, SOLIS JM, MATIN DEL RIO R, LERMA J. Characteristics of CA1 activation through the hippocampal trisynaptic pathway in the unanaesthetized rat. *Brain Res.* 413(1):75-86, 1987.
59. HERRING A, AMBRÉE O, TOMM M, HABERMANN H, SACHSER N, PAULUS W, KEYVANI K. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp. Neurol.* 216, 184–192, 2009.
60. HERTZOG C, KRAMER AF, WILSON RS, LINDENBERGER U. Enrichment

- effects on adult cognitive development: can the functional capacity of older adults be preserved and enhanced? *Psychol. Sci. Public Interest*. 9: 1–65, 2008.
61. HEUNINCKX S, WENDEROTH N, SWINNEN SP. System neuroplasticity in the aging brain: recruiting additional neural resources for successful motor performance in elderly persons. *J Neurosci*. 28: 91-99, 2008.
 62. HOLMES A, ROGERS RJ. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus maze experience: further evidence for qualitative shift in emotional state? *Pharmacol Biochem Behav*. 60: 473-488, 1998.
 63. HONIG WK. Studies of working memory in the pigeon. *Cognit Proces. in Ani.behav*. 211-248, 1978.
 64. HULTSCH DF, HERTZOG C, SMALL BJ, DIXON RA. Use it or lose it: engaged lifestyle as a buffer of cognitive decline in aging? *Psychol. Aging*. 14: 245, 1999.
 65. IMHOF JT, COELHO ZMI, SCHMITT ML, MORATO GS, CAROBREZ AP. Influence of gender and age on performances of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav Brain Res*. 56: 177-180, 1993.
 66. JACOBS L, SCHENK F. Unpacking the Cognitive Map: The Parallel Map Theory of Hippocampal Function. *Psychological Review*. 110 (2): 285–315, 2003.
 67. JAEGLI SM, STUDER-LUETHI B, BUSCHKUEHL M, SU Y-F, JONIDES J, PERRIG WJ. The relationship between n-back performance and matrix reasoning – implications for training and transfer. *Intelligence* 38, 625–635, 2010.
 68. JANKOWSKY JL, MELNIKOVA T, FADALE DJ, XU GM, SLUNT HH, GONZALES V, YOUNKIN LH, YOUNKIN SG, BORCHELT DR, SAVONENKO AV. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci*. 25, 5217–5224, 2005.
 69. KAMETANI H. Analysis of age-related changes in stress-induced grooming in the

- rat. Differential behavioral profile of adaptation to stress. *Ann N Y Acad Sci.* 525:101-113, 1988.
70. KANDEL ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294: 1030 –1038, 2001.
71. KANDEL ER. The Biology of Memory: A Forty-Year Perspective. *J. Neurosci.*, 29(41):12748–12756, 2009.
72. KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. In: *Principles of Neural Science.* N.Y.:McGraw-Hill., 2000.
73. KAWAGOE T, SUZUKI M, NISHIGUCHI S, ABE N, OTSUKA Y, NAKAI R, YAMADA M, YOSHIKAWA S, SEKIYAMA K. Brain activation during visual working memory correlates with behavioral mobility performance in older adults. *Front in Aging Neurosc.* 7(186):1-9, 2015.
74. KEMPERMANN G, KUHN HG, GAGE FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495, 1997.
75. KEMPERMANN G, KUHN HG, GAGE FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J. Neurosci.* 18, 3206–3212, 1998.
76. KEMPERMANN G, GAST D, GAGE FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Annals of neurology.* 52(2): 135–43, 2002.
77. KENNARD JA, BROWN KL, WOODRUFF-PAK DS. Aging in the cerebellum and hippocampus and associated behaviors over the adult life span of CB6F1 mice. *Neuroscience.* 2013.
78. KESNER RP. Neurobiological Views of Memory. In: MARINEZ J.R., J.L.; KESNER, R.P., eds. *Learning and Memory. A Biological View.* San Diego, Academic Press, 399-438, 1986.

79. KYD RJ, BILKEY DK. Prefrontal cortex lesions modify the spatial properties of hippocampal place cells. *Cereb Cortex*. 13(5):444-451, 2003.
80. LABAR KS, COOK CA, TORPEY DC, WELSH-BOHMER KA. Impact of healthy aging on awareness and fear conditioning. *Behav Neurosci*. 118(5): 905-915, 2004.
81. LANDAU SM, MARKS SM, MORMINO EC, RABINOVICI GD, OH H, O'NEIL JP, WILSON RS, JAGUST WJ. Association of lifetime cognitive engagement and low β -amyloid deposition. *Arch. Neurol*. 69, 623–629, 2012.
82. LANDERS MS, KNOTT GW, LIPP HP, POLETAEVA I, WELKER E. Synapse formation in adult barrel cortex following naturalistic environmental enrichment. *Neuroscience* 199, 143–152, 2011.
83. LANDFIELD PW. Hippocampal neurobiological mechanisms of age-related memory dysfunction. *Neurobiol. Aging*. 9: 571–579, 1988.
84. 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*. 90(3): 511–518, 2008.
85. LENZE EJ, MULSANT BH, SHEAR MK, SCHULBERG HC, DEW MA, BEGLEY AE, REYNOLDS CF. Comorbid anxiety disorders in depressed elderly patients. *Am J Psychiatry*. 157(5), 722–728, 2000.
86. LINDNER MD, BALCH AH, VANDERMAELEN CP. Short forms of the “reference-” and “working memory” Morris water maze for assessing age-related deficits. *Behavioral and Neural Biology*. 58: 94-102, 1992.
87. LIU N, HE SY. Early natural stimulation through environmental enrichment accelerates neuronal development in the mouse dentate gyrus. *PLoS one* 7, e30803, 2012.

88. LÖVDÉN M, SCHAEFER S, NOACK H, BODAMMER NC, KÜHN S, HEINZE HJ, DÜZEL E, BÄCKMAN L, LINDENBERGER U. Spatial navigation training protects the hippocampus against age-related changes during early and late adulthood. *Neurobiol. Aging* 33(3):620.e9-620.e22, 2012.
89. LUSTIG C, SHAH P, SEIDLER R, REUTER-LORENZ PA. Aging, training, and the brain: A review and future directions. *Neuropsychol. Rev.* 19, 504–522, 2009.
90. MAHNCKE HW, BRONSTONE A, MERZENICH MM. Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. *Prog Brain Res.* 157: 81–109, 2006.
91. MARKOWSKA AL, STONE WS, INGRAM DK, REYNOLDS J, GOLD PE, CONTI LH. Individual differences in aging: behavioral and neurobiological correlates. *Neurobiology of Aging.* 10:31–43, 1989.
92. MARTIN M, CLARE L, ALTGASSEN AM, CAMERON MH, ZEHNDER F. Cognition-based interventions for healthy older people and people with mild cognitive impairment. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2011.
93. MARTIN SJ, MORRIS RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus.* 12:609–636, 2002.
94. MARTINEK Z, LÁT J. Long-term stability of individual differences in exploratory behaviour and rate of habituation in dogs. *Physiol Bohemoslov.* 18(3): 217-225, 1969.
95. MASON JW. A historical view of stress field. *J Hum Stress.* 1:6-12, 1975.
96. MCLNTYRE JS, CRAIL FI. Age differences in memory for item and source information. *Canadian Journal of Psychology.* 41 (2): 175–192, 1987.
97. MEANS LW, KENNARD KJP. Working memory and the aged rats: Deficient two-choice win-stay water-escape acquisition and retention. *Physiology and Behavior.*

- 49: 301-307, 1991.
98. MEDAWAR P. The definition and measurement of senescence." In: Ciba Foundation Colloquia on Ageing, Volume I, Wolstenholme, G. E. W. (ed.). J. & A. Churchill, London, 4-15, 1955.
 99. MOHLMAN J, GORMAN JM. The role of executive functioning in CBT: A pilot study with anxious older adults. *Behav Res and Therapy*, 43, 447–465, 2005.
 100. MORA F, SEGOVIA G, DEL ARCO A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics 24in several areas of the brain. *Brain research reviews*. 55(1): 78–88, 2007.
 101. MORA F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 15(1): 45–52, 2013.
 102. MORA-GALLEGOS A, ROJAS-CARVAJAL M, SALAS S, SABORIO-ARCE A, FORNAGUERA-TRIAS J, BRENES JC. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem*. 118:96-104, 2015.
 103. MOZOLIC JL, LONG AB, MORGAN AR, RAWLEY-PAYNE M, LAURIENTI PJ. A cognitive training intervention improves modality-specific attention in a randomized controlled trial of healthy older adults. *Neurobiol. Aging* 32, 655–668, 2011.
 104. NAHAS TR. O teste do campo aberto. In: Técnicas para o estudo do sistema nervoso. Xavier GF (org.) Ed. Plêiade, São Paulo, 1999.
 105. NEVES G, COOKE SF, BLISS TV. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*. 9:65–75, 2008.
 106. NITHIANANTHARAJAH J, HANNAN AJ. The neurobiology of brain and

- cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog. Neurobiol.* 89, 369–382, 2009.
107. NOUCHI R, TAKI Y, TAKEUCHI H, HASHIZUME H, AKITSUKI Y, SHIGEMUNE Y, SEKIGUGUI A, KOTOZAKI Y, TSUKIURA T, YOMOGIDA Y, KAWASHIMA R. Brain training game improves executive functions and processing speed in the elderly: a randomized controlled trial. *PLoS one* 7, e29676, 2012.
 108. O'KEEFE J, NADEL L. *The Hippocampus as a Cognitive map*. Oxford Univ. Press, Oxford, 1978.
 109. OLTON DS. Mnemonic Functions of the Hippocampus: Past, Present and Future. In: SQUIRE, L.R.; LINDENLAUB, E., eds. *The Biology of Memory: Symposium Bernried, Germany October 15th - 19th, 1989*. Stuttgart, Schattauer Verlag, 427-443, 1990.
 110. OLTON DS, FEUSTLE WA. Hippocampal function required for nonspatial working memory. *Experimental Brain Research*, 41,(3–4), 380–389, 1981.
 111. OLTON DS, PAPAS BC. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17, 669–682, 1979.
 112. OLTON DS, SAMUELSON R.J. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 2(2):97-116, 1976.
 113. OTTONI EB. *EthoLog 2.25. Software*. Sao Paulo, Brasil: University of São Paulo. 1999.
 114. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Relatório mundial sobre violência e saúde*. Genebra, 2002.
 115. PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic

- press. 2 end, Sandiego, USA, 1997.
116. POTVIN O, LORRAIN D, BELLEVILLE G, GRENIER S, PRÉVILLE M. Subjective sleep characteristics associated with anxiety and depression in older adults: A population-based study. *Int J Geriatr Psychiatry*. 29(12):1262:1270, 2014.
 117. PRESCOTT R. Some behavioral effects of variables which influence general level of activity of rats. *Anim Behav*. 18:791-796, 1970.
 118. RANKIN CH, ABRAMS T, BARRY RJ, BHATNAGAR S, CLAYTON DF, COLOMBO J, COPPOLA G, GEYER MA, GLANZMAN DL, MARSLAND S, MCSWEENEY FK, WILSON DA, WU CF, THOPSON RF. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*. 92:135-138, 2009.
 119. RAWLINS JN, OLTON DS. The septo-hippocampal system and cognitive mapping. *Behav brain Res*. 5(4):331-358, 1982.
 120. ROBERTSON IH. A right hemisphere role in cognitive reserve. *Neurobiol. Aging* 35, 1375–1385, 2014.
 121. ROY V, CHAPILLON P. Futher evidences that risk assessment and object exploration behaviours are useful to evaluate emotional reactivity in rodents. *Behav Brain Res*. 154:439-448, 2004.
 122. ROWE WB, SPREEKMEESTER E, MEANEY MJ, QUIRION R, ROCHFORD I. Reactivity to novelty in cognitively impaired and cognitively unimpaired aged rats and young rats. *Neuroscience*, 83:669-680, 1998.
 123. SAMSON RD, BARNES CA. Impact of aging brain circuits on cognition. *Eur J Neurosci*. 37(12): 1903-1915, 2013.
 124. SANDI C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast*. 6:41–52, 1998.

125. SANTOS AMG. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER GF (orgs.) Técnicas para o estudo do sistema nervoso. Plêiade, 1a. ed. São Paulo, 1999.
126. SCHMIEDEK, LOVDEN M, LINDENBERGER U. Hundred days of cognitive training enhance broad cognitive abilities in adulthood: findings from the COGITO study. *Front. Aging Neurosci.* 2, 2010.
127. SCHWEIZER S, HAMPSHIRE A, DALGLEISH T. Extending brain-training to the affective domain: increasing cognitive and affective executive control through emotional working memory training. *PLoS ONE.* 6, 2011.
128. SCHRÖDER N, NETTO CA, MEDINA JH. Novelty causes time dependent retrograde amnesia for one trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 11: 3323-3328. 5, 1999.
129. SEGOVIA G, DEL ARCO A, MORA F. Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J Neural Transm.* 116(8): 1007-1016, 2009.
130. SHARMA S, RAKOCZY S, BROWN-BORH H. Assessment of spatial memory in mice. 87(17-18): 521-536, 2010.
131. SHUKITT-HALE B, CASADESUS G, CANTUTI-CASTELVETRI I, JOSEPH JA. Effect of age on object exploration, habituation, and response to spatial and nonspatial change. *Behav Neurosci.* 115(5):1059-1064, 2001.
132. SHUKITT-HALE B, MOUZAKIS G, JOSEPH JA. Psychomotor and spatial memory performance in aging male fischer 344 rats. *Experimental Gerontology.* 33(6): 615-624, 1998.
133. SOFFIE M, BUHOT MC, POU CET B. Cognitive and non-cognitive processes involved in selective object exploration: Comparison between young adult and old

- rats. *Physiology & Behavior*. 52:1029-1035, 1992.
134. SORAVIA LM, HEINRICHS M, AERNI A, MARONI C, SCHELLING G, EHLERT U, ROOZENDAAL B, QUERVAIN DJ. Glucocorticoids reduce phobic fear in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(14):5585-90, 2006.
 135. SQUIRE LR, ZOLA SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(24):13515-13522, 2006.
 136. SZELAG E, SKOLIMOWSKA J. Cognitive function in elderly can be ameliorated by training in temporal information processing. *Restor. Neurol. Neurosci*. 30, 419–434, 2012.
 137. TAUPIN P. The Hippocampus: neurotransmission and plasticity in the nervous system. Nova Science Pub. 1 ed. New York, 2007.
 138. TEIXEIRA LCM. Exrcício fésico, neurogênese e memória. Dissertação Universidade de São Paulo, 2013.
 139. THIEL CM, HUSTON JP, SCHWARTING RJK. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, 85: 1253-1262. 2, 1998.
 140. THIEL CM, MÜLLER CP, HUSTON JP, SCHWARTING RJK. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural pharmacology and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93: 243-251. 3, 1999.
 141. THOMAS GJ, BRITO GN, STEIN DP, BERKO JK. Memory and septo-hippocampal connections in rats. *J Comp Phychol*. 93(3): 339-347, 1982.
 142. TORIL P, REALES JM, BALLESTEROS S. Video game training enhances cognition of older adults: a meta-analytic study. *Psychol. Aging* 29, 706–716, 2014.
 143. TULVING E. Episodic and semantic memory. In: TULVING E, DONALDSON W (Eds.), *Organization of Memory*. Academic Press, New York, 1972.

144. WALSH RN, CUMMINS RA. The open-field test: a critical review. *Psych Bull.* 83(3):482-504, 1976.
145. WALSH RN, CUMMINS RA. Changes in hippocampal neuronal nuclei in response to environmental stimulation. *Int J Neurosci.* 94(4):209-212, 1979.
146. WEST MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging.* 14(4):287-293, 1993.
147. WETHERELL JL, GATZ M, CRASKE MG. Treatment of generalized anxiety disorder in older adults. *J Consult and Clin Psych,* 71(1), 31–40, 2003.
148. WILLIS SL, TENNSTEDT SL, MARSISKE M, BALL K, ELIAS J, MANN-KOEPKE K, MORRIS JN, REBOK GW, UNVERZAGT FW, STODDARD AM, WRIGHT E. Long-term effects of cognitive training on everyday functional outcomes in older adults. *JAMA* 296, 2805–2814, 2006.
149. XAVIER GF. A modularidade da memória e o sistema nervoso. *Psicologia USP.* 4(1-2): 61-115, 1993.
150. XAVIER GF, OLIVEIRA-FILHO FJ, SANTOS AM. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and desruption of performance in spatial tasks: difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues?. *Hippocampus.* 9(6): 668-681, 1999.
151. YAU JL, NOBLE J, HIBBERD C, ROWE WB, MEANEY MJ, MORRIS RG, SECKL JR. Chronic treatment with the antidepressant amitriptyline prevents impairments in water maze learning in aging rats. *J Neurosci.* 15, 22(4): 1436-1442, 2002.

8. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF.CEUA/IB/030/2011
Ref. 2011.1.635.41.6

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada no dia 21/06/2011, **APROVOU** o Projeto "Influência da aprendizagem espacial sobre os padrões temporais de expressão das proteínas BMAL1, CLOCK, PER1 e CREB no hipocampo de ratos idosos" - **Protocolo 131/2011**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Aline Vilar da Silva Machado).

Atenciosamente.

Profa. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. GILBERTO FERNANDO XAVIER

Departamento de Fisiologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>