ILTON SANTOS DA SILVA

EXPERIÊNCIA MATERNAL, MEMÓRIA ESPACIAL E NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ADULTA EM RATAS

MATERNAL EXPERIENCE, SPATIAL MEMORY AND ADULT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS IN RATS

SÃO PAULO
2013

ILTON SANTOS DA SILVA

EXPERIÊNCIA MATERNAL, MEMÓRIA ESPACIAL E NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ADULTA EM RATAS

MATERNAL EXPERIENCE, SPATIAL MEMORY AND ADULT HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS IN RATS

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

Orientador: Dr. Gilberto Fernando Xavier

SÃO PAULO

2013

Ficha Catalográfica

Silva, Ilton Santos da

Experiência maternal, memória espacial e neurogênese hipocampal adulta em ratas

177 p.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Experiência maternal 2. Memória 3. Neurogênese hipocampal I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).
Prof(a). Dr(a).	Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier

Orientador

À minha família, Antônio (*in memoriam*), Almerinda, Igor e Thaiany.

"Há aqueles que lutam um dia; e por isso são muito bons;
há aqueles que lutam muitos dias; e por isso são muito bons;
há aqueles que lutam anos; e são melhores ainda;
porém há aqueles que lutam toda a vida;
esses são imprescindíveis."
Bertolt Brecht

Agradecimentos

Agradeço a minha família pelo incentivo, pelo carinho em todos os momentos e por compreenderem a minha ausência para que pudesse me dedicar a essa jornada. Obrigado Almerinda, Igor, Thaiany, Maria, Aurélio e João Batista por estarem sempre por perto nos momentos alegres e difíceis. Nada seria possível sem vocês.

Dezenas de páginas ainda seriam insuficientes, mas tentarei expressar brevemente aqui a minha gratidão aos amigos Edson Tanhoffer e Claudia Sallai, pelo carinho e amizade de sempre; pelo incentivo que começou muito antes do início dessa jornada. Muito obrigado.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Professor Dr. Gilberto F. Xavier, por me receber no seu laboratório, pelas ideias, conversas, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da Pós-Graduação. Obrigado pela amizade. Dedicação incondicional à ciência, compromisso com a educação, disciplina e precisão científica são algumas das qualidades que pude observar de forma destacada no Professor Dr. Gilberto durante esses anos no laboratório e que pretendo tomar como exemplo para minha carreira. Também agradeço aos colegas de laboratório e amigos Arnaldo Cheixas, Barbara Onishi, Carolina Goulart, Cyrus Villas-Bôas, Elisa Jordão, Felipe Rodrigues, João Gimenez, Leopoldo Barletta, Lívia Clemente, Manoel Brito, Paula Moura, Renata Lima, Rodrigo Pavão e Wataru Sumi. Alguns pelo pouco tempo e outros pelos vários anos de companheirismo no trabalho e na diversão. Agradeço também aos colegas funcionários do Departamento de Fisiologia pela ajuda em vários momentos e também ao Instituto de Biociências e a Universidade de São Paulo pelo apoio.

I would like to express my utmost gratitude to Dr. Craig H. Kinsley for having me in his laboratory for a year, for the friendship and the unconditional support, not only in regard to technical and scientific issues, but for making my stay in his laboratory and in the US a priceless personal experience. Dr. Kinsley has a remarkable way of conducting his lab, based on team effort, respect with everyone around him and on a contagious joy in making science. Undoubtedly, Dr. Kinsley is a source of inspiration for me. I would also like to thank Dr. Kelly Lambert for the support in her laboratory; I learned a lot with her as well. Lastly, I thank the fabulous team of neuroscientists from both Kinsley's and Lambert's lab. It was a lot of fun working with everyone. Thank you Amanda Rzucidlo, Courtney Rousse, Dustin Luchmee, Emberly Sinclair, Grandon Atwood, Jamie Blair, Jennifer Tedrick, Juliana Ruiz, Katie Freeman,

Kelly Rafferty, Kristen Lybert, Matt McMaster, Molly Brown, Molly Hyer, Phil Joseph and Susie Zemcik. I also thank the Department of Psychology and the University of Richmond for the support.

Agradeço ao CNPq e a CAPES pelo financiamento que permitiu a realização deste trabalho.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BDNF	do Inglês "*brain-derived neurotrophic factor*", fator neurotrófico derivado do encéfalo
BrdU	5-bromodeoxiuridina
BS	do Inglês "*Blocking solution*", solução usada para incubação de tecidos
CA	sub-campos da formação hipocampal (CA1-CA4)
CM	comportamento maternal
CP	cuidado parental
DCX	doublecortin
ENR	ambiente enriquecido
FH	formação hipocampal
FMB	do Inglês "*Full maternal behavior*", conjunto de comportamentos maternais
GD	giro denteado
HCl	ácido clorídrico
i.c.v	via de administração intracerebroventricular
i.p.	via de administração intraperitoneal
ITI	do Inglês "*Intertrial Interval*", intervalo entre as tentativas
LED	do Inglês "*Light-emmiting diode*", diodo emissor de luz
MR	memória de referência
MO	memória operacional
mPOA	do Inglês "*medial preoptic area*", área preóptica medial do hipotálamo
MULT	multíparas; fêmeas que passaram por duas ou mais gestações e períodos de lactação

WM	do inglês, "*water maze"*, labirinto aquático de Morris
NeuN	"Neuronal Nuclei", marcador nuclear de neurônios maduros
NUL	nulíparas; fêmeas sem experiência maternal
PBS	do Inglês "*Phosphate buffered saline*", solução para manutenção do pH
PRIM	primíparas; fêmeas que passaram por uma gestação e período de lactação
PRIV	privadas; fêmeas que passaram por uma gestação e foram privadas de contato com os filhotes
RAM	do inglês, "*radial arm maze"*, labirinto radial de oito braços
SENS	sensibilizadas; fêmeas virgens que expressam comportamentos maternais pela exposição a filhotes adotivos
SHR	do inglês, "*Spontaneously Hypertensive Rats"*, ratos espontaneamente hipertensos
STD	do Inglês, "*Standard*", gaiola moradia padrão de laboratório
ZSV	zona subventricular

Índice

Resumo ---------- I

Abstract ---------- II

Introdução Geral

Bases evolutivas do cuidado maternal ---------- 1

Comportamento maternal em ratas ---------- 5

Experiência maternal e memória espacial ---------- 11

Experiência maternal e neurogênese hipocampal adulta ---------- 19

Objetivos e justificativa para as abordagens adotadas ---------- 25

Capítulo I

Memória espacial em ratas da linhagem Wistar expostas à experiência maternal

Introdução ---------- 29

Objetivos ---------- 32

Justificativa para a abordagem adotada ---------- 33

Métodos ---------- 34

Animais ---------- 34

Acasalamento ---------- 35

Sensibilização Maternal e constituição dos grupos experimentais ---------- 35

Labirinto aquático de Morris ---------- 37

Procedimentos ---------- 39

Teste de Memória de Referência ---------- 40

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test") ---------- 41

Teste de Memória Operacional ---------- 41

Análise de dados ---------- 43

Resultados - Experimento 1 (avaliação iniciada uma semana após o desmame dos filhotes)

Memória de referência ---------- 44

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test") ---------- 46

Memória operacional ---------- 47

Resultados - Experimento 2 (avaliação iniciada durante o período de cuidados maternais)

Memória de referência ---------- 51

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test") ---------- 53

Memória operacional ---------- 54

Discussão ---------- 60

Capítulo II

Memória espacial em ratas expostas à experiência maternal: uma comparação entre as linhagens Wistar e Sprague-Dawley

Introdução ---------- 70

Objetivos ---------- 72

Justificativa para a abordagem adotada ---------- 72

Métodos ---------- 73

Animais ---------- 73

Acasalamento e constituição dos Grupos Experimentais ---------- 74

Teste de Memória de Referência ---------- 74

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test") ---------- 75

Teste de Memória Operacional ---------- 75

Análise de dados ---------- 75

Resultados ---------- 76

Memória de referência ---------- 76

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test") ---------- 81

Memória operacional ---------- 83

Discussão ---------- 90

Capítulo III

Efeitos do enriquecimento ambiental sobre a memória e neurogênese hipocampal adulta em ratas Sprague-Dawley expostas à experiência maternal

Introdução ---------- 98

Objetivos ---------- 100

Justificativa para a abordagem adotada ---------- 100

Métodos ---------- 102

Animais ---------- 102

Acondicionamento em ambiente enriquecido e constituição dos Grupos Experimentais ---------- 103

Tratamento com BrdU ---------- 105

Tarefas de localização e reconhecimento de objetos - Equipamentos ---------- 106

Tarefas de localização e reconhecimento de objetos - Procedimentos ---------- 107

Histologia ---------- 110

Imunohistoquímica ---------- 111

BrdU ---------- 112

DCX/NeuN ---------- 113

Identificação e quantificação de fenótipos celulares ---------- 113

Análise de dados ---------- 115

Resultados

Localização de objetos (LO) - Primeira tentativa (amostra) ---------- 116

Localização de objetos (LO) - Segunda tentativa (localização) ---------- 119

Reconhecimento de objetos (RO) - Terceira tentativa (reconhecimento) ---------- 122

Resultados Anatômicos - BrdU ---------- 125

DCX ---------- 126

BrdU/DCX ---------- 127

BrdU/NeuN ---------- 128

Discussão ---------- 130

Discussão Geral e Conclusões ---------- 136

Referências Bibliográficas ---------- 142

Anexos - *Parecer do comitê de ética em experimentação animal do IB* ---------- 161

Resumo

O presente estudo avaliou (1) a memória espacial de ratas Wistar expostas a diferentes formas de experiência maternal [primiparidade (PRIM), sensibilização maternal pela exposição a filhotes adotivos (SENS) e primiparidade com privação de contato com os filhotes por 6 horas diárias (PRIV), em comparação com a nuliparidade (NUL)] em tarefas espaciais de memórias de referência e operacional no labirinto aquático de Morris. Os resultados revelaram ausência de diferenças quando os animais são avaliados após o desmame dos filhotes, enquanto que o período de contato com os mesmos resultou em comportamentos relacionados à ansiedade em ratas SENS. Adicionalmente, ratas PRIV exibiram melhor desempenho no teste de memória operacional, possivelmente devido a um efeito de enriquecimento ambiental pela exposição intermitente e contínua aos filhotes durante o período de lactação. Ainda, comparou- se (2) o desempenho de ratas PRIM e NUL das linhagens Wistar (W) e Sprague-Dawley (SDW) nas mesmas tarefas comportamentais no labirinto aquático. As ratas PRIM-SDW exibiram melhores desempenhos em relação às NUL-SDW e também em relação às PRIM-W no teste de memória de referência, enquanto que no teste de memória operacional, as ratas PRIM-SWD exibiram um desempenho superior em relação às PRIM-W. Adicionalmente, ratas SWD, independentemente da experiência maternal, exibiram estratégias de busca mais eficientes para cumprir a tarefa. Por fim, (3) avaliou-se o desempenho de ratas PRIM e NUL da linhagem SWD expostas a um ambiente enriquecido (AE) em comparação com ratas PRIM e NUL mantidas em gaiolas comuns de laboratório (STD) em tarefas de localização e reconhecimento de objetos, bem como as taxas de neurogênese hipocampal desses animais. Os resultados mostraram que as ratas PRIM-AE foram mais sensíveis à alteração na disposição espacial de um objeto familiar em comparação com as NUL-AE. Adicionalmente, as ratas NUL e STD exibiram mais comportamentos relacionados com ansiedade e estresse. Os resultados anatômicos mostraram que a experiência maternal e a exposição ao AE por 45 dias não geraram alterações na neurogênese hipocampal em ratas SWD. Estes resultados mostram que diferentes formas de experiência maternal exercem alterações distintas sobre o comportamento de ratas, de forma dependente do momento em que os animais são avaliados e da linhagem de ratas utilizadas. Adicionalmente, mostram que o AE gera alterações de memória espacial e produz efeitos ansiolíticos, particularmente em ratas PRIM.

Abstract

Maternal experience in rats induces changes in brain and behavior. This study compared (1) spatial memory performances of primiparous (PRIM), pup-induced maternal behaviors (SENS), 6h/daily pup-deprived primiparous (DEP) and nuliparous (NUL) Wistar rats in the reference and working memory versions of the Morris water maze task. No differences were found when the animals were tested after pup's weaning/exposure. On the other hand, lactation/pup exposure period induced anxiety-like behaviors in SENS rats when tested during this period. In addition, DEP rats showed better performances in the working memory task, which may be an "environmental enrichment effect" due the intermittent exposure to the offspring during lactation. We also compared (2) spatial performances of PRIM and NUL rats from 2 different strains, *i.e.*, Wistar (W) and Sprague-Dawley (SDW) in the same tasks described in the first experiment. The results showed better performances of PRIM-SDW groups relative to both NUL-SWD and PRIM-W in the reference memory task, while PRIM-SWD outperformed PRIM-W rats in the working memory task. Additionally, SWD rats, regardless their reproductive status, showed better performance in relation to their search strategies to find the hidden platform. Lastly, we (3) evaluated performances of PRIM and NUL Sprague-Dawley rats exposed to an enriched environment (EE) compared to NUL and PRIM rats housed in standard laboratory cages (STD) in an object placement and object recognition task. All groups were injected with BrdU in order to assess hippocampal cell proliferation, differentiation/migration, and cell survival in these animals. In the place object task, PRIM-AE rats exhibited better performances compared to NUL-AE rats. In addition, NUL and STD rats showed more anxiety and stress-related behaviors. The anatomical data showed no differences among all groups, indicating that enriched environment in a regimen of 45 days exposure or maternal experience had no influence on the hippocampal neurogenesis in Sprague-Dawley rats. Taken together, these data show that different forms of maternal experience in rats induce different effects on behavior, in a time and strain-dependent manner. Also, the results showed that exposure to an enriched environment induced spatial memory alterations and anxyolitic effects, mainly in PRIM rats.

Introdução geral

Bases evolutivas do cuidado maternal

O sucesso reprodutivo e a consequente sobrevivência de muitas espécies dependem diretamente do grau de investimento realizado pelos pais. Esse investimento, expresso na forma de cuidado parental (CP), pode ser definido como qualquer comportamento direcionado a um coespecifico reprodutivamente imaturo que aumenta a probabilidade do mesmo atingir a maturidade (Numan & Insel, 2003). Essencialmente, espécies altriciais dependem *sine qua non* da atenção parental para a garantia de suprimento nutricional, abrigo e proteção contra predadores. De forma geral, o CP inclui a construção de ninhos e tocas, cuidado com os filhotes (ou ovos) dentro ou fora do corpo dos pais, abastecimento alimentar da prole antes e depois do nascimento e o seu cuidado até mesmo após a independência nutricional (Clutton-Brock, 1991).

Embora haja variação no desempenho de cuidados parentais entre os diferentes grupos de animais, o papel da fêmea sobrepõe-se ao do macho em muitos deles. Em cerca de 90% das espécies de mamíferos, o cuidado é uniparental, realizado pela fêmea (Kleiman & Malcolm, 1981; Clutton-Brock, 1991) e o cuidado somente paternal é completamente ausente (Kokko & Jennions, 2008), embora em algumas espécies o pai possa contribuir em menor grau (Gubernick & Teferi, 2000). Já em aves, a ausência do período de gestação e lactação possivelmente contribui para que o papel de ambos os pais seja equiparável: em 81% das espécies, o cuidado é biparental, em 8% envolve somente a fêmea e em 9% ocorre cuidado cooperativo, ou seja, além dos pais, há também ajuda de outros membros do grupo na criação da prole (Cockburn, 2006). Em anfíbios, apesar da ausência de CP na maioria das espécies, algumas delas podem apresentar cuidado maternal ou paternal e, mais raramente, biparental (Beck, 1998; Reynolds et al., 2002).

Há ainda uma correlação entre o desempenho de CPs e o modo de fertilização. Usualmente, o cuidado maternal está associado a espécies que apresentam fertilização interna e o cuidado paternal a espécies que apresentam fertilização externa, tanto em anfíbios, quanto em peixes (Gross & Shine, 1981). Nas espécies de invertebrados que apresentam CP, a fêmea assume o papel principal e o cuidado biparental é raro (Zeh & Smith, 1985). Por fim, a maioria das espécies de répteis costuma esconder seus ovos e não desempenham cuidados parentais após a postura, porém nas espécies que o fazem, o cuidado é realizado pela fêmea ou por ambos os pais (Reynolds et al., 2002; Kokko & Jennions, 2008).

Com base nos dados mencionados anteriormente, é inevitável a discussão sobre a razão (ou razões) que proporcionaram a seleção de um comportamento essencial à sobrevivência da progênie, notavelmente nas fêmeas, uma vez que ambos os pais têm um interesse mútuo na reprodução, *viz* propagar os seus genes. De fato, é possível que durante a história evolutiva dos animais, principalmente dos mamíferos, certas pressões seletivas tenham estimulado o desenvolvimento de cuidados parentais de forma mais pronunciada nas fêmeas. Uma explicação plausível reside na análise do número de gametas e no custo energético para produzi-los em ambos os sexos. Clutton-Brock (1991) sugere que as fêmeas investem mais no cuidado com os filhotes porque apenas um óvulo é fecundado por vez e requer um alto investimento energético ao longo do desenvolvimento embrionário. Por outro lado, a capacidade de fertilização no macho é raramente limitada pela produção de espermas, mas sim pelo número de inseminações ou de fêmeas com quem ele consegue acasalar. De acordo com esse argumento, Williams (1996) enfatiza os papéis distintos do macho e da fêmea no processo reprodutivo, a partir do ato copulatório:

"*A male mammal´s essential role may end with copulation, which involves a negligible expenditure of energy and materials on his part, and only a momentary lapse of attention from matters of direct concern to his safety and well-being. The situation is markedly different for the female, for which copulation may mean a commitment to a prolonged burden, in both the mechanical and physiological sense, and its many attendant stresses and dangers. Consequently the male, having little to lose in his primary reproductive role, shows an aggressive and immediate willingness to mate with as many females as may be available*" (Pág. 163).

Portanto, enquanto na grande maioria das espécies os esforços reprodutivos do macho estão voltados para a competição por acasalamento, a fêmea dirige sua atenção para o bem estar da prole, contribuindo decisivamente para a sua sobrevivência. O papel fundamental da genetriz nessa etapa do processo reprodutivo é enfatizado por uma linha de pensamento que atribui ao surgimento do cuidado maternal um papel central na evolução dos mamíferos e do encéfalo. O defensor dessa ideia, o neuroanatomista Paul MacLean, sugeriu três comportamentos como fatores chaves na transição dos ancestrais reptilianos terapsídeos para os mamíferos (MacLean, 1996): o desenvolvimento de cuidados diretos dos filhotes pela fêmea, a comunicação áudiovocal, que proporcionou o estreitamento do contato entre a mãe e o filhote e possivelmente contribuiu para o desenvolvimento da linguagem; e por fim, o comportamento de brincar, que pode ter surgido como uma necessidade de minimizar a competição entre os filhotes no ninho. Faz sentido, portanto, pensar que o sistema nervoso dos mamíferos tenha desenvolvido mecanismos neurais aprimorados em paralelo ao desenvolvimento dos cuidados maternais, o que permitiria a execução de comportamentos mais complexos em comparação com a postura de

ovos e o abandono do ninho nos ancestrais reptilianos. Em apoio a sua teoria, MacLean propôs ainda que as mães conduziram a espécie humana a exibir dominância no uso mão direita para executar a maioria das funções. Segundo MacLean, essa lateralidade surgiu em virtude da necessidade das mães em segurar os seus bebês com a mão esquerda, próximo ao coração, assim suas batidas ajudariam a acalmá-los; consequentemente, a mão direita era usada para executar todas as outras funções. MacLean sugeriu que o fato de carregar o bebê com a mão esquerda pode ter influenciado a expansão anatômica e funcional do hemisfério direito nas mulheres, contribuindo para a formação de um encéfalo preparado para lidar com as múltiplas demandas impostas pelo período de cuidados com a prole (MacLean, 1999; Lambert, 2003). Reforçando a importância da influência maternal sobre a evolução do encéfalo nos mamíferos, Keverne et al. (1996) realizaram um experimento seminal mostrando o papel do genoma parental no desenvolvimento de diferentes estruturas encefálicas. Utilizando camundongos quiméricos androgenéticos (animais com o genoma paternal duplicado, *i.e.* ambas as cópias alélicas provenientes do pai) e partenogenéticos (animais com o genoma maternal duplicado, *i.e.* ambas as cópias alélicas provenientes da mãe), os autores investigaram a distribuição e o desenvolvimento das células dissômicas provenientes de ambos os pais no encéfalo da progênie. Os resultados mostraram que houve um acúmulo das células de origem paternal em estruturas do hipotálamo, mas não no córtex; em contraste, as células de origem maternal se acumularam no córtex, estriado e hipocampo, mas não no hipotálamo. Adicionalmente, foi observado que os encéfalos dos animais partenogenéticos apresentaram tamanhos maiores e dos animais androgenéticos tamanhos menores em termos de medida absoluta e de forma mais pronunciada em relação ao tamanho do corpo. Os autores sugerem que a herança matrilineal contribui para o desenvolvimento de estruturas relacionadas às funções cognitivas mais complexas, enquanto que

o genoma patrilineal atua no desenvolvimento de áreas envolvidas com comportamentos motivacionais primários.

O período de cuidados maternais coloca a fêmea diante de um conflito, onde ela deve ser capaz de estabelecer prioridades, gerenciar o seu próprio sustento e o compartilhamento de seus recursos energéticos com os filhotes (Hrdy, 2001). É possível, portanto, que durante a história evolutiva dos animais, mecanismos neurais adaptativos tenham surgido nas fêmeas para suprir as demandas de um período energeticamente e comportamentalmente desafiador, onde a fêmea deve estar preparada para garantir que o seu investimento metabólico e genético não seja perdido.

Comportamento maternal em ratas

A transição para a maternidade representa um irrefragável comprometimento em muitos aspectos. Um organismo que antes era completamente devotado às suas próprias necessidades agora deve redirecionar a sua atenção para o cuidado e bem estar do mais precioso produto do seu investimento genético e metabólico, *viz* a prole. Em ratos de laboratório, a fêmea exibe comportamentos essenciais à sobrevivência dos seus filhotes antes mesmo que eles nasçam. Por exemplo, alguns dias antecedentes ao parto, a rata começa a amontoar o material usado para revestir o assoalho da gaiola até formar um aglomerado de bordas compactas e com uma depressão no centro. Esse aglomerado servirá como ninho onde a fêmea repousará durante o parto e que cumprirá a importante função de contribuir na termorregulação dos filhotes (Leon & Woodside, 1983; Lonstein & Morrel, 2007). Durante o parto, a rata cuidadosamente puxa os filhotes emergentes do canal vaginal; então ela os remove do saco amniótico e executa uma cuidadosa limpeza corporal com o objetivo de remover o líquido amniótico; por fim, a rata

rompe a ligação entre os filhotes, o cordão umbilical e a placenta (Hollaway et al., 1980; Lonstein & Morrel, 2007), marcando o início de um período onde o repertório comportamental aprimorado da fêmea fará a diferença entre a sobrevivência ou a morte da sua prole.

Essencialmente, os comportamentos maternais (CMs) que a genetriz exibe garantem a nutrição, termorregulação e proteção dos filhotes. Em ratos, esses comportamentos podem ser divididos em cuidados diretos ou ativos (Numan & Insel, 2003; Lonstein & Morrel, 2007), como a remoção dos filhotes durante o parto e a limpeza corporal, mencionados anteriormente; recuperação e agrupamento, *i.e.*, a fêmea cuidadosamente carrega os filhotes dispersos na gaiola em sua boca e os coloca em grupo num único local, com o objetivo de manter uma temperatura corporal constante entre eles. Ainda, a rata exibe um comportamento de agachar sobre a ninhada em posição de cifose maternal (Stern & Lonstein, 2001; Stern & Keer, 2002), uma postura caracterizada pela flexão ascendente da coluna vertebral que serve a diversos propósitos. Entre eles, permite o acesso à região das mamas pelos filhotes, facilitando o aleitamento; também contribui para que a fêmea execute uma limpeza corporal mais detalhada da sua ninhada, particularmente da região anogenital, que por sua vez exerce um papel fundamental na estimulação da excreção e no desenvolvimento emocional dos filhotes (Stern & Keer, 2002; Numan & Insel, 2003; Lonstein & Morrel, 2007; Numan & Stolzenberg, 2008). Por outro lado, os cuidados indiretos (Numan & Insel, 2003) consistem na construção de ninhos e a agressão contra intrusos, comportamentos que não são dirigidos diretamente aos filhotes, mas contribuem para protegê-los contra possíveis predadores ou qualquer ameaça iminente (Lonstein & Morrel, 2007). Coletivamente, esse conjunto de atividades que a fêmea desempenha em benefício da sua prole é tradicionalmente conhecido por comportamento maternal completo, ou "*Full Maternal Behavior*" (FMB) (Stern & Lonstein, 2001; Numan & Insel, 2003; Lonstein & Morrel, 2007).

Consequentemente, a coleta de dados relacionados a CMs específicos, *e.g.*, latência para agrupar os filhotes, ou em forma de FMB permite avaliar a responsividade da fêmea às necessidades da prole, sendo medidas tradicionalmente utilizadas em estudos sobre CM (Fleming & Rosenblatt, 1974; Pedersen et al., 1982; Brown et al., 1996; Bridges et al., 1997).

O CM em roedores é estimulado por uma série de fatores e suas interações. Diferente de uma rata nulípara (NUL), *i.e.,* uma fêmea sem qualquer tipo de experiência maternal, a rata primípara (PRIM), *i.e.*, uma fêmea que vivencia sua primeira gestação e período de lactação, prontamente acolhe os seus filhotes assim que eles nascem, sugerindo a existência de fatores relacionados ao fim da gestação e período pós-parto que desencadeiam o desempenho de CMs já na primeira exposição aos filhotes. Entre esses fatores, as alterações nos níveis dos hormônios esteroides ovarianos estradiol (E_2) e progesterona (P) e dos hipofisários ocitocina (OX) e prolactina (PRL) comumente observadas durante esse período exercem um papel central em promover o início dos CMs em ratas (Terkel & Rosenblatt, 1968; Pedersen et al., 1982; Bridges, 1984; Bridges et al., 1985; Bridges et al., 1997). Em suporte ao papel hormonal na indução do CM, Terkel & Rosenblatt (1968) realizaram um estudo seminal, onde ratas virgens receberam injeções contendo sangue de ratas pós-parturientes dentro de 48 horas após o parto e então foram expostas a filhotes adotivos para avaliação do CM. Os resultados mostraram que as ratas que receberam sangue das mães exibiram latências menores para agrupar os filhotes adotivos em comparação com ratas virgens que receberam sangue de outras ratas virgens ou em comparação com ratas que receberam solução salina, sugerindo que alguma substância presente no sangue das ratas pós-parturientes promovia o desempenho de CMs em ratas sem qualquer experiência reprodutiva anterior. De fato, durante a primeira metade da gestação os níveis plasmáticos de E_2 são baixos, aumentam por volta do dia 15 e se mantêm elevados até o dia do parto, *viz* dia 22; em

contraste, a P se mantém em níveis altos até ao redor do dia 15 e então começa a diminuir, com uma queda abrupta após o dia 20 (Numan & Insel, 2003), sugerindo que a indução do CM em ratas pode residir nas flutuações nos níveis desses hormônios. Consistentemente, diversos estudos revelaram a importância do E_2 e P na indução do CM em ratas, principalmente do E_2 (Bridges, 1984; Rosenblatt et al., 1994; Rosenblatt & Ceus, 1998; Rosenblatt et al., 1998). Adicionalmente, o CM maternal também pode ser induzido em ratas NUL pelo tratamento sistêmico ou intracerebroventricular (icv) com PRL (Bridges et al,. 1985; Bridges et al., 1990; Bridges, 1994; Bridges et al., 1997), bem como pela administração icv de OX (Pedersen et al., 1982; Rubin et al., 1983; Fahrbach et al., 1984; Wamboldt & Insel, 1987). Assim, fica claro o papel dos hormônios relacionados à gestação e ao período pós-parto no desencadeamento dos CMs na rata, sugerindo a existência de uma relação com a circuitaria neural envolvida no CM.

A área preóptica medial (mPOA), localizada na porção rostral do hipotálamo, é um dos mais bem estudados sítios neurais relacionados ao CM. Essa relação é apoiada por duas principais linhas de evidências experimentais. A primeira mostra que lesões na mPOA prejudicam severamente o desempenho de CMs como construção de ninhos, agrupamento e limpeza corporal dos filhotes, mas sem afetar outras funções motoras ou cognitivas (Numan et al., 1977; Jacobson et al., 1980; Fleming et al., 1983; Numan & Smith, 1984; Cohn & Gerall, 1989; Oxley & Fleming, 2000; Stack et al., 2002; Numan, 2006; Lee & Brown, 2007). A segunda reside na análise da interação entre hormônios e a mPOA, *i.e.*, a administração de E_2 (Numan et al., 1977; Fahrbach & Ptaff, 1986), PRL (Bridges et al., 1996; Bridges et al., 1997), ou OX (Pedersen et al., 1982; Fahrbach et al., 1984) diretamente nessa área diminuem a latência para a exibição de CMs em ratas NUL, sugerindo que a mPOA é uma região alvo para a ação dos hormônios na indução do CM. Consistentemente, há estudos mostrando que a mPOA possui um

número considerável de receptores de estrógenos (Shughrue et al, 1997), progesterona (Numan et al., 1999) e PRL (Bakowska & Morrel, 1997), o que torna essa região nervosa sensível às flutuações hormonais comuns durante a gestação e período pós parto. A mPOA também se mostra notavelmente plástica frente aos hormônios E_2 e P, exibindo modificações na extensão dos seus ramos dendríticos e também no formato e tamanho dos corpos celulares dos seus neurônios durante o fim da gestação ou em virtude do tratamento com E_2+P em ratas virgens ovariectomizadas, com o objetivo de mimetizar as flutuações hormonais da gestação (Keyser-Marcus et al., 2001). Adicionalmente, a expressão da proteína *Fos* pelos neurônios da mPOA tem um papel relevante na manutenção do comportamento maternal (Numan & Numan, 1997; Stack & Numan, 2000), uma vez que sofre modulação pelo tempo de interação entre a mãe e os filhotes (Fleming & Walsh, 1994; Numan et al., 1998). Em apoio ao papel da proteína *Fos* sobre o CM, Brown et al. (1996) mostraram que camundongos mutantes para inativação do gene *Fos B* foram incapazes de desempenhar CMs de forma adequada, comprometendo a sobrevivência dos seus filhotes. Dessa forma, esse resultado sugere que o CM também é influenciado por um componente genético.

Entretanto, existe uma rota de acesso à circuitaria neural subjacente ao CM que é independente de ação hormonal, ou seja, ratas virgens podem exibir CMs sem a influência dos eventos endócrinos associados ao fim da gestação (Numan & Insel, 2003). Inicialmente, uma rata NUL que é exposta a filhotes adotivos tende a evitá-los ou pode até mesmo cometer infanticídio (Rosenblatt, 1967; Mennela & Moltz, 1989), porém entre 4 e 7 dias de coabitação, a fêmea NUL gradualmente começa a construir ninhos, agrupa os filhotes, repousa próximo a eles e realiza limpeza corporal da ninhada de forma semelhante a uma fêmea que passou pelo período de gestação, um processo tradicionalmente conhecido como sensibilização maternal (Rosenblatt,

1967; Fleming & Rosenblatt, 1974; Fleming & Luebke, 1981; Numan & Insel, 2003). Confirmando a não dependência da ação de hormônios relacionados à gestação sobre o CM, Rosenblatt (1967) submeteu grupos de ratos machos castrados ou intactos, bem como grupos de fêmeas NUL ovariectomizadas e hipofisectomizadas ou intactas ao processo de sensibilização maternal. Os resultados mostraram que depois de alguns dias, praticamente todos os animais exibiram CMs típicos, com pequenas diferenças na latência para sensibilização entre os grupos. Por outro lado, o tratamento hormonal que mimetiza os eventos endócrinos relacionados ao fim da gestação promove uma diminuição significativa na latência para a sensibilização maternal em ratas NUL (Numan et al., 1977; Pedersen et al., 1982; Fahrbach & Ptaff, 1986; Bridges et al., 1996; Bridges et al., 1997), sugerindo que a ação hormonal é necessária para promover o início dos CMs logo após o parto, mas não para a sua manutenção ao longo do período pós-parto. Embora sejam incapazes de lactar (Fleming & Luebke, 1981; Numan & Insel, 2003), ratas sensibilizadas pelo contato com filhotes adotivos (SENS) exibem CMs praticamente indistinguíveis aos de uma fêmea pós-parturiente, exceto por alguns aspectos particulares relacionados à postura de agachamento sobre os filhotes, possivelmente pelo fato de não possuírem mamas desenvolvidas e, portanto, não receberem a estimulação sensorial causada pela sucção (Rosenblatt, 1967; Numan & Insel, 2003). Exceto pela ausência do estímulo causado pela sucção, todas as outras formas de interação somatossensorial entre uma rata NUL e os filhotes adotivos parecem ser importantes para a manutenção do CMs observados em ratas sensibilizadas (Stern & Mackinnon, 1976; Lonstein & Morrell, 2007), uma vez que a presença de filhotes pode ser considerada como um reforço de alto valor sensorial e uma forma de enriquecimento ambiental (Mattson et al., 2001, Kinsley et al., 2012).

Portanto, o CM em ratas tem origem complexa e multifatorial. Não somente o estado humoral da genetriz é capaz de modular o cuidado que ela dispensa à sua prole, mas também a combinação entre as experiências sensoriais com os filhotes e as influências ambientais que por sua vez, culminam com as alterações nervosas necessárias para um comportamento aprimorado e essencial para a sobrevivência dos filhotes.

Experiência maternal e memória espacial

A capacidade que os animais têm de deslocar-se no ambiente de forma eficiente depende do conhecimento sobre rotas, trajetos percorridos e suas relações com estímulos do ambiente, como sugeriu Edward C. Tolman em 1948 após uma série de estudos nos quais investigou o comportamento de ratos em labirintos:

> " … *we believe that in the course of learning something like a field map of the environment gets established in the rat's brain ... and it is this tentative map, indicating routes and paths and environmental relationships, which finally determines what responses, if any, the animal will finally release"* (Tolman, 1948, pág. 193).

O tipo de aprendizagem à qual Tolman fez menção refere-se à capacidade que os animais têm de formar um mapa cognitivo e usá-lo para navegar no ambiente. O modo de navegação por meio de um mapa cognitivo, de acordo com a teoria proposta por O'Keefe & Nadel (1978), é composto por dois principais sistemas distintos: o primeiro, *place system*, é um sistema de memória relacionado aos locais do ambiente no qual o animal vive e suas relações espaciais com

objetos específicos, posicionados em locais também específicos desse ambiente. O segundo, *misplace system*, está relacionado com alterações em um local particular, envolvendo a presença de um novo objeto ou a ausência de um objeto familiar. Segundo os autores, o uso do *place system* permite que o animal possa avaliar a sua própria posição em um ambiente familiar e deslocar-se de um local a outro independente de qualquer pista sensorial em particular, mas sim por meio de cálculos envolvendo um sistema de triangulação que utiliza pares de estímulos e o seu próprio corpo como vértices. Já o *misplace system* está relacionado à atividade exploratória dos animais, que permite a construção de mapas dos ambientes novos e a incorporação de novas informações ou objetos aos mapas já existentes.

No entanto, os animais podem deslocar-se no ambiente de outras formas além do uso de mapas cognitivos. O'Keefe & Nadel (1978) propuseram a existência de um segundo modo de navegação por meio de uma sistema denominado *taxon system*, que é baseado no uso de estratégias egocêntricas, *i.e.*, o deslocamento baseado em rotações e movimentos do próprio corpo do animal. O *taxon system* é subdividido ainda em estratégias de guiamento e orientação; na primeira, o animal atribui valor a um objeto ou alguma forma de reforço e simplesmente move-se em direção ou afasta-se por meio da redução ou aumento da distância entre o seu próprio corpo e o alvo. Já no uso da estratégia de orientação, o animal utiliza uma pista do ambiente e então orienta o seu deslocamento com base na rotação do seu eixo corporal em relação a essa pista (O'Keefe & Nadel, 1978), por exemplo, adotando sempre uma direção em sentido horário ou anti-horário ao navegar por um labirinto radial até encontrar o reforço ao acaso, o que caracteriza o uso de uma estratégia de orientação independente do uso de mapeamento cognitivo (Yoerg & Kamil, 1982).

O'Keefe & Nadel (1978) sugerem ainda importantes diferenças entre as formas de navegação no ambiente por meio do uso de mapas cognitivos e estratégias de guiamento/orientação. De acordo com os autores, a primeira forma confere maior flexibilidade ao organismo, permite uma rápida adaptação às alterações no ambiente e a evocação de informações específicas adquiridas em contextos também específicos, resultando numa forma de deslocamento eficiente mesmo que poucas pistas familiares estejam disponíveis. Em contraste, a segunda forma é independente de informações contextuais, requer repetição extensiva e envolve a execução de comportamentos estereotipados e pouco flexíveis. Olton (1983) ainda faz a distinção entre memórias espaciais de referência e operacional. A primeira está relacionada com a formação de uma memória estável, de longo prazo, que pode ser usada para guiar uma ação em várias tentativas de uma tarefa espacial. Já a memória operacional envolve a manipulação e evocação de informações condicionadas a uma única tentativa, as quais podem ser usadas para orientar uma ação prospectiva e, logo após o seu uso podem ser descartadas (Olton & Papas, 1979; Olton, 1983).

Adicionalmente, O'Keefe & Nadel (1978) propuseram um modelo neural subjacente às funções de memória espacial que atribui um papel fundamental à formação hipocampal (FH) para a formação do mapa cognitivo, mas não para o desempenho com base em estratégias de guiamento e orientação. O envolvimento do hipocampo na construção do mapa cognitivo é apoiado essencialmente pela descoberta de células piramidais que disparam quando o animal explora uma porção particular do seu ambiente (O'Keefe & Dostrovsky, 1971), *i.e.,* enquanto o animal se desloca num ambiente familiar, células piramidais individuais no hipocampo entram em atividade e parecem codificar as relações espaciais entre os pares de estímulos de cada local do ambiente, permitindo a construção de uma espécie de "mapa neural" multi-modal,

representando aquele ambiente (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; O'Keefe & Nadel, 1978; Burgess et al., 1994; Shapiro et al., 1997; Morris, 2000).

A FH é uma estrutura que mantém uma organização citoarquitetônica similar em diversas espécies de vertebrados (Figura 1A). Ela está localizada bilateralmente no lobo temporal medial e é constituída coletivamente pela *fascia dentata* ou giro denteado (GD), subículo, pré-subículo, parasubículo, córtex entorrinal e o hipocampo propriamente dito, este último composto pelos subcampos CA1-CA4 (Figura 1B) (O'Keefe & Nadel, 1978; Swanson, 1983; Andersen et al., 2007). Sugere-se que a notável organização estrutural da FH em forma de lamelas bem definidas confere à estrutura a capacidade de avaliar múltiplas combinações entre os estímulos do ambiente, considerando que a formação do mapa cognitivo é um sistema multi-modal (O'Keefe & Nadel, 1978).

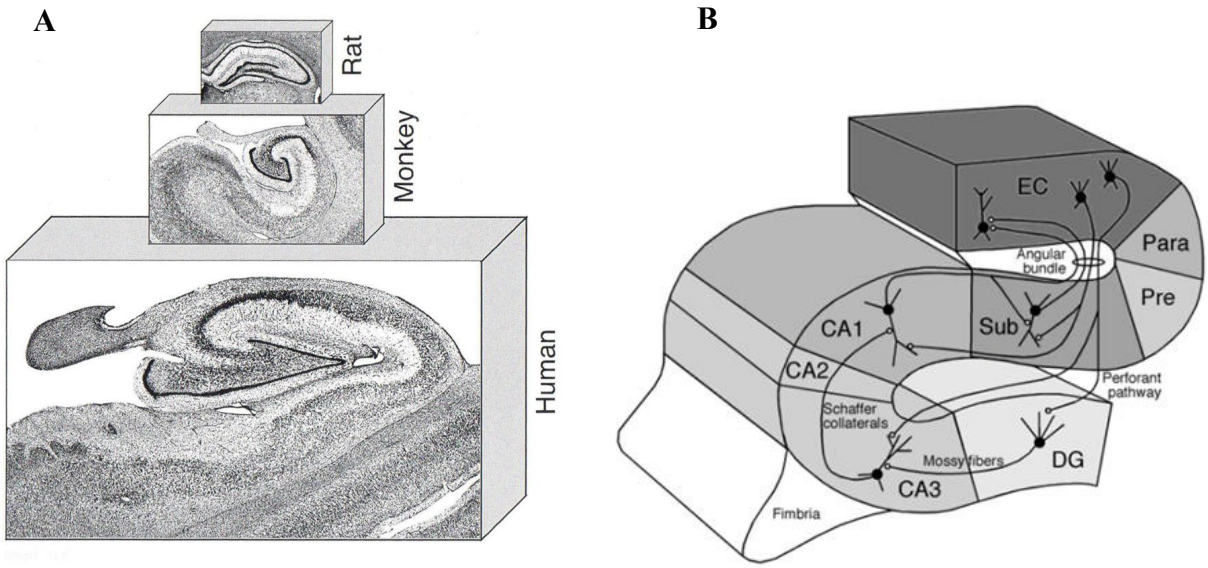


Figura 1. Secções coronais da formação hipocampal (FH) de ratos, macacos e humanos tratadas com a coloração de Nissl, mostrando a similaridade na organização citoarquitetônica dessa estrutura entre as diferentes espécies **(A)**. A FH é formada pelo córtex entorrinal (EC), giro denteado (DG), subículo (Sub), pré-subículo (Pre), parasubículo (Para), e o hipocampo propriamente dito (subcampos CA1-CA4; CA=

cornu ammonis); também é possível observar as conexões entre as estruturas da FH por onde ocorre o fluxo das informações que entram e saem pelo EC **(B)**. (Figuras retiradas de Andersen et al., Em: *The hippocampus book,* Oxford University Press, 2000).

De fato, o desempenho de tarefas que envolvem a construção de um mapa cognitivo requer a integridade da FH (Morris et al., 1982; Auer et al., 1989; McNaughton et al., 1989; Morris et al., 1990; Gallagher & Holland, 1992; Xavier et al., 1999), embora os animais possam adquirir, pelo uso de estratégias de guiamento/orientação, informações relevantes sobre as tarefas mesmo após extensas lesões hipocampais (Eichenbaum et al., 1990; Xavier et al., 1999), indicando que podem utilizar ambas as formas de navegação simultaneamente, mas dependem de estratégias de guiamento/orientação quando o mapeamento cognitivo não é possível em virtude de danos ao hipocampo (Whishaw & Mittleman, 1986; O'Keefe & Nadel, 1978; Xavier et al., 1999). O hipocampo e estruturas relacionadas também parecem essenciais para o desempenho de tarefas de memória operacional, mas não de tarefas envolvendo a aquisição de memórias de referência (Olton, 1983).

Portanto, a memória espacial em roedores é uma função que depende em grande parte da integridade da FH, uma vez que essa estrutura contém uma representação do ambiente, permitindo a navegação de forma eficiente mesmo em um habitat em constante mudança. Embora os animais possam deslocar-se de outras formas independentemente da participação da FH, esta última confere maior flexibilidade e permite que o animal esteja adaptado para lidar com situações em que a otimização do seu deslocamento seja essencial para sua sobrevivência.

Em uma fêmea de mamífero, a maternidade gera uma série de adaptações em diversos níveis, não só visando atender as necessidades da prole, mas também suprir o aumento da demanda energética na genetriz. Como mencionado na seção anterior, os cuidados maternais

dirigidos diretamente à prole são essenciais à sua sobrevivência. No entanto, o aprimoramento de comportamentos na fêmea que não são diretamente relacionados aos filhotes também pode resultar em benefícios de extrema importância para a sobrevivência dos seus descendentes. Por exemplo, num ambiente hostil e com fontes escassas de alimento, é importante que a fêmea seja hábil o bastante para forragear em locais distintos, percorrer trajetos otimizados e em um curto espaço de tempo, permitindo que ela possa voltar ao ninho rapidamente para garantir a proteção dos filhotes contra possíveis predadores e com o mínimo gasto energético (Kinsley et al., 1999; Silva et al., 2012). O aprimoramento de tais habilidades implica em alterações cognitivas que até recentemente não eram associadas à experiência maternal, particularmente alterações de memória espacial. De fato, nas últimas décadas, estudos com roedores em laboratório vêm mostrando que a experiência maternal gera alterações de desempenho em tarefas que avaliam a memória espacial (Kinsley et al., 1999; Galea et al., 2000; Pawluski et al., 2006, Zimberknopf et al., 2011).

Em um estudo pioneiro, Kinsley et al. (1999) submeteram ratas da linhagem Sprague-Dawley multíparas (MULT, animais que vivenciaram duas ou mais gestações e períodos de lactação) após o desmame da última ninhada e NUL em idade equivalente a 16 dias de teste numa versão que avalia a memória de referência no labirinto radial de oito braços (*radial arm maze*, RAM). Os resultados mostraram que as ratas MULT cometeram menos erros ao procurar pelo alimento já nos primeiros seis dias de teste ao passo que as NUL gradualmente alcançaram o mesmo desempenho a partir do sétimo dia de treino na tarefa, indicando que a experiência maternal torna as fêmeas forrageadoras mais eficientes. Por outro lado Pawluski et al. (2006b) mostraram que ratas PRIM da linhagem Long Evans, avaliadas a partir de 4 dias após o desmame dos filhotes cometeram menos erros em comparação com ratas NUL ao escolherem os

braços reforçados nos testes do RAM, de forma independente da versão avaliada, *i.e.*, memórias de referência ou operacional. Resultados similares também foram observados em ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley avaliadas no mesmo teste comportamental a partir de 34 dias após o desmame dos filhotes (Pawluski et al., 2006a), indicando que a experiência maternal altera o desempenho espacial no RAM num período longo após a separação entre os filhotes e a genetriz. Interessantemente, ratas NUL sensibilizadas pela exposição contínua a filhotes adotivos também mostram um desempenho superior às ratas que nunca tiveram contato com filhotes, numa versão seca do labirinto aquático de Morris (Kinsley et al., 1999; Lambert et al., 2005). Adicionalmente, ratas maternalmente experientes da linhagem Fischer 344, também superaram as NUL em tarefas que avaliam a memória para familiaridade e disposição espacial de objetos (Macbeth et al., 2008a,b). Essas alterações de desempenho espacial em ratas que passaram pela experiência maternal também são observadas quando os animais são avaliados em idades mais avançadas numa versão seca do labirinto aquático de Morris (Love et al., 2005), além disso, essas ratas exibem um declínio de memória espacial menos acentuado aos 24 meses de idade em comparação com ratas NUL em idade equivalente (Gatewood et al., 2005), indicando que as alterações nervosas proporcionadas pelos eventos que compõem a experiência maternal produzem benefícios duradouros à fêmea. No entanto, Bodensteiner et al. (2006) mostraram que ratas Long Evans avaliadas no labirinto aquático de Morris durante a gestação e uma semana após o parto não diferiram de ratas NUL numa tarefa de memória de referência, mas foram mais rápidas ao aprender a nova localização da plataforma numa versão que avalia a memória operacional. Adicionalmente, Darnaudéry et al. (2007) mostraram que ratas Sprague-Dawley PRIM exibiram prejuízo acentuado no teste de memória de referência no labirinto aquático nos quatro primeiros dias após o parto. Ainda, Zimberknopf et al. (2011) mostraram que ratas PRIM

jovens da linhagen Wistar exibiram estratégias diferentes em relação às NUL ao desempenharem as tarefas de memória de referência e operacional no labirinto aquático de Morris. Portanto, essa discrepância entre os resultados mencionados pode residir em parte nas condições experimentais empregadas, na linhagem de ratas utilizadas e/ou pode refletir uma dependência do momento em que os animais são avaliados (*i.e.*, durante a gestação, logo após o parto ou ainda após o desmame dos filhotes). Ratas que passaram pela experiência maternal mostram ainda redução da ansiedade e estresse quando expostas a labirintos abertos e elevados, geralmente temidos por roedores (Wartella et al., 2003; Love et al., 2005; Macbeth et al., 2008a), efeito que parece ser dependente da interação física com os filhotes (Lonstein, 2005).

Uma vez que o hipocampo é uma estrutura intimamente relacionada com a memória espacial (O'Keefe & Nadel, 1978, Xavier et al., 1999), é possível que as alterações de desempenho observadas em virtude da experiência maternal estejam relacionadas a modificações nessa estrutura. Em suporte a essa hipótese, Kinsley et al. (2006) compararam a densidade de espinhas dendríticas no sub-campo CA1 do hipocampo entre grupos independentes de ratas nulíparas em diferentes fases do ciclo estral (NUL), ratas ao fim da gestação (LP), lactantes (LAC), ratas ovarietomizadas (OVZ) e ovariectomizadas tratadas com E_2 e P (OVZ+E_2 e P), este último grupo incluído na tentativa de mimetizar as flutuações desses hormônios que ocorrem naturalmente durante a gestação. Os resultados mostraram que os grupos LP, LAC e OVZ+E_2 e P exibiram maior densidade de espinhas dendríticas em relação aos demais grupos, porém não diferiram entre si, sugerindo que o hipocampo apresenta uma notável plasticidade frente às flutuações hormonais que ocorrem durante a gestação e período pós-parto. Efeitos similares também foram observados no sub-campo CA1 e CA3 de ratas PRIM e MULT após o desmame dos filhotes (Pawluski & Galea, 2005). Ademais, Wooley & McEwen (1992) mostraram que o

efeito do E_2 sobre a densidade das espinhas dendríticas do hipocampo é regulado via um mecanismo dependente de receptores de N-metil D-aspartato (NMDA). Ainda, Tomizawa et al. (2003) mostraram que o hormônio ocitocina promove aumento na duração da LTP tanto em fatias de hipocampo tratadas em cultura quanto no hipocampo de ratas lactantes *in vivo*, sem tratamento hormonal artificial.

Portanto, os estudos mencionados indicam que a fêmea passa por alterações comportamentais durante um período importante da sua vida reprodutiva, contribuindo para a melhoria de um repertório comportamental essencial à sobrevivência dos filhotes e da própria genetriz. As alterações de memória espacial, em particular, podem ser o resultado das adaptações plásticas observadas no hipocampo, uma estrutura que se mostra notavelmente sensível às flutuações hormonais oriundas do período de gestação e pós-parto, sugerindo que o encéfalo materno é beneficiado por mecanismos neurais adaptativos que contribuem para suprir as demandas energéticas e comportamentais impostas pela maternidade.

Experiência maternal e neurogênese hipocampal adulta

A ideia inicial de que o encéfalo era incapaz de produzir novas células além do período de desenvolvimento pré-natal começou a mudar a partir de 1960. Uma série de estudos pioneiros conduzidos por Joseph Altman mostrou que o nascimento de novas células é um fenômeno que ocorre continuamente ao longo da vida adulta, particularmente no córtex, hipocampo e bulbo olfatório de ratos (Altman, 1962; Altman, 1963; Altman & Das, 1965; Altman, 1966; Altman & Das, 1966; Altman, 1969). No entanto, os trabalhos de Altman foram incisivamente criticados em virtude dos métodos utilizados para marcar as novas células, os quais não eram completamente confiáveis na época. A partir da década de 1980, com o surgimento do BrdU (5-

bromodeoxiuridina), um análogo sintético da timidina que se integra permanentemente ao DNA de células em divisão, a neurogênese passou a ser estudada de forma mais ampla, o que levou a descoberta de novas células nascendo em encéfalos adultos de várias espécies, incluindo aves (Goldman & Nottebohm, 1983), roedores (van Praag et al., 1999), macacos (Kornack & Rakic, 1999) e humanos (Eriksson et al., 1999). A facilidade de uso do BrdU e a confiabilidade na sua detecção por métodos imunohistoquímicos permitiram a confirmação definitiva de que a neurogênese ocorre de forma mais pronunciada em duas regiões encefálicas: a zona subventricular (SVZ) localizada nas paredes dos ventrículos laterais (Galvão et al., 2008; Xing et al., 2008; O'Keeffe et al., 2009) e o giro denteado (GD) da formação hipocampal (Kempermann et al., 1997; Eriksson et al., 1998; van Praag et al., 2005). A ocorrência da neurogênese nesta última gera uma série de questões intrigantes sobre o seu significado funcional. Uma vez que o hipocampo é tradicionalmente conhecido pelo seu envolvimento com a memória, é possível que a adição de novos neurônios nessa área contribua para o aprimoramento dessas funções, particularmente de memórias do tipo espacial (van Praag et al., 2002; Madsen et al., 2003; Wiskott et al., 2006; Aimone et al., 2011).

O uso de marcadores específicos tem sido uma estratégia experimental valiosa no estudo da neurogênese, desde o nascimento de uma nova célula até a sua caracterização fenotípica e funcional. Em ratos, o ciclo celular é de aproximadamente 24 horas (Cameron & Mckay, 2001) e o BrdU é incorporado às células em divisão, particularmente na fase S da mitose por cerca de 5-6 horas após a sua aplicação, embora esse tempo possa variar dependendo da dose inicial (Hayes & Nowakoski, 2000; Magavi & Macklis, 2008). As células que sobrevivem, podem iniciar o processo de crescimento e extensão de axônios e ramificações dendríticas dos dias 4 a 15 após o nascimento (Hastings & Gould, 1999). Essa fase pode ser caracterizada pela marcação da

Doublecortin (DCX), uma proteína endógena associada aos microtúbulos, expressa particularmente em neurônios imaturos (Brown et al., 2003; Couillard-Després et al., 2005). A partir de cerca de 2 semanas, os novos neurônios expressam uma proteína nuclear chamada "Neuronal Nuclei" (NeuN) que em co-expressão com o BrdU pode fornecer um índice de maturação e sobrevivência celular (Mullen et al., 1992; Leuner et al., 2007; Furuta & Bridges, 2009; Epp et al., 2011). Com 4 semanas de vida, os novos neurônios tornam-se eletrofisiologicamente maduros; a partir de 4 meses, apresentam morfologia semelhante aos neurônios com maior tempo de vida e integram-se completamente à circuitaria neural pré-existente (van Praag et al., 2002).

A neurogênese adulta é modulada por uma série de fatores endócrinos e ambientais. Por exemplo, Eisch et al. (2000) mostraram que o tratamento crônico com morfina ou heroína reduz significativamente a taxa de neurogênese na camada de células granulares do giro denteado de ratos. Ademais, a elevação nos níveis plasmáticos de corticosterona em virtude de experiências que geram estresse também pode prejudicar o nascimento de novas células no hipocampo (Tanapat et al., 1998; Gould et al., 2000), possivelmente por meio de um mecanismo que envolve a liberação e acúmulo de glutamato (Stein-Behrens et al., 1994). Por outro lado, alguns hormônios ovarianos exercem efeitos positivos sobre a neurogênese hipocampal adulta. Tanapat et al. (1999) mostraram que ratas submetidas ao procedimento de ovariectomia, visando eliminar a produção de estrógenos, apresentam menor número de células em proliferação marcadas com BrdU no hipocampo, um efeito que foi revertido pela reposição de estrógenos. Estendendo a investigação sobre a influência dos estrógenos na neurogênese hipocampal adulta, Barha et al. (2009) mostraram que a administração de diferentes formas de estrógeno aumenta significativamente o número de novas células no GD de ratas jovens ovariectomizadas, porém de

forma dependente da dose. Particularmente, o estrógeno 17β-estradiol aumenta não só a sobrevivência, mas também promove a ativação dos novos neurônios gerados no hipocampo de ratas (McClure et al., 2013). A progesterona também interfere no processo de neurogênese, porém de forma dependente da ação do estradiol (Tanapat et al., 2005; Galea, 2008). Além de fatores endógenos, o enriquecimento ambiental também exerce efeitos sobre a neurogênese hipocampal adulta. Animais de laboratório mantidos em gaiolas que contém objetos de formas e tamanhos variados, pequenos brinquedos e túneis, exibem um aumento significativo no número de novas células no GD em comparação com animais que vivem em gaiolas comuns de laboratório (Kempermann et al., 1997). A exposição a um ambiente enriquecido (AE) é uma fonte de estímulos bastante distinta em relação a um ambiente sensorialmente pobre pelo fato de que os animais têm a oportunidade de explorar objetos diferentes e interagir socialmente com outros animais, o que gera alterações marcantes também no comportamento desses animais (Rosenzweig, 1966; Walsh, 1981; van Praag et al., 2000; Benaroya-Milshtein et al., 2004).

O encéfalo materno é um rico modelo para o estudo da plasticidade natural do sistema nervoso. As adaptações morfológicas e funcionais observadas no encéfalo de animais em laboratório sugerem que as fêmeas possuem mecanismos neurais adaptativos que contribuem para o aperfeiçoamento de comportamentos que são necessários para a sobrevivência da prole e da própria mãe (Wooley & McEwen, 1992; Kinsley et al., 1999; Keyser-Marcus et al., 2001; Tomizawa et al., 2003; Macbeth et al., 2008). O hipocampo é uma estrutura que se mostra particularmente sensível às alterações hormonais que ocorrem durante a gestação e período pós-parto (Tomizawa et al., 2003; Pawluski & Galea, 2005; Kinsley et al., 2006), possivelmente pelo fato de possuir um grande número de receptores de hormônios esteroides, particularmente de glicocorticóides e estrógenos (McEwen, 1994; Weiland et al., 1997). Diante dessa notável

plasticidade do hipocampo em virtude da presença desses hormônios, é possível que ocorram alterações na produção, diferenciação e sobrevivência de novas células no GD em associação com a experiência maternal, período em que ocorrem marcadas flutuações nos níveis de diversos hormônios (Korányi et al., 1977; Bridges et al., 1997; Bridges & Byrnes, 2006; Lonstein & Morrel, 2007).

De fato, há estudos mostrando que a experiência maternal em ratas altera diferencialmente a proliferação e sobrevivência de novas células geradas no hipocampo. Por exemplo, Darnaudéry et al. (2007) administraram dose única de BrdU em ratas NUL e PRIM 24 horas após o parto e os encéfalos foram removidos 2 horas ou 14 dias após a injeção para a avaliação da taxa de proliferação e sobrevivência das novas células no GD, respectivamente. Os resultados mostraram que no período logo após o parto houve um decréscimo acentuado na proliferação celular em comparação com as ratas NUL, enquanto que nenhuma alteração foi observada na sobrevivência das células duas semanas depois. O estudo também sugere que esse efeito pode ocorrer em parte por conta do decréscimo de estradiol e aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticóides após o parto. Outro estudo mostrou que o decréscimo da proliferação celular no GD é resultante da presença dos filhotes durante o período pós-parto (Leuner et al., 2007). Nesse estudo, foi observado que a redução na produção de novas células é menor próximo ao momento do desmame dos filhotes, quando a fêmea já não se mostra responsiva ao cuidado permanente da prole. No mesmo estudo, os autores mostraram que a elevação nos níveis de corticosterona também é condicionada pela presença dos filhotes, pois quando estes são removidos as ratas apresentaram níveis normais deste hormônio. Adicionalmente, o efeito negativo sobre a produção de novas células é completamente ausente quando os filhotes são removidos da gaiola logo após o nascimento (Leuner et al., 2007). Em um

estudo de abordagem metodológica similar, Pawluski & Galea (2007) mostraram que ratas MULT e PRIM exibiram um menor número de células em divisão marcadas por BrdU no GD 48 horas após o nascimento dos filhotes, bem como uma redução na sobrevivência dessas células no grupo PRIM 22 dias depois do parto. Além disso, ratas sensibilizadas pela exposição a filhotes adotivos exibiram um aumento acentuado na taxa de proliferação de novas células após 24 horas de exposição aos filhotes, enquanto que 22 dias de contato com os mesmos promoveu um aumento na taxa de sobrevivência das novas células. O mesmo grupo de pesquisa também mostrou que ratas em período de gestação não exibem alterações no número de novas células produzidas no GD em comparação com ratas NUL (Pawluski et al., 2010).

Portanto, os estudos descritos mostram que a plasticidade do encéfalo materno, particularmente em relação à produção e sobrevivência de novos neurônios no hipocampo é regulada por uma série de fatores, incluindo diferentes formas de experiência maternal, flutuações nos níveis de certos hormônios (particularmente os estrógenos e glicocorticóides) e a exposição aos filhotes.

Objetivos e justificativa para as abordagens adotadas

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de diferentes formas de experiência maternal sobre a memória espacial e o reconhecimento de objetos. Adicionalmente, pretendeu-se avaliar a plasticidade hipocampal nessas ratas diante da exposição a um ambiente enriquecido, em termos de neurogênese hipocampal adulta.

O Capítulo I descreve experimentos envolvendo grupos de ratas nulíparas, primíparas, primíparas privadas de contato com os filhotes temporária e repetitivamente e sensibilizadas pela exposição a filhotes adotivos, avaliadas em tarefas espaciais de memória de referência e operacional no labirinto aquático de Morris. Foram realizados dois experimentos distintos, com o objetivo de avaliar o desempenho dos animais em função do tempo decorrido após o parto. O Experimento 1 foi planejado de forma que os testes tivessem início uma semana após o desmame dos filhotes das ratas primíparas. Já no Experimento 2, grupos independentes, mas com os mesmos históricos reprodutivos dos animais do Experimento 1, foram submetidos aos testes no labirinto aquático de forma idêntica ao Experimento 1, porém com início dos treinos cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes das ratas primíparas. Considerou-se a hipótese de que diferentes formas de experiência maternal produziriam alterações de desempenho distintas, no entanto de forma mais pronunciada no período de lactação/cuidados com os filhotes.

O Capítulo II descreve experimentos envolvendo grupos de ratas primíparas e nulíparas das linhagens Wistar e Sprague-Dawley submetidas aos testes de memórias de referência e operacional no labirinto aquático de Morris, da mesma forma como descrito no Capítulo I, com início dos treinos cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes das ratas primíparas. Considerando o fato de que a maior parte dos estudos que mostram melhora de desempenho em

tarefas de memória espacial utilizaram ratas da linhagem Sprague-Dawley (Kinsley et al., 1999; Gatewood et al., 2005; Lambert et al., 2005; Pawluski et al., 2006b; Darnaudéry et al., 2007) e o mesmo efeito não foi observado em ratas Wistar (Zimberknopf et al., 2011; Capítulo I deste estudo), considerou-se a hipótese de que experiência maternal exerça um efeito sobre a memória espacial de forma dependente da linhagem de ratas utilizadas.

O labirinto aquático de Morris foi escolhido para a realização dos experimentos descritos nos Capítulos I e II deste trabalho por ser uma ferramenta valiosa no estudo da memória espacial, pois permite, por meio de manipulações relativamente simples, que diferentes sistemas de memória sejam avaliados, com ênfase no desempenho baseado na construção de um mapa cognitivo do ambiente (O'Keefe & Nadel, 1978, Morris, 1981; Xavier et al., 1999). Além disso, o labirinto aquático fornece uma série de parâmetros que possibilitam uma análise robusta sobre as estratégias que os animais utilizam para completar a tarefa (Xavier et al., 1999; Zimberknopf et al., 2011).

Por fim, o Capítulo III descreve experimentos que testaram as hipóteses de que ratas maternalmente experientes podem exibir (1) maior plasticidade em relação ao nascimento e sobrevivência de novas células no hipocampo em virtude da exposição a um ambiente de maior complexidade, em associação com (2) um desempenho superior em tarefas de localização e reconhecimento de objetos, em comparação com ratas nulíparas. Para isso, ratas primíparas e nulíparas da linhagem Sprague-Dawley foram acondicionadas em ambiente enriquecido ou em gaiolas comuns de laboratório por um período de 45 dias, a partir de 2 semanas após o desmame dos filhotes das ratas primíparas. Durante esse período, os animais foram tratados com BrdU para marcação de células em divisão no momento da exposição aos diferentes ambientes. Após

esse período, os animais foram testados em tarefas de memória de localização e reconhecimento de objetos, as quais se mostram sensíveis às alterações nervosas em virtude da experiência maternal (Macbeth 2008a, b), além de permitirem avaliar um desempenho dependente e relativamente independente da formação hipocampal (localização e reconhecimento de objetos, respectivamente) (Xavier et al., 1990; Mumby et al., 2002). Em seguida, os encéfalos foram removidos e submetidos aos tratamentos imunohistoquímicos para visualização das novas células. O uso dos marcadores específicos para as proteínas Doublecortin (DCX) e "Neuronal Nuclei" (NeuN) em associação com o BrdU permitiram a caracterização fenotípica das novas células, fornecendo índices de proliferação, diferenciação e maturação/sobrevivência celular, procedimento que mostrou bons resultados em estudos prévios (Magavi et al., 2000; Couillard-Despres et al., 2005).

Capítulo I

Memória espacial em ratas da linhagem Wistar expostas à experiência maternal

Ilton Santos da Silva[1] e Gilberto Fernando Xavier[1]

Palavras-chave: Experiência maternal, memória espacial, hormônios, hipocampo.

Os eventos que compõem a experiência maternal, como a gestação, parto e o período de lactação/cuidado com os filhotes modificam o encéfalo e o comportamento de ratas. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de ratas Wistar em tarefas que avaliam memória de referência e memória operacional, ambas espaciais, no labirinto aquático de Morris. No Experimento 1, ratas primíparas (PRIM), sensibilizadas pela exposição a filhotes adotivos (SENS), ratas privadas de contato com os filhotes após o nascimento por 6 horas diárias (PRIV) e ratas nulíparas (NUL) foram avaliadas 7 dias após o desmame/período de exposição aos filhotes (21 dias). No Experimento 2, grupos independentes de ratas foram expostas às mesmas condições reprodutivas, porém os testes foram iniciados cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes. No Experimento 1, os resultados mostraram que a experiência maternal não exerceu qualquer efeito sobre a memória espacial das ratas Wistar avaliadas 7 dias após o desmame/exposição aos filhotes. No entanto, os resultados do Experimento 2 revelaram que o período de contato com os filhotes resultou em alterações motivacionais para cumprir a tarefa em ratas SENS, tanto na versão que avalia a memória de referência, quanto na que avalia a memória operacional, possivelmente por uma relação com estados de ansiedade e hiperatividade. Adicionalmente, ratas PRIV exibiram melhor desempenho no teste de memória operacional, possivelmente devido a um efeito de enriquecimento ambiental pela exposição intermitente aos filhotes durante o período de lactação. Estes resultados estendem os dados da literatura, mostrando que diferentes formas de experiência maternal exercem alterações distintas sobre o comportamento de ratas, porém, de forma dependente do momento em que os animais são avaliados.

---

[1]Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências/Universidade de São Paulo.
Email: silvais@ib.usp.br; gfxavier@usp.br.

Introdução

O período de gestação, parto e lactação envolve uma série de alterações no sistema nervoso de uma fêmea de mamífero. Essas alterações permitem que o corpo da fêmea esteja preparado para atender às novas demandas metabólicas e comportamentais impostas pela multiplicidade de eventos que compõem o fenômeno da reprodução. Isto é, mecanismos fisiológicos e comportamentais adicionais são requeridos para suprir as necessidades da fêmea e também da sua progênie. Por exemplo, fêmeas de roedores exibem certos comportamentos aprimorados após o parto, como diminuição de ansiedade e medo, aperfeiçoamento da capacidade de caça e aumento de habilidades espaciais em virtude da experiência maternal (Kinsley et al., 1999; Tomizawa et al., 2003; Love et al., 2005; Kinsley & Lambert, 2006). De fato, a importância evolutiva relacionada ao aperfeiçoamento desses comportamentos se reflete nos benefícios que a mãe e os filhotes recebem. É possível considerar, por exemplo, que a diminuição do medo e da ansiedade permite que uma fêmea de mamífero saia do seu ninho para forragear, mesmo em ambientes hostis, onde há a possibilidade de confronto com predadores. Já uma memória espacial aprimorada possibilita que o animal percorra trajetos otimizados para encontrar alimento e retorne ao seu ninho o mais rápido possível, dessa forma, economizando energia e tempo longe da vulnerável prole.

Kinsley et al. (1999) mostraram que ratas multíparas (MULT, animais que passaram por duas gestações e períodos de lactação) da linhagem Sprague-Dawley cometeram menos erros que as nulíparas (NUL, animais sem qualquer experiência maternal) ao desempenharem uma tarefa espacial de busca por alimento no labirinto radial de oito braços. Por outro lado, Pawluski et al. (2006b) não encontraram diferenças de desempenho entre ratas MULT e NUL da linhagem

Sprague-Dawley na mesma tarefa comportamental, porém, as ratas primíparas (PRIM, animais que passaram por uma gestação e período de lactação) mostraram um desempenho melhor que qualquer outro grupo avaliado, indicando que a primeira experiência maternal exerce um efeito positivo sobre a memória espacial de ratas Sprague-Dawley. Outro estudo avaliou o desempenho de ratas Long-Evans durante o período de gestação, mostrando que as ratas prenhes pela primeira vez não diferiram das ratas NUL numa tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris, mas foram mais rápidas para encontrar a plataforma durante uma tarefa que avalia a memória operacional, considerando o desempenho dos animais ao longo dos dias e não das tentativas dentro de cada sessão (Bodensteiner et al., 2006). Zimberknopf et al., (2011) mostraram que ratas PRIM da linhagem Wistar utilizam estratégias mais eficientes para desempenhar a tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris quando comparadas às NUL. Ainda durante o período de gestação, ratas da linhagem Sprague-Dawley superaram as NUL numa tarefa que avalia a discriminação da disposição espacial de objetos familiares (Macbeth et al., 2008a). É interessante observar que em alguns estudos as ratas expostas à experiência maternal e que apresentam melhora de desempenho em tarefas espaciais também exibem decréscimo nos níveis de ansiedade (Love et al., 2005; Macbeth et al., 2008b; Zimberknopf et al., 2011), sugerindo uma relação próxima entre a experiência maternal, redução da ansiedade e a melhora na memória espacial.

A exposição diária a filhotes adotivos pode estimular o desenvolvimento de cuidados maternais em ratas virgens e sem que elas tenham sofrido as alterações hormonais associadas à gestação. Após alguns dias de contato com os filhotes, ratas NUL exibem comportamentos maternais típicos, semelhantes aos exibidos por uma mãe biológica, fenômeno que é conhecido

como sensibilização maternal (Fleming & Rosenblatt, 1974). Apesar de não ocorrer lactação, as alterações químicas e comportamentais desencadeadas nas fêmeas sensibilizadas são, em parte, semelhantes àquelas que ocorrem numa fêmea em período pós-parto. Por conta dessas semelhanças, esse tipo de manipulação experimental tem sido utilizado em diversos estudos sobre os efeitos da privação de contato com os filhotes e da sensibilização maternal em ratas NUL (Fleming & Rosenblatt, 1974; Stern, 1997; Bridges & Scanlan, 2005; Pawluski et al., 2006b).

Alguns estudos mostraram que somente o contato com os filhotes também exerce influência sobre a memória espacial das ratas sensibilizadas. Por exemplo, ratas virgens da linhagem Long-Evans, sensibilizadas pela exposição a filhotes adotivos (SENS), exibiram um desempenho melhor que ratas NUL e semelhante ao de ratas PRIM numa tarefa espacial de busca por alimento, numa versão seca do labirinto de Morris (Kinsley et al., 1999). Melhora semelhante foi observada em ratas SENS em comparação com ratas NUL e ratas primíparas privadas de contato com os filhotes após o nascimento (PRIV), numa variante da versão seca do labirinto de Morris (Lambert et al., 2005). Sugere-se que a estimulação sensorial proporcionada pelos filhotes promova a liberação de pequenas quantidades de endorfina e ocitocina, os quais por sua vez, podem promover a ativação de áreas importantes do sistema nervoso (Kinsley & Lambert, 2006).

De fato, certas áreas nervosas têm sua estrutura e funcionamento modificados em virtude da experiência maternal. O hipocampo, uma região encefálica conhecida pelo seu envolvimento na memória espacial, é sensível às flutuações hormonais oriundas do período de gestação e pós-parto. Por exemplo, alterações nos níveis de estradiol podem estimular um aumento na densidade

de espinhas dendríticas no sub-campo CA1 (Wooley & McEwen, 1992); o sub-campo CA3 também se mostra notavelmente plástico, apresentando dendritos remodelados em virtude da experiência maternal (Pawluski & Galea, 2005). Além disso, fêmeas ao final da gestação e durante o período de lactação exibem maior concentração de espinhas dendríticas no sub campo CA1 (Kinsley et al., 2006). Ratas MULT também apresentam maiores níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) na região CA1 do hipocampo quando comparadas às NUL (Macbeth et al., 2008b). Adicionalmente, os receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) são ativados quando os estrógenos atingem seus níveis mais altos, induzindo alterações sinápticas (Adams et al., 2004). Estes e outros estudos mostram que o hipocampo materno é exposto a uma série de transformações e exibe uma notável plasticidade frente às adaptações fisiológicas que acompanham a experiência maternal. É possível que essas propriedades plásticas inerentes ao encéfalo materno sejam refletidas nas alterações cognitivas mencionadas anteriormente, proporcionando à fêmea um repertório comportamental diferenciado para lidar com as novas demandas impostas pela reprodução.

Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações de memória espacial em ratas da linhagem Wistar expostas a diferentes formas de experiência maternal, incluindo (1) primiparidade, (2) sensibilização maternal e (3) primiparidade associada à privação de contato com os filhotes por determinados períodos de tempo, todas em comparação com (4) a nuliparidade. Pretendeu-se também avaliar o desempenho desses animais considerando-se o intervalo de tempo decorrido após o parto. Para isso, animais que passaram pelas experiências

maternais mencionadas acima foram avaliados em tarefas espaciais de memória de referência e memória operacional por meio do labirinto aquático de Morris, onde grupos independentes foram avaliados durante e após o período de lactação/exposição aos filhotes. As hipóteses consideradas foram que diferentes formas de experiência maternal produziriam alterações comportamentais distintas e essas alterações poderiam ser mais pronunciadas na fase em que a fêmea está mais responsiva às necessidades da prole, *i.e.*, durante o período de lactação/exposição aos filhotes.

Justificativa para a abordagem adotada

As alterações comportamentais são distintas em fêmeas com diferentes históricos reprodutivos. Ao fim da gestação, uma fêmea de roedor já começa a exibir comportamentos em preparação para receber os filhotes, como a construção de ninhos; assim que os filhotes nascem, eles são prontamente acolhidos pela fêmea. Em contraste, ratas virgens que são expostas a filhotes adotivos pela primeira vez, tendem a evitá-los; porém, depois de alguns dias de exposição, as ratas são motivadas de tal forma que passam a desempenhar cuidados maternais típicos, comportamentos que até então não faziam parte de seu repertório (Fleming & Rosenblatt, 1974). Essas diferenças no estado motivacional em virtude da gestação e da exposição aos filhotes levantam a possibilidade da ocorrência de alterações cognitivas distintas entre ratas primíparas, sensibilizadas e nulíparas, estas últimas sem exposição a qualquer tipo de experiência maternal. Consequentemente, surge o interesse em investigar se essas alterações poderiam se estender a uma fêmea primípara que foi diariamente privada de contato com os seus filhotes. Adicionalmente, a avaliação dos animais em diferentes fases pós-parto permite investigar se as

alterações comportamentais são restritas ao período de lactação/contato com os filhotes ou se elas se estendem além desse período, produzindo modificações mais permanentes no comportamento dos animais.

O labirinto aquático de Morris (Morris, 1981) foi a tarefa de escolha porque ela permite avaliar funções de memória dependentes do hipocampo, estrutura que é particularmente sensível às flutuações hormonais decorrentes do período de gestação e lactação (Pawluski & Galea, 2005; Kinsley et al., 2006). Além disso, a tarefa é amplamente utilizada em estudos de estratégias de localização espacial em roedores (Morris, 1981; Xavier et al., 1999; D'Hooge & De Deyn, 2001; Gerlai, 2001; Bodeinsteiner et al., 2006; Xavier & Costa, 2009). Para cumprir a tarefa que envolve partir de diferentes pontos a cada tentativa, os animais precisam utilizar mapeamento espacial, o qual sabidamente envolve a participação de estruturas da formação hipocampal (O'Keefe & Nadel, 1978; Xavier & Costa, 2009).

Métodos

Animais

Neste estudo foram utilizadas 70 ratas da linhagem Wistar, com 90 dias de idade no início das manipulações experimentais. Todos os animais foram provenientes do biotério central do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e suas matrizes foram adquiridas no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME/UNIFESP). Os animais foram acondicionados em caixas opacas de polipropileno (41 x 34 x 16 cm), com quatro ratas por gaiola e livre acesso a comida e água. O biotério permaneceu em um ciclo claro/escuro de 12h cada (luzes acesas das

07 às 19hs) e a temperatura foi mantida ao redor dos 21^0C. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais Vertebrados em Experimentação do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo 062/2008; Anexo $n^0$1).

Acasalamento

Aos 90 dias de idade, parte dos animais foi submetida ao acasalamento por sistema de harém, onde um macho sexualmente experiente foi acondicionado juntamente com quatro fêmeas por cerca de sete dias. Após esse período ou assim que a gestação foi constatada, as ratas foram acondicionadas individualmente. Animais que não apresentaram gestação visível durante um período máximo de 15 dias não foram incluídos nos grupos experimentais.

Sensibilização Maternal e constituição dos Grupos Experimentais

Num período de 24 horas após o nascimento, os filhotes foram sexados e a ninhada foi padronizada em seis animais (3 machos e 3 fêmeas) por fêmea lactante. No grupo de ratas Primíparas, os lactentes permaneceram com as mães biológicas desde o nascimento até o desmame, aos 21 dias. No grupo que foi privado de contato com os filhotes, os mesmos foram retirados da mãe diariamente por seis horas e colocados juntamente com ratas virgens para estimular o fenômeno de sensibilização maternal nesse grupo. As ratas virgens foram expostas aos filhotes adotivos por seis horas diárias, durante 21 dias para indução dos CMs por sensibilização maternal. O andamento do processo foi monitorado por gravação em vídeo para garantir que todas as fêmeas desenvolvessem CMs típicos, tais como construção de ninhos,

busca e agrupamento dso filhotes, e agachamento sobre os mesmos (cifose maternal), além de limpeza corporal. Todos os esforços foram feitos para evitar manipulações durante o período de interação mãe-filhote. A exposição das ratas a esses procedimentos gerou os grupos experimentais descritos resumidamente abaixo.

Experimento 1

- **Grupo Nulíparas** (NUL; ratas virgens, sem qualquer manipulação experimental e com a mesma idade e condições de manutenção que os demais grupos; n = 12);
- **Grupo Primíparas** (PRIM; animais que passaram por uma gestação e permaneceram com seus filhotes até o desmame aos 21 dias; n = 12);
- **Grupo Privadas** (PRIV; ratas que passaram por uma gestação, porém foram privadas de contato com os filhotes por seis horas diárias, também durante 21 dias; n = 9); e
- **Grupo Sensibilizadas** (SENS; ratas virgens que foram expostas aos filhotes adotivos por seis horas diárias, durante 21 dias; n = 9).

Os testes comportamentais do Experimento 1 foram iniciados 7 dias após o desmame dos filhotes dos grupos PRIM e PRIV, e o mesmo intervalo de tempo após ao último dia de exposição aos filhotes adotivos no grupo SENS.

Experimento 2

Grupos independentes de animais, submetidos a procedimentos idênticos aos descritos no Experimento 1 foram incluídos no Experimento 2, com a composição apresentada abaixo.

- **Grupo NUL**, n = 10;

- **Grupo PRIM**, n = 7;
- **Grupo PRIV**, n = 6;
- **Grupo SENS**, n = 5.

Os testes comportamentais do Experimento 2 foram iniciados cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes dos grupos PRIM e PRIV, coincidindo com o início do processo de sensibilização maternal dos animais do grupo SENS.

Labirinto aquático de Morris

O equipamento consiste de uma piscina circular, com diâmetro de 200 cm e altura de 50 cm, construída em fibra de vidro (Figura 1). Suas paredes internas foram pintadas em preto visando torná-las homogêneas. Diariamente, a piscina foi preenchida com água até 25,5 cm e uma plataforma móvel de 9 cm de diâmetro e 24 cm de altura foi posicionada a 1,5 cm abaixo do nível da água servindo como ponto de escape para os animais. A plataforma foi construída em acrílico e pintada na cor preta, tornando-a visualmente imperceptível aos animais nadando na superfície e assim forçando-os a utilizar somente pistas distais como auxílio para navegação.

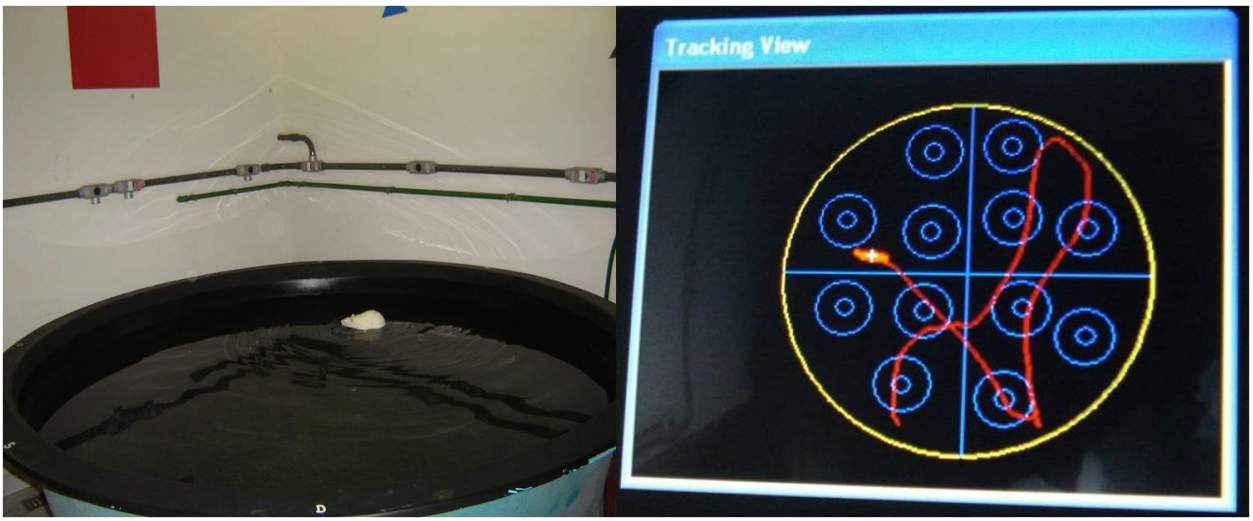


Figura 1. Labirinto aquático de Morris utilizado nos testes de memória espacial (esquerda) e visualização das áreas imaginárias configuradas no programa para a análise descritiva dos dados (direita). Note que a piscina foi dividida em 4 "quadrantes" e foram definidos 12 "contadores", isto é, áreas medindo 27 cm de diâmetro, concêntricas a possíveis locais para a plataforma no teste de memória operacional, os quais auxiliaram na análise sobre a precisão com que os animais buscam pela plataforma.

A sala em que o equipamento foi posicionado mede 3x3 m e recebe iluminação indireta para evitar conflitos de captura de contraste pelo programa de registro comportamental. Vários estímulos distais evidentes, em forma de figuras geométricas em cores e brilhos contrastantes foram disponibilizados nas paredes da sala, com o objetivo de auxiliar os animais a navegarem na piscina baseados nessas informações distais. Para o registro do comportamento dos animais, uma câmera de vídeo conectada a um computador foi posicionada a 180 cm acima da piscina. As informações enviadas ao computador foram processadas pelo programa Ethovision v. 3.1 (Noldus I.T., Wageningen, NL), que é capaz de registrar e calcular parâmetros relacionados ao deslocamento dos animais na arena. Para a análise descritiva dos dados, a arena foi dividida em quatro quadrantes iguais formados por linhas imaginárias que se cruzam no centro da arena, ligando o lado norte ao lado sul e lado leste ao oeste (Figura 1). Além disso, 12 outras áreas

imaginárias denominadas "contadores" foram usadas. Cada contador consiste em um círculo concêntrico à localização da plataforma e com diâmetro três vezes maior que esta (portanto, o contador mede 27 cm de diâmetro). Adicionalmente, foram designados pontos de referência na borda da piscina [usando as denominações norte (N), sul (S), leste (E), oeste (W), nordeste (NE), sudeste (SE), noroeste (NO) e sudoeste (SO)], os quais serviram como pontos de partida para liberação dos animais. Os parâmetros comportamentais coligidos pelo sistema de registro estão descritos nas seções seguintes, bem como o tempo e o número de tentativas específicos em cada tipo de teste no labirinto aquático.

Procedimentos

A cada tentativa de treino, os animais foram liberados de um dos oito pontos de partida com o focinho voltado para a parede da piscina. O sistema de registro foi programado para ser acionado 0,1 segundos após o animal ser colocado na área que delimita a circunferência da piscina. Assim que os animais encontravam e subiam na plataforma, o registro foi interrompido, finalizando a tentativa. O programa finalizava o registro assim que o animal permanecesse na exata área da plataforma por 2 segundos, caracterizando o cumprimento da tarefa, ou o tempo máximo da tentativa, de 120 segundos, se esgotasse. Quando o animal não encontrava a plataforma no tempo estabelecido, ele era conduzido para a mesma, onde permanecia por 20 segundos, com o objetivo de fornecer a informação sobre a localização da plataforma em relação às pistas da sala. Após esse procedimento, os animais eram transferidos para as suas gaiolas-moradia. Todos os experimentos (realizados entre 07 e 13h) foram conduzidos pelo mesmo experimentador, o qual permaneceu no mesmo local da sala durante todos os testes. Os animais

dos diferentes grupos foram testados em ordem aleatória a cada dia; esse procedimento teve o objetivo de minimizar qualquer possível variação de desempenho relacionada com o horário em que os animais foram testados (*i.e.,* início da manhã *vs*. fim da manhã).

Teste de Memória de Referência

No teste de memória de referência, a plataforma permaneceu no mesmo local ao longo de todo o treino (centro do quadrante noroeste, NO), realizado ao longo de vários dias. A cada tentativa, os animais foram liberados aleatoriamente de pontos de partida distintos, porém equidistantes da plataforma, com o objetivo de minimizar o uso de estratégias de guiamento e dar ênfase a estratégias de mapeamento espacial. Como a plataforma foi posicionada no mesmo local ao longo de vários dias de treino, essa tarefa permite avaliar a aquisição de uma memória espacial de longa duração sobre o local específico em que se encontra a plataforma, aplicável a todas as tentativas e sessões de treino.

No Experimento 1, os treinos foram iniciados uma semana após o desmame dos filhotes. O experimento de memória de referência durou 12 dias consecutivos, com 2 tentativas diárias e um intervalo entre-tentativas (do inglês, "intertrial interval", ITI) de 10 minutos entre elas. No Experimento 2, os treinos começaram cerca de 24 h após o parto e duraram 8 dias consecutivos, com 3 tentativas diárias e ITI igual a 10 minutos. Os parâmetros analisados no teste de memória de referência foram latência para encontrar a plataforma (tempo decorrido desde a liberação do animal na piscina até que ele encontre a plataforma ou esgote-se o tempo máximo de 120 s), trajeto percorrido (distância navegada pelo animal durante a tentativa), porcentagem de tempo no quadrante (tempo despendido no quadrante imaginário em que a plataforma foi posicionada em

relação ao tempo total na piscina) e velocidade de nado (parâmetro que fornece um índice sobre o estado motivacional e atividade motora dos animais).

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test")

No dia seguinte ao último dia de treino no teste de memória de referência, em ambos os experimentos, os animais foram submetidos ao "Probe test". O teste consistiu em expor o animal somente a uma tentativa de 180 segundos; porém, a plataforma foi removida com o objetivo de avaliar a quantidade de tempo que os animais despendem procurando pela plataforma em sua localização prévia e a taxa de extinção desse comportamento ao longo do tempo. Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de tempo despendido e o número de cruzamentos no contador crítico. Esses parâmetros fornecem uma medida sobre a precisão da busca espacial por se tratar de uma área concêntrica à plataforma com 3 vezes o seu tamanho, *i.e.*, quanto mais tempo os animais passam nessa área, maior sua precisão espacial. Com o decorrer do tempo, os animais tendem a abandonar essa estratégia e buscar pela plataforma em outros setores da piscina, fenômeno que caracteriza a extinção do comportamento adquirido nos dias anteriores. Os animais passaram por duas sessões consecutivas sem a plataforma, uma por dia, com duração total de 180 segundos cada. O tempo de exploração da piscina sem a presença da plataforma foi dividido em "Blocos" consecutivos de 60 segundos cada, o que permite avaliar o comportamento de extinção da resposta aprendida ao longo da sessão.

Teste de memória operacional

No dia seguinte a última sessão do "Probe Test", deu-se início o teste de memória operacional, tanto no Experimento 1 como no Experimento 2. Diferentemente do teste de

memória de referência, durante o teste de memória operacional, a plataforma foi posicionada em um novo local a cada dia de treino, exigindo que os animais adquirissem diariamente uma nova informação sobre a localização da plataforma e mantivessem essa informação armazenada na memória operacional o tempo suficiente para cumprir a tarefa naquele determinado dia. Isto é, na primeira tentativa de cada dia, os animais podem encontrar a plataforma escaneando a piscina ou, com a ajuda do experimentador caso não a encontrem no tempo máximo disponível de 120 segundos. Assim, nas tentativas subsequentes do mesmo dia, os animais podem se beneficiar da informação adquirida na primeira tentativa para encontrarem a plataforma mais rapidamente. Os parâmetros mensurados foram latência para encontrar a plataforma, trajeto percorrido, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador que continha a plataforma naquele dia, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador onde a plataforma estava localizada no dia anterior e no local exato que delimitava a circunferência da plataforma também no dia anterior. É interessante observar que os parâmetros relacionados ao padrão de navegação dos animais no dia anterior (área do contador e da plataforma) fornecem índices mais precisos de busca e extinção de uma resposta armazenada na memória operacional ao longo de 24 horas.

O teste de memória operacional foi dividido em duas fases consecutivas em ambos os experimentos: nos seis primeiros dias, de 1 a 6 o ITI foi igual a 5 minutos e na fase seguinte, nos dias 7 a 11, o ITI foi igual a 15 minutos. Para ambas as fases, foram realizadas 3 tentativas diárias.

Análise de dados

Todos os resultados comportamentais foram submetidos à análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) e quando necessário, foi empregado o teste *post hoc* de Tukey HSD para comparações múltiplas. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Statistica v. 10 (StatSoft, Inc., 2011) e os resultados foram considerados significantes quando os valores de p foram iguais ou menores que 0,05.

No teste de memória de referência, foi realizada uma ANOVA separada para cada parâmetro (latência, trajeto, porcentagem de tempo no quadrante da plataforma e velocidade de nado), considerando-se os grupos com diferentes históricos reprodutivos (NUL, PRIM, PRIV, SENS) como fator entre-sujeitos, e "Sessão" (12 dias no Experimento 1 e 8 dias no Experimento 2) e "Tentativa" (2 no Experimento 1 e 3 no Experimento 2) como fatores intra-sujeitos. Apenas para efeitos de apresentação dos resultados envolvendo o teste de memória de referência, foi realizada uma média dos escores das tentativas por sessão.

No teste de avaliação e extinção da resposta adquirida, cada tentativa diária de 180 segundos foi dividida em 3 blocos consecutivos de 60 segundos cada. Os parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no local da plataforma foram analisados separadamente, tendo como fatores entre-sujeitos os grupos experimentais e como fatores intra-sujeitos "Sessão" (2 dias) e "Bloco" (3 de 60 segundos cada), para ambos os experimentos.

Em relação aos escores obtidos no teste de memória operacional, "Tentativa" e "Fase" foram considerados fatores intra-sujeitos e os grupos como fatores entre-sujeitos. Com o objetivo de comparar o desempenho dos animais ao longo das tentativas, levando em consideração o ITI, as 11 sessões do teste de memória operacional foram divididas em 2 fases: a primeira, cujo ITI

foi igual a 5 minutos, compreendeu os dias 2 a 6 (o primeiro dia foi excluído pois há muita variabilidade nas respostas), e a segunda fase, cujo ITI foi igual a 15 minutos, incluiu os dias 7 a 11, para ambos os experimentos. Isto é, para cada uma dessas fases, calculou-se as médias de cada escore por tentativa incluindo-se nas mesmas os dados de todas as sessões, de modo que a evolução dos escores ao longo das tentativas expressou o funcionamento da memória operacional levando em consideração o ITI.

Resultados - Experimento 1 (avaliação iniciada uma semana após o desmame dos filhotes)

Memória de referência

Durante o processo de sensibilização maternal, foram observados eventos de rejeição e agressão aos filhotes por parte de três ratas expostas a filhotes adotivos. Essas ratas foram excluídas dos experimentos.

A Figura 1.1 apresenta os resultados obtidos no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris. A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao fator Grupo para os parâmetros latência (Figura 1.1A), trajeto percorrido (Figura 1.1B), porcentagem de tempo no quadrante da plataforma (Figura 1.1C) e velocidade de nado (Figura 1.1D), ($F_{3,38}$ = 0,58-1,51, $p > 0,22$). Em contraste, a ANOVA revelou efeitos significantes em relação aos fatores Sessão ($F_{11,418}$ = 34,72-58,61, $p < 0,01$) e Tentativa ($F_{1,38}$ =5,29-8,94, $p < 0,03$) para latência e trajeto percorrido. Não houve interação entre os fatores Grupo e Sessão ($F_{33,418}$ = 0,49-1,49, $p > 0,74$) e Grupo, Sessão e Tentativa ($F_{33,418}$ = 1,33-1,70, $p > 0,10$) em qualquer dos parâmetros analisados no teste de memória de referência espacial.

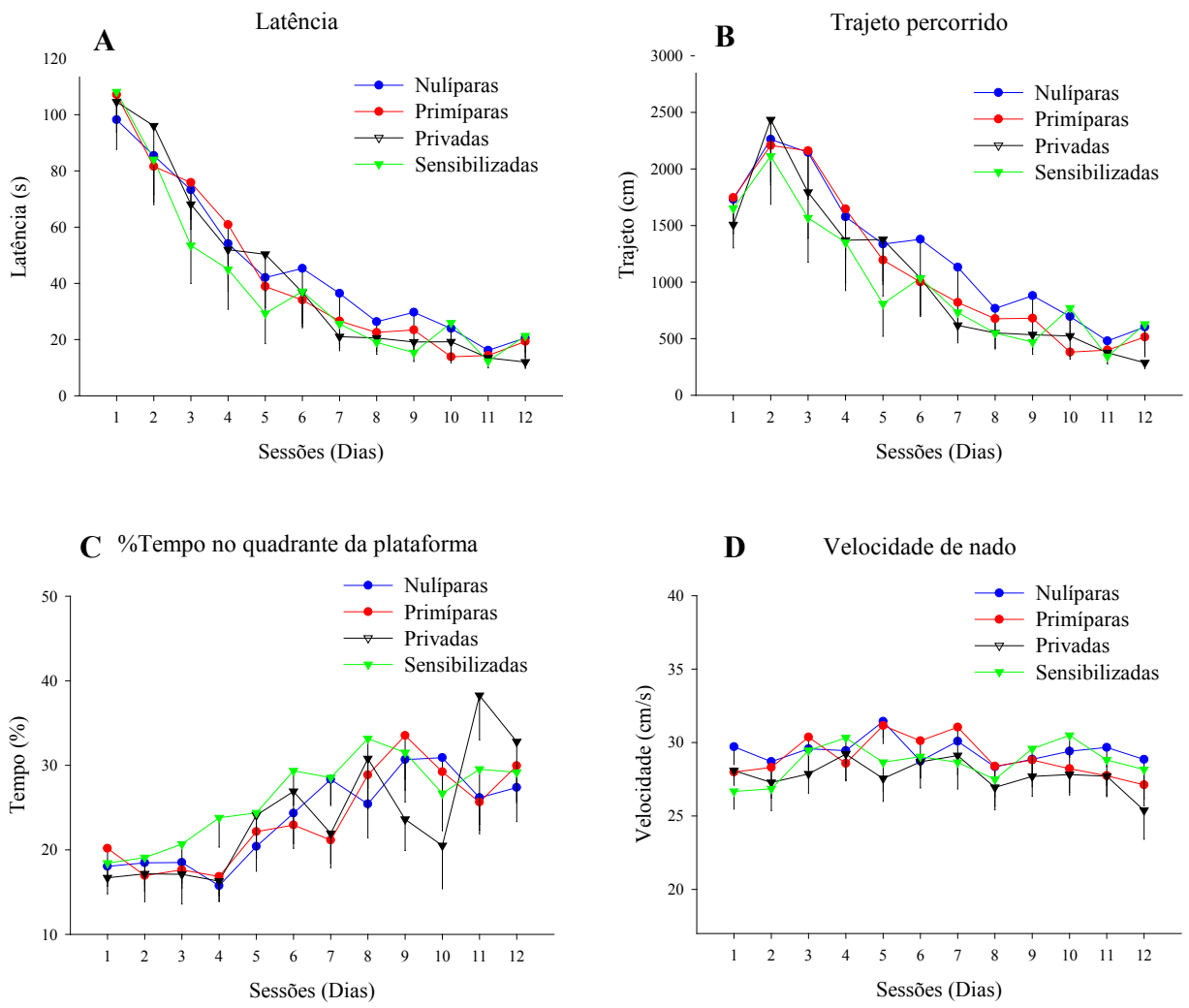


Figura 1.1 - Desempenho de ratas Wistar no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris realizado ao longo de 12 sessões de treino, expresso pelos parâmetros latência (A), trajeto percorrido (B), porcentagem de tempo no quadrante da plataforma (C) e velocidade de nado (D), considerando a experiência maternal dos animais dos diferentes grupos. Os dados estão representados em termos de média ± EPM. Valores médios de duas tentativas por sessão foram usados para representação gráfica dos dados.

Assim, os resultados mostram que a experiência maternal não resultou em alterações na aquisição e desempenho dos animais na tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris; mostram ainda que todos os grupos foram capazes de aprender e

desempenhar a tarefa de forma semelhante, melhorando seu desempenho ao longo das sessões e tentativas. Adicionalmente, a ausência de diferenças no parâmetro velocidade de nado aponta que a motivação para cumprir a tarefa foi semelhante entre os grupos.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test")

A ANOVA revelou ausência de efeitos significantes relacionados ao fator Grupo tanto em relação à porcentagem de tempo (Figura 1.2A) como na frequência de cruzamentos no contador da plataforma (Figura 1.2B), ($F_{3,38}$ = 0,16-0,76, $p > 0,51$). Por outro lado, a ANOVA revelou efeitos significantes em relação aos fatores Sessão ($F_{1,38}$ = 19,08-20,98, $p < 0,001$) e Bloco ($F_{2,76}$ = 52,49-52,78, $p < 0,001$). Portanto, os resultados indicam que todos os grupos exibiram taxas equivalentes de busca pelo local previamente reforçado e de extinção do comportamento de busca pela plataforma em sua localização prévia, sendo, portanto, capazes de adaptar seu comportamento às novas contingências de reforço da tarefa, procurando pela plataforma em outros setores da piscina.

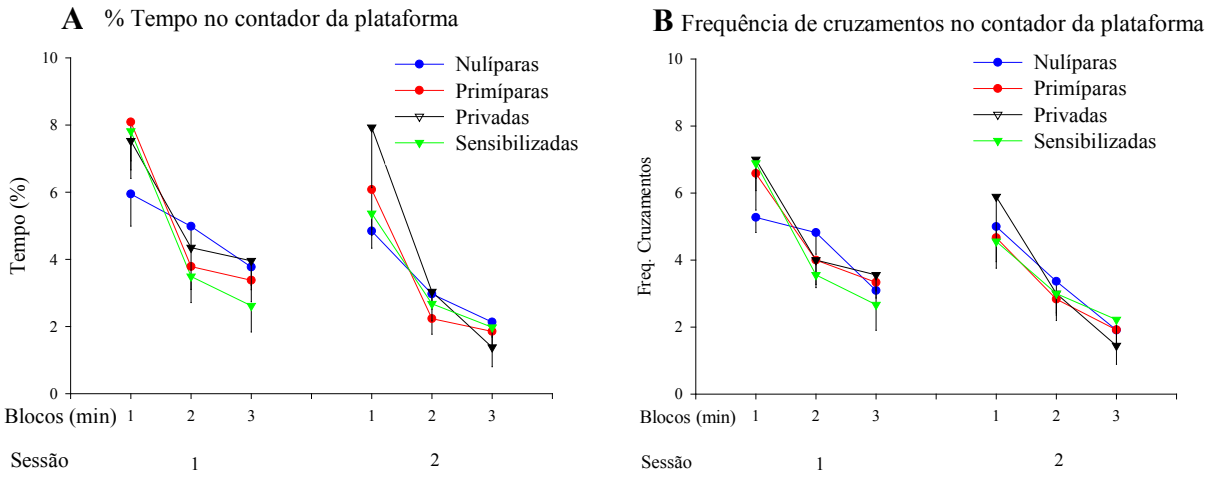


Figura 1.2 - Desempenho de ratas Wistar no teste de avaliação e extinção da resposta aprendida ("Probe test") no labirinto aquático de Morris, realizado ao longo de 2 sessões, com uma tentativa diária de 180

segundos cada. O desempenho é expresso pelos parâmetros porcentagem de tempo (A) e frequência de cruzamentos (B) no contador da plataforma, considerando a experiência maternal dos animais dos diferentes grupos. Para análise temporal do desempenho dos animais, cada tentativa foi dividida em 3 blocos consecutivos de 60 segundos cada. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

Portanto, esses resultados mostram que a experiência reprodutiva em fêmeas não gera alterações significativas no desempenho de uma tarefa que avalia memória de referência espacial e também não altera a taxa de extinção do comportamento de busca pela plataforma no Probe Test, assim como a flexibilidade comportamental diante da nova contingência de reforço.

Memória operacional

A ANOVA revelou ausência de diferenças significativas relacionadas ao fator Grupo em relação aos parâmetros latência (Figura 1.3A), trajeto percorrido (Figura 1.3B), porcentagem de tempo (Figura 1.3C) e frequência de cruzamentos no contador da plataforma (Figura 1.3D); ($F_{3,38}$ = 0,38-1,47, $p > 0,23$), indicando que a experiência maternal não altera a memória operacional dessas fêmeas.

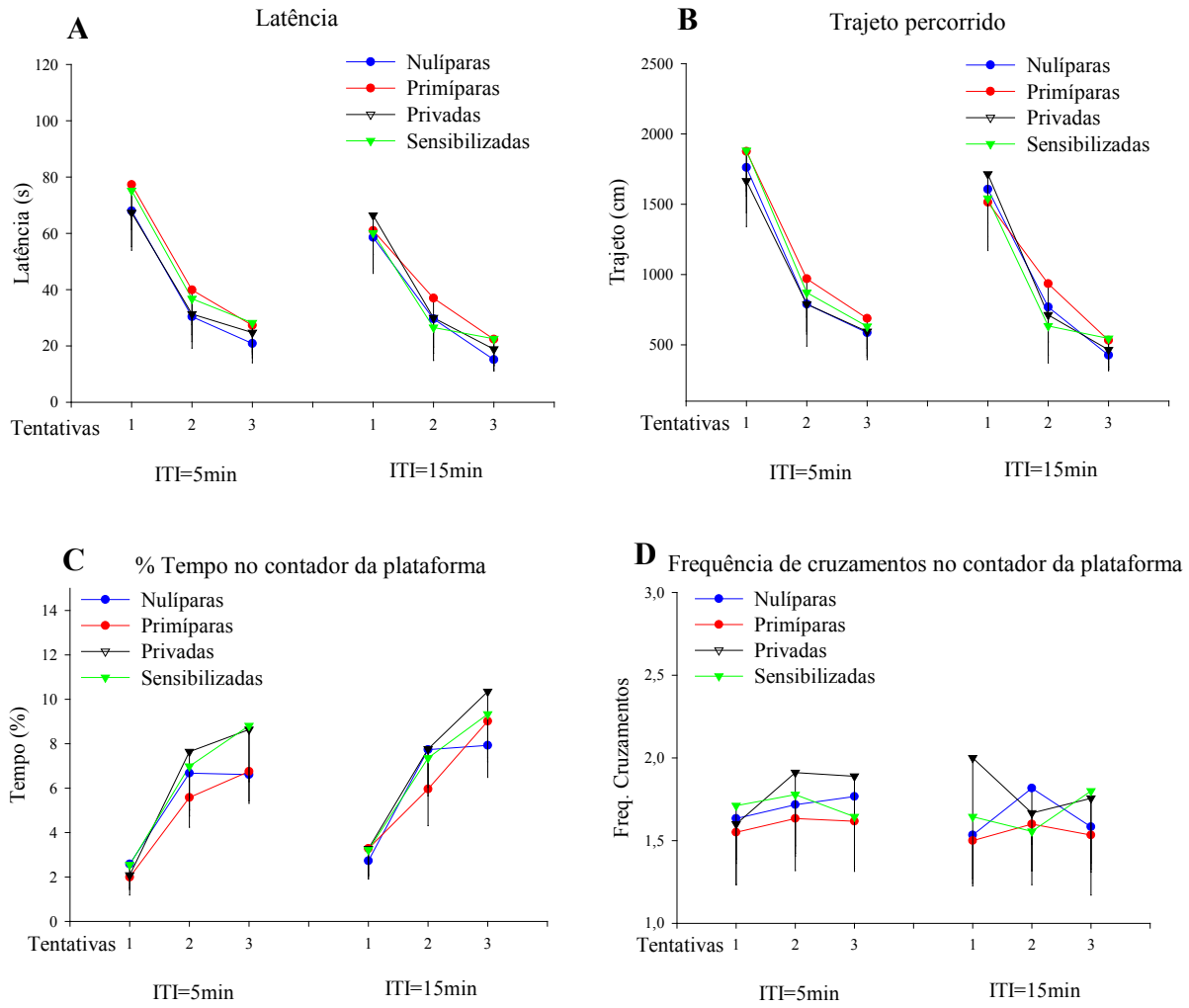
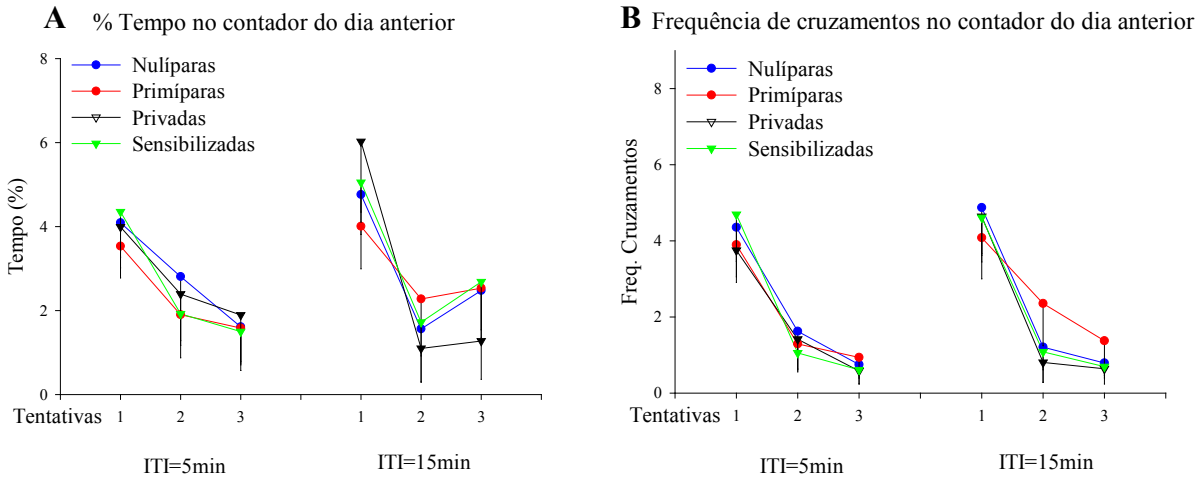


Figura 1.3 - Desempenho de ratas Wistar no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Os animais foram avaliados ao longo de 10 sessões consecutivas, sendo as cinco primeiras com um ITI= 5 minutos (Fase 1) e as cinco últimas com ITI= 15 minutos (Fase 2); cada sessão consistiu de 3 tentativas. O desempenho dos animais é expresso pelos parâmetros latência (A), trajeto percorrido (B), porcentagem de tempo (C) e frequência de cruzamentos (D) no contador da plataforma em função das experiências maternais dos animais dos diferentes grupos. Para a análise do desempenho ao longo das tentativas, foram calculadas médias de cada uma das 3 tentativas diárias em cada fase de treino, incluindo todas as sessões daquela fase. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

A ANOVA revelou ainda diferenças significantes em relação ao fator Tentativa ($F_{2,76}$ = 106,11-211,53 $p < 0,001$) para os parâmetros latência, trajeto percorrido, porcentagem de tempo

e frequência de cruzamentos no contador da plataforma, indicando o funcionamento da memória operacional. Ademais, a ANOVA revelou ausência de interações significantes em relação aos fatores Grupo e Fase ($F_{3,38}$ = 0,40-0,98, $p > 0,70$) e Grupo, Fase e Tentativa ($F_{6,76}$ = 0,19-1,33, $p > 0,25$), em qualquer dos parâmetros analisados, indicando que o desempenho dos animais dos diferentes grupos não sofre interferência do tempo de intervalo entre as tentativas. Portanto, todos os grupos foram capazes de aprender e completar a tarefa de forma semelhante, melhorando seu desempenho ao longo das tentativas.

Adicionalmente, foi possível avaliar (1) a memória sobre a área onde a plataforma estava posicionada no dia anterior, bem como (2) a taxa de extinção desse comportamento ao longo das três tentativas do teste de memória operacional. Essas medidas estão representadas pelos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 1.4A) e frequência de cruzamentos (Figura 1.4B) no contador crítico e porcentagem de tempo (Figura 1.4C) e frequência de cruzamentos (Figura 1.4D) no exato local da plataforma do dia anterior.



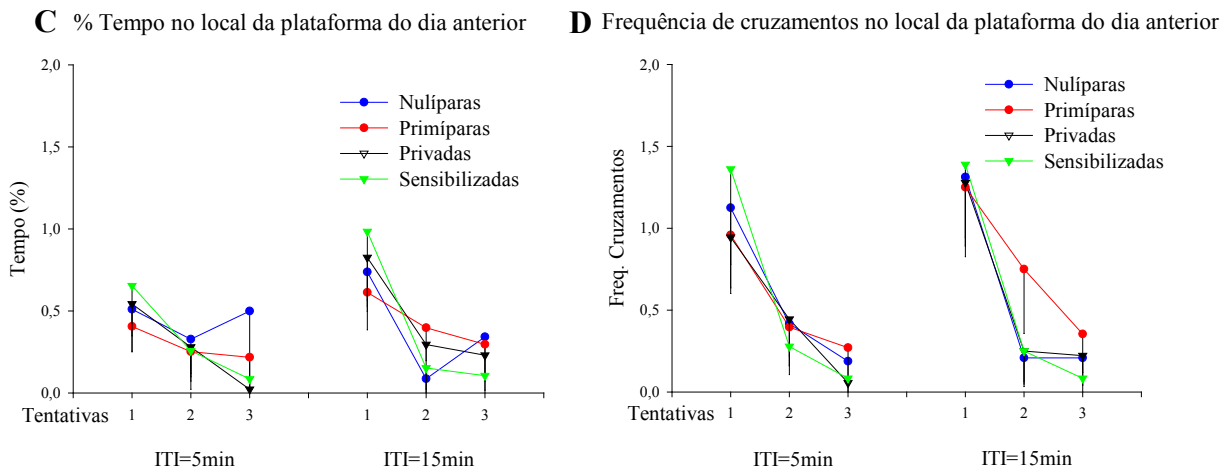


Figura 1.4 - Desempenho de ratas Wistar no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Os animais foram avaliados ao longo de 10 sessões consecutivas, sendo as cinco primeiras com um ITI = 5 minutos (Fase 1) e as cinco últimas com ITI = 15 minutos (Fase 2); cada sessão consistiu em 3 tentativas. O desempenho dos animais é expresso pelos parâmetros porcentagem de tempo (A) e frequência de cruzamentos (B) no contador da plataforma do dia anterior, porcentagem de tempo (C) e frequência de cruzamentos (D) no local exato da plataforma do dia anterior, em função da experiência maternal dos diferentes grupos. Para a análise do desempenho ao longo das tentativas, foram calculadas médias de cada uma das três tentativas diárias em cada fase de treino. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao fator Grupo ($F_{3,38}$ = 0,27-1,25, $p > 0,30$), bem como ausência de diferenças significantes na interação entre os fatores Grupo e Tentativa ($F_{3,38}$ = 0,24-0,70, $p > 0,54$) em relação aos parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador assim como no local exato onde a plataforma estava localizada no dia anterior, indicando que a experiência maternal não alterou a memória dos animais em relação à lembrança da localização da plataforma na sessão anterior, *i.e.*, 24 horas antes.

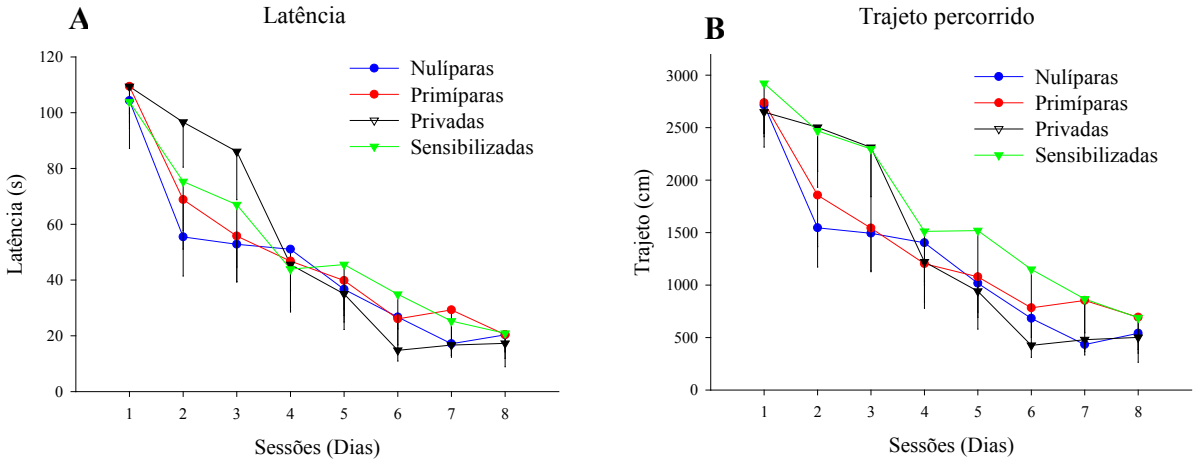
Em conjunto, os resultados do Experimento 1 mostram que a experiência maternal em ratas da linhagem Wistar não produz alterações de memória espacial nas versões envolvendo

memória de referência e memória operacional no labirinto aquático de Morris, quando os animais são avaliados uma semana após o desmame e separação dos filhotes.

Resultados - Experimento 2 (avaliação iniciada durante o período de cuidados maternais)

Memória de referência

Neste experimento, os testes comportamentais foram iniciados cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes dos grupos PRIM e PRIV e no primeiro dia de exposição aos filhotes adotivos no grupo SENS. Da mesma forma que no Experimento 1, a plataforma permaneceu no quadrante noroeste durante todo o treino. Os animais foram submetidos a 8 sessões consecutivas no teste de memória de referência, com 3 tentativas diárias e um intervalo de 10 minutos entre elas. O número de sessões nesse teste foi reduzido com o objetivo de incluir todos os testes comportamentais dentro do período de lactação e cuidados com os filhotes (21 dias). Os resultados são apresentados na Figura 1.5.



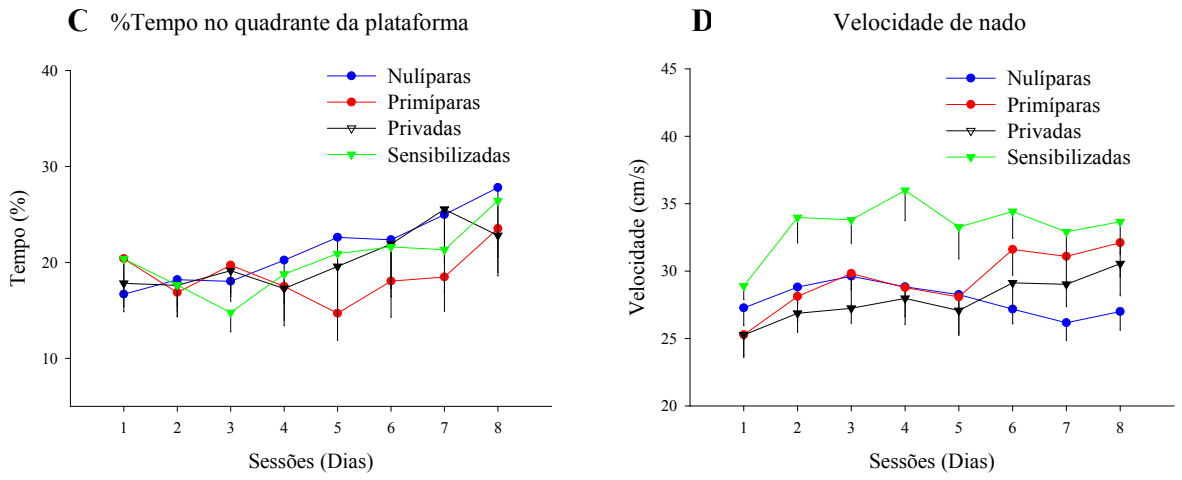


Figura 1.5 - Desempenho de ratas Wistar no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris ao longo de 8 sessões de treino, expresso pelos parâmetros latência (A), trajeto percorrido (B), porcentagem de tempo no quadrante da plataforma (C) e velocidade de nado (D) em função da experiência maternal dos diferentes grupos. Os dados estão representados em termos de média ± EPM. Valores médios de duas tentativas por sessão foram usados para representação gráfica dos dados.

A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao fator Grupo para os parâmetros latência e porcentagem de tempo no quadrante da plataforma (Figuras 1.5A e 1.5C), ($F_{3,24}$ = 0,62-0,92, $p > 0,44$). Interessantemente, a ANOVA envolvendo o parâmetro trajeto percorrido apresentou um efeito de Grupo marginalmente significativo (Figura 1.5B), ($F_{3,24}$ = 2,90, p = 0,05553). De fato, a inspeção da Figura 1.5B sugere que o grupo SENS exibiu uma taxa de aquisição da tarefa mais lenta em relação ao grupo NUL, particularmente nas sessões iniciais de treino. Adicionalmente, a ANOVA revelou a existência de um efeito significante em relação ao fator Grupo envolvendo a velocidade de nado (Figura 1.5D), ($F_{3,24}$ = 5,17, p = 0,006). A análise *post hoc* indicou que o grupo SENS exibiu velocidades de nado significantemente maiores em relação aos grupos NUL e PRIV (p = 0,006 e p = 0,013, respectivamente) e quase significantemente maiores que a do grupo PRIM (p = 0,082). A ANOVA revelou ainda interação significante entre os fatores Grupo e Sessão ($F_{21,168}$ = 2,23, p =

0,002), indicando padrões de velocidades diferentes ao longo das sessões no grupo SENS quando comparado aos demais grupos.

Portanto, os resultados do teste de memória de referência indicam que ratas Wistar sensibilizadas exibem marcadas alterações na velocidade de nado em relação aos demais grupos, sugerindo que sua motivação para o desempenho da tarefa foi distinto. Esse aumento na velocidade de nado pode denotar uma hiperatividade que, por sua vez, pode ter prejudicado seu desempenho na tarefa, particularmente nas fases iniciais de treino, que correspondeu à fase de exposição aos filhotes adotivos. O aumento no trajeto percorrido também indica um prejuízo que pode ter relação com o aumento da velocidade de nado.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test")

A ANOVA revelou ausência de efeitos significantes relacionados ao fator Grupo no parâmetro porcentagem de tempo no contador ($F_{3,24} = 1,02$, $p = 0,40$), (Figura 1.6A) e um efeito marginalmente significante no fator Grupo relacionado ao parâmetro frequência de cruzamentos no contador ($F_{3,24} = 2,51$, $p = 0,08$), (Figura 1.6B). De fato, a inspeção do gráfico sugere que os grupos PRIV e SENS exibiram um desempenho sutilmente melhor na lembrança do local onde a plataforma estava posicionada durante o teste de memória de referência. A ANOVA também revelou uma interação significante entre os fatores Grupo e Bloco na frequência de cruzamentos no contador ($F_{6,48} = 2,50$, $p = 0,03$), (Figura 1.6B) e uma interação quase significante entre os mesmos fatores no parâmetro porcentagem de tempo no contador ($F_{3,24} = 2,19$, $p = 0,059$), (Figura 1.6A). Esses resultados indicam que o desempenho dos grupos foi diferente ao longo do tempo. A ANOVA revelou ainda efeito significante em relação aos fatores principais Sessão ($F_{1,24} = 27,63$-$55,57$, $p < 0,001$) e Bloco ($F_{2,48} = 20,25$-$26,19$, $p < 0,001$) tanto para a porcentagem

de tempo como para a frequência de cruzamentos no contador que continha a plataforma, indicando que os animais foram capazes de extinguir o comportamento de busca pela plataforma em sua localização prévia.

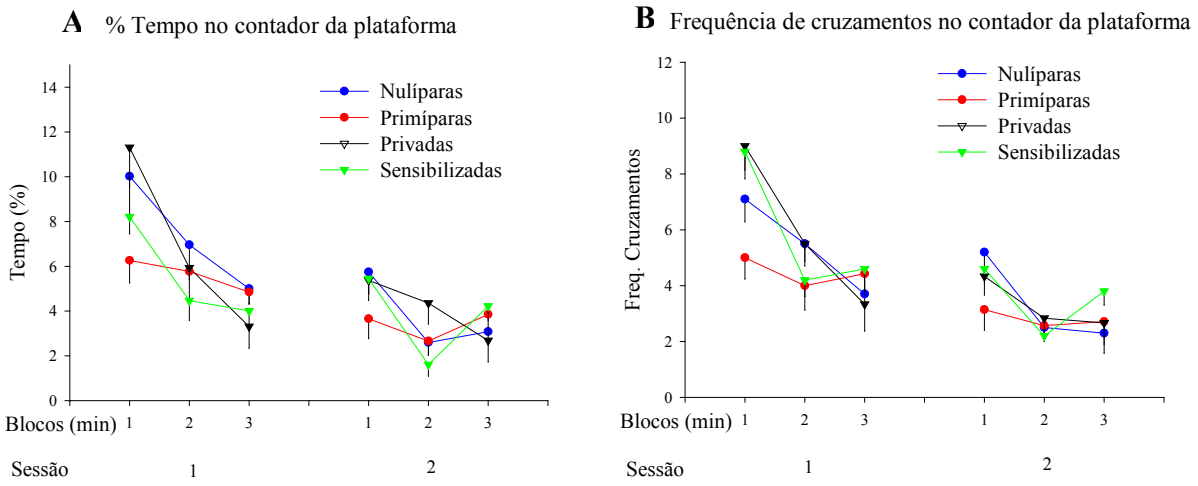


Figura 1.6 - Desempenho de ratas Wistar no teste de avaliação e extinção da resposta aprendida ("Probe test") no labirinto aquático de Morris. Os animais dos diferentes grupos foram avaliados ao longo de 2 sessões, com uma tentativa diária de 180 segundos, em que a plataforma foi removida da piscina. O desempenho é expresso pelos parâmetros porcentagem de tempo (A) e frequência de cruzamentos (B) no contador da plataforma. Para análise temporal do desempenho dos animais, cada tentativa foi dividida em 3 blocos consecutivos de 60 segundos cada. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

O teste de avaliação e extinção da resposta adquirida mostrou um desempenho sutilmente melhor dos grupos SENS e PRIV quanto à lembrança do local onde a plataforma estava posicionada nos dias anteriores. Adicionalmente, os resultados mostraram que a extinção desse comportamento ao longo do tempo foi diferente entre os grupos.

Memória operacional

Assim como no Experimento 1, no teste de memória operacional, a localização da plataforma foi alterada diariamente. Os resultados são apresentados na Figura 1.7.

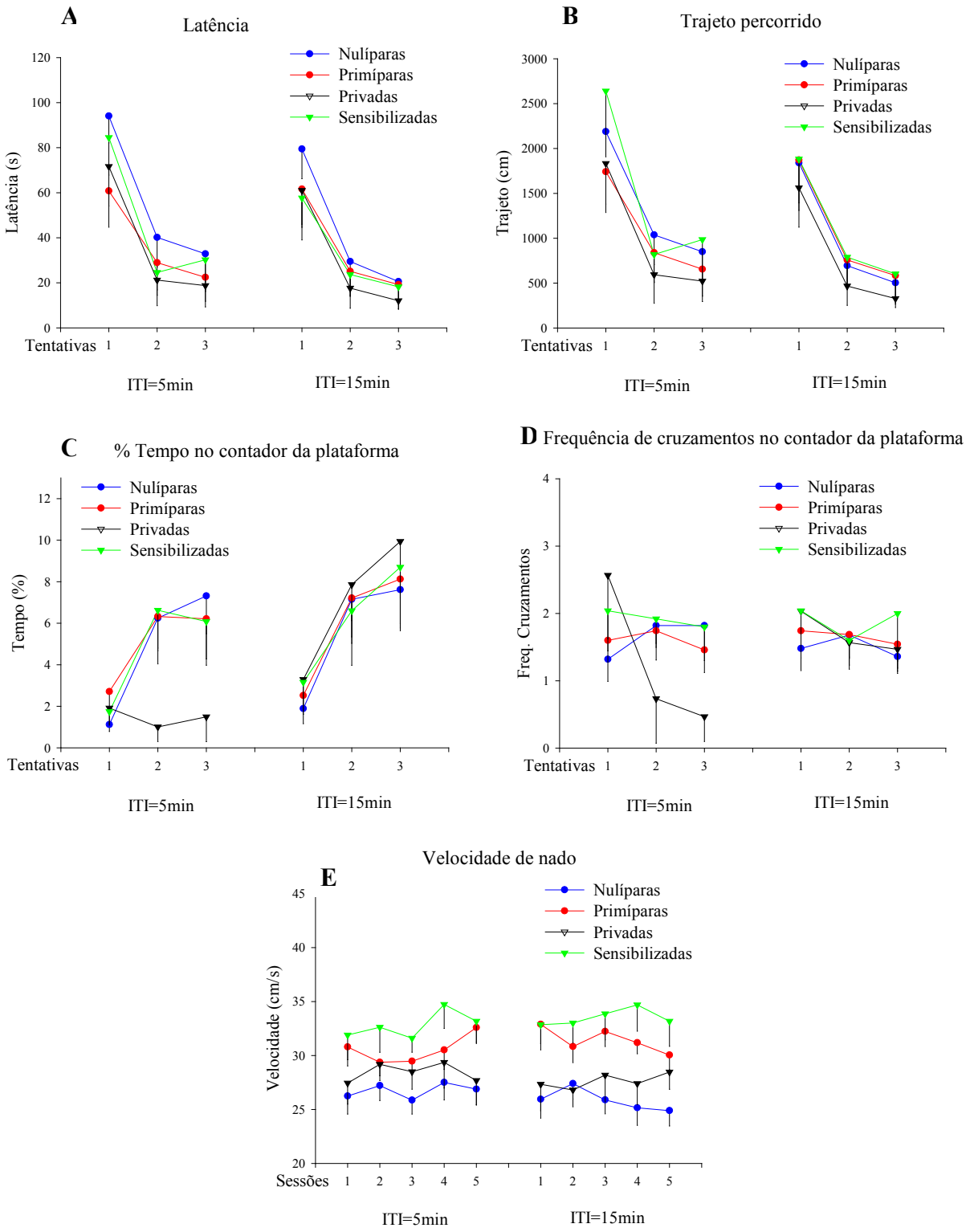


Figura 1.7 - Desempenho de ratas Wistar no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris ao longo de 10 sessões consecutivas, sendo as cinco primeiras com um ITI= 5 minutos (Fase 1) e as cinco últimas com ITI= 15 minutos (Fase 2); cada sessão consistiu em 3 tentativas. O desempenho dos

animais é expresso pelos parâmetros latência (A), trajeto percorrido (B), porcentagem de tempo (C), frequência de cruzamentos (D) no contador da plataforma e velocidade de nado (E), em função de sua experiência maternal. Para a análise do desempenho ao longo das tentativas, foram calculadas médias de cada uma das 3 tentativas diárias em cada fase de treino. No parâmetro velocidade de nado, foram calculadas médias de 3 tentativas em cada sessão para representar o desempenho dos animais ao longo dos dias. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

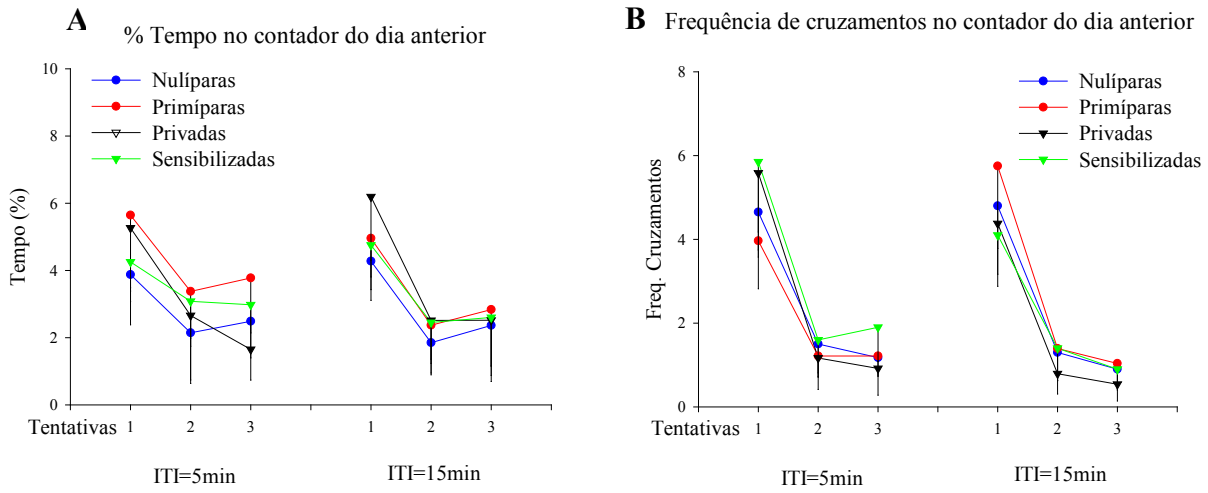
A ANOVA revelou um efeito significante em relação ao fator Grupo tanto para a latência ($F_{3,24} = 4,20$, $p = 0,015$), (Figura 1.7A) como para o trajeto percorrido ($F_{3,24} = 4,98$, $p = 0,007$), (Figura 1.7B). Análises *post hoc* mostraram que o grupo PRIV exibiu latências menores que o grupo NUL ($p = 0,021$), bem como trajetos menores do que os grupos SENS ($p = 0,008$) e NUL ($p = 0,023$), indicando que a privação de contato com os filhotes por 6 horas diárias resultou numa aquisição mais eficiente da tarefa. A ANOVA mostrou ainda ausência de efeito relacionado ao fator Grupo no parâmetro porcentagem de tempo no contador ($F_{3,24} = 1,24$, $p > 0,30$), (Figura 1.7C) e um efeito marginalmente significante relacionado ao fator Grupo no parâmetro frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{3,24} = 2,91$, $p = 0,055$), (Figura 1.7D). Neste último, a inspeção do gráfico sugere que o grupo PRIV exibiu um desempenho diferente dos demais grupos. A ANOVA também revelou diferenças significantes em relação ao fator Tentativa ($F_{2,48} = 7,79$-$266,02$, $p < 0,002$) nos parâmetros latência, trajeto percorrido, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma, indicando melhora de desempenho ao longo das tentativas. Ademais, a ausência de interações significantes entre os fatores Grupo e Tentativa nos parâmetros trajeto percorrido e porcentagem de tempo no contador da plataforma ($F_{6,48} = 1,03$-$1,72$, $p > 0,13$) e Grupo e Fase nos parâmetros latência, trajeto percorrido e frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{3,24} = 0,54$-$2,01$, $p > 0,13$), indica que o desempenho entre os diferentes grupos não difere ao longo das tentativas e nem em relação ao tempo de intervalo entre elas, nesses parâmetros. Entretanto, a

ANOVA revelou uma interação significante entre os fatores Grupo e Tentativa no parâmetro frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{6,48} = 8,62$, $p = 0,001$). A análise *post hoc* mostrou que o Grupo PRIV exibiu padrões diferentes de precisão na busca pela plataforma na área do contador, quando comparado aos demais grupos. É interessante observar que a ANOVA mostrou um efeito marginalmente significante relacionado à interação entre os fatores Grupo e Tentativa no parâmetro latência ($F_{6,48} = 1,94$, $p = 0,092$), sugerindo que o desempenho dos grupos foi quase diferente ao longo das tentativas. Adicionalmente, a ANOVA revelou uma interação significante entre os fatores Grupo e Fase no parâmetro porcentagem de tempo no contador da plataforma ($F_{3,24} = 18,19$, $p = 0,001$). Análises *post hoc* mostraram que o grupo PRIV exibiu um padrão de desempenho diferente dos demais grupos quando o ITI foi igual a 5 minutos.

Em relação ao parâmetro velocidade de nado (Figura 1.7E), a ANOVA revelou um efeito relacionado ao fator Grupo ($F_{3,24} = 8,64$, $p < 0,001$), mostrando que o grupo SENS exibiu velocidades maiores que o grupo NUL (*post hoc* $p < 0,001$) e também maiores que o grupo PRIV (*post hoc* $p = 0,023$). A análise *post hoc* mostrou ainda que o grupo PRIM exibiu velocidades maiores que o grupo NUL ($p = 0,009$). A ANOVA também revelou um efeito relacionado à interação entre os fatores Grupo e Sessão ($F_{12,96} = 2,05$, $p = 0,027$) e as análises *post hoc* indicaram que o grupo PRIV exibiu padrões de velocidade distintos em relação aos demais grupos. Adicionalmente, um efeito significante em relação ao fator Tentativa ($F_{2,48} = 6,32$, $p = 0,003$) mostrou que os animais aumentaram suas velocidades de nado ao longo das tentativas. A ANOVA revelou ainda ausência de significância relacionada ao fator Fase ($F_{1,24} = 0,002$, $p = 0,96$) e à interação entre os fatores Grupo e Tentativa ($F_{6,48} = 1,40$, $p = 0,23$) e Grupo e Fase (F

$_{3,24}$ = 1,34, p = 0,28), indicando que a velocidade de nado entre os diferentes grupos não difere ao longo das tentativas e nem sofre influência do intervalo de tempo entre elas.

A Figura 1.8 mostra os resultados que expressam o desempenho dos animais em relação à lembrança da localização da plataforma no dia anterior. A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes relacionadas ao fator Grupo ($F_{3,24}$ = 0,13-0,95, p > 0,43), Fase ($F_{1,24}$ = 0,01-1,07, p > 0,30) e à interação entre os fatores Grupo e Tentativa ($F_{6,48}$ = 0,37-1,25, p > 0,29) e Grupo e Fase ($F_{3,24}$ = 0,54-1,75, p > 0,18) nos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 1.8A), frequência de cruzamentos (Figura 1.8B) no contador da plataforma e porcentagem de tempo (Figura 1.8C) e frequência de cruzamentos (Figura 1.8D) no local exato onde a plataforma estava localizada no dia anterior, indicando que os animais de todos os grupos foram capazes de lembrar o local onde a plataforma estava localizada no dia anterior (*i.e.*, 24 h antes) e extinguir o comportamento de busca nesse local ao longo do tempo.



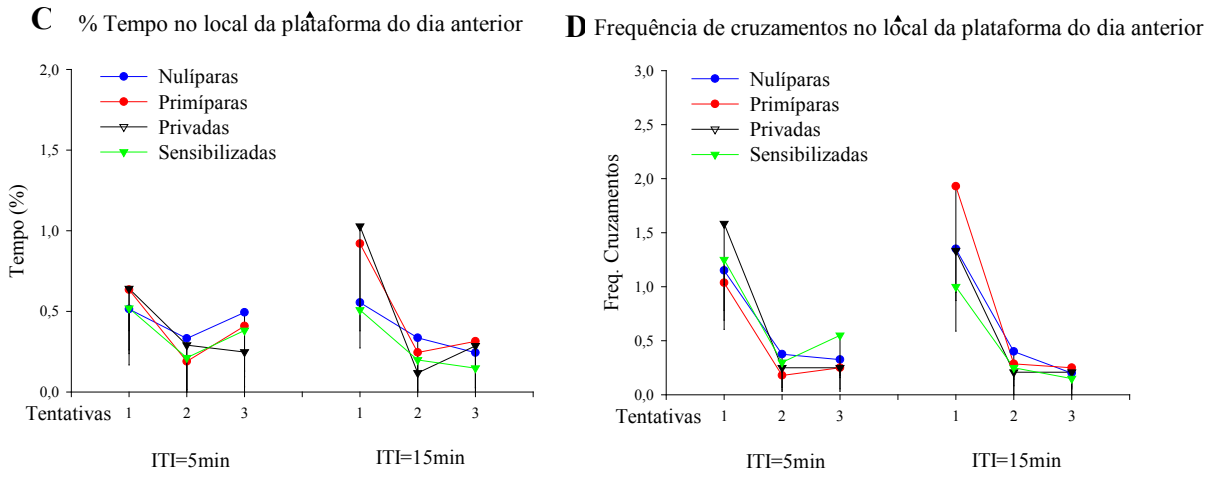


Figura 1.8 - Desempenho de ratas Wistar no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Os animais foram avaliados ao longo de 10 sessões consecutivas, sendo as cinco primeiras com um ITI= 5 minutos (Fase 1) e as cinco últimas com ITI= 15 minutos (Fase 2); cada sessão consistiu em 3 tentativas. O desempenho dos animais é expresso pelos parâmetros porcentagem de tempo (A) e frequência de cruzamentos (B) no contador da plataforma do dia anterior, porcentagem de tempo (C) e frequência de cruzamentos (D) no local exato da plataforma do dia anterior, em função da experiência maternal dos diferentes grupos. Para a análise do desempenho ao longo das tentativas, foram calculadas médias de cada uma das três tentativas diárias em cada fase de treino. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

Portanto os resultados do teste de memória operacional mostram que ratas Wistar primíparas, privadas de contato com seus filhotes por 6 horas diárias exibiram uma aquisição mais eficiente, cumprindo a tarefa de forma mais rápida e percorrendo trajetos menores. Além disso, ratas sensibilizadas pelo contato com filhotes adotivos exibiram velocidades de nado maiores, indicando que sua motivação durante a aquisição da tarefa foi distinta em relação aos demais grupos.

Em conjunto, os resultados do Experimento 2 mostram que diferentes formas de experiência maternal influenciam o desempenho de ratas Wistar em tarefas de memória espacial, quando os animais são avaliados durante o período de lactação/exposição aos filhotes. De forma mais específica, a experiência maternal em ratas sensibilizadas, caracterizada pelo contato diário

por 6 horas com filhotes adotivos, resultou em alterações na velocidade de nado tanto no teste de memória de referência quanto no teste de memória operacional, indicando que sua motivação para desempenhar a tarefa foi distinta, possivelmente por estar relacionada com elevação nos níveis de ansiedade e hiperatividade que, por sua vez, podem ter levado a uma aquisição mais lenta da tarefa. Adicionalmente, a exposição intermitente aos filhotes em ratas primíparas exerceu um efeito positivo no desempenho dos animais na tarefa de memória operacional.

Discussão

Os resultados do Experimento 1 mostraram que a experiência maternal não gerou alterações de desempenho em ratas da linhagem Wistar avaliadas 7 dias após o desmame/exposição aos filhotes, tanto numa tarefa de memória de referência quanto numa tarefa de memória operacional. A distinção entre memória de referência e operacional é importante, pois estas envolvem mecanismos neurais e psicológicos diferentes (Olton, 1983). A memória operacional está relacionada à manipulação e evocação de informações condicionadas a uma única tentativa, as quais podem ser usadas para orientar uma ação prospectiva e, logo após o seu uso, podem ser descartadas (Olton & Papas, 1979). Já a memória de referência está relacionada com a formação de uma memória estável, de longo prazo, que pode ser usada para guiar uma ação em várias tentativas subsequentes (Olton & Papas, 1979).

Em contraste aos nossos resultados obtidos no Experimento 1, Kinsley et al., (1999) relatou uma melhora significativa na memória espacial de ratas Sprague-Dawley que passaram pela experiência maternal. Num primeiro experimento, ratas MULT e NUL da linhagem Sprague-Dawley foram avaliadas no labirinto radial de 8 braços por 16 dias. Os resultados mostraram que as ratas MULT fizeram mais escolhas corretas ao procurar pela recompensa nos

primeiros 6 dias de teste. Num segundo experimento, ratas PRIM, SENS e NUL foram submetidas a um teste de memória de referência na versão seca do labirinto de Morris. Os resultados mostraram que as ratas PRIM e SENS foram mais rápidas para cumprir a tarefa em comparação com as ratas NUL (Kinsley et al., 1999). No entanto, alguns fatores importantes devem ser levados em consideração na interpretação desses resultados. Olton (1979) alerta para o fato de que roedores podem se deslocar em labirintos de diversas formas, sem necessariamente fazer uso da memória para cumprir a tarefa. No labirinto radial de 8 braços, particularmente, os animais podem guiar-se pelo uso de pistas internas ao labirinto, como o cheiro do alimento no final dos braços ou mesmo trilhas de odor deixadas em tentativas anteriores (Olton, 1983). O autor ressalta ainda que para cumprir a tarefa no labirinto radial, os animais podem fazer uso de *estratégias,* por exemplo, adotando um padrão de sempre virar à direita quando retornam à plataforma central após uma escolha e então, entrando dois braços depois daquele que está acabando de sair (Olton, 1983). Esse tipo de resposta denota um comportamento que é conveniente num determinado momento para se atingir um objetivo (encontrar o alimento), mas torna-se ineficaz quando há alterações internas ao labirinto (pistas proximais). Em contaste, labirintos amplos, abertos e elevados minimizam o uso de estratégias (Olton, 1983), como por exemplo, deslocar-se com base em alguma pista proximal localizada no chão ou internamente ao labirinto ou ainda, deslocar-se em círculos adotando apenas uma direção em sentido horário ou anti-horário até encontrar o reforço ao acaso (Yoerg & Kamil, 1982). Quando o labirinto é posicionado em um ambiente com vários estímulos discriminativos em forma de pistas distais, ele enfatiza a aquisição de uma memória por meio de mapeamento espacial (O´Keefe & Conway, 1978). Esse tipo de memória é adquirida de forma gradativa, após algumas sessões de treino, proporcionando desempenhos mais eficientes em comparação com estratégias de

guiamento, pois após a sua aquisição os animais podem desempenhar a tarefa mesmo que poucas pistas distais estejam disponíveis (O´Keefe & Nadel, 1978).

O fato de os animais exibirem um desempenho melhor já no início do treino no experimento de Kinsley et al. (1999), sugere que as ratas MULT estariam adotando *estratégias* de forrageamento mais eficazes do que as NUL e não fazendo uso de memória para desempenhar a tarefa, pois se essa diferença estivesse relacionada a processos de memória, o desempenho entre MULT e NUL seria inicialmente igual e tornar-se-ia melhor apenas depois de alguns dias de treino, durante os quais construiriam as relações espaciais de forma mais eficaz, proporcionando então o melhor desempenho. O labirinto aquático de Morris utilizado em nossos experimentos é amplo, medindo 200 cm de diâmetro, foi posicionado em uma sala com várias pistas distais salientes e nenhuma pista proximal foi disponibilizada para os animais (Figura 1). Estes fatores restringem o uso de estratégias de guiamento e estimulam o uso do mapeamento espacial (Olton, 1983), o que pode explicar a ausência de diferenças no desempenho dos diferentes grupos avaliados nesse experimento. Adicionalmente, os experimentos de Kinsley et al. (1999) na versão seca do labirinto de Morris usaram a redução na latência como indicador de melhora no desempenho espacial dos animais e não a distância percorrida. Pawluski & Galea (2008) sugerem que a latência não é o parâmetro mais indicado para expressar o desempenho em tarefas de memória espacial, pois está intimamente relacionada com a atividade motora e não com a memória estritamente. Portanto, é possível que as diferenças observadas em Kinsley et al. (1999) sejam relacionadas à habilidade motora e/ou à estratégia de busca adotada pelas ratas que passaram pela experiência maternal e não à memória.

Similarmente aos nossos resultados obtidos no Experimento 1, Zimberknopf et al. (2011) não encontraram diferenças na memória espacial de ratas NUL e PRIM da linhagem Wistar

avaliadas no labirinto aquático de Morris. Grupos independentes de animais de ambas as condições reprodutivas foram avaliados ao redor dos 3 meses (15 dias após o desmame dos filhotes) e 18 meses de idade (15 meses após o desmame dos filhotes). Interessantemente, no teste de memória de referência as ratas PRIM aos 18 meses exibiram uma estratégia de busca pela plataforma diferente quando comparadas com as NUL da mesma idade, escaneando a piscina em sua porção mais central, enquanto que suas equivalentes NUL passaram mais tempo nas porções externas. Adicionalmente, as ratas PRIM jovens entraram mais vezes no contador do dia anterior (área onde a plataforma estava posicionada 24 h antes) em relação às suas equivalentes NUL, demonstrando um comportamento de perseverança na busca pela plataforma no teste de memória operacional. Esses dados reforçam a ideia de que as ratas que passaram pela experiência maternal utilizam estratégias mais eficazes que as nulíparas e não necessariamente fazem uso de uma memória aperfeiçoada para cumprir a tarefa.

Outro fator importante que exerce efeito sobre a memória espacial de ratas que vivenciaram a experiência maternal é o momento em que elas são avaliadas. Existem relatos de melhora no desempenho espacial durante a gestação (Bodensteiner et al., 2006; Galea et al., 2000). Por outro lado, um prejuízo acentuado é observado nos quatro primeiros dias após o parto (Darnaudéry et al., 2007). Outros estudos mostram ainda que a melhora de desempenho só é observada após o desmame dos filhotes (34 dias depois: Pawluski et al., 2006b; 2 a 4 dias depois: Pawluski et al., 2006a; 15 dias e 16 meses depois: Lemaire et al., 2006; 22 dias, 12 e 18 meses depois: Gatewood et al., 2005). Em contraste, outros estudos mostram ausência de diferenças na memória espacial entre NUL e PRIM quando avaliadas após o desmame dos filhotes (Lambert et al., 2005; Zimberknopf et al., 2011). A origem da disparidade entre os resultados mencionados pode estar no fato de que estes estudos geralmente avaliam os mesmos animais em períodos

diferentes ao longo da gestação, período pós-parto e pós-desmame dos filhotes. Assim, pode ser que exista um efeito de treino relacionado à melhora no desempenho dos animais.

No Experimento 2 do presente estudo, grupos independentes de animais constituídos de forma similar aos grupos do Experimento 1, foram expostos a testes cujo início se deu cerca de 24 horas após o parto e se estenderam por todo o período de lactação/exposição aos filhotes (21 dias). Os resultados do teste de memória de referência mostraram que as fêmeas SENS exibiram trajetos maiores que as ratas NUL nas primeiras sessões de treino. Interessantemente, essas fêmeas também apresentaram velocidades maiores que as NUL e PRIV e quase maiores que as PRIM ($p = 0,082$) no teste de memória de referência. Adicionalmente, o grupo SENS também exibiu velocidades maiores que os grupos NUL e PRIV no teste de memória operacional. Embora Kinsley et al. (1999) e Lambert et al. (2005) tenham mostrado melhora de desempenho espacial em ratas sensibilizadas pela exposição contínua a filhotes adotivos, estes estudos não investigaram o desempenho dos animais durante o período de contato com os filhotes. É interessante observar que o desempenho inferior das ratas SENS em nosso estudo foi observado particularmente no início do treino no teste de memória de referência, coincidindo com o início da exposição aos filhotes. Durante os primeiros dias em que uma rata virgem é exposta aos filhotes adotivos, ela tende a evitá-los e não exibe comportamentos maternais de imediato, talvez, devido ao conflito entre os comportamentos de retirada e aproximação dos filhotes (Fleming & Rosenblatt, 1974; Numan & Insel, 2003). Durante esse período ocorre uma acentuada elevação nos níveis de corticosterona e sua diminuição se dá após alguns dias de exposição aos filhotes, quando as fêmeas passam a exibir comportamentos maternais semelhantes às primíparas (Korányi et al., 1977). Portanto, parece plausível que o prejuízo de desempenho das fêmeas SENS observado em nosso estudo seja devido aos efeitos do estresse e

da ansiedade causados pelo início do processo de sensibilização maternal, uma vez que o estresse e a consequente elevação nos níveis de glicocorticóides são fatores reconhecidamente prejudiciais na aquisição de tarefas de memória espacial (McLay et al., 1998; de Quervain et al., 1998), principalmente de uma tarefa de memória de referência (Coburn-Litvak et al., 2003), de forma consistente com os nossos resultados. Como a sensibilização maternal em fêmeas nulíparas é, primariamente, uma rota de acesso à circuitaria neural envolvida com o comportamento maternal não dependente de ação hormonal (Numan & Insel, 2003), é possível hipotetizar que essas ratas não se beneficiam dos efeitos atenuantes dos hormônios sobre o estresse, geralmente observados em ratas que passaram pela experiência maternal completa, incluindo a gestação e o período de contato com os filhotes (Wartella et al., 2003; Leuner & Shors, 2006).

Ao contrário do que era esperado, nossos resultados mostraram que as ratas privadas de contato com os filhotes por 6 horas diárias ao longo de 21 dias, exibiram um desempenho mais eficiente na tarefa de memória operacional, quando avaliadas durante o período de lactação. Em contraste, Lambert et al. (2005) não encontram diferenças entre PRIV e ratas NUL numa tarefa de memória de referência na versão seca do labirinto de Morris. Por outro lado, Pawluski et al. (2006a) mostraram que as ratas que passaram pela gestação e tiveram seus filhotes removidos dentro de 24 horas, exibiram um prejuízo de desempenho para cumprir tarefas de memória de referência e operacional no labirinto radial de oito braços. Ambos os estudos avaliaram os as fêmeas após o período correspondente ao desmame e fim da lactação. Os nossos achados em relação ao melhor desempenho das ratas PRIV no teste de memória operacional podem refletir um efeito motivacional da introdução e retirada constante dos filhotes na gaiola das fêmeas. Visto que a presença dos filhotes pode ser considerada como uma forma de enriquecimento

ambiental (Pawluski & Galea, 2008), é possível hipotetizar que a retirada dos filhotes a cada 18 horas e sua reintrodução na gaiola da fêmea lactante após decorridas 6 horas, tenha servido como uma fonte de estimulação, porém, minimizando a possibilidade de habituação a esse estímulo como ocorre com uma fêmea primípara, a qual passa 24 horas em contato com os filhotes. Diferentemente das ratas SENS, as ratas PRIV foram expostas às alterações hormonais decorrentes da gestação e período pós-parto em que foram avaliadas, as quais associadas à exposição intermitente aos filhotes podem ter levado às alterações nervosas que proporcionaram o melhor desempenho no teste de memória operacional. De fato, o hipocampo sofre alterações morfológicas e funcionais em virtude das flutuações hormonais que ocorrem durante a gestação e o período pós-parto (Wooley & McEwen, 1992; Tomizawa et al., 2003; Kinsley et al., 2006). Particularmente, os hormônios esteroides estradiol e corticosterona sofrem marcadas alterações em virtude da experiência maternal (Stern et al., 1973; Rosenblatt et al., 1979) e estes exercem efeitos sobre o desempenho espacial de roedores (Bowman et al., 2001; Dohanich, 2002). Ratas exibem um aumento nos níveis de estradiol durante a gestação e uma diminuição ao longo do período pós-parto (Rosenblatt et al., 1979; Hapon et al., 2003) enquanto que a corticosterona aumenta ao fim da gestação e se eleva ainda mais durante o período pós-parto (Stern et al., 1973; Atkinson & Waddell, 1995). Essas flutuações nos níveis dos hormônios que exercem influência sobre a funcionalidade e anatomia de uma estrutura conhecida pelo seu envolvimento na memória espacial talvez possam explicar as diferenças no desempenho, geralmente observadas em diferentes fases durante a experiência maternal. Além disso, ratas que passaram pela experiência maternal não exibem as mesmas alterações na morfologia hipocampal quando atingem idades mais avançadas (Love et al., 2005) em comparação com suas equivalentes mais

jovens (Wooley & McEwen, 1992; Kinsley et al., 2006), sugerindo que essas adaptações neurais podem ser reversíveis e não permanentes.

Outro fator que chama a atenção é a linhagem das ratas que são utilizadas nos estudos sobre a influência da experiência maternal sobre as funções de memória espacial. Os estudos que mostraram melhora significativa de desempenho em ratas expostas a algum tipo de experiência maternal utilizaram as linhagens Sprague-Dawley (Kinsley et al., 1999; Gatewood et al., 2005; Lambert et al., 2005; Pawluski et al., 2006b; Darnaudéry et al., 2007) e Long-Evans (Galea et al., 2000; Bodensteiner et al., 2006; Pawluski et al., 2006a), enquanto que na linhagem Wistar não foram observadas diferenças comportamentais similares relacionadas à experiência maternal (Zimberknopf et al., 2011 e Experimento 1 deste estudo). Como essas linhagens exibem desempenhos diferentes em tarefas espaciais (Higashida & Ogawa, 1987; Harker & Whishaw, 2002; Manahan-Vaughan & Schwegler, 2011), é possível hipotetizar que os seus desempenhos também podem diferir em função da experiência maternal, de forma linhagem-dependente. Portanto, para responder essa questão, seriam necessários estudos comparando especificamente o desempenho de ratas de diferentes linhagens que passaram pela mesma experiência maternal, na mesma tarefa comportamental.

Em conjunto, os resultados descritos neste capítulo mostram que a experiência maternal não gera alterações no desempenho espacial de ratas Wistar avaliadas 7 dias após o desmame dos filhotes. Em contraste, quando avaliadas durante o período de lactação/exposição aos filhotes, fêmeas sensibilizadas exibiram alterações motivacionais, tanto numa tarefa de memória de referência quanto numa tarefa de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Adicionalmente, ratas que passaram pela gestação e foram privadas de contato com os seus filhotes por 6 horas diárias apresentaram um melhor desempenho no teste de memória

operacional, sugerindo que as alterações hormonais decorrentes da gestação e período pós-parto associadas à exposição intermitente aos filhotes geraram alterações nervosas que resultaram num desempenho melhor. Estes resultados estendem os dados da literatura, mostrando que diferentes formas de experiência maternal produzem alterações de memória espacial em ratas, porém, esse efeito se mostrou dependente do período pós-parto em que os animais são avaliados.

Agradecimentos

Este estudo foi desenvolvido com o suporte financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

Capítulo II

Memória espacial em ratas expostas à experiência maternal: uma comparação entre as linhagens Wistar e Sprague-Dawley

Ilton Santos da Silva[1] e Gilberto Fernando Xavier[1]

Palavras-chave: Experiência maternal, memória espacial, Wistar, Sprague-Dawley.

A maternidade gera alterações comportamentais e fisiológicas na fêmea que contribuem para que a prole e a genetriz sobrevivam. Estudos anteriores sugerem que a experiência maternal em fêmeas de linhagens diferentes gera efeitos comportamentais distintos em tarefas espaciais. O presente estudo teve como objetivo comparar o desempenho de ratas primíparas (PRIM) e nulíparas (NUL) das linhagens Sprague-Dawley e Wistar em tarefas espaciais nas versões que avaliam memórias de referência e operacional no labirinto aquático de Morris. Os testes comportamentais tiveram início cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes. Os resultados mostraram que as ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley exibiram melhores desempenhos em relação às NUL da mesma linhagem e também em relação às ratas PRIM da linhagem Wistar, expressos por meio da redução do comprimento do trajeto e das latências no teste de memória de referência. No teste de memória operacional, as ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley exibiram um desempenho superior em relação às PRIM da linhagem Wistar, expresso por meio de comprimentos de trajetos menores. Adicionalmente, ratas da linhagem Sprague-Dawley, independentemente da experiência maternal, exibiram estratégias de busca mais eficientes para cumprir a tarefa, tanto no teste de memória de referência quanto no teste de memória operacional. Estes resultados mostram que a experiência maternal gera alterações de desempenho em tarefas espaciais de forma dependente da linhagem, particularmente em relação às ratas Sprague-Dawley.

---

[1]Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências/Universidade de São Paulo.
Email: silvais@ib.usp; gfxavier@usp.br.

Introdução

O encéfalo materno representa um rico modelo para o estudo da plasticidade e flexibilidade natural do sistema nervoso frente às demandas impostas pela reprodução. Por exemplo, a área preóptica medial do hipotálamo (mPOA), conhecida pelo seu envolvimento na regulação do comportamento maternal (Numan, 1974; Wellman et al., 1997; Stafisso-Sandoz et al., 1998; Numan & Stolzenberg, 2008), exibe modificações na extensão dos seus ramos dendríticos e também no formato e tamanho dos corpos celulares dos seus neurônios em virtude da experiência maternal (Keyser-Marcus et al., 2001). O hipocampo exibe marcadas alterações em sua anatomia e função devido às flutuações hormonais que são comuns durante o período de gestação e pós-parto. Essas alterações incluem o aumento na concentração de espinhas dendríticas (Pawluski & Galea, 2005; Kinsley et al., 2006) e nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Macbeth et al., 2008) no sub-campo CA1, além de uma facilitação sináptica mediada por receptores N-metil D-aspartato (NMDA) entre as células piramidais da mesma região hipocampal (Wooley et al., 1997). Adicionalmente, fatias de hipocampo tratadas em cultura com o hormônio ocitocina exibem aumento na duração da potenciação de longo prazo (LTP) e esse efeito também foi observado em camundongos lactantes, sem qualquer tratamento hormonal artificial (Tomizawa et al., 2003). Como o hipocampo é uma região tradicionalmente conhecida pelo seu envolvimento em funções de memória espacial (O´Keefe & Nadel, 1978; Xavier et al., 1999; Xavier & Costa, 2009), é possível que as adaptações morfofuncionais mencionadas acima contribuam para as alterações de memória espacial observadas em ratas que passaram pela experiência maternal (Kinsley et al., 1999; Love et al., 2005; Pawluski et al., 2006a).

A aprendizagem espacial em roedores, no entanto, sofre influência de uma série de variáveis como o sexo do sujeito experimental, flutuações nos níveis de hormônios esteróides e efeitos deletérios do estresse e envelhecimento (Gaulin et al., 1990; Galea et al., 1996; Bowman et al., 2001; Gatewood et al., 2005; Witty et al., 2013). Porém, essa influência não se limita a esses fatores e suas combinações. Muitos estudos mostram que diferentes linhagens de roedores, incluindo camundongos (Wiss et al., 2000; Brown & Wong, 2007; Abramov et al., 2008) e ratos (Higashida & Ogawa, 1987; van der Staay, 1999; Harker & Whishaw, 2002; Manahan-Vaughan & Schwegler, 2011) apresentam diferenças na taxa de aprendizagem em tarefas espaciais. Essas diferenças entre linhagens também são observadas na anatomia e função do hipocampo. Epp et al. (2011) mostraram que ratos das linhagens Sprague-Dawley e Long-Evans diferem quanto à taxa de neurogênese e ativação dos novos neurônios em resposta ao treino numa tarefa espacial no labirinto aquático de Morris. Além disso, ratos Sprague-Dawley, "*Spontaneously Hypertensive Rats*" (SHR), Fischer 344 e Wistar exibem marcadas diferenças eletrofisiológicas no hipocampo e essas diferenças mostraram relação com o desempenho numa tarefa espacial no labirinto aquático de Morris (Diana et al., 1994).

Portanto, considerando a notável plasticidade do encéfalo materno e as alterações comportamentais frente aos desafios que acompanham a gestação e o período de cuidado com os filhotes, é possível que as alterações de memória observadas nessas fêmeas também variem em função da linhagem, uma vez que esta, por si só, é uma variável a ser considerada em estudos de memória espacial.

Objetivos

Este estudo teve como objetivo comparar a memória espacial de ratas primíparas (PRIM, animais que passaram por uma gestação e período de lactação) e nulíparas (NUL, animais sem qualquer experiência maternal) das linhagens Wistar e Sprague-Dawley. Para isso, os grupos de animais mencionados acima foram avaliados em tarefas espaciais de memória de referência e operacional por meio do labirinto aquático de Morris, com início dos treinos cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes. A hipótese considerada foi que a experiência maternal produziria alterações comportamentais de forma dependente da linhagem, de forma mais pronunciada em ratas da linhagem Sprague-Dawley.

Justificativa para a abordagem adotada

Os estudos que mostraram melhora significativa de desempenho em ratas expostas a experiência maternal utilizaram em sua grande maioria animais da linhagem Sprague-Dawley (Kinsley et al., 1999; Gatewood et al., 2005; Lambert et al., 2005; Pawluski et al., 2006b; Darnaudéry et al., 2007) e, em menor extensão, animais da linhagem Long Evans (Galea et al., 2000; Bodensteiner et al., 2006; Pawluski et al., 2006a). Por outro lado, o mesmo efeito não foi observado em ratas da linhagem Wistar (Zimberknopf et al., 2011 e Experimento 1 deste estudo). No entanto, até o presente momento, não há estudos comparando o desempenho de ratas de linhagens diferentes e maternalmente experientes, expostas concomitantemente à mesma tarefa espacial. Como essas linhagens exibem desempenhos distintos (Higashida & Ogawa, 1987; Harker & Whishaw, 2002; Manahan-Vaughan & Schwegler, 2011), é possível que os seus desempenhos também possam diferir em função da experiência maternal, de forma dependente da linhagem. A escolha da primiparidade como condição reprodutiva de estudo se deve ao fato

de esta produzir alterações de memória espacial mais pronunciadas em comparação com a multiparidade (duas ou mais gestações e períodos de lactação), somente gestação ou sensibilização maternal em ratas da linhagem Sprague-Dawley (Pawluski et al., 2006b). A utilização do labirinto aquático de Morris como tarefa comportamental permite, por meio de manipulações relativamente simples, que diferentes funções de memória sejam avaliadas, fornecendo uma série de parâmetros bastante informativos sobre o desempenho espacial dos animais (Morris, 1981; Xavier et al., 1999).

Métodos

Animais

Neste estudo foram utilizadas 26 ratas da linhagem Wistar e 27 da linhagem Sprague-Dawley, com 90 dias de idade no início das manipulações experimentais. As ratas Wistar foram provenientes do biotério central do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB/USP) e suas matrizes foram adquiridas no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME/UNIFESP). Os animais da linhagem Sprague-Dawley foram adquiridos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Estes últimos permaneceram em período de aclimatação no biotério do IB/USP por três semanas antes de qualquer manipulação experimental. As condições de acondicionamento em biotério foram as mesmas descritas no Capítulo I.

Acasalamento e constituição dos Grupos Experimentais

Aos 90 dias de idade, parte dos animais de ambas as linhagens foi submetida ao acasalamento por sistema de harém, da mesma forma como descrito no Capítulo I. Após o nascimento dos filhotes, foram organizados os seguintes grupos:

- **Grupo Nulíparas** (NUL; ratas virgens, sem qualquer manipulação experimental e com a mesma idade e condições de manutenção que os demais grupos; Wistar n=15, Sprague-Dawley n=15);
- **Grupo Primíparas** (PRIM; animais que passaram por uma gestação e permaneceram com seus filhotes até o desmame aos 21 dias; Wistar n=11, Sprague-Dawley n=12).

Os testes comportamentais foram iniciados cerca de 24 horas após o nascimento dos filhotes dos grupos de ratas primíparas.

Labirinto aquático de Morris

O equipamento, bem como os procedimentos utilizados neste estudo foram idênticos aos descritos no Capítulo I.

Teste de Memória de Referência

O experimento de memória de referência foi conduzido da mesma forma como descrito no Capítulo I. O teste teve a duração de 12 dias consecutivos, com 2 tentativas diárias e um intervalo (ITI) de 10 minutos entre elas. Os parâmetros analisados no teste de memória de referência foram: latência para encontrar a plataforma, trajeto percorrido, porcentagem de tempo no quadrante da plataforma e velocidade de nado.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test")

No dia seguinte ao último dia de treino no teste de memória de referência, deu-se início ao "Probe test". A metodologia utilizada nessa fase foi a mesma descrita no Capítulo I. Os animais passaram por duas tentativas consecutivas, uma por dia, com duração total de 180 segundos cada. Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de tempo despendido e o número de cruzamentos no contador da plataforma.

Teste de memória operacional

No dia seguinte à última sessão do "Probe Test", deu-se início ao teste de memória operacional. O experimento foi divido em duas fases: a primeira ocorreu ainda dentro do período de contato com os filhotes dos grupos PRIM (dias 15 a 20, totalizando 6 sessões) e a segunda teve início 7 dias após o desmame (dias 28 a 33, 6 sessões). Em ambas as fases, foram realizadas 3 tentativas diárias com um ITI igual a 5 minutos. Os parâmetros mensurados foram latência para encontrar a plataforma, trajeto percorrido, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma e por fim, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador onde a plataforma estava localizada no dia anterior.

Análise de dados

A forma com que os dados comportamentais foram analisados foi a mesma descrita no Capítulo I, exceto pela adição de alguns fatores na análise, descritos a seguir.

No teste de memória de referência, "Grupo" (NUL *vs* PRIM) e "Linhagem" (Wistar *vs* Sprague-Dawley) foram considerados fatores entre-sujeitos e "Sessão" (12 dias) e "Tentativa" (2 diárias) fatores intra-sujeitos.

No teste de avaliação e extinção da resposta adquirida, os parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no local da plataforma foram analisados separadamente, tendo os grupos experimentais e as linhagens como fatores entre-sujeitos e "Sessão" (2 dias) e "Bloco" (3 de 60 segundos, cada) como fatores intra-sujeitos.

No teste de memória operacional, "Tentativa" (3 diárias) e "Fase" (2, durante e após o período de cuidados maternais) foram considerados fatores intra-sujeitos e os grupos e linhagens como fatores entre-sujeitos.

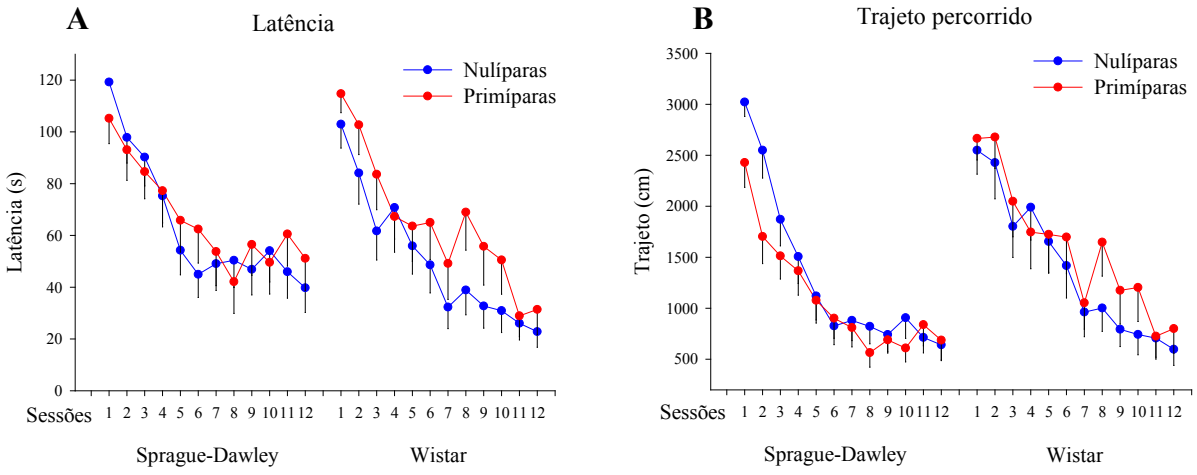
Resultados

Memória de referência

A Figura 2.1 mostra os resultados do teste de memória de referência. A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes relacionadas ao fator Grupo nos parâmetros latência e trajeto percorrido (Figuras 2.1A e 2.1B, respectivamente), ($F_{1,49}$ = 0,002-2,46, $p > 0,12$). No entanto, em relação aos parâmetros porcentagem de tempo no quadrante da plataforma e velocidade de nado (Figuras 2.1C e 2.1D, respectivamente), houve um efeito significante relacionado ao fator Grupo ($F_{1,49}$ = 8,21-9,04, $p < 0,007$). Análises *post hoc* mostraram que o grupo NUL passou mais tempo no quadrante da plataforma ($p = 0,004$) e exibiu velocidades de nado maiores ($p = 0,003$).

A ANOVA também mostrou uma interação significante entre os fatores Grupo e Linhagem em relação ao trajeto percorrido ($F_{1,49} = 5,01$, $p = 0,029$). O grupo PRIM da linhagem Sprague-Dawley apresentou trajetos menores em relação ao grupo PRIM da linhagem Wistar (*post hoc*, $p = 0,004$), indicando que a experiência maternal exerceu um efeito positivo no desempenho dos animais Sprague-Dawley. Não houve interação significante entre os fatores

Grupo e Linhagem nos parâmetros latência, porcentagem de tempo no quadrante e velocidade de nado ($F_{1,49}$ = 0,002-1,11, p > 0,29). Adicionalmente, a ANOVA revelou uma interação significante entre os fatores Grupo e Sessão em relação ao parâmetro velocidade de nado ($F_{11,539}$ = 2,51, p = 0,004). A inspeção da Figura 2.1D, indica que o grupo NUL exibiu velocidades de nado distintas ao longo das sessões. Também houve uma diferença próxima à significância entre os fatores Grupo e Sessão em relação à porcentagem de tempo no quadrante da plataforma (Figura 2.1C), ($F_{11,539}$ = 1,77, p = 0,055), sugerindo que desempenho do grupo NUL diferiu ao longo das sessões quanto ao tempo gasto no quadrante onde a plataforma foi posicionada. Não houve interações significantes entre os fatores Grupo e Sessão em relação à latência e trajeto percorrido ($F_{11,539}$ = 0,53-0,95, p > 0,48), bem como entre os fatores Grupo e Tentativa em todos os parâmetros analisados no teste de memória de referência ($F_{1,49}$ = 0,06-2,48, p > 0,12).



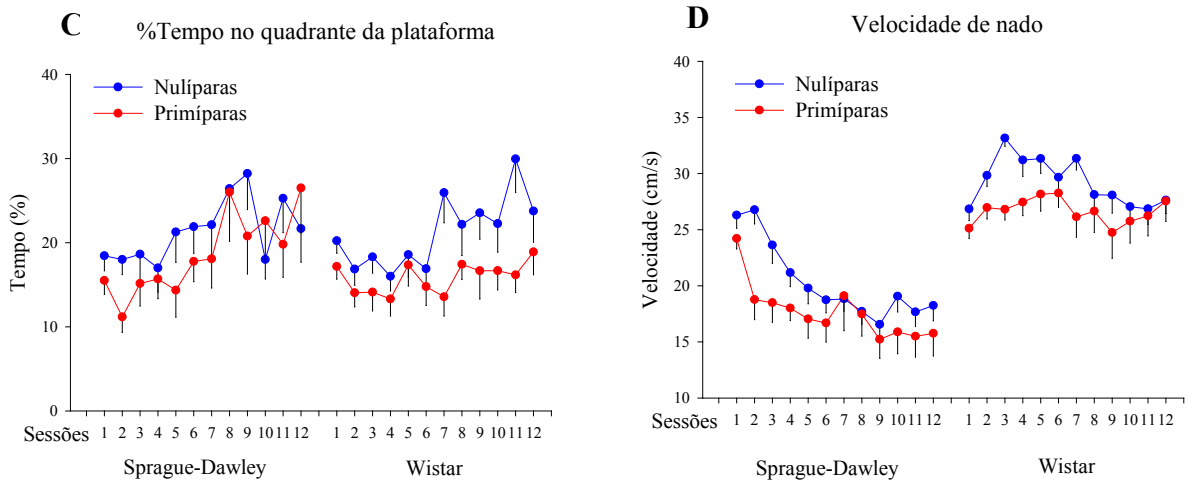


Figura 2.1 - Desempenho de ratas das linhagens Sprague-Dawley e Wistar no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris ao longo de 12 sessões de treino, expresso pelos parâmetros latência (A), trajeto percorrido (B), porcentagem de tempo no quadrante da plataforma (C) e velocidade de nado (D) em função da experiência maternal dos diferentes grupos. Os dados estão representados em termos de média ± EPM. Valores médios de duas tentativas por sessão foram usados para representação gráfica dos dados.

A ANOVA revelou um efeito significante em relação ao fator Linhagem, relacionado aos parâmetros trajeto percorrido e velocidade de nado ($F_{1,49}$ = 10,18-93,22, $p < 0,003$). As análises *post hoc* mostraram que animais da linhagem Sprague-Dawley exibiram trajetos ($p = 0,005$) e velocidades ($p < 0,001$) significantemente menores. Não houve diferenças significantes relacionados ao fator Linhagem envolvendo os parâmetros latência e porcentagem de tempo no quadrante da plataforma ($F_{1,49}$ = 1,20-1,85, $p > 0,17$). A ANOVA mostrou ainda uma interação significante entre os fatores Linhagem e Sessão em relação aos parâmetros trajeto percorrido e velocidade de nado ($F_{11,539}$ = 2,43-9,30, $p < 0,006$), indicando que as linhagens exibiram padrões de trajetos e velocidades diferentes ao longo das sessões. Não houve interação significativa entre os fatores Grupo e Linhagem em relação aos parâmetros latência e porcentagem de tempo no quadrante da plataforma ($F_{11,539}$ = 1,21-1,59, $p > 0,096$). Em contraste, a ANOVA mostrou interações significantes envolvendo os fatores Linhagem e Tentativa em relação aos parâmetros

latência e trajeto percorrido (Figuras 2.1A e 2.1B, respectivamente), ($F_{1,49}$ = 4,16-15,73, $p < 0,048$). Análises *post hoc* mostraram que os animais da linhagem Sprague-Dawley exibiram latências e trajetos menores na primeira tentativa e, esse desempenho se manteve na segunda. Já os animais da linhagem Wistar, exibiram latências e trajetos maiores na primeira tentativa, mas melhoraram significativamente na segunda (particularmente nas sessões iniciais de treino), igualando seu desempenho ao dos animais Sprague-Dawley. Não houve interação significante entre os fatores Linhagem e Tentativa em relação aos parâmetros porcentagem de tempo no quadrante da plataforma e velocidade de nado ($F_{1,49}$ = 0,92-2,25, $p > 0,13$). A ANOVA mostrou ainda uma interação significante entre os fatores Grupo, Linhagem e Sessão em relação ao parâmetro velocidade de nado ($F_{11,539}$ = 1,81, $p = 0,049$). A Figura 2.1D mostra que, diferentemente das ratas Wistar, os animais da linhagem Sprague-Dawley exibiram velocidades decrescentes ao longo das sessões, particularmente no grupo PRIM. Não houve interações significantes entre os fatores Grupo, Linhagem e Sessão em relação aos parâmetros latência, comprimento do trajeto e porcentagem de tempo no quadrante da plataforma ($F_{11,539}$ = 1,19-1,53, $p > 0,11$). A ANOVA também revelou a existência de diferenças significantes na interação entre os fatores Grupo, Linhagem e Tentativa em relação aos parâmetros latência e trajeto percorrido (Figuras 2.2A e 2.2B, respectivamente), ($F_{1,49}$ = 6,68-9,60, $p < 0,02$). Interessantemente, a análise de contrastes complementar à ANOVA envolvendo esses parâmetros, mostrou que o grupo PRIM da linhagem Sprague-Dawley melhorou seu desempenho na segunda tentativa em relação à primeira, o que não ocorreu no grupo NUL da mesma linhagem. Já os animais Wistar melhoraram o seu desempenho na segunda tentativa em relação à primeira, tanto no grupo PRIM quanto no grupo NUL, indicando novamente que a experiência maternal exerce um efeito positivo no desempenho dos animais somente da linhagem Sprague-Dawley (Figura 2.2). Não

houve interação significativa entre os fatores Grupo, Linhagem e Tentativa nos parâmetros porcentagem de tempo no quadrante e velocidade de nado ($F_{1,49} = 0,22\text{-}1,70$, $p > 0,19$).

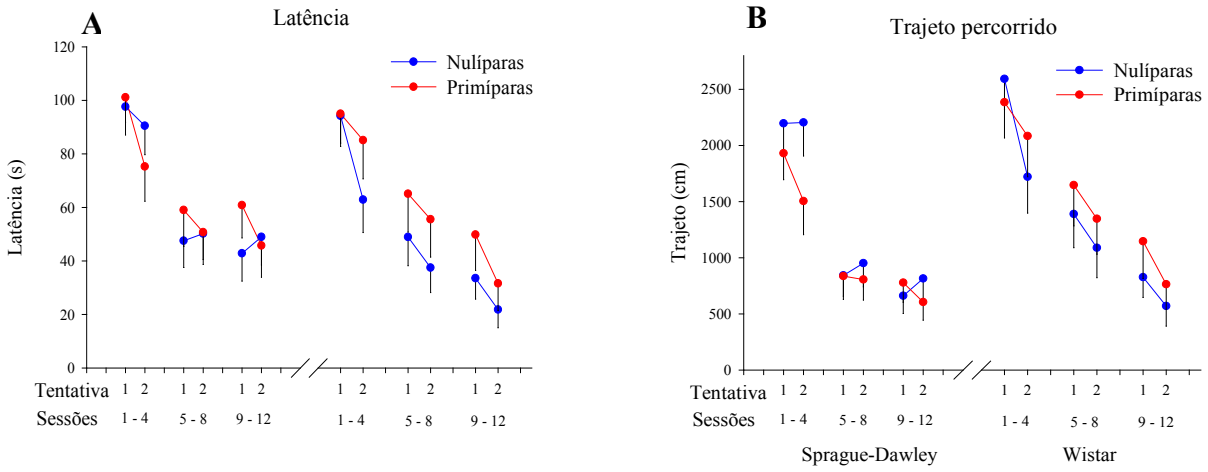


Figura 2.2 - Desempenho de ratas das linhagens Sprague-Dawley e Wistar no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris, expresso pelos parâmetros latência (A) e trajeto percorrido (B) em função da experiência maternal dos diferentes grupos. Os dados estão representados em termos de média ± EPM. Valores médios das primeiras e segundas tentativas das sessões de 1 a 4, 5 a 8 e 9 a 12 foram usados para representar desempenho dos animais ao longo das tentativas e blocos de sessões.

Em conjunto, os resultados do teste de memória de referência mostraram que ratas da linhagem Sprague-Dawley avaliadas no início do período de lactação e cuidados maternais exibiram um desempenho melhor na tarefa, caracterizado por trajetos menores para encontrar a plataforma. Adicionalmente, mostraram que o desempenho superior desses animais já nas primeiras tentativas das sessões iniciais de treino, tanto na latência, quanto no trajeto percorrido, indica que a origem dessa melhora parece estar relacionada à estratégia que as ratas Sprague-Dawley, particularmente as primíparas, utilizam para escanear a piscina e encontrar a plataforma.

Interessantemente, os resultados também mostraram que a experiência maternal proporcionou um benefício no desempenho de ratas Sprague-Dawley em comparação com ratas

primíparas da linhagem Wistar (caracterizado por trajetos menores), indicando que a experiência maternal produziu melhora no desempenho de forma dependente da linhagem. Além disso, entre as ratas da linhagem Sprague-Dawley, as primíparas mostraram uma estratégia mais eficiente, utilizando a informação adquirida na primeira tentativa para melhorar seu desempenho na segunda, em termos de latência e trajeto percorrido até encontrar a plataforma. Tanto as ratas primíparas quanto as nulíparas da linhagem Wistar exibiram comportamentos semelhantes entre si, melhorando seus desempenhos na segunda tentativa.

Por fim, os resultados mostraram que ratas primíparas da linhagem Spague-Dawley exibiram velocidades de nado cada vez menores ao longo das sessões, indicando baixos níveis de ansiedade e estados motivacionais distintos para cumprir a tarefa. Em contraste, ratas nulíparas de ambas as linhagens exibiram velocidades maiores com o decorrer do treino, sugerindo que a experiência maternal em ratas pode diminuir os níveis de ansiedade e hiperatividade em ratas.

Avaliação da memória de referência e extinção da resposta adquirida ("Probe Test")

A Figura 2.3 mostra os resultados do teste de avaliação e extinção da resposta adquirida. A ANOVA revelou uma diferença significante relacionada ao fator Grupo no parâmetro frequência de cruzamentos no contador (Figura 2.3B), ($F_{1,49} = 6,77$, $p = 0,012$). Análises *post hoc* mostraram que o grupo NUL cruzou mais vezes pela área onde a plataforma estava localizada nos dias anteriores ($p = 0,01$). Também houve uma diferença próxima à significância em relação ao fator Grupo, relativo à porcentagem de tempo no contador (Figura 2.3A), ($F_{1,49} = 3,06$, $p = 0,08$). De fato, a inspeção do gráfico sugere que as ratas NUL também passaram mais tempo na área do contador. A ANOVA mostrou ainda diferenças significantes relacionadas à interação entre os fatores Grupo e Bloco relativos a ambos os parâmetros ($F_{2,98} = 4,65$-$5,53$, $p <$

0,01). As análises de contraste mostraram que as ratas NUL despenderam mais tempo (p = 0,01) e cruzaram mais vezes (p = 0,001) na área do contador durante os primeiros 60 segundos. Não houve interação significante entre os fatores Grupo e Sessão em nenhum dos parâmetros ($F_{1,49}$ = 0,001-0,002, p > 0,95).

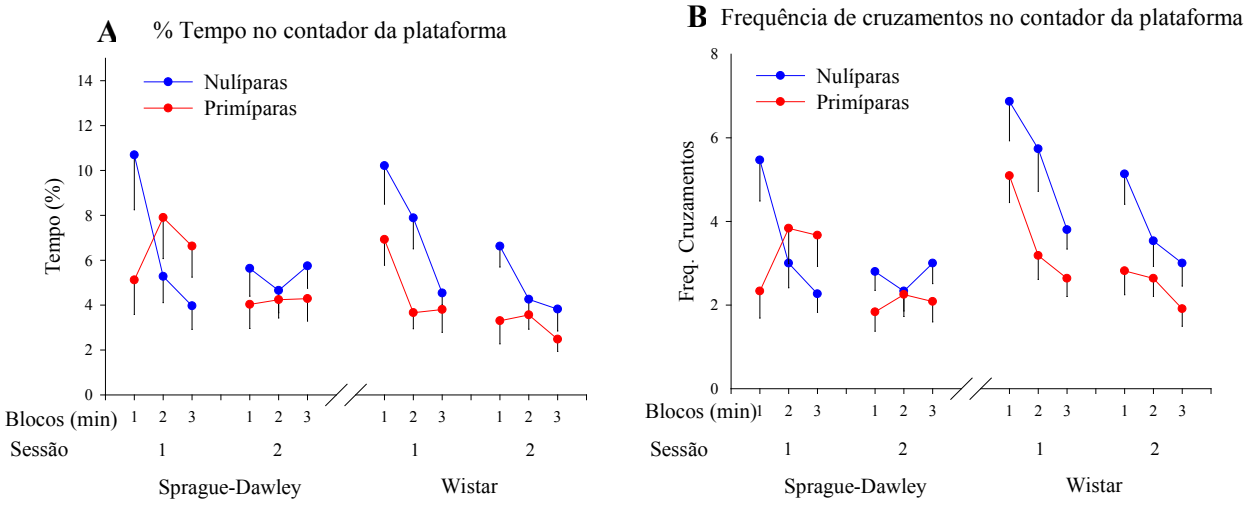


Figura 2.3 - Desempenho de ratas das linhagens Wistar e Sprague Dawley, primíparas e nulíparas, no teste de avaliação e extinção da resposta aprendida ("Probe test") no labirinto aquático de Morris, em função de Blocos de 1 minuto cada, em cada uma das 2 sessões de 180 minutos cada. O desempenho é expresso pelos parâmetros porcentagem de tempo (A) e frequência de cruzamentos (B) no contador da plataforma. Para análise temporal do desempenho dos animais, cada tentativa foi dividida em 3 blocos consecutivos de 60 segundos cada. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

A ANOVA mostrou diferenças significantes relacionadas ao fator Linhagem em relação ao parâmetro frequência de cruzamentos no contador ($F_{1,49}$ = 5,56, p = 0,02). A análise post hoc mostrou que animais da linhagem Wistar cruzaram mais vezes a área do contador (p = 0,01). Não houve diferença significativa relacionada ao fator Grupo quanto à porcentagem de tempo na mesma área ($F_{1,49}$ = 0,51, p = 0,47). A ANOVA revelou ainda uma interação significante entre os fatores Linhagem e Bloco em relação ao parâmetro frequência de cruzamentos no contador ($F_{2,98}$ = 4,94, p < 0,009). A análise de contrastes complementar à ANOVA mostrou que as ratas da

Linhagem Wistar cruzaram mais vezes pela área do contador, particularmente durante os primeiros 60 segundos ($p = 0,004$). Não houve interação significante entre os fatores Linhagem e Bloco em relação ao fator porcentagem de tempo no contador ($F_{2,98} = 1,63$, $p = 0,19$). A ANOVA mostrou ainda ausência de interações significantes entre os fatores Grupo e Linhagem, Linhagem e Sessão ou Grupo, Linhagem e Sessão ($F_{1,49} = 0,11$-$2,02$, $p > 0,16$) e, Grupo, Linhagem e Bloco em ambos os parâmetros analisados no Probe Test ($F_{2,98} = 1,67$-$1,76$, $p > 0,17$). Por fim, o efeito significante relacionado aos fatores Sessão ($F_{1,49} = 17,51$-$21,09$, $p < 0,001$) e Bloco ($F_{2,98} = 8,70$-$9,72$, $p > 0,001$) em ambos os parâmetros indica que todos os grupos de ambas as linhagens foram capazes de extinguir o comportamento de busca pela plataforma em sua localização nos dias anteriores de um dia para o outro.

Portanto, os resultados do teste de avaliação e extinção da resposta aprendida mostraram que as ratas nulíparas foram mais precisas em lembrar o local onde a plataforma estava posicionada nos dias anteriores, comportamento refletido pelo aumento do número de cruzamentos e de tempo despendido no contador, particularmente no início da tentativa. Adicionalmente, os resultados mostraram que as ratas da linhagem Wistar, independentemente da experiência reprodutiva, também foram mais precisas quanto à lembrança sobre o local da plataforma, cruzando mais vezes pela área do contador no primeiro bloco da exposição. Entretanto, todos os grupos mostraram uma taxa semelhante de extinção do comportamento aprendido nos dias anteriores, ao longo do tempo.

Memória operacional

Os resultados do teste de memória operacional estão apresentados na Figura 2.4. A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes relacionadas ao fator Grupo ($F_{1,49} = 0,02$-

1,15, $p > 0,28$) nos parâmetros latência (Figura 2.4A), trajeto percorrido (Figura 2.4B), porcentagem (Figura 2.4C) e frequência (Figura 2.4D) de cruzamentos no contador da plataforma, indicando que a experiência maternal não proporcionou alterações na memória operacional desses animais. Quanto ao fator Fase, a ANOVA revelou um efeito significante nos parâmetros latência, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{1,49} = 5,47\text{-}16,86$, $p < 0,03$), indicando que o desempenho dos animais durante o período de lactação/cuidados maternais e o período pós-desmame foi diferente. Não houve interação significante entre os fatores Grupo e Fase ($F_{1,49} = 0,15\text{-}1,03$, $p > 0,31$) e Grupo e Tentativa ($F_{2,98} = 0,29\text{-}1,21$, $p > 0,30$) nos parâmetros latência, trajeto percorrido, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma, indicando que o grupo PRIM não diferiu do grupo NUL nas duas fases pós-parto em que foram avaliadas e nem ao longo das tentativas de treino. Interessantemente, a ANOVA mostrou uma interação significante entre os fatores Grupo, Fase e Tentativa nos parâmetros latência (Figura 2.4A) e trajeto percorrido (Figura 2.4B), ($F_{2,98} = 4,21\text{-}4,88$, $p < 0,02$). A análise de contrastes complementar à ANOVA revelou que as ratas PRIM diminuíram suas latências e trajetos na terceira tentativa da Fase 2 em comparação com a mesma tentativa da Fase 1, indicando que a experiência maternal teve um efeito positivo no desempenho dos animais quando estes são avaliados após o período de lactação e cuidados com os filhotes. Não houve interação significante entre os fatores Grupo, Fase e Tentativa nos parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{2,98} = 1,13\text{-}1,66$, $p > 0,19$).

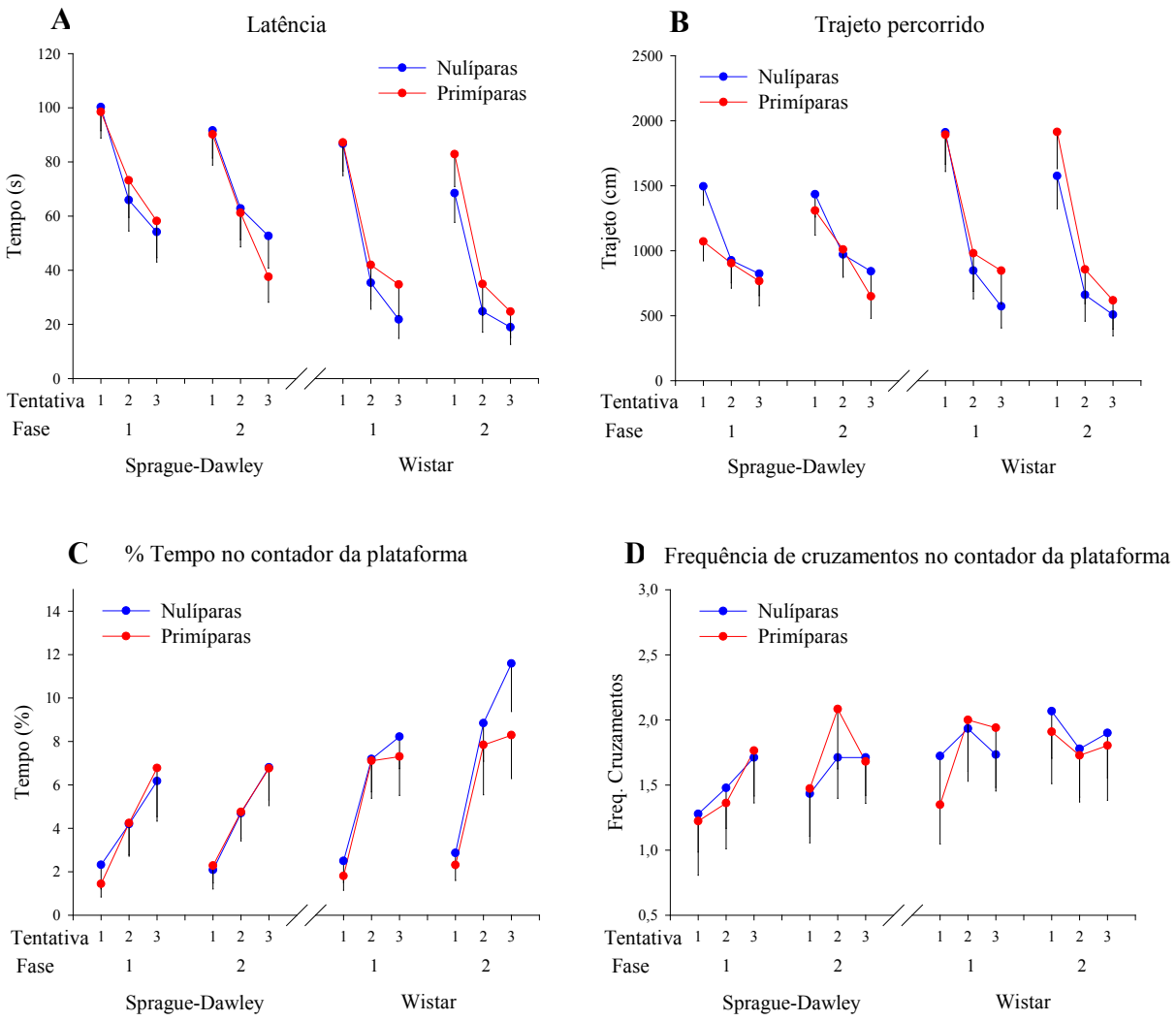


Figura 2.4 - Desempenho de ratas das linhagens Wistar e Sprague-Dawley no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris ao longo de 12 sessões divididas em duas fases: na primeira, os animais foram avaliados durante o período de lactação e cuidados maternais (dias 15 a 20) e a segunda, 7 dias após o desmame dos filhotes (dias 28 a 33). Cada sessão consistiu em 3 tentativas com um ITI de 5 minutos. O desempenho dos animais é expresso pelos parâmetros latência (A), trajeto percorrido (B), porcentagem de tempo (C), frequência de cruzamentos (D) no contador da plataforma, em função de sua experiência maternal. Para a análise do desempenho ao longo das tentativas, foram calculadas médias de cada uma das 3 tentativas diárias em cada fase de treino. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

A ANOVA mostrou ainda diferenças significantes relacionadas ao fator Linhagem nos parâmetros latência, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da

plataforma ($F_{1,49}$ = 8,66-25,88, $p < 0,005$). As análises post hoc mostraram que as ratas da linhagem Wistar exibiram latências menores, permaneceram mais tempo e cruzaram mais vezes pela área do contador ($p < 0,005$). Não houve diferença significante relacionado ao fator Linhagem no parâmetro trajeto percorrido ($F_{1,49}$ = 1,80, $p > 0,18$), porém, houve uma interação significante entre os fatores Grupo e Linhagem ($F_{1,49}$ = 6,20, $p = 0,016$) no mesmo parâmetro. As análises de contraste mostraram que o grupo PRIM da linhagem Sprague-Dawley realizou trajetos menores em comparação com o grupo PRIM da linhagem Wistar ($p = 0,01$), indicando que a experiência maternal exerceu um efeito positivo no desempenho dos animais de maneira linhagem-dependente. A ANOVA revelou ainda ausência de interações significantes entre os fatores Grupo e Linhagem nos parâmetros latência, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{1,49}$ = 0,44-1,13, $p > 0,29$). Interessantemente, a ANOVA mostrou uma interação significante entre os fatores Linhagem e Fase no parâmetro trajeto percorrido ($F_{1,49}$ = 5,90, $p = 0,018$). As análises *post hoc* mostraram que durante a Fase 1, as ratas da linhagem Sprague-Dawley percorreram trajetos menores em comparação com as ratas Wistar ($p = 0,03$). Adicionalmente, as ratas Wistar melhoraram o seu desempenho da Fase 1 para a Fase 2, igualando-se as ratas Sprague-Dawley, que por sua vez, mantiveram o mesmo desempenho na Fase 2. Não houve interação significante entre os fatores Linhagem e Fase nos parâmetros latência, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{1,49}$ = 0,002-2,34, $p > 0,13$). A ANOVA mostrou ainda uma interação significante entre os fatores Linhagem e Tentativa nos parâmetros latência, trajeto percorrido e porcentagem de tempo no contador da plataforma ($F_{2,98}$ = 6,64-29,49, $p < 0,002$), indicando que as ratas Wistar apresentaram latências menores durante as segundas e terceiras tentativas, trajetos maiores nas primeiras e por fim, passaram mais tempo na área do contador durante as segundas

e terceiras tentativas (*post hoc*, $p < 0,003$). Houve também uma interação significante entre os fatores Linhagem, Fase e Tentativa no parâmetro frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{2,98} = 6,35$, $p < 0,002$). As análises *post hoc* mostraram que as ratas Wistar cruzaram mais vezes que as Sprague-Dawley pela área do contador durante a segunda tentativa da Fase 1 ($p < 0,046$) e durante a primeira da Fase 2 ($p < 0,035$). Não houve interação significante entre os fatores Grupo, Linhagem e Tentativa ou Grupo, Linhagem, Fase e Tentativa nos parâmetros latência, trajeto percorrido, porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador da plataforma ($F_{2,98} = 0,007$-$1,49$, $p > 0,22$). A ANOVA também mostrou ausência de interação significante entre os fatores Grupo, Linhagem e Fase ($F_{1,49} = 0,005$-$2,10$, $p > 0,15$) nos mesmos parâmetros, bem como ausência de diferenças entre os fatores Linhagem, Fase e Tentativa nos parâmetros latência, trajeto percorrido e porcentagem de tempo no contador da plataforma ($F_{2,98} = 0,56$-$1,15$, $p > 0,31$). Por fim, a diferença significante no fator Tentativa ($F_{2,98} = 5,95$-$226,65$, $p < 0,004$) indica que os animais foram capazes de aprender a tarefa, melhorando seus desempenhos ao longo das tentativas.

A Figura 2.5 mostra os resultados dos parâmetros que expressam o desempenho dos animais em relação à lembrança da localização da plataforma no dia anterior. A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes relacionadas aos fatores Grupo, Linhagem ou Fase ($F_{1,49} = 0,001$-$1,49$, $p > 0,22$), bem como à interação entre os fatores Grupo e Fase ou Grupo e Linhagem ($F_{1,49} = 0,51$-$1,54$, $p > 0,20$) ou Grupo, Linhagem e Fase ($F_{1,49} = 0,12$-$0,26$, $p > 0,60$), nos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 2.5A) e frequência de cruzamentos (Figura 2.5B) no contador da plataforma do dia anterior, indicando que experiência maternal e a linhagem não exerceram influência no desempenho dos animais quanto à lembrança sobre localização da

plataforma no dia anterior, tanto durante o período de lactação e cuidados maternais quanto após o desmame dos filhotes.

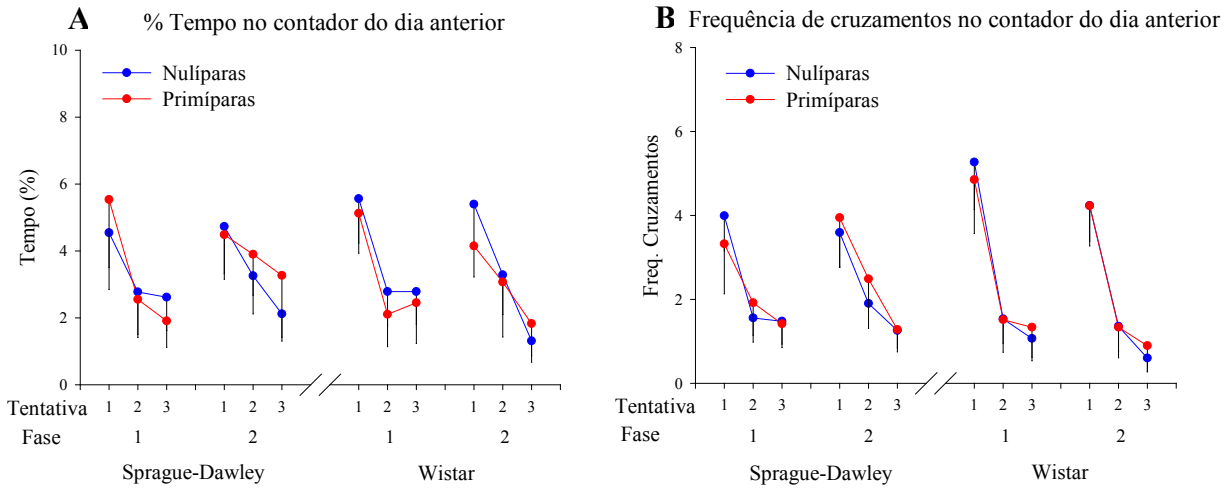


Figura 2.5 - Desempenho de ratas das linhagens Wistar e Sprague-Dawley no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Os animais foram avaliados ao longo de 12 sessões divididas em duas fases: na primeira, os animais foram avaliados durante o período de lactação e cuidados maternais (dias 15 a 20) e a segunda, 7 dias após o desmame dos filhotes (dias 28 a 33). Cada sessão consistiu em 3 tentativas com um ITI de 5 minutos. O desempenho dos animais é expresso pelos parâmetros porcentagem de tempo (A) e frequência de cruzamentos (B) no contador da plataforma do dia anterior, em função da experiência maternal dos diferentes grupos. Para a análise do desempenho ao longo das tentativas, foram calculadas médias de cada uma das três tentativas diárias em cada fase de treino. Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

Em contraste, a ANOVA revelou uma interação significante entre os fatores Grupo, Fase e Tentativa no parâmetro porcentagem de tempo no contador do dia anterior ($F_{2,98} = 3,17$, $p = 0,046$), indicando que as ratas PRIM melhoraram a sua taxa de extinção do comportamento de busca pela plataforma em sua posição prévia da primeira para a segunda tentativa na Fase 1 (*post hoc*, $p < 0,001$), enquanto que o mesmo não ocorreu na Fase 2. Adicionalmente, as ratas NUL melhoraram sua taxa de extinção na Fase 2, reduzindo a porcentagem de tempo no contador da segunda para a terceira tentativa ($p = 0,03$), diferentemente da Fase 1. Ainda, a ANOVA mostrou

uma interação significante entre os fatores Linhagem e Fase ($F_{1,49} = 4,45$, $p = 0,03$) e Linhagem e Tentativa ($F_{2,9} = 8,88$, $p < 0,001$) no parâmetro frequência de cruzamentos no contador. As análises *post hoc* mostraram que as ratas da linhagem Wistar cruzaram mais vezes na área do contador do dia anterior na Fase 2 em relação à Fase 1 ($p = 0,01$), enquanto que as ratas Sprague-Dawley não alteraram seu comportamento entre as diferentes fases pós-parto. As ratas Wistar também cruzaram mais vezes pela área do contador do dia anterior durante a primeira tentativa em relação às Sprague-Dawley ($p < 0,01$). Não houve interação significante entre os fatores Grupo e Tentativa, Grupo Linhagem e Tentativa, Grupo, Linhagem, Fase e Tentativa ou Linhagem, Fase e Tentativa em ambos os parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos no contador do dia anterior ($F_{2,98} = 0,12$-$0,63$, $p > 0,31$). Por fim, o efeito significante no fator Tentativa em ambos os parâmetros ($F_{2,98} = 39,19$-$141,32$, $p < 0,001$) indica que os animais foram capazes de extinguir o comportamento de busca pela plataforma em sua localização no dia anterior (*i.e.*, 24 horas antes) e então procurá-la em outras áreas da piscina.

Em conjunto, os resultados do teste de memória operacional mostraram que a experiência maternal exerceu um efeito positivo no desempenho de ratas Sprague-Dawley em relação às Wistar. Esse desempenho foi expresso por trajetos menores, refletindo uma estratégia mais eficaz de busca pela plataforma. Por outro lado, os dados mostraram que as ratas Wistar, independentemente da experiência maternal, exibiram um desempenho melhor, caracterizado por latências e trajetos menores, além de maior precisão de busca espacial, refletida no aumento do tempo e no número de cruzamentos no contador da plataforma. Ademais, o período em que os animais são avaliados exerceu influência em seus desempenhos. Ratas primíparas exibiram latências sutilmente menores em tentativas específicas do período pós-desmame dos filhotes, enquanto que animais da linhagem Sprague-Dawley exibiram trajetos menores comparadas à

Wistar durante o período de lactação e cuidados com os filhotes. No entanto, todos os animais foram capazes de aprender a tarefa, melhorando seus desempenhos ao longo das tentativas. Por fim, as ratas primíparas exibiram uma taxa de extinção do comportamento de busca pela plataforma no dia anterior melhor durante o período de lactação e cuidados maternais. Além disso, as ratas Wistar se mostraram mais precisas quanto à lembrança sobre a posição da plataforma no dia anterior, cruzando mais vezes pela área onde a plataforma estava posicionada 24h antes. Os resultados mostraram ainda que todos os animais foram capazes de extinguir o comportamento de busca pela plataforma em sua posição no dia anterior ao longo das tentativas, em função da alteração da contingência de reforço.

Discussão

Os resultados do presente estudo mostraram que a experiência maternal gerou alterações na memória espacial de forma dependente da linhagem, particularmente em ratas Sprague-Dawley. Tais alterações foram observadas tanto numa tarefa de memória de referência quanto numa tarefa de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Esses achados confirmam hipóteses levantadas em estudos anteriores, os quais sugeriram que ratas expostas à experiência maternal utilizam estratégias mais eficientes no desempenho de tarefas espaciais (Capítulo I deste estudo; Zimberknopf et al., 2011). No entanto, o conjunto de resultados obtidos neste estudo indica que a experiência maternal teve maior impacto sobre a memória de ratas da linhagem Sprague-Dawley.

No teste que avalia a memória de referência espacial, as ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley exibiram desempenhos superiores em relação às NUL da mesma linhagem e também em relação às ratas PRIM da linhagem Wistar. Esse desempenho superior foi expresso

por trajetos e latências menores, além do maior aproveitamento da informação obtida na primeira tentativa sobre a localização da plataforma para melhorar o desempenho na segunda (Figura 2.1), particularmente no início do treino. As ratas da PRIM da linhagem Sprague-Dawley também exibiram velocidades de nado menores e decrescentes ao longo das sessões, sugerindo habituação e baixos níveis de ansiedade para cumprir a tarefa. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Kinsley et al. (1999), onde ratas MULT (multíparas; duas ou mais gestações e períodos de lactação) da linhagem Sprague-Dawley superaram ratas NUL numa tarefa espacial com duração de dezesseis dias no labirinto radial de oito braços. É interessante observar que nos experimentos de Kinsley et al. (1999) as fêmeas maternalmente experientes cometeram menos erros ao buscar pelo alimento já no início do treino, ao passo que as NUL melhoraram gradualmente e só alcançaram o mesmo desempenho que as MULT após sete dias de treino. O desempenho superior das ratas Sprague-Dawley que passaram pela experiência maternal completa (gestação, lactação e cuidado com os filhotes) já nos primeiros dias de treino, tanto nos estudos de Kinsley et al. (1999) quanto no presente estudo, reforçam a ideia de que essas fêmeas utilizam estratégias de busca mais eficazes que as suas correspondentes sem experiência maternal (ver a discussão sobre o uso de estratégias de busca no Capítulo I). Ademais, outros estudos também encontraram melhora de desempenho em ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley em testes de memória de referência numa versão seca do labirinto de Morris (Kinsley et al., 1999, Experimento 2; Gatewood et al., 2005; Lambert et al., 2005), estando de acordo com os resultados obtidos no presente experimento.

No "Probe Test", em que a plataforma foi removida da piscina, os resultados mostraram que as ratas NUL, independentemente da linhagem, cruzaram mais vezes no local onde a plataforma foi posicionada durante o teste de memória de referência, particularmente no primeiro

bloco da exposição. Embora ao longo do tempo, todos os grupos tenham mostrado extinção do comportamento de busca pela plataforma na área onde ela estava posicionada originalmente, as ratas NUL exibiram um comportamento de perseverança, cruzando mais vezes na área do contador no início da exposição. Esse resultado denota maior flexibilidade das ratas PRIM em adequar seu comportamento à nova situação sem a presença da plataforma. De fato, por meio de uma tarefa de memória operacional no labirinto aquático de Morris, Bodensteiner et al. (2006) mostraram que ratas PRIM foram menos perseverantes na busca pela plataforma no quadrante da piscina onde ela foi posicionada no dia anterior e ainda foram mais rápidas para encontrar a plataforma em sua nova localização a cada semana de treino. Os autores do estudo sugerem que as ratas PRIM exibem maior flexibilidade diante de uma nova situação. Uma vez que o estágio do ciclo estral não exerce influência sobre o desempenho espacial de ratas virgens (Bodensteiner et al., 2006; Pawluski et al., 2006a; Zimberknopf et al., 2011), é possível que o desempenho das NUL observado no "Probe Test" seja devido ao fato de essas ratas apresentarem, num primeiro momento, uma memória mais precisa para a lembrança de um evento anterior, porém, menor flexibilidade ao abandonar uma informação adquirida previamente e resolver um novo problema espacial.

Assim como no teste de memória de referência, o teste que avalia a memória operacional mostrou que as ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley exibiram um desempenho superior ao das PRIM da linhagem Wistar, expresso por trajetos menores para encontrar a plataforma, indicando que a experiência maternal teve um impacto maior sobre o comportamento de ratas Sprague-Dawley. Ainda, as ratas PRIM, independentemente da linhagem, reduziram suas latências e trajetos na terceira tentativa da Fase 2 em comparação com a mesma tentativa da Fase 1, sugerindo que a experiência maternal exerceu um efeito positivo na memória operacional das

ratas avaliadas uma semana após o desmame dos filhotes. Assim como no presente experimento, Pawluski et al. (2006b) também mostraram, em ratas Sprague-Dawley, que a primeira experiência maternal completa produz melhora de desempenho numa tarefa de memória operacional no labirinto radial de oito braços. O mesmo efeito da experiência maternal sobre a memória operacional foi observado em ratas Sprague-Dawley submetidas ao teste na versão seca do labirinto de Morris (Gatewood et al., 2005). Por outro lado, ratas da linhagem Wistar expostas a diferentes condições reprodutivas e avaliadas em diferentes momentos após o parto mostram nenhuma ou uma sutil alteração de memória operacional no labirinto aquático de Morris (Capítulo I deste estudo; Zimberknopf et al., 2011). Em roedores, a memória operacional e a flexibilidade comportamental diante de novas situações envolve o funcionamento do córtex pré-frontal (Kesner et al, 1996); este por sua vez, recebe aferências do hipocampo e amígdala, podendo estar envolvido também com a memória relacionada a eventos de relevância emocional (Ishikawa & Nakamura, 2003). Interessantemente, há estudos mostrando que os neurônios piramidais do córtex pré-frontal são sensíveis à atuação dos hormônios ovarianos estrógeno, progesterona e estradiol (Bethea et al., 2002; Hao et al., 2007; Bohacek et al., 2008). Adicionalmente, Paris et al. (2011) mostraram que níveis elevados de progesterona no córtex pré-frontal de ratas foram associados com um melhor desempenho em tarefas espaciais. Portanto, é possível que o ambiente hormonal proporcionado pelos eventos que compõem a experiência maternal induza um aumento na plasticidade das áreas nervosas envolvidas com a memória operacional e o planejamento de novas ações, o que explicaria as alterações comportamentais observadas no presente estudo.

O conjunto de experimentos deste capítulo também mostrou que a linhagem é uma variável importante na investigação da memória espacial em ratas com experiência maternal.

Além de as ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley exibirem desempenhos superiores em relação às suas equivalentes NUL e também em relação às PRIM da linhagem Wistar, as linhagens por si só exibiram características comportamentais distintas. Os resultados do teste de memória de referência mostraram que as ratas Sprague-Dawley, independentemente da experiência maternal, exibiram trajetos e velocidades de nado menores na busca pela plataforma. Além disso, as fêmeas Sprague-Dawley exibiram trajetos e latências menores já na primeira tentativa, indicando que a suas estratégias de busca diferem das utilizadas pelas Wistar, que por sua vez melhoram seus desempenhos somente na segunda tentativa. No teste que avalia a memória operacional as linhagens também exibiram desempenhos distintos, expresso pelo menor trajeto nas primeiras tentativas do teste nas ratas Sprague-Dawley, ao passo que as Wistar exibiram latências menores nas tentativas subsequentes e passaram mais tempo na área da plataforma. Coerentemente com os resultados obtidos no presente experimento, Higashida & Ogawa (1987) mostraram que ratos machos das linhagens Sprague-Dawley e Wistar diferem em relação ao processo de aquisição e desempenho de uma tarefa espacial no labirinto radial de oito braços. O estudo mostrou que os ratos da linhagem Wistar cometeram mais erros na escolha dos braços que continham o reforço e exibiram maior atividade motora. Por outro lado, esses ratos mostraram latências menores para cumprir a tarefa dentro de cada tentativa, porém levaram mais dias para atingir um desempenho assintótico. Os resultados do presente estudo se assemelham aos obtidos por Higashida & Ogawa (1987) pelo fato de que, particularmente durante o "Probe Test" e o teste de memória operacional, as ratas Wistar exibiram latências menores, principalmente nas segundas e terceiras tentativas, porém trajetos e latências maiores nas primeiras. As ratas da linhagem Wistar também cruzaram mais vezes pela área do contador e ainda mostraram velocidades de nado maiores durante o teste de memória de referência,

indicando maior taxa de atividade motora. É possível que as diferenças comportamentais observadas entre as linhagens Wistar e Sprague-Dawley no presente estudo tenham como substrato as características neurofisiológicas distintas observadas no hipocampo de ambas as linhagens. Diana et al. (1994) avaliaram ratos Sprague-Dawley e Wistar na versão para memória de referência no labirinto aquático de Morris e aferiram a porcentagem de indução da potenciação pós-tetânica (PTP) e potenciação de longo prazo (LTP), após um breve estímulo elétrico de 100 Hz em fatias de hipocampo obtidas desses animais. Os resultados mostraram que a indução de PTP foi notavelmente maior na região do giro denteado das fatias obtidas de ratos Sprague-Dawley, enquanto que nenhuma diferença entre as linhagens foi observada na indução de LTP. Também não foram detectadas diferenças eletrofisiológicas no sub-campo CA1 nas fatias de hipocampo. Interessantemente, os ratos Sprague-Dawley exibiram um melhor desempenho na tarefa espacial, sugerindo uma possível relação com a característica elétrica peculiar observada no giro denteado desses animais durante o experimento eletrofisiológico. Visto que o giro denteado é uma via neural importante para a aquisição e desempenho de uma tarefa de memória espacial (Xavier et al., 1999; Xavier & Costa, 2009), não seria surpreendente que as diferenças comportamentais entre as linhagens, observadas no presente estudo, sejam geradas em virtude das características elétrofisiológicas distintas, presentes no giro denteado das ratas Sprague-Dawley.

Em conjunto, os resultados deste capítulo mostraram que a experiência maternal completa gera alterações de memória espacial em ratas Sprague-Dawley avaliadas durante o período de lactação e cuidados com os filhotes, de forma mais pronunciada numa tarefa que avalia a memória de referência no labirinto aquático de Morris. A análise do desempenho desses animais ao longo das tentativas mostrou que as ratas primíparas da linhagem Sprague-Dawley

utilizam estratégias de busca pela plataforma mais eficazes em comparação com suas equivalentes nulíparas e também em relação às primíparas da linhagem Wistar, tanto numa tarefa que avalia a memória de referência quanto noutra que avalia a memória operacional. Em adição, as linhagens por si só também mostraram comportamentos distintos ao cumprir ambas as tarefas no labirinto aquático. Enquanto as ratas Sprague-Dawley exibiram trajetos e velocidades de nado menores, conferindo maior precisão na estratégia de busca, as ratas Wistar apresentaram trajetos e velocidades de nado maiores, além de cruzarem mais vezes pela área do contador onde a plataforma foi posicionada. Estes resultados apoiam as hipóteses levantadas no Capítulo I deste estudo, mostrando que as ratas maternalmente experientes utilizam estratégias de busca mais eficientes, porém esse efeito é dependente da linhagem de ratas utilizadas, particularmente em relação à linhagem Sprague-Dawley. Essa eficiência comportamental representa uma notável plasticidade do encéfalo materno diante do fenômeno da reprodução, particularmente no período crítico em que a fêmea deve estar apta para atender as demandas da vulnerável prole, gerenciar os recursos disponíveis e garantir o seu próprio sustento.

Agradecimentos

Este estudo foi desenvolvido com o suporte financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

Capítulo III

Efeitos do enriquecimento ambiental sobre a memória e neurogênese hipocampal adulta em ratas Sprague-Dawley expostas à experiência maternal

Ilton Santos da Silva[1], Craig Howard Kinsley[2], Katie Coren Freeman[2] e Gilberto Fernando Xavier[1]

Palavras-chave: Experiência maternal, memória, neurogênese, hipocampo.

A experiência maternal em ratas produz marcadas alterações plásticas no hipocampo, uma estrutura envolvida em funções de memória. Este estudo teve como objetivo avaliar o desempenho de ratas primiparas (PRIM) e nulíparas (NUL) da linhagem Sprague-Dawley expostas a um ambiente enriquecido (AE) por 45 dias, em comparação com ratas PRIMs e NULs mantidas em gaiolas comuns de laboratório (STD), numa tarefa dependente e noutra independente do hipocampo (localização e reconhecimento de objetos, respectivamente), bem como analisar taxas de proliferação, diferenciação e sobrevivência de células geradas no GD desses animais. Os animais receberam doses diárias de BrdU (50mg/Kg, i.p.) em três fases distintas durante a exposição aos diferentes ambientes e então foram avaliados nas tarefas de localização e reconhecimento de objetos. Os encéfalos foram submetidos ao processamento imunohistoquímico para revelação de células marcadas por BrdU, DCX, e a coexpressão de BrdU+DCX e BrdU+NeuN. Os resultados mostraram que as ratas PRIM mantidas em AE foram mais sensíveis à alteração na disposição espacial de um objeto familiar na tarefa de localização, em comparação com as NUL do mesmo ambiente. Adicionalmente, as ratas NUL e STD exibiram mais comportamentos relacionados com ansiedade e estresse, sugerindo que a experiência maternal e o AE produzem efeitos ansiolíticos. Os resultados anatômicos mostraram que a experiência maternal e a exposição ao AE por 45 dias não geraram alterações nas taxas de proliferação, diferenciação e sobrevivência das novas células geradas no hipocampo de ratas Sprague-Dawley.

---

[1]Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências/Universidade de São Paulo, Brasil.
Email: silvais@ib.usp; gfxavier@usp.br.
[2]Department of Psychology - Gottwald Science Center/University of Richmond, EUA.
Email: ckinsley@richmond.edu; katie.freeman@richmond.edu.

Introdução

A neurogênese é um fenômeno que ocorre continuamente no encéfalo de indivíduos adultos, particularmente na zona subventricular (ZSV) e no giro denteado (GD) da formação hipocampal (Altman, 1962; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999; Gage, 2002). Como o hipocampo é uma estrutura reconhecidamente envolvida em funções de memória (O'Keefe & Nadel, 1978; Morris et al., 1982; Xavier et al., 1999), atualmente há um grande interesse sobre o significado funcional da produção de novos neurônios nessa área em particular (Deng et al., 2009; Garthe et al., 2009; Kitamura et al., 2009; Aimone et al., 2011; Burghardt et al., 2012; Winocur et al., 2012; Deng et al., 2013).

A exposição a ambientes enriquecidos estimula a geração de novos neurônios no hipocampo. Por exemplo, roedores adultos expostos a um ambiente de maior complexidade associado com a oportunidade de interação social, exibem um aumento significante na taxa de neurogênese no GD em comparação com animais mantidos em gaiolas comuns de laboratório (Kempermann et al., 1997; Kempermann et al., 1998; Nilsson et al., 1999; van Praag et al., 2000). Adicionalmente, fatores endócrinos também contribuem para a regulação da neurogênese adulta, *e.g.*, alterações nos níveis dos hormônios esteroides ovarianos estradiol (Tanapat et al., 1999; Barha et al., 2009; McClure et al., 2013), progesterona (Tanapat et al., 2005; Galea, 2008) e também do glicocorticóide adrenal corticosterona (Leuner et al., 2007; Brummelte & Galea, 2010). Como estes hormônios têm seus níveis alterados em virtude da experiência maternal, não parece surpreendente a ocorrência de alterações na taxa de neurogênese hipocampal em decorrência do período de gestação, lactação e cuidados com os filhotes, embora o conhecimento sobre esse fenômeno seja limitado. Pawluski & Galea (2007) testaram essa hipótese investigando a taxa de proliferação e sobrevivência de novas células no GD de ratas MULT (multíparas; duas

ou mais gestações e períodos de lactação), PRIM (primíparas; uma gestação e período de lactação), NUL (nulíparas; sem experiência maternal) e SENS (sensibilizadas; ratas que exibem comportamentos maternais em decorrência da exposição a filhotes adotivos) da linhagem Sprague-Dawley. As ratas receberam injeção única de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), um marcador que é integrado ao DNA de células em divisão, cerca de 24 horas após o nascimento/exposição aos filhotes e os seus encéfalos foram removidos 24 horas ou 21 dias após o tratamento para quantificação das novas células. Os resultados mostraram que as ratas MULT e PRIM exibiram um decréscimo acentuado no número de células BrdU-postivas no período logo após o parto e um decréscimo na taxa de sobrevivência celular no grupo PRIM em comparação com os demais grupos, expresso pela dupla marcação com o BrdU e "Neuronal Nuclei" (NeuN, um marcador de neurônios maduros) no GD dos animais que passaram por 22 dias de lactação/exposição aos filhotes. Ademais, ratas SENS exibiram um aumento significante no número de células BrdU-positivas após 24 horas de exposição aos filhotes adotivos, enquanto que a exposição aos filhotes por 22 dias gerou um aumento na taxa de sobrevivência celular em ratas SENS. Por outro lado, Pawluski et al. (2010) mostraram que durante a gestação, não há alterações no número de células BrdU-positivas no GD em comparação com ratas NUL. No entanto, esses animais exibiram um menor número de células em picnose (um estado de degeneração nuclear que indica morte celular) no GD durante o início da gestação, em relação às NUL. Portanto, esses estudos mostram que a neurogênese hipocampal adulta sofre alterações em virtude dos eventos que compõem a experiência maternal, de forma mais pronunciada no período pós-parto. É possível que esse fenômeno seja refletido em alterações de memória, uma vez que a plasticidade inerente ao encéfalo materno contribui para o aperfeiçoamento de comportamentos que visam suprir as necessidades da fêmea e da sua prole.

Objetivos

Este estudo teve como objetivos avaliar possíveis alterações nas taxas de proliferação, diferenciação e sobrevivência de novas células geradas no GD da formação hipocampal de ratas primíparas e nulíparas da linhagem Sprague-Dawley expostas a um ambiente enriquecido, em comparação com grupos independentes de animais com o mesmo histórico reprodutivo, porém, acondicionados em gaiolas-padrão de laboratório. Pretendeu-se também avaliar a memória desses animais por meio das tarefas de localização e reconhecimento de objetos. Para isso, todos os animais foram tratados com BrdU em fases distintas ao longo de 45 dias de exposição aos diferentes ambientes e então, foram avaliados nas tarefas de localização e reconhecimento de objetos, respectivamente. Os encéfalos foram então tratados com marcadores específicos para cada fase do processo de neurogênese, *i.e.*, proliferação, diferenciação e sobrevivência das novas células. As hipóteses consideradas foram que o encéfalo das ratas primíparas, devido à sua notável plasticidade, seria mais sensível aos estímulos proporcionados pela exposição ao ambiente enriquecido, exibindo maior taxa de neurogênese em comparação com os demais grupos. Além disso, um desempenho superior desses animais nas tarefas de localização e reconhecimento de objetos foi considerado uma hipótese plausível, uma vez que a neurogênese adulta ocorre em áreas relacionadas com o desempenho dessas tarefas, principalmente da tarefa de localização de objetos.

Justificativa para a abordagem adotada

A geração de novos neurônios no encéfalo adulto é um processo que envolve basicamente três etapas: proliferação, diferenciação e maturação. A escolha de cada marcador e suas combinações foi feita com base em sua especificidade na caracterização do fenótipo celular

tipicamente observado durante cada estágio da neurogênese, mencionado anteriormente. O BrdU (5-bromodeoxiuridina) é uma análogo halogenado da timidina que é permanentemente integrado ao material genético de células em divisão (Magavi & Macklis, 2008). Quando administrado via i.p., o BrdU é incorporado às células em divisão por cerca de 5-6 horas após a sua aplicação, embora esse tempo possa variar dependendo da dose inicial (Hayes & Nowakoski, 2000; Magavi & Macklis, 2008). Além disso, o BrdU é facilmente detectado por métodos de imunohistoquímica e a quantificação do número de células marcadas pelo mesmo fornece um índice de proliferação celular (Kempermann et al., 1997; Magavi & Macklis, 2008). A doublecortin (DCX) é uma proteína endógena associada aos microtúbulos que é expressa especificamente em precursores neuronais *i.e.*, neurônios jovens migratórios, entre os dias 1 e 14 de vida (Couillard-Despres et al., 2005; Galea et al., 2008). Dessa forma, sua detecção permite identificar neurônios em estágios iniciais de diferenciação e a sua co-expressão com o BrdU fornece um índice de diferenciação das novas células em neurônios jovens (Barha et al., 2011; Epp et al., 2011). O "Neuronal Nuclei" (NeuN) é uma proteína nuclear expressa por neurônios maduros em vertebrados, a partir de cerca de 2 semanas de vida (Mullen et al., 1992; Galea et al., 2008). Sua detecção por métodos de imunohistoquímica em co-expressão com o BrdU é comumente utilizada como índice de maturação e sobrevivência das células geradas na ocasião do tratamento com o BrdU (Leuner et al., 2007; Furuta & Bridges, 2009; Epp et al., 2011). Portanto, a utilização da tripla marcação do tecido nervoso com BrdU/DCX/NeuN foi escolhida por caracterizar fenótipos celulares típicos de cada etapa do processo de neurogênese, método que já mostrou bons resultados anteriormente (Magavi et al., 2000).

As tarefas comportamentais empregadas neste estudo, em suas mais diversas variações, têm sido utilizadas com frequência em estudos sobre memórias de reconhecimento e localização

espacial de objetos (Xavier et al., 1990; Dere et al., 2002; Mumby et al., 2002; Macbeth et al., 2008). A tarefa de localização permite investigar a memória dos animais sobre a disposição espacial de objetos, enquanto que a tarefa de reconhecimento fornece um índice sobre a memória para objetos familiares. No primeiro caso, os animais tendem a explorar por mais tempo um objeto familiar posicionado em um local diferente, *i.e.*, se em uma primeira tentativa os animais são expostos a dois objetos idênticos e na segunda um dos objetos tem sua posição alterada, os animais passam a investigar por mais tempo o objeto em sua nova localização. Já no segundo caso, os animais são expostos primeiramente a dois objetos idênticos, porém, numa exposição subsequente, um dos objetos é substituído por outro de cor e forma diferentes do original, mas sem alteração de sua localização; este último passa a ser um estímulo novo no ambiente, fazendo com que os animais o explorem por mais tempo (Dere et al., 2007). Interessantemente, ratas que passaram pela experiência maternal exibem um desempenho superior em comparação com as nulíparas, tanto na tarefa dependente quanto na tarefa não dependente do hipocampo (localização e reconhecimento de objetos, respectivamente) (Macbeth et al., 2008). Portanto, a escolha dessas tarefas comportamentais se deve ao fato delas serem sensíveis ao desempenho de ratas maternalmente experientes e também, por permitirem a avaliação de memórias dependentes e não dependentes do hipocampo por meio de manipulações relativamente simples na configuração dos objetos.

Métodos

Animais

Neste estudo foram utilizadas 48 ratas da linhagem Sprague-Dawley, com 90 dias de idade no início dos experimentos, obtidas sob encomenda pré-condicionada para experiência

reprodutiva (24 primíparas e 24 nulíparas; Charles River Laboratories, NC). Os animais chegaram ao biotério do Gottwald Science Center (University of Richmond, EUA) uma semana após o desmame dos filhotes e permaneceram num período de aclimatação por uma semana adicional. A sala do biotério onde os animais foram acondicionados permaneceu em temperatura constante ao redor de 20 ^{o}C e com um ciclo claro/escuro de 12 horas cada (luzes das 6 às 18hs). Os animais foram inicialmente colocados em gaiolas opacas de polipropileno, medindo 20 x 45 x 25cm com livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos experimentais empregados nesse estudo foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Comittee (IACUC, University of Richmond).

Acondicionamento em ambiente enriquecido e constituição dos Grupos Experimentais

Duas gaiolas metálicas idênticas, medindo 91,4 x 60,9 x 99,0 cm foram usadas como ambiente enriquecido (AE), o qual é constituído por elementos descritos previamente na literatura (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). As gaiolas receberam túneis e diversos objetos de cores e formas variadas, os quais tiveram a sua distribuição e arranjo alterados diariamente, com o objetivo de estimular a atividade exploratória dos animais. As gaiolas foram compostas por dois andares, sendo que o segundo poderia ser acessado por meio de uma pequena escada metálica que ligava os dois andares (Figura 3). Além dos objetos, os animais foram acondicionados em grupo (12 animais por gaiola), com o objetivo de estimular também comportamentos de interação social. Água e comida foram disponibilizadas *ad libitum*.

Figura 3 - Gaiola de enriquecimento ambiental, medindo 91,4 x 60,9 x 99,0 cm, a qual foi usada como fonte de estímulo para o fenômeno de neurogênese adulta. A gaiola recebeu túneis, brinquedos, bolas e diversos outros objetos de cores e formas variadas como fonte de estímulo para o comportamento exploratório. Além disso, os animais tiveram a oportunidade de desempenhar comportamentos de interação social, proporcionado pela presença de outros animais (12 animais por gaiola).

Animais de controle foram acondicionados em gaiolas-padrão (ou "standard", STD) de laboratório, medindo 20 x 45 x 25 cm. Foram colocados 3 animais por gaiola durante todo o estudo. Água e comida também foram disponibilizadas *ad libitum*.

Após uma semana em período de aclimatação, os animais foram expostos às seguintes condições experimentais: NUL-STD (ratas nulíparas acondicionadas em gaiolas-padrão de laboratório, n=12); PRIM-STD (ratas primíparas acondicionadas em gaiolas-padrão de laboratório, n=12); NUL-ENR (ratas nulíparas acondicionadas em ambiente enriquecido, n=12) e PRIM-ENR (ratas primíparas acondicionadas em ambiente enriquecido, n=12).

Tratamento com BrdU

No primeiro dia de exposição ao AE, deu-se início ao tratamento com o 5-bromodeoxiuridina (BrdU; Sigma-Aldrich Co.). Os animais de todos os grupos receberam doses diárias da substância, numa concentração de 50mg/Kg, i.p., diluído em solução salina 0,9% (20mg/ml), diluída sempre poucos minutos antes do seu uso. A solução final era filtrada em retentor de partículas de 0,45 μm (Thermo Fisher Scientific Inc.) e mantida a 4° C até o momento do uso. Todos os animais foram tratados em três fases distintas durante a exposição ao ambiente enriquecido (Figura 3.1).

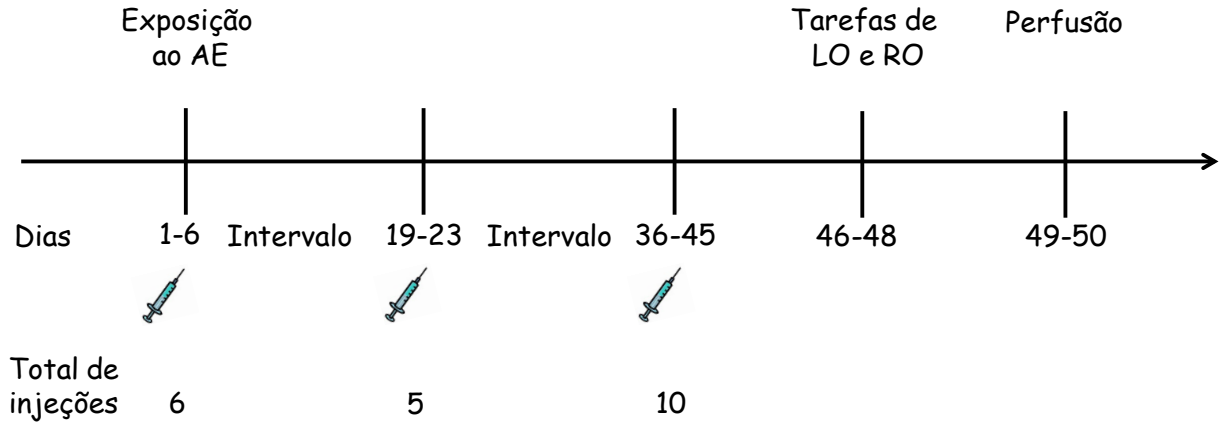


Figura 3.1 - Linha do tempo representando o esquema de tratamento com o 5-bromodeoxiuridina (BrdU). Os animais de todos os grupos receberam injeções diárias de BrdU, divididas em três fases distintas: a primeira iniciou-se no primeiro dia de exposição ao AE e envolveu 6 injeções (dias 1-6), a segunda totalizou 5 injeções (dias 19-23) e a terceira ocorreu nos últimos 10 dias de exposição, totalizando 10 injeções (dias 36-45). Nos dias subsequentes, os animais passaram pelas tarefas de reconhecimento (RO) e localização de objetos (LO), (dias 46-48) e finalmente, foram perfundidos e tiveram seus encéfalos removidos (dias 49 e 50) para o processamento histológico.

A primeira fase de tratamento com BrdU teve seu início no primeiro dia de exposição ao AE e estendeu-se por 6 dias, totalizando 6 injeções (dias 1 ao 6); a segunda envolveu 5 injeções (dias 19 ao 23) e a terceira, ocorreu nos últimos 10 dias de exposição ao AE, totalizando 10

injeções (dias 36 ao 45). O emprego de três fases distintas de tratamento com o BrdU teve como objetivo marcar o maior número possível de células novas geradas em virtude da exposição aos diferentes ambientes e o intervalo entre elas, foi uma tentativa de minimizar o sofrimento dos animais por conta das aplicações intraperitoneais e dos efeitos tóxicos da droga. Apesar dessas estratégias, um dos animais morreu no último dia de tratamento, possivelmente em virtude dos efeitos tóxicos do BrdU.

Tarefas de localização e reconhecimento de objetos - Equipamentos

No dia seguinte ao último dia de tratamento com o BrdU, deu-se início aos testes de localização e reconhecimento de objetos. O equipamento utilizado na tarefa consiste de uma arena circular, construída em alumínio, com diâmetro de 180 cm e altura de 60 cm (Figura 3.2). O assoalho da arena foi revestido por um preparado proveniente de espiga de milho ("*corncob bedding",* o mesmo material usado para revestir as gaiolas-padrão e enriquecidas). A arena foi posicionada em uma sala medindo 3x3 m, com iluminação indireta para evitar conflitos de captura de contraste pelo programa de registro comportamental. Vários estímulos distais evidentes, em forma de figuras geométricas em cores contrastantes foram disponibilizados nas paredes da sala, com o objetivo de auxiliar os animais a navegarem na arena baseados nessas informações. Para o registro do comportamento dos animais, uma câmera de vídeo conectada a um computador foi posicionada a cerca de 180 cm acima da arena. As informações enviadas ao computador foram processadas pelo programa Ethovision v. 3.1 (Noldus I.T., Wageningen, NL), que é capaz de registrar e calcular parâmetros relacionados ao deslocamento dos animais.

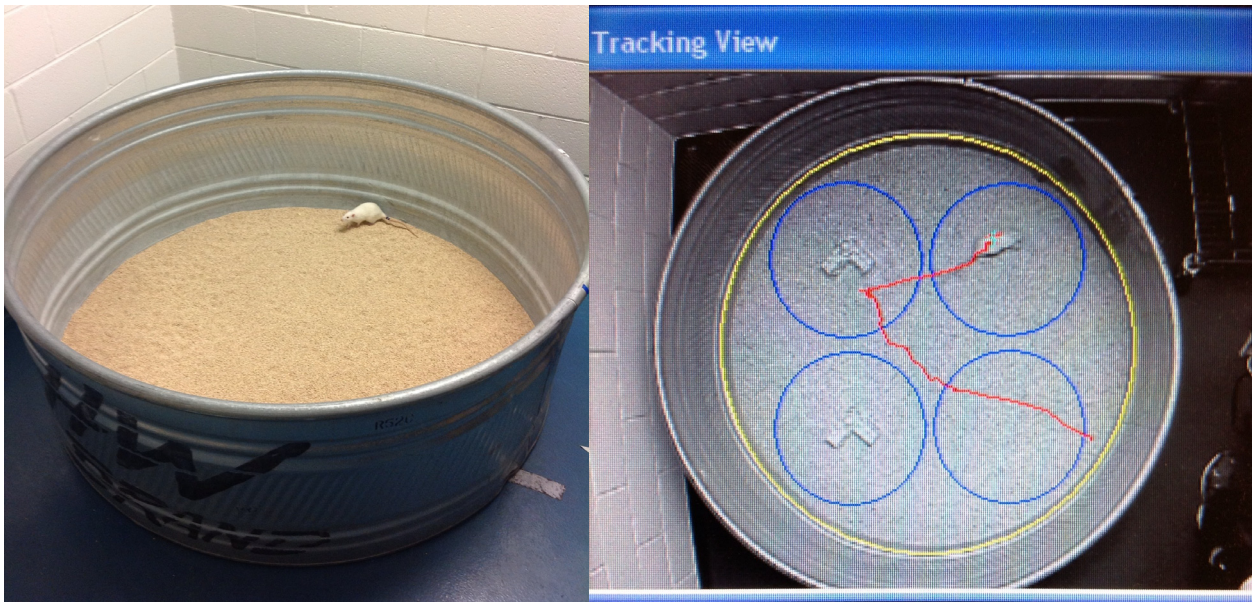


Figura 3.2 - Arena utilizada nos testes de localização e reconhecimento de objetos (esquerda) e visualização das áreas imaginárias que foram configuradas no programa (direita), que permitiram posteriormente a análise descritiva dos dados. Note que a arena foi dividida em quatro áreas circulares, onde os objetos foram posicionados (áreas de exploração), permitindo mensurar parâmetros que auxiliaram na análise sobre a exploração desses objetos.

Tarefas de localização e reconhecimento de objetos - Procedimentos

A cada tentativa de teste, os animais foram liberados de pontos equidistantes aos objetos, com o focinho voltado para a parede da arena. O sistema de registro foi programado para ser acionado 0,1 segundos após o animal ser colocado na área que delimita a circunferência da arena. Os animais tiveram a oportunidade de explorar os objetos por 5 minutos e assim que esse tempo se esgotasse, o software foi programado para finalizar o registro do deslocamento dos animais, finalizando aquela tentativa.

Inicialmente, os animais passaram por um período de habituação na arena, podendo percorrê-la livremente por 5 minutos, sem a presença de qualquer objeto. Logo em seguida, deu-se início aos testes, que incluíram três exposições (Figura 3.3), cada uma com duração de 5

minutos e com um ITI também de 5 minutos. Na primeira exposição (tentativa de amostra), foram colocados dois objetos na arena, um no centro do quadrante noroeste (NO) e outro no centro do quadrante nordeste (NE), (Figura 3.3, objetos A e B, respectivamente). Os objetos eram idênticos, construídos em plástico, medindo cerca de 18 cm de largura e altura (Figura 3.4). Na segunda exposição (localização de objetos, LO) o objeto B foi movido para o quadrante sudoeste (SO), (objeto B*). Na terceira e última exposição, o objeto que permaneceu no mesmo local nas duas primeiras exposições (objeto A), foi substituído por um novo (objeto C), de dimensões semelhantes, porém de cor e forma diferente (Figura 3.4), caracterizando a tentativa de reconhecimento de objetos (RO).

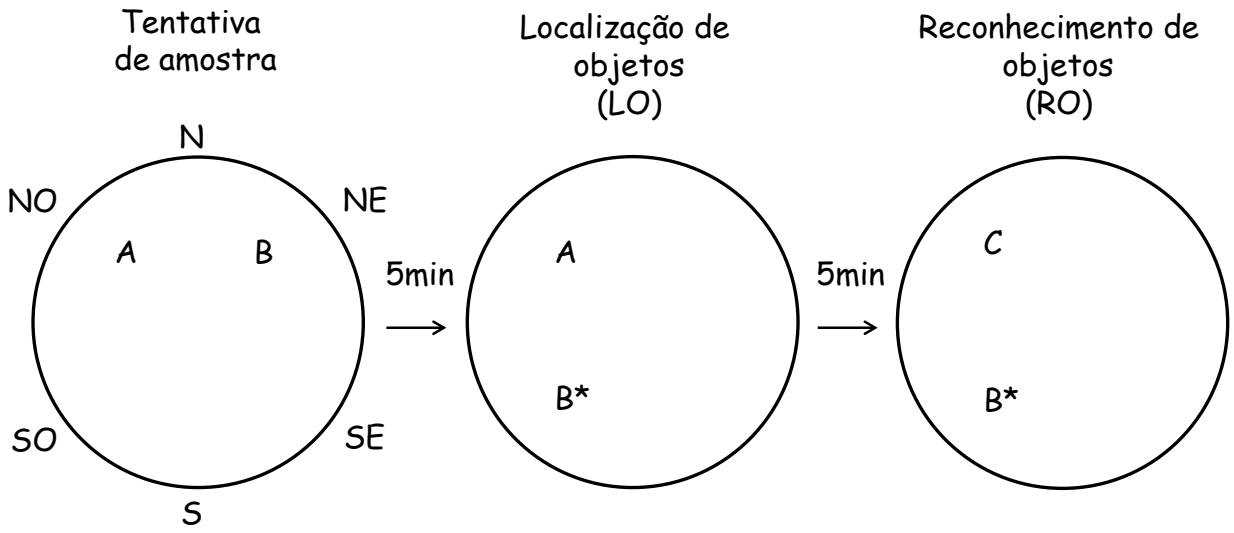


Figura 3.3 - Esquema representando as três etapas consecutivas dos testes de memória de localização (LO) e reconhecimento de objetos (RO). Após um período de habituação na arena, os animais foram inicialmente expostos a dois objetos idênticos (objetos A e B; tentativa de amostra). Na segunda exposição, o objeto B foi movido para o quadrante SO (objeto B*; tentativa de localização) e por fim, o objeto A foi substituído por um diferente (objeto C; tentativa de reconhecimento). Cada exposição teve a duração total de 5 minutos, com um intervalo (ITI) também de 5 minutos entre elas.

Ratas de grupos experimentais diferentes foram testadas em sequência aleatória na tarefa. Esse procedimento teve o objetivo de controlar qualquer possível variação de desempenho relacionada com o horário em que os animais foram testados (*i.e.,* início da manhã *vs*. fim da manhã). Após os testes, os animais foram transferidos para as suas gaiolas-moradia. Todos os experimentos (realizados entre 06h e 13h) foram conduzidos pelo mesmo pesquisador, o qual permaneceu no mesmo local da sala durante todos os testes.

Figura 3.4 - Objetos utilizados nos testes de localização e reconhecimento de objetos. A foto da esquerda mostra os dois objetos idênticos que foram utilizados nas duas primeiras tentativas (tentativa de amostra e tentativa de localização). A foto da direita mostra o objeto diferente que foi inserido no ambiente na terceira tentativa (tentativa de reconhecimento).

Para a análise descritiva dos dados, foram desenhadas quatro áreas circulares imaginárias, concêntricas ao local onde os objetos foram posicionados, medindo cerca de três vezes o seu tamanho (*i.e*., cada área media 54 cm de diâmetro), (Figura 3.4). As áreas foram desenhadas no centro dos quadrantes noroeste (NO), nordeste (NE), sudoeste (SO) e sudeste (SE), sendo assim designadas como "áreas de exploração". O sistema de registro foi programado para coligir dados relacionados a cada uma das quatro áreas, independentemente da presença de objetos.

Os parâmetros comportamentais utilizados como índices de exploração incluíram porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos nas áreas que continham os objetos. Esses parâmetros fornecem medidas de atividade exploratória dos dois objetos na tentativa de amostra. Essas mesmas medidas referentes à nova área em que um dos objetos foi reposicionado durante a tentativa de localização, proporciona uma medida de memória sobre a disposição espacial dos objetos. Por fim, as mesmas medidas referentes à área onde um dos objetos familiares não alterado nas tentativas anteriores, foi substituído por um novo objeto durante a tentativa de reconhecimento, proporciona uma medida da memória sobre os objetos familiares. Também foram mensurados o trajeto total percorrido e a velocidade média de deslocamento dos animais, que fornecem índices de atividade motora, estados motivacionais e níveis de ansiedade dos animais.

Histologia

No dia seguinte ao último dia dos testes de LO e RO, deu-se início ao processamento histológico dos encéfalos. Para isso, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital (100mg/Kg, i.p.) e submetidos à perfusão intracardíaca com PBS 0,1M, seguido por paraformaldeído a 4% (cerca de 200 ml de cada solução por animal). Os encéfalos foram então removidos e armazenados em paraformaldeído a 4% por 24 horas. Na sequência, foram transferidos para uma solução crioprotetora de sacarose a 30%, onde permaneceram por pelo menos 48 horas numa temperatura de 4°C até o momento do fatiamento. Em seguida, um criostato eletrônico (HM 550, Thermo Fisher Scientific Inc.) foi utilizado para coletar secções de 40µm ao longo de toda a extensão rostro-caudal do hipocampo, com um intervalo de 120 µm

entre elas. As secções foram então armazenadas em PBS 0,1M a 4º C até o momento do processamento imunohistoquímico.

Imunohistoquímica

Encéfalos de três animais de cada grupo foram submetidos à tripla marcação por BrdU, Doublecortin (DCX) e NeuN (marcadores para células recém geradas, neurônios jovens migratórios e neurônios completamente maduros, respectivamente). Vários estudos pilotos foram realizados a fim de se testar o procedimento, além da confecção de lâminas contendo controles positivos e negativos para a avaliação da especificidade de todos os anticorpos utilizados neste experimento. Estes últimos consistiram em submeter séries separadas de secções a todo o processamento usual de imunohistoquímica, porém, com a omissão do anticorpo primário (controle negativo) ou secundário (controle positivo). Esse procedimento é fundamental quando se utiliza dupla ou tripla marcação, pois dessa forma, é possível identificar, se houve qualquer resultado falso positivo oriundo de interações inespecíficas dos anticorpos primários com células ou proteínas não-alvo e/ou entre os anticorpos secundários e primários não-alvo ("*cross-reactivity*").

Embora nenhuma interação inespecífica tenha sido detectada por meio dos controles, os procedimentos foram realizados em passos sequenciais, com o objetivo de evitar qualquer possível reação cruzada. Ou seja, como os anticorpos primários anti-BrdU e anti-NeuN utilizados nesse estudo foram obtidos de espécies hospedeiras relacionadas (rato e camundongo, respectivamente), optou-se por expor o tecido somente aos anticorpos para o BrdU num primeiro passo e em seguida, após a lavagem desses anticorpos, o mesmo procedimento foi realizado para

os demais marcadores ("*sequential staining technique*"). Assim, a possibilidade da ocorrência de reação cruzada torna-se praticamente inexistente.

Todos os procedimentos de lavagem e incubação foram realizados expondo-se o tecido à agitação constante e moderada em agitador de plataforma basculante, com o objetivo de atingir todas as partes das secções e garantir a distribuição homogênea dos anticorpos em todo o tecido.

BrdU

Inicialmente, as secções passaram por uma bateria de lavagens em PBS 0,1M (3x5min) para remoção da solução crioprotetora, seguida por uma lavagem em dH_2O para retirada do excesso de PBS, com o objetivo de evitar o tamponamento do HCl. As fatias foram então incubadas em HCl 2M por 2 horas em temperatura ambiente e em seguida, foram lavadas novamente em PBS 0,1M (4x8min) para reequilibrar o seu pH (7,35). O próximo passo envolveu a incubação do tecido a 4° C por 1 hora em "*blocking solution*" (BS), composta por soro normal de cabra 8% (NGS, Life Technologies Co.), albumina de soro bovino 0,3% (BSA, Sigma-Aldrich Co.) e Triton X-100 a 0,3% (Sigma-Aldrich Co.). Em seguida, as fatias foram incubadas a 4 ^{o} C por 24 horas em BS contendo o anticorpo primário anti-BrdU, proveniente de rato (1:100, Accurate Chemical & Scientific Co.). Na sequência, o tecido passou novamente por uma série de lavagens em PBS 0,1M (3x5min), seguido por incubação em BS contendo o anticorpo secundário anti-rato proveniente de mula (1:250, Life Technologies Co.) por 2 horas e em temperatura ambiente. Logo em seguida, deu-se início ao tratamento do tecido para os demais marcadores.

DCX/NeuN

Após todos os passos do tratamento para o BrdU, o tecido passou novamente por lavagens em PBS 0,1M (3x5min), seguido de incubação por 24 horas a 4º C em BS contendo os anticorpos primários anti-DCX proveniente de coelho (1:200, Cell Signaling Technology, Inc.) e anti NeuN proveniente de camundongo (1:100, EMD Millipore Co.). Em seguida, as fatias foram lavadas em PBS 0,1M (3x5min) e incubadas por 2 horas, sob temperatura ambiente, em BS contendo os anticorpos secundários anti-coelho, proveniente de mula e anti-camundongo, proveniente de cabra (ambos 1:250, Life Technologies Co.). Por fim, as fatias foram novamente lavadas em PBS 0,1M (3x5min), montadas em lâminas de vidro gelatinizadas e fixadas em solução anti-descoloração (Life Technologies Co.). As lâminas foram armazenadas por ao menos 12 horas a 4º C antes do início do imageamento microscópico.

Identificação e quantificação de fenótipos celulares

Após o processamento imunohistoquímico, as lâminas foram codificadas e um experimentador que desconhecia os tratamentos empregados foi responsável pelo imageamento e quantificação dos diferentes fenótipos celulares. As micrografias foram coletadas e analisadas com a ajuda de um microscópio de luz Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com uma fonte de luz Colibri.2 (Zeiss, Alemanha), composta por quatro módulos em LED, cada um proporcionado a excitação de um comprimento de onda específico. As imagens foram capturadas sob objetiva de 40x e o programa Axiovision 4.6 (Carl Zeiss, Alemanha) foi utilizado para o processamento e análise das micrografias. As imagens foram capturadas ao longo de toda a extensão da camada de células granulares, incluindo a zona subgranular e o hilo do giro denteado. Séries de imagens foram capturadas através de todo o plano Z, com um intervalo de 1

μm entre elas, o que permitiu incluir a quantificação de células localizadas em diferentes planos focais na mesma secção. Os filtros utilizados para visualização das células imunopositivas foram o Alexa Fluor, 546nm (BrdU), Alexa Fluor, 489nm (DCX) e DAPI, 470nm (NeuN). As imagens foram capturadas de forma multidimensional, *i.e.*, com a utilização dos três filtros simultaneamente, o que permitiu posteriormente a combinação entre eles para a análise de colocalização dos diferentes fluoróforos.

Cada micrografia foi analisada individualmente para a quantificação do número total de células marcadas por BrdU, que fornece um índice de proliferação celular; Doublecortin (DCX), que marca neurônios jovens migratórios e, células marcadas por ambos os marcadores BrdU e DCX, que fornece um índice sobre diferenciação neuronal; por fim, também foram quantificadas as células marcadas por BrdU e NeuN, que fornecem um índice sobre maturação neuronal. As células foram consideradas $BrdU^+$ quando estas apresentavam coloração intensa e exibiam corpos celulares de forma arredondada ou oval (Figura 3.7A e B); em relação às células marcadas por DCX, foram incluídas na quantificação somente aquelas que apresentavam intensa coloração, ramificações visíveis e claramente conectadas ao corpo celular do neurônio (Figura 3.8 A e B). Células marcadas por BrdU e que também exibiam uma coloração intensa por DCX ao redor do seu corpo celular e este último ligado à ramificações neuronais, foram consideradas positivas para BrdU e DCX (Figura 3.9A, B e C). Por fim, foram consideradas positivas para BrdU e NeuN as células que exibiam ambos os marcadores ocupando o mesmo espaço no corpo celular em diferentes planos focais (Figura 3.9.1A, B e C). Foram analisados três animais por grupo e um hemisfério por encéfalo foi amostrado, de maneira alternada, assumindo-se que a quantidade de novas células é semelhante em ambos os lados.

Análise de dados

Os resultados comportamentais foram submetidos à análise de variância para medidas repetidas (ANOVA) e quando necessário, foi empregado o teste *post hoc* de Tukey HSD para comparações múltiplas. As análises foram realizadas com o auxílio do programa Statistica v. 10 (StatSoft, Inc., 2011). Nos testes de localização e reconhecimento de objetos, foi realizada uma ANOVA separada para cada um dos parâmetros (porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos na área dos objetos, trajeto percorrido e velocidade de deslocamento), considerando-se "Grupo" (NUL *vs* PRIM) e "Ambiente" (ENR *vs* STD) como fatores entre-sujeitos e "Objeto" (dois idênticos na tentativa de amostra, "A" e "B"; um deles com a posição alterada na tentativa de localização, "B^*"; e um objeto diferente na tentativa de reconhecimento, "C") como fator intra-sujeitos.

O número total de células imunopositivas para BrdU, DCX, BrdU/DCX e BrdU/NeuN foi multiplicado por 2, com o objetivo de estimar o número total de novas células para ambos os hemisférios, método já utilizado em estudos anteriores (Woong-Goodrich et al., 2011). Além disso, esses mesmos valores foram multiplicados por 4, considerando-se o intervalo em que as fatias foram coletadas (uma a cada 4). O número total de células quantificadas foi então submetido à ANOVA fatorial separada para cada um dos marcadores, tendo "Grupo" (NUL *vs* PRIM) e "Ambiente" (ENR *vs* STD) como fatores entre-sujeitos. Todos os resultados da análise estatística foram considerados significantes somente quando os valores de p fossem iguais ou menores que 0,05.

Resultados

Localização de objetos (LO)

Primeira tentativa (tentativa amostra)

A Figura 3.5 apresenta os resultados obtidos durante a primeira tentativa do teste. A ANOVA revelou um efeito significante relacionado ao fator Grupo nos parâmetros frequência de cruzamentos nas áreas dos objetos (Figura 3.5B), trajeto percorrido (Figura 3.5C) e velocidade de deslocamento (Figura 3.5D), ($F_{1,43}$ = 5,57-9,63, $p < 0,02$). As análises de contraste complementares à ANOVA mostraram que as ratas do grupo NUL cruzaram mais vezes nas áreas correspondentes aos dois objetos idênticos ($p = 0,01$), percorreram distâncias ($p = 0,003$) e mostraram velocidades ($p = 0,005$) maiores durante a primeira exposição, sugerindo que estes animais exibiram estados motivacionais distintos quando expostos à tarefa. Não houve diferença relacionada ao fator Grupo no parâmetro porcentagem de tempo nas áreas dos objetos (Figura 3.5A), ($F_{1,43} = 0,33$, $p = 0,56$). A ANOVA também mostrou um efeito significante relacionado ao fator Ambiente no parâmetro frequência de cruzamentos na área dos objetos ($F_{1,43} = 7,83$, $p = 0,007$), indicando que animais do ambiente STD cruzaram mais vezes por essas áreas (*post hoc*, $p = 0,007$). Não houve diferença significante relacionada ao fator Ambiente nos parâmetros porcentagem de tempo na área do objeto, trajeto percorrido e velocidade de deslocamento ($F_{1,43}$ = 0,07-2,50, $p > 0,12$), nem à interação entre os fatores Grupo e Ambiente em qualquer dos parâmetros analisados na tentativa de amostra ($F_{1,43}$ = 0,05-1,54, $p > 0,22$).

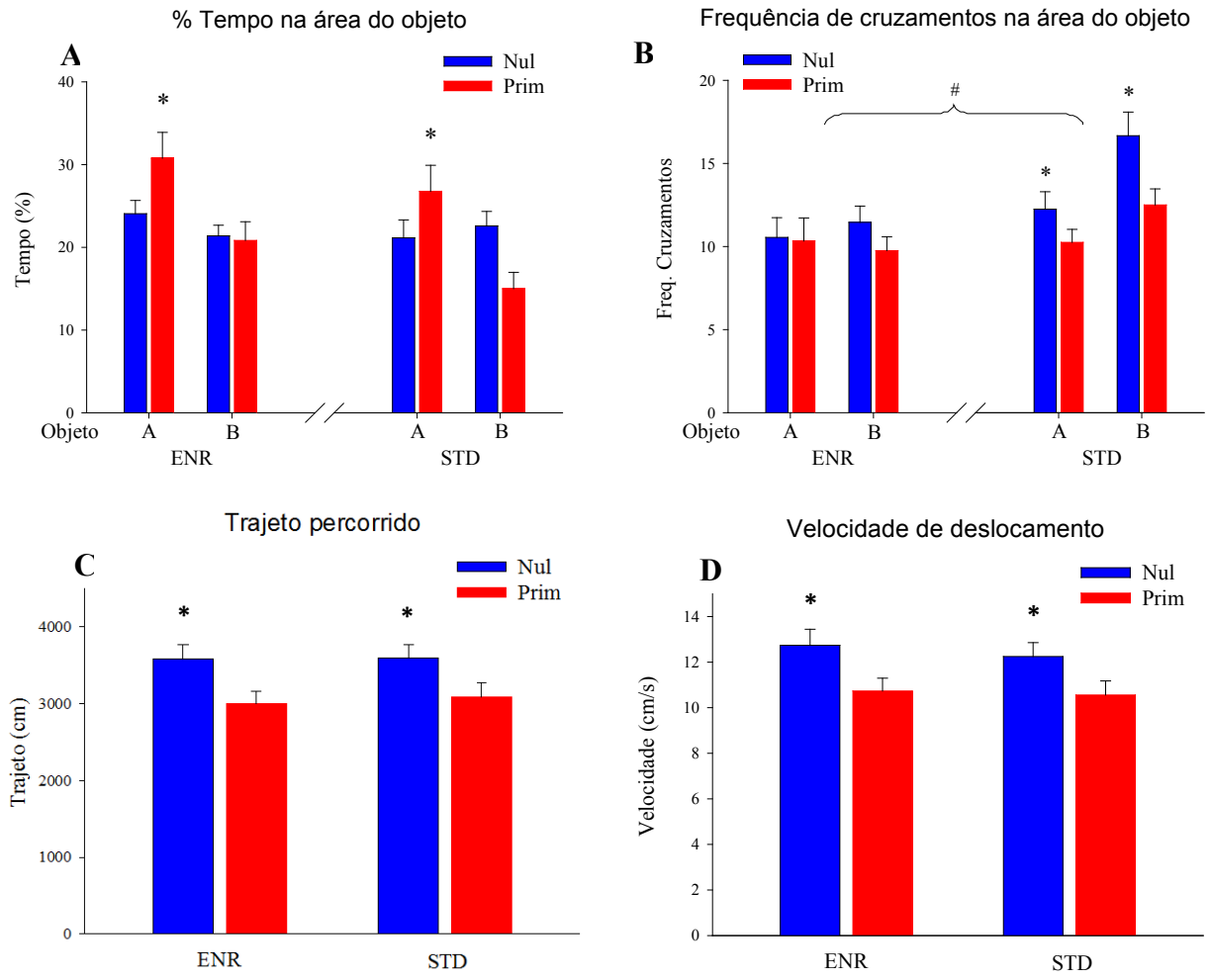


Figura 3.5 - Desempenho de ratas nulíparas (Nul) e primíparas (Prim) da linhagem Sprague-Dawley expostas ao ambiente enriquecido (ENR) ou padrão de laboratório (STD) na primeira exposição (tentativa amostra) dos testes de localização e reconhecimento de objetos. Os animais foram expostos a dois objetos idênticos (Objeto A e B) por 5 minutos e os parâmetros mensurados foram a porcentagem de tempo despendido (A; * Grupo x Objeto, $p < 0,001$) e número de cruzamentos (B; *Grupo, $p < 0,02$; #Ambiente, $p = 0,007$) na área de exploração dos objetos (uma área imaginária concêntrica ao objeto, medindo três vezes o seu tamanho), trajeto percorrido (C; *Grupo, $p < 0,02$) e velocidade de deslocamento (D; *Grupo, $p < 0,02$). Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

Surpreendentemente, a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes relacionadas ao fator Objeto nos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 3.5A) e frequência de cruzamentos na área do objeto (Figura 3.5B), ($F_{1,43} = 6,43$-$17,64$, $p < 0,02$). Apesar de ambos os objetos serem idênticos, as análises *post hoc* mostraram que os animais despenderam mais

tempo explorando o objeto A ($p < 0,001$), localizado no quadrante NO da arena (ver ilustração sobre a posição dos objetos nas Figuras 3.2 e 3.3). Em contraste, a análise mostrou que os animais cruzaram mais vezes pela área correspondente ao objeto B ($p = 0,01$), localizado no quadrante NE. Adicionalmente, a ANOVA mostrou uma interação significante entre os fatores Grupo e Objeto no parâmetro porcentagem de tempo na área do objeto ($F_{1,43} = 14,08$, $p < 0,001$). As análises *post hoc* indicaram que as ratas PRIM exploraram por mais tempo o objeto A ($p < 0,001$) e também o exploraram por mais tempo em comparação com as ratas NUL ($p = 0,03$), as quais por sua vez, apresentaram a mesma taxa de exploração para ambos os objetos ($p = 0,99$). Houve ainda uma interação significante entre os fatores Ambiente e Objeto no parâmetro frequência de cruzamentos na área do objeto ($F_{1,43} = 5,28$, $p < 0,03$), indicando que as ratas do ambiente STD cruzaram mais vezes pela área do objeto B ($p = 0,006$), localizado no quadrante NE da arena e também cruzaram mais vezes pelo local desse objeto em relação aos animais do ambiente ENR ($p = 0,002$). A ANOVA revelou inexistência de interações significantes entre os fatores Grupo e Objeto no parâmetro frequência de cruzamentos na área do objeto; entre os fatores Ambiente e Objeto no parâmetro porcentagem de tempo na área do objeto e por fim, entre os fatores Grupo, Ambiente e Objeto nos parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos na área do objeto ($F_{1,43} = 0,05$-$1,76$, $p > 0,19$).

Portanto, os resultados da tentativa de amostra revelaram que, embora os dois objetos utilizados na primeira tentativa tenham sido idênticos, o local em que um deles foi posicionado induziu maior permanência dos animais, particularmente das ratas primíparas. Esse fato pode estar relacionado com a proximidade do objeto A em relação às paredes da sala de experimentos (ver Figuras 3.2 e 3.3 da seção de métodos), caracterizando um "canto", que pode ter representado um local mais seguro em relação aos demais setores da arena. Nesse caso, a ratas

primíparas se mostraram mais cautelosas ao explorar a arena, permanecendo por mais tempo na área do objeto localizado próximo à parede. Adicionalmente, as ratas nulíparas apresentaram comportamentos típicos relacionados com níveis elevados de ansiedade e hiperatividade em roedores, como maior frequência de cruzamentos nas áreas dos objetos, além de trajetos e velocidades de deslocamento maiores, sugerindo que a experiência maternal pode ter reduzido os níveis de ansiedade no grupo de ratas primíparas. Por fim, o maior número de cruzamentos nas áreas dos objetos pelas ratas do ambiente STD também pode denotar maior atividade locomotora relacionada com ansiedade, sugerindo que o acondicionamento em ambiente enriquecido pode ter proporcionado um efeito ansiolítico sobre o desempenho dos animais.

Localização de objetos (LO)

Segunda tentativa (tentativa de localização)

Os resultados da tentativa de localização de objetos estão apresentados na Figura 3.6. A ANOVA revelou um efeito significante relacionado ao fator Objeto nos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 3.6A) e frequência de cruzamentos (Figura 3.6B) na área do objeto ($F_{1,43}$ = 7,51-11,518, $p < 0,009$), indicando, como esperado, que o mesmo objeto numa nova localização captou maior atividade exploratória dos animais (*post hoc*, $p = 0,001$). Não houve diferenças significantes relacionadas aos fatores Grupo, Ambiente e nem à interação entre os fatores Grupo e Ambiente, Grupo e Objeto ou Ambiente e Objeto nos parâmetros porcentagem de tempo e frequência de cruzamentos na área do objeto ($F_{1,43}$ = 0,001-2,27, $p > 0,13$). Interessantemente, a ANOVA revelou uma interação significante entre os fatores Grupo, Ambiente e Objeto no parâmetro porcentagem de tempo na área do objeto ($F_{1,43} = 4,48$, $p = 0,040$). As análises *post hoc* mostraram que as ratas PRIM-ENR exploraram por mais tempo o objeto alterado em

comparação com o não alterado ($p = 0,007$), enquanto que os animais NUL-ENR exploraram igualmente ambos os objetos ($p = 0,52$). Já em relação aos animais do ambiente STD, ocorreu exatamente o quadro oposto: os animais STD-NUL exploraram por mais tempo o objeto que teve sua posição alterada em relação ao não alterado ($p = 0,007$) e as ratas STD-PRIM exploraram igualmente os dois objetos ($p = 0,53$). Esse resultado sugere que a experiência maternal associada à exposição ao ambiente enriquecido proporcionou uma melhora de memória em relação à taxa de exploração de um objeto posicionado em um local familiar, caracterizada pelo decréscimo da taxa de exploração do objeto não alterado. Não houve interação significante entre os fatores Grupo, Ambiente e Objeto no parâmetro frequência de cruzamentos na área do objeto ($F_{1,43} = 1,46$, $p > 0,23$).

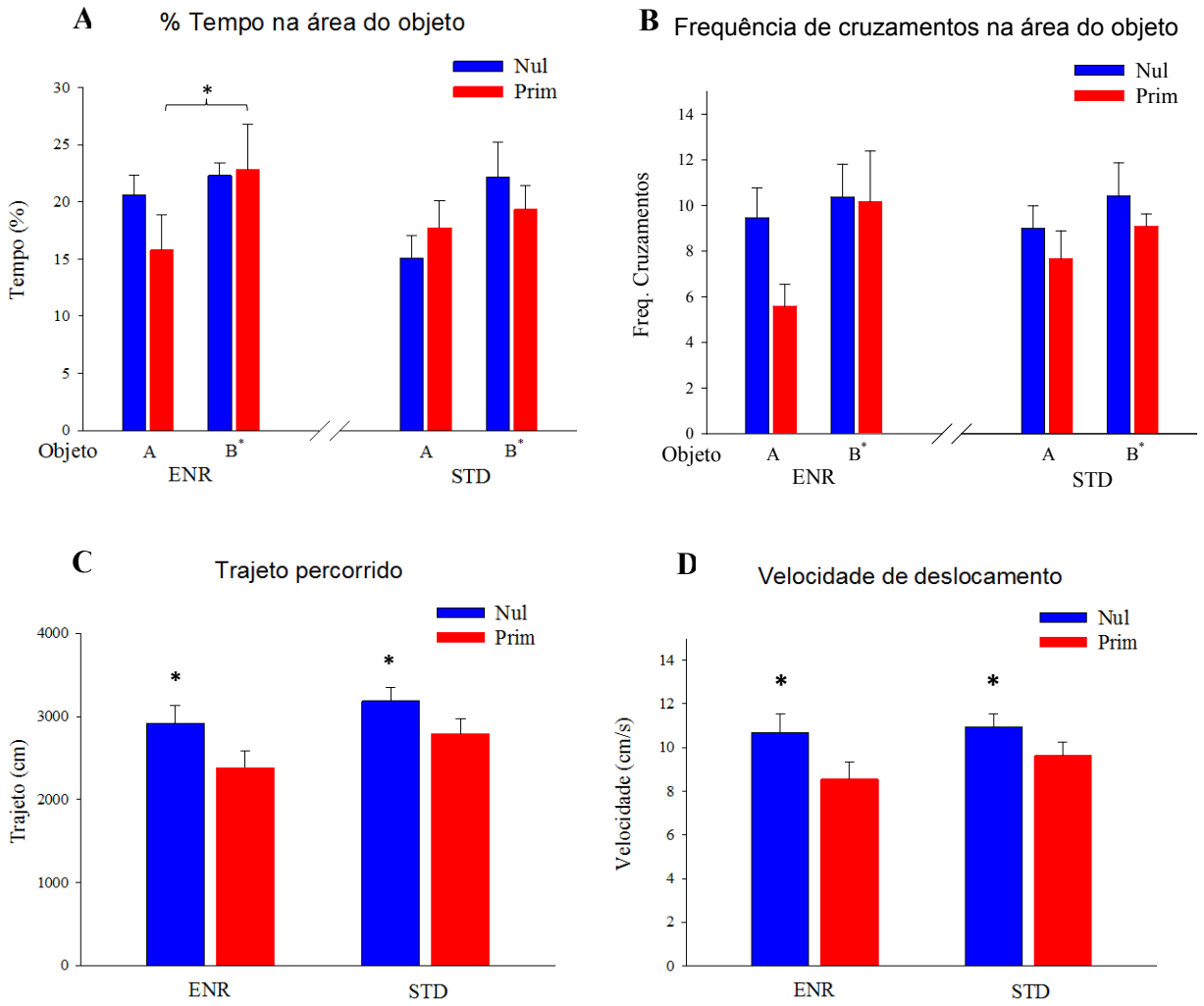


Figura 3.6 - Desempenho de ratas nulíparas (Nul) e primíparas (Prim) da linhagem Sprague-Dawley expostas ao ambiente enriquecido (ENR) ou padrão de laboratório (STD) na segunda exposição (tentativa de localização) do teste de localização de objetos. Os animais foram expostos a dois objetos idênticos por 5 minutos, tendo um deles sua localização alterada (Objeto B*). Os parâmetros mensurados foram a porcentagem de tempo despendido (A; *Grupo x Ambiente x Objeto, $p = 0,04$) e número de cruzamentos (B) na área de exploração dos objetos (uma área imaginária concêntrica ao objeto, medindo três vezes o seu tamanho), trajeto percorrido (C; *Grupo, $p < 0,02$) e velocidade de deslocamento (D; *Grupo, $p < 0,02$). Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

A ANOVA revelou ainda um efeito significante relacionado ao fator Grupo nos parâmetros trajeto percorrido e velocidade de deslocamento ($F_{1,43} = 5,93$-$5,98$, $p < 0,02$). As análises *post hoc* mostraram que as ratas nulíparas exibiram trajetos e velocidades maiores (p =

0,01), indicando níveis elevados de ansiedade e hiperatividade. Por fim, a ANOVA mostrou um efeito marginalmente significante relacionado ao fator Ambiente no parâmetro trajeto percorrido ($F_{1,43} = 3,17$, $p = 0,082$), sugerindo que as ratas do ambiente STD percorreram trajetos maiores. Não houve efeito significante relacionado ao fator Ambiente no parâmetro velocidade de deslocamento e à interação entre os fatores Grupo e Ambiente nos parâmetros trajeto percorrido e velocidade de deslocamento ($F_{1,43} = 0,13$-$0,89$, $p > 0,35$).

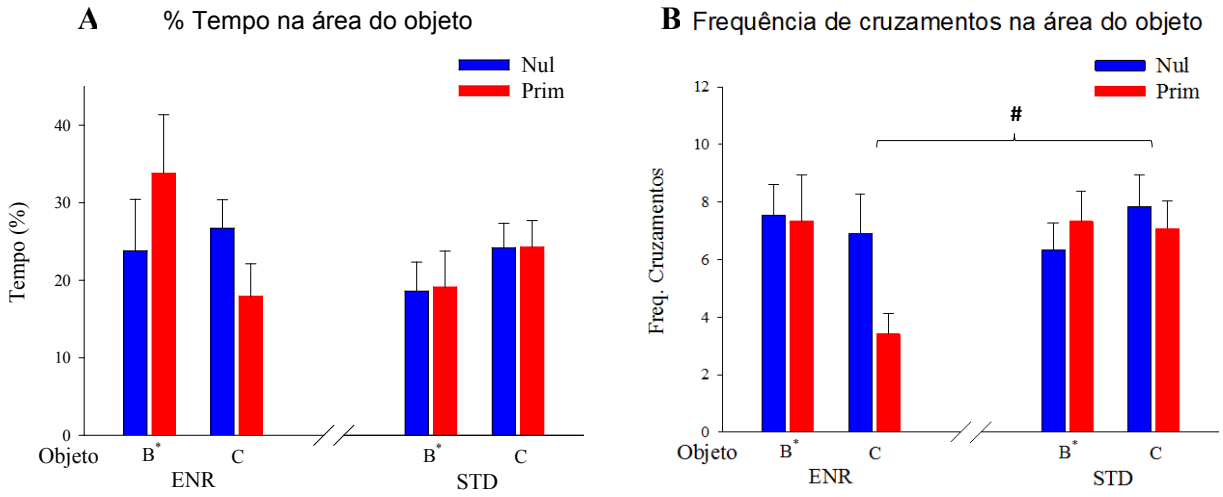
Portanto, os resultados da segunda tentativa mostraram que, embora o objeto posicionado em um novo local não tenha captado maior atividade exploratória de um grupo experimental em particular, as ratas primíparas expostas ao ambiente enriquecido se mostraram mais sensíveis à alteração espacial dos objetos, reduzindo a taxa de exploração do objeto em posição familiar em comparação com o objeto posicionado em um novo local. Adicionalmente, assim como na tentativa de amostra, as ratas nulíparas exibiram trajetos e velocidades de deslocamento maiores, sugerindo estados motivacionais distintos, possivelmente relacionados com níveis alterados de ansiedade e hiperatividade.

Reconhecimento de objetos (RO)

Terceira tentativa (tentativa de reconhecimento)

A Figura 3.7 apresenta os resultados da tentativa de reconhecimento de objetos. A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes relacionadas aos fatores Objeto, Grupo, Ambiente e à interação entre os fatores Grupo e Ambiente ou Grupo, Ambiente e Objeto nos parâmetros porcentagem de tempo (Figura 3.7A) e frequência de cruzamentos (Figura 3.7B) na área do objeto ($F_{1,43} = 0,002$-$1,59$, $p > 0,21$), indicando que a experiência maternal e a exposição ao ambiente enriquecido não alteraram a memória dos animais para objetos familiares. Além

disso, a ausência de efeito significante no fator Objeto mostrou que o novo objeto inserido no ambiente não foi capaz de captar maior atividade exploratória dos animais. A ANOVA mostrou ainda uma interação significante entre os fatores Ambiente e Objeto no parâmetro frequência de cruzamentos na área do objeto ($F_{1,43} = 4,52$, $p = 0,03$). As análises *post hoc* mostraram que as ratas do ambiente STD cruzaram mais vezes pela área do objeto novo ($p = 0,03$), sugerindo que os animais do ambiente ENR exibiram habituação à presença de novos objetos no ambiente. Houve ainda uma interação quase significante entre os fatores Grupo e Objeto ($F_{1,43} = 3,40$, $p = 0,072$) no parâmetro frequência de cruzamentos na área do objeto, sugerindo que as ratas NUL investigaram mais vezes o objeto novo. Não houve interação significante entre os fatores Grupo e Objeto ou Ambiente e Objeto no parâmetro porcentagem de tempo na área do objeto ($F_{1,43} = 1,72\text{-}2,62$, $p > 0,11$).



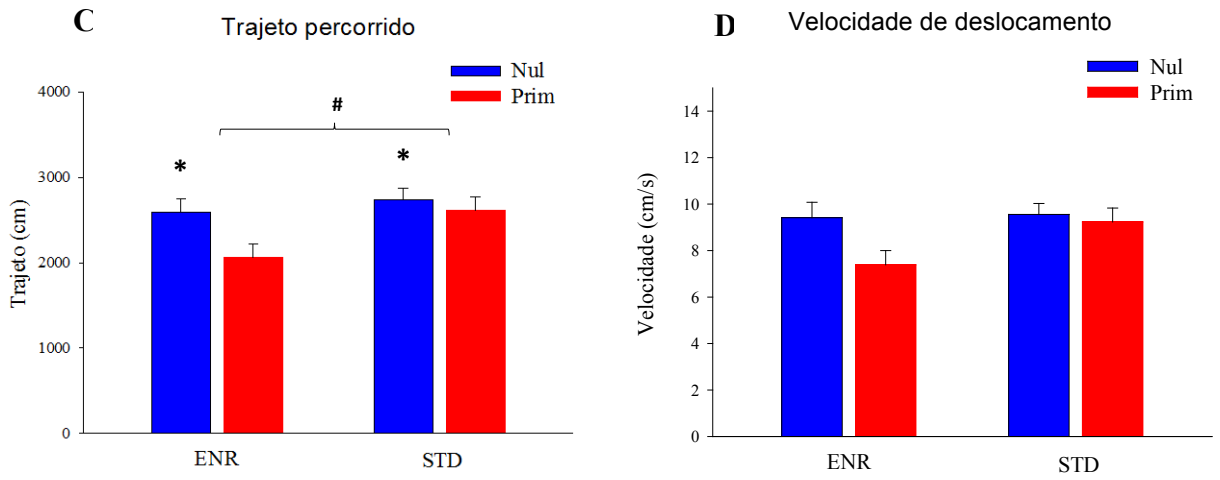


Figura 3.7 - Desempenho de ratas nulíparas (Nul) e primíparas (Prim) da linhagem Sprague-Dawley expostas ao ambiente enriquecido (ENR) ou padrão de laboratório (STD) na terceira exposição (tentativa de reconhecimento) do teste de reconhecimento de objetos. Os animais foram expostos a dois objetos por 5 minutos, sendo um deles substituído por um objeto distinto dos anteriores (Objeto C). Os parâmetros mensurados foram a porcentagem de tempo despendido (A) e número de cruzamentos (B; #Ambiente x Objeto, p = 0, 03) na área de exploração dos objetos (uma área imaginária concêntrica ao objeto, medindo três vezes o seu tamanho), trajeto percorrido (C; *Grupo, p = 0,03; #Ambiente, p = 0,02) e velocidade de deslocamento (D). Os dados estão representados em termos de média ± EPM.

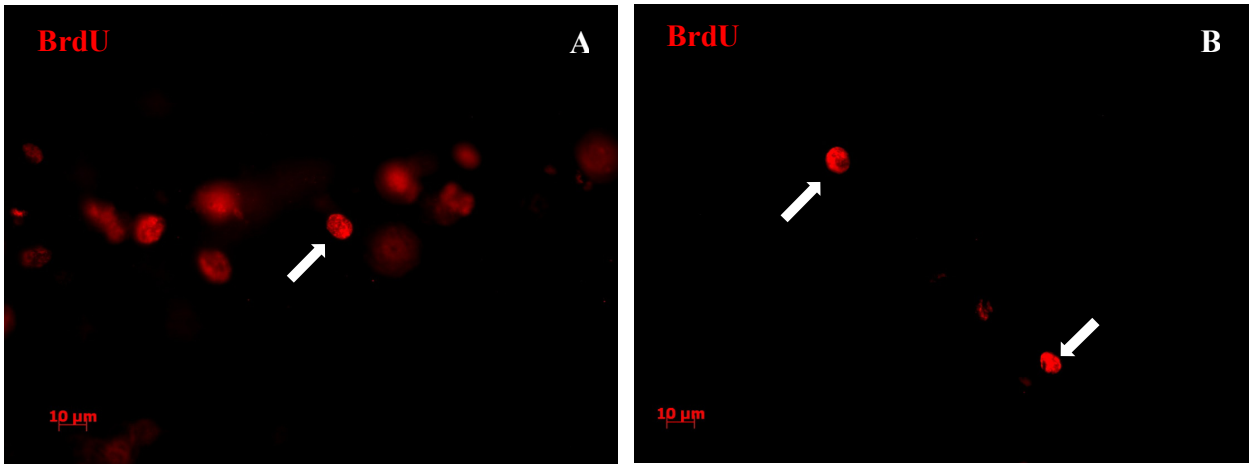
A ANOVA também revelou um efeito significante relacionado aos fatores Grupo ($F_{1,43}$ = 4,63, p = 0,03) e Ambiente ($F_{1,43}$ = 5,27, p = 0,02) no parâmetro trajeto percorrido. As análises *post hoc* mostraram que as ratas NUL percorreram trajetos maiores (p = 0,03); os animais do ambiente STD também exibiram trajetos maiores (p = 0,02). Houve ainda um efeito marginalmente significante relacionado ao fator Grupo ($F_{1,43}$ = 3,96, p = 0,052) e ao fator Ambiente ($F_{1,43}$ = 2,85, p = 0,09) no parâmetro velocidade de deslocamento, sugerindo que as ratas NUL e animais do ambiente STD exibiram velocidades maiores. Não houve interação significante entre os fatores Grupo e Ambiente nos parâmetros trajeto percorrido e velocidade de deslocamento ($F_{1,43}$ = 1,65-2,09, p > 0,15).

Em conjunto, os resultados da terceira tentativa mostraram que a experiência maternal e o ambiente enriquecido não alteraram a memória de reconhecimento de objetos familiares de ratas Sprague-Dawley. Também mostraram que o novo objeto inserido no ambiente não foi capaz de captar maior atividade exploratória dos animais, o que pode explicar a ausência de diferenças significantes na taxa de exploração entre os diferentes grupos. De maneira consistente com as tentativas anteriores, as ratas nulíparas, assim como as do ambiente STD, exibiram trajetos maiores, indicando maior atividade locomotora, o que pode estar relacionado com elevados níveis de ansiedade e hiperatividade.

Resultados Anatômicos

BrdU

Os resultados quantitativos, bem como as fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para o BrdU são mostrados na figura 3.8. A ANOVA revelou ausência de diferenças significativas no fator Grupo, Ambiente e na interação entre eles ($F_{1,8}$ = 0,09-0,16, p > 0,69), indicando que o número total de novas células geradas no GD não sofreu alteração em virtude da experiência maternal e da exposição ao ambiente enriquecido.



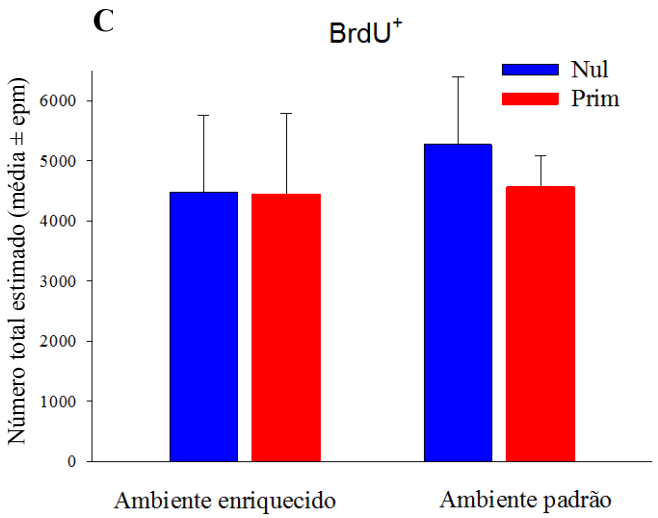
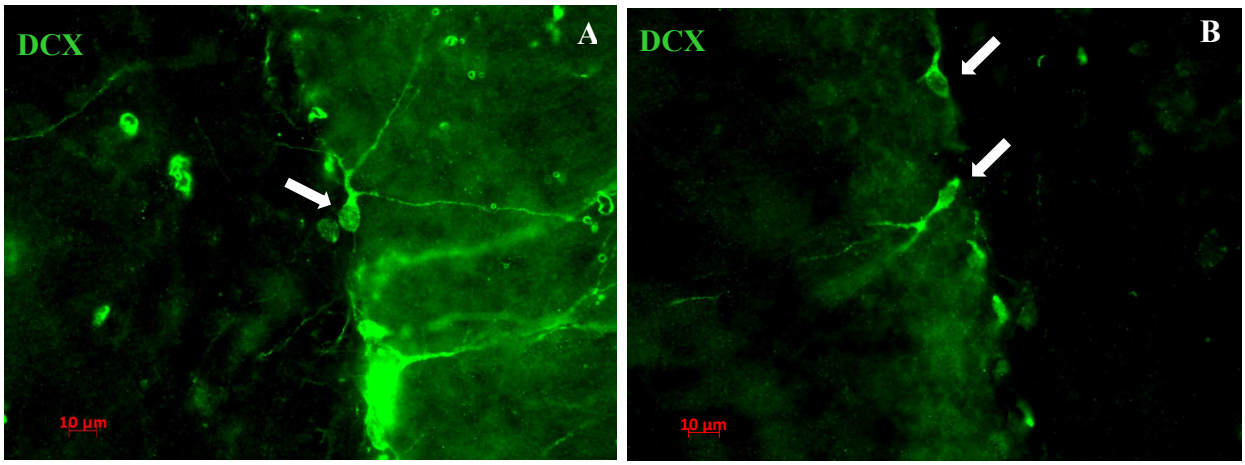


Figura 3.8 - Fotomicrografias representativas de células $BrdU^+$ na camada granular do GD (A, B), bem como o resultado quantitativo (C), expresso pela média ± EPM do número total estimado de células $BrdU^+$ geradas durante o acondicionamento em ambientes distintos (enriquecido X padrão) no GD de ratas primíparas (PRIM) e nulíparas (NUL) da linhagem Sprague-Dawley.

DCX

Os resultados da imunohistoquímica para DCX são mostrados na Figura 3.9. A ANOVA revelou ausência de diferenças significativas nos fatores Grupo, Ambiente e na interação entre eles ($F_{1,8}$ = 0,01-0,06, $p > 0,79$). Portanto, estes resultados mostram que o número de neurônios em diferenciação não se altera por conta da experiência maternal e da exposição ao ambiente enriquecido.



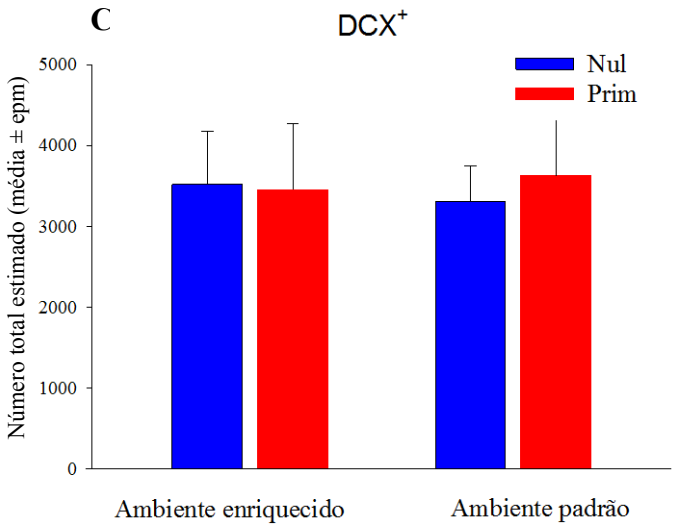


Figura 3.9 - Fotomicrografias representativas de células DCX^+ na camada granular do GD (A, B), bem como o resultado quantitativo (C), expresso pela média ± EPM do número total estimado de células DCX^+ no GD de ratas primíparas (PRIM) e nulíparas (NUL) da linhagem Sprague-Dawley.

BrdU/DCX

Os resultados da análise de colocalização dos marcadores para BrdU e DCX são mostrados na Figura 3.9.1. A ANOVA mostrou ausência de efeitos significantes de Grupo, Ambiente e de interação entre os mesmos ($F_{1,8}$ = 0,01-0,33, $p > 0,57$). Esses resultados mostram que a diferenciação das células recém-geradas em precursores neuronais não é alterada em virtude da experiência maternal e da exposição ao ambiente enriquecido.

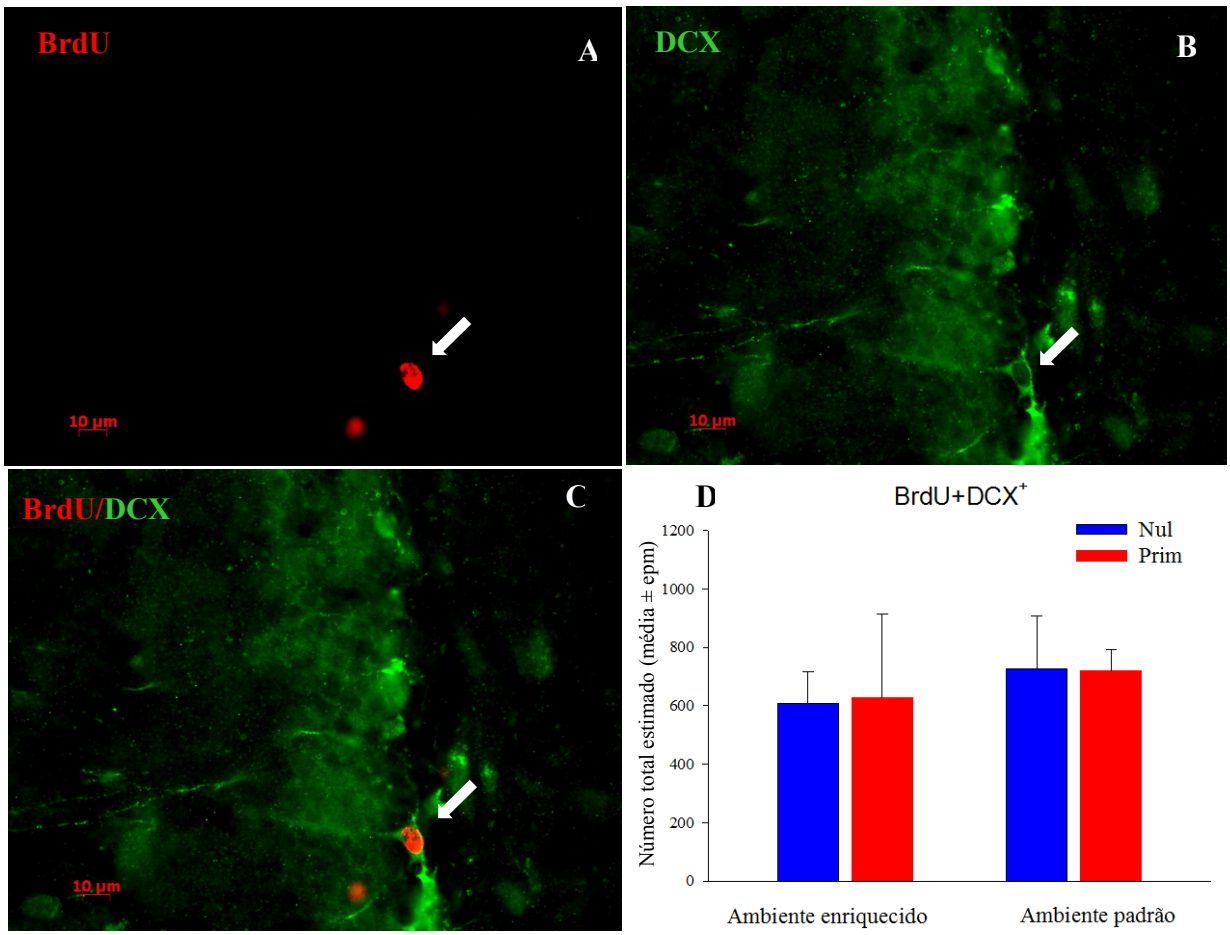


Figura 3.9.1 - Análise de colocalização dos marcadores para BrdU e DCX no GD de ratas primíparas (PRIM) e nulíparas (NUL) da linhagem Sprague-Dawley. As figuras mostram a mesma célula expressando os marcadores para BrdU e DCX (A e B, respectivamente), o que resulta numa coloração dupla quando as imagens são combinadas (C; BrdU em vermelho e DCX em verde). O resultado quantitativo (D) é expresso pela média ± EPM do número total estimado de células duplamente marcadas por BrdU e DCX.

BrdU/NeuN

A Figura 3.9.2 mostra os resultados obtidos na análise de colocalização dos marcadores para BrdU e NeuN. A ANOVA apontou ausência de efeitos de Grupo, Ambiente e de interação entre eles ($F_{1,8} = 0,31\text{-}0,91$, $p > 0,36$). Embora a análise visual dos dados mostre uma inclinação para um maior número de células BrdU/NeuN positivas nas ratas primíparas expostas ao

ambiente enriquecido (Figura 3.9.2D), sugestivo de que a experiência maternal proporciona maior taxa de sobrevivência e maturação de novas células em virtude da exposição ao ambiente enriquecido, não houve interação significativa entre os fatores Grupo e Ambiente (p = 0,365), o que pode estar relacionado com a grande variabilidade dos resultados (note a barra de erro na Figura 3.9.2D).

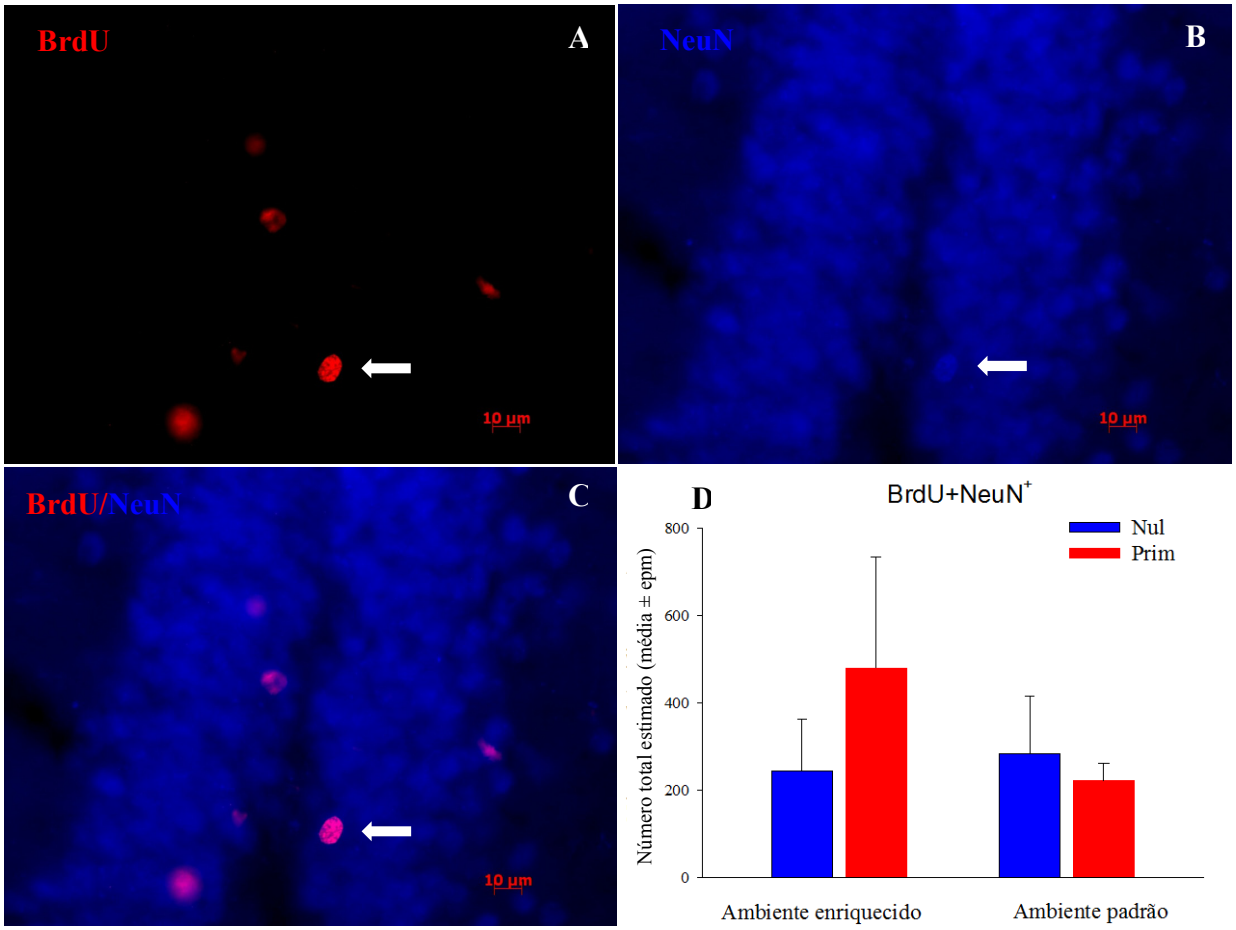


Figura 3.9.2 - Análise de colocalização dos marcadores para BrdU e NeuN no GD de ratas primíparas (PRIM) e nulíparas (NUL) da linhagem Sprague-Dawley. As figuras mostram a mesma célula expressando os marcadores para BrdU e NeuN (A e B, respectivamente), o que resulta numa coloração dupla quando as imagens são combinadas (C; BrdU em vermelho e NeuN em azul). O resultado quantitativo (D) é expresso pela média ± EPM do número total estimado de células duplamente marcadas por BrdU e NeuN.

Discussão

Os resultados comportamentais do presente estudo mostraram que as ratas primíparas expostas ao ambiente enriquecido (AE) exibiram uma memória sobre a disposição espacial de objetos superior em comparação com as ratas nulíparas expostas às mesmas condições ambientais. Esse comportamento foi expresso pelo maior tempo de exploração do objeto cuja localização espacial foi alterada em comparação com o objeto cuja localização espacial foi mantida, enquanto que as ratas nulíparas exploraram igualmente ambos os objetos. Por outro lado, a tentativa que avalia a memória de reconhecimento para objetos familiares mostrou que as ratas do ambiente STD, independentemente da experiência maternal, cruzaram mais vezes pela área do objeto não familiar, introduzido na arena em substituição ao objeto que não teve sua localização espacial alterada nas tentativas anteriores. Adicionalmente, as ratas NUL mostraram uma tendência ($p = 0,07$) também para o maior número de cruzamentos pela mesma área. Esses resultados indicam que a experiência maternal e a exposição ao AE exercem efeitos sobre o desempenho de ratas Sprague-Dawley em tarefas que avaliam a memória de localização e reconhecimento de objetos.

A distinção entre as tarefas de localização e reconhecimento de objetos é importante, pois envolvem mecanismos neurais e psicológicos diferentes. A tarefa de localização de objetos consiste na alteração da disposição espacial de um objeto familiar, explorado numa tentativa anterior, enquanto que a tarefa de reconhecimento de objetos é caracterizada pela inserção de um objeto novo no ambiente em substituição a um dos objetos explorados numa tentativa anterior (Dere et al., 2007). Em relação ao primeiro caso, diversos estudos mostram que o hipocampo tem participação fundamental na formação de uma memória adquirida com base em elementos espaciais e contextuais, enquanto que no segundo, a memória que permite discriminar a

familiaridade de um objeto explorado anteriormente, é mantida relativamente intacta quando o hipocampo é lesionado experimentalmente (Xavier et al., 1990; Mumby et al., 2002; Good et al., 2007; Balderas et al., 2008; Manns & Eichenbaum, 2009; Langston & Wood, 2010). Os resultados do presente estudo mostraram que as ratas PRIM expostas ao AE foram mais sensíveis em relação à alteração espacial dos objetos em comparação com as NUL mantidas nas mesmas condições ambientais, sugerindo que a experiência maternal associada à exposição a um ambiente de maior complexidade gerou alterações no hipocampo dessas ratas que resultaram no aprimoramento de um comportamento relacionado a essa estrutura nervosa. De fato, diversos estudos sugerem que as adaptações anatômicas e funcionais do hipocampo materno de ratas têm relação com desempenhos superiores em tarefas espaciais (Kinsley et al., 1999; Tomizawa et al., 2003; Gatewood et al., 2005; Pawluski & Galea, 2005).

Por meio de tarefas similares, Macbeth et al. (2008) mostraram que ratas MULT superaram ratas NUL tanto numa tarefa não espacial, de reconhecimento de objetos, quanto noutra espacial, de localização de objetos, de forma mais pronunciada em comparação com os resultados obtidos no presente experimento. No entanto, as condições experimentais empregadas nos estudos de Macbeth et al. (2008) diferem em muitos aspectos das utilizadas no presente estudo. Nos experimentos de Macbeth et al. (2008), foram utilizadas ratas que passaram por mais de uma gestação e períodos de lactação, condição reprodutiva em que alterações de memória espacial são obervadas de forma mais pronunciada, dependendo da tarefa empregada, como o labirinto radial de oito braços (Kinsley et al., 1999; Tomizawa et al., 2003) ou uma versão seca do labirinto de Morris (Gatewood et al., 2005). Além disso, Macbeth et al. (2008) submeteram os animais a 4 dias de exposição em cada fase da tarefa enquanto que no presente estudo, optou-se pela versão "one-trial" para cada versão da tarefa, estratégia que é suficiente para captar a

atividade exploratória e avaliar os dois tipos de memórias em roedores (Dere et al., 2007). Alternativamente, é possível que o desempenho dos animais tenha sido influenciado pela exposição prévia ao AE. De fato, a primeira tentativa de exposição ou tentativa amostra, revelou um resultado inesperado; apesar de ambos os objetos utilizados nessa tentativa serem idênticos, um deles captou maior atividade exploratória dos animais, particularmente o objeto "A", localizado no quadrante noroeste da arena, o mais próximo de uma das paredes da sala de experimentos (ver Figura 3.2 na seção de métodos). Interessantemente, os resultados mostraram que as ratas PRIM exploraram por mais tempo o objeto "A" e por mais tempo em relação às ratas NUL, as quais exploraram ambos os objetos igualmente. É possível que a proximidade do objeto "A" em relação à parede da sala de experimentos possa ter representado um local mais seguro para esses animais, sugerindo que as PRIM exibiram maior cautela ao explorar um ambiente aberto. Ainda, a tentativa de reconhecimento de objetos mostrou que as ratas do ambiente STD, independente do histórico reprodutivo, cruzaram mais vezes pela área do objeto novo, sugerindo que estes animais foram mais sensíveis à substituição de um objeto familiar por outro diferente. O fato de o AE incluir objetos variados, de tamanhos e formas diferentes pode ter alterado a motivação dos animais mantidos nesse ambiente para explorar objetos diferentes pela habituação aos objetos da gaiola, o que pode explicar a atração pelo objeto novo somente nos animais acondicionados em gaiolas comuns de laboratório.

Os resultados do presente experimento também mostraram que as ratas NUL, independentemente do ambiente em que foram mantidas, bem como os animais acondicionados em gaiolas comuns de laboratório, independentemente da condição reprodutiva, percorreram distâncias e exibiram velocidades de deslocamento maiores em todas as exposições dos testes comportamentais. Estes resultados indicam maior atividade motora nesses animais,

possivelmente relacionado com níveis elevados de ansiedade e estresse. De acordo com os resultados obtidos no presente experimento, diversos estudos mostram que a experiência maternal diminui a ocorrência de comportamentos relacionados com ansiedade e estresse (Lonstein, 2005; Love et al., 2005; Byrnes & Bridges, 2006; Macbeth et al., 2008), possivelmente pela redução nos níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol (Windle et al., 1997; Shanks et al., 1999) e/ou menor ativação de áreas relacionadas a esses comportamentos, caracterizada pela redução na expressão da proteína *c*-fos (da Costa et al., 1996; Wartella et al., 2003). O AE é uma fonte de estimulação sensorial formada pela combinação entre a oportunidade de explorar objetos inanimados e interagir socialmente com outros animais, o que gera alterações no encéfalo e no comportamento de roedores (Rosenzweig, 1966; Walsh, 1981; Benaroya-Milshtein et al., 2004). Um dos efeitos conhecidos da exposição ao AE é a redução da ansiedade e estresse (Roy et al., 2001; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Friske & Gammie, 2005; Leal-Galicia et al., 2007; Hughes & Otto, 2013), o que pode explicar a redução na atividade motora dos animais mantidos em AE em comparação com os animais acondicionados em gaiolas comuns no presente experimento. Em suporte a esse resultado, Sztainberg et al. (2010) mostraram uma redução na atividade motora de camundongos mantidos em AE, porém, essa redução não influenciou a capacidade exploratória dos animais. Portanto, esses resultados sugerem que a experiência maternal e o AE enriquecido exerceram efeitos ansiolíticos sobre o desempenho dos animais durante a exploração de um ambiente novo.

Os resultados anatômicos mostraram que a experiência maternal por si só, ou associada à exposição por 45 dias ao AE não proporcionou alterações nas taxas de proliferação, diferenciação e sobrevivência das novas células geradas no GD de ratas Sprague-Dawley. Consistentemente com os resultados obtidos no presente estudo, Leuner et al. (2007) mostraram

que ratas PRIM não diferiram das NUL quanto ao número de células marcadas pelo BrdU, quando avaliadas após o desmame dos filhotes. No entanto, durante o período de lactação e exposição aos filhotes, foi observada uma redução no número de novas células no GD das ratas PRIM, resultado também encontrado por Pawluski & Galea (2007). Portanto, alterações nas taxas de neurogênese hipocampal em ratas maternalmente experientes parecem depender do período em que os animais são avaliados, sendo observadas particularmente durante o período de lactação e exposição aos filhotes. De fato, a inibição do aumento nos níveis de corticosterona por meio de adrenalectomia durante esse período foi efetiva na prevenção do decréscimo na taxa de proliferação celular no GD, indicando que o contato com os filhotes e a lactação elevam os níveis do hormônio corticosterona, relacionado ao estresse, impactando de maneira negativa a neurogênese hipocampal em ratas PRIM (Leuner et al., 2007). No entanto, até este momento, o presente estudo foi o único a investigar os efeitos da experiência maternal associada à exposição a um AE sobre a neurogênese hipocampal adulta, mostrando que os estímulos diferenciados proporcionados por 45 dias de exposição ao AE não foram capazes de alterar a proliferação, diferenciação e sobrevivência das novas células geradas no GD da formação hipocampal.

Em conjunto, os resultados do presente estudo mostraram que as ratas PRIM mantidas em ambiente enriquecido mostraram maior sensibilidade à alteração espacial de um objeto familiar numa tarefa dependente da integridade do hipocampo, em comparação com as NUL mantidas nas mesmas condições ambientais, sugerindo que a experiência maternal associada ao enriquecimento ambiental gerou alterações na capacidade dos animais de reagirem a alteração espacial, possivelmente relacionada com alterações hipocampais. Adicionalmente, ratas NUL, bem como as ratas mantidas em gaiolas comuns de laboratório exibiram comportamentos relacionados com ansiedade e estresse, tais como aumento no trajeto percorrido e na velocidade

de deslocamento durante as exposições às tarefas comportamentais, sugerindo que a experiência maternal e a exposição ao AE produziram efeitos ansiolíticos em ratas Sprague-Dawley. Por fim, as alterações comportamentais mencionadas não mostraram relação com a neurogênese adulta, uma vez que a experiência maternal e a exposição ao AE por 45 dias não foram capazes de alterar as taxas de proliferação, diferenciação e sobrevivência das novas células geradas no GD desses animais.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estágio sanduiche a Ilton Santos da Silva (Processo BEX 2594/11-0). Ao Professor Dr. Craig H. Kinsley e ao Departamento de Psicologia da Universidade de Richmond-USA pela colaboração que permitiu a realização deste trabalho.

.

Discussão Geral e Conclusões

Os resultados descritos no Capítulo I do presente trabalho mostraram que a experiência maternal em suas mais diferentes formas (primiraridade, primiparidade com privação de contato com os filhotes e sensibilização maternal) não geraram alterações de desempenho em ratas da linhagem Wistar avaliadas uma semana após o desmame/exposição aos filhotes em comparação com ratas nulíparas (NUL), tanto numa tarefa de memória de referência quanto numa tarefa de memória operacional no labirinto aquático de Morris. Em contraste, estudos prévios mostraram melhora significativa na memória espacial de ratas da linhagem Sprague-Dawley avaliadas no labirinto radial de oito braços após a separação entre a genetriz e sua prole (Kinsley et al., 1999; Pawluski et al., 2006). Por outro lado, ratas sensibilizadas pela exposição diária a filhotes adotivos (SENS) e ratas primíparas privadas de contato com sua prole por 6 horas diárias (PRIV) exibiram alterações de desempenho quando avaliadas durante o período de lactação/exposição aos filhotes. As ratas SENS exibiram um prejuízo para cumprir a tarefa de memória de referência, caracterizado pelas distâncias maiores para encontrar a plataforma. Além disso, essas ratas exibiram velocidades de nado maiores tanto no teste de memória de referência, quanto no teste de memória operacional, indicando um comportamento relacionado à ansiedade e alterações motivacionais. É possível que o prejuízo para cumprir a tarefa e as alterações motivacionais observadas nas ratas SENS estejam relacionados ao estresse gerado pela exposição inicial aos filhotes adotivos, uma vez que durante o início do processo de sensibilização maternal há um conflito entre o comportamento de evitação e aproximação da ninhada, sendo que na grande maioria das vezes a rata tende a evitar os filhotes, chegando, em alguns casos, a cometer infanticídio (Rosenblatt, 1967, Numan & Insel, 2003). Já as ratas PRIV exibiram um desempenho superior em relação aos demais grupos no teste de memória operacional, em

contraste com os resultados obtidos por Pawluski et al. (2006), que mostraram um prejuízo de memória operacional em ratas PRIM que tiveram seus filhotes retirados definitivamente dentro de 24 horas após o nascimento. No entanto, no presente experimento, as fêmeas foram expostas intermitentemente ao contato com os filhotes, o que pode ser considerada uma forma de enriquecimento ambiental (Pawluski & Galea, 2008) que associada às alterações hormonais características do final da gestação e período pós-parto pode ter proporcionado alterações nervosas que resultaram em um desempenho superior na tarefa de memória operacional.

A discrepância entre os resultados observados nos estudos que utilizaram ratas da linhagem Wistar (Zimberknopf et al., 2011; Capítulo I do presente trabalho) e os estudos que mostram melhora significativa de memória espacial em ratas da linhagem Sprague-Dawley (Kinsley et al., 1999; Gatewood et al., 2005; Lambert et al., 2005; Darnaudéry et al., 2007) geraram a hipótese de que o efeito da experiência maternal sobre a memória espacial poderia ser dependente da linhagem de ratas utilizadas. De fato, os resultados apresentados no Capítulo II do presente trabalho mostraram que a experiência maternal gerou maior impacto sobre o desempenho de ratas Sprague-Dawley em relação às ratas da linhagem Wistar, tanto numa tarefa de memória de referência quanto numa tarefa de memória operacional, confirmando hipóteses levantadas em estudos anteriores, sugerindo que ratas maternalmente experientes utilizam estratégias mais eficientes para desempenhar uma tarefa espacial, porém de forma mais pronunciada em ratas da linhagem Sprague-Dawley (Zimberknopf et al., 2011; Capítulo I do presente trabalho). Adicionalmente, ratas PRIM da linhagem Sprague-Dawley exibiram velocidades de nado menores ao cumprir a tarefa, sugerindo baixos níveis de ansiedade em relação aos demais grupos avaliados. Consistentemente com esses resultados, estudos anteriores mostraram que ratas maternalmente experientes exibem menores níveis de ansiedade em relação

às NUL (Wartella et al., 2003 Macbeth et al., 2008), efeito que é dependente da interação física com os filhotes em ratas pós-parturientes (Lonstein, 2005). Ademais, a linhagem por si só mostrou ser uma variável importante em estudos de memória espacial, como observado nas características comportamentais distintas entre as linhagens Sprague-Dawley e Wistar neste estudo. De forma independente da experiência maternal, ratas da linhagem Sprague-Dawley exibiram trajetos menores nas primeiras tentativas tanto no teste de memória de referência quanto no teste de memória operacional, sugerindo que sua estratégia de busca é mais eficiente em relação às ratas da linhagem Wistar. Por outro lado, estas últimas melhoram significativamente os seus desempenhos nas tentativas subsequentes, ao passo que as ratas Sprague-Dawley mantiveram um desempenho similar ao longo das tentativas. Higashida & Ogawa (1987) compararam o desempenho de ratos da linhagem Wistar e Sprague-Dawley em tarefas espaciais no labirinto radial de oito braços e mostraram importantes diferenças de comportamento entre as duas linhagens. Os ratos da linhagem Wistar apresentaram maior atividade locomotora e cumpriram a tarefa em um tempo menor, porém cometeram significantemente mais erros na escolha dos braços reforçados. Adicionalmente, ratos da linhagem Wistar aprendem mais rápido que ratos da linhagem Sprague-Dawley uma tarefa de esquiva quando um choque elétrico é utilizado como estímulo incondicionado (Kuribara et al., 1976). Sugere-se que as diferenças de desempenho espacial entre as linhagens Wistar e Sprague-Dawley residam nas características eletrofisiológicas do hipocampo entre as duas linhagens. Em apoio a essa hipótese, Diana et al. (1994) compararam o desempenho espacial e a porcentagem de indução da potenciação pós-tetânica (PTP) e potenciação de longo prazo (LTP), após estímulo elétrico de 100 Hz em fatias de hipocampo de ratos de ambas as linhagens. Os resultados mostraram que a indução de PTP foi significantemente maior no giro denteado das fatias obtidas

de ratos Sprague-Dawley, enquanto que nenhuma diferença entre as linhagens foi observada na indução de LTP. Interessantemente, os ratos Sprague-Dawley exibiram um melhor desempenho na tarefa espacial, sugerindo que a característica eletrofisiológica distinta observada no giro denteado de ratos Sprague-Dawley pode ter relação com a melhora na memória espacial (Diana et al., 1994).

Os resultados comportamentais apresentados no Capítulo III deste trabalho mostraram que a exposição a um ambiente enriquecido gerou uma alteração no desempenho de ratas PRIM numa tarefa de localização, mas não numa de reconhecimento de objetos, em comparação com ratas NUL expostas às mesmas condições ambientais. Adicionalmente, os resultados mostraram que as ratas NUL e as ratas mantidas em gaiolas comuns de laboratório percorreram distâncias e exibiram velocidades de deslocamento maiores em relação às demais condições reprodutivas e de acondicionamento. Esses resultados sugerem que o ambiente enriquecido associado à experiência maternal gerou alterações em estruturas relacionadas com a memória para disposição espacial de objetos e também proporcionaram um efeito ansiolítico sobre o comportamento dos animais. De fato, estudos anteriores sugerem que as alterações no hipocampo em virtude dos eventos que compõem a experiência maternal tenham relação com o desempenho espacial em ratas (Kinsley et al., 1999; Tomizawa et al., 2003). Adicionalmente, a experiência maternal proporciona redução de comportamentos relacionados à ansiedade e estresse em ratos (Lonstein, 2005; Love et al., 2005; Byrnes & Bridges, 2006; Macbeth et al., 2008), efeito que é dependente da interação com os filhotes (Lonstein, 2005). Similarmente, o ambiente enriquecido é um fator que gera efeitos ansiolíticos em ratos (Roy et al., 2001; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Friske & Gammie, 2005; Leal-Galicia et al., 2007; Hughes & Otto, 2013), possivelmente pelos efeitos estimulatórios da interação social com outros animais e do aumento da atividade exploratória em

virtude da exposição a novos objetos. No entanto, até o presente momento, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos associados da experiência maternal e da exposição a um ambiente enriquecido sobre o comportamento e a neurogênese hipocampal de ratas.

Por fim, os resultados anatômicos descritos no Capítulo III revelaram ausência de diferenças nas taxas de proliferação, diferenciação e maturação/sobrevivência de novas células geradas no giro denteado do hipocampo de ratas Sprague-Dawley, em virtude da experiência maternal e/ou exposição a um ambiente enriquecido por 45 dias. Consistentemente com esses resultados, estudos prévios mostraram que experiência maternal por si só não gera alterações na neurogênese hipocampal adulta quando as fêmeas são avaliadas após o desmame dos filhotes, mas exerce um efeito supressor sobre a proliferação celular durante o período de lactação, possivelmente pelo aumento nos níveis do hormônio corticosterona durante esse período (Leuner et al., 2007). Confirmando esse efeito, Pawluski & Galea (2007) mostraram uma redução acentuada no número de novas células no giro denteado de ratas em período de lactação. Dessa forma é possível que a variação na neurogênese hipocampal em ratas maternalmente experientes seja um efeito dependente do momento em que os animais são avaliados.

No conjunto, os experimentos que compõem o presente trabalho mostraram que diferentes formas de experiência maternal geram alterações distintas sobre a memória espacial de ratas, porém de forma dependente do momento em que os animais são avaliados e da linhagem utilizada, sendo observadas alterações mais pronunciadas em ratas da linhagem Sprague-Dawley. Por fim, a experiência maternal associada à exposição a um ambiente enriquecido exerceram efeitos sutis sobre a memória para disposição espacial de objetos, mas mostraram efeitos ansiolíticos significativos sobre o comportamento dos animais. Adicionalmente, a neurogênese hipocampal adulta não é alterada em virtude da experiência maternal de forma isolada ou em

associação com a exposição a um ambiente de maior complexidade. Esses resultados acrescentam e reforçam a literatura da área, mostrando que o encéfalo materno é modulado por uma série de fatores internos e externos, os quais contribuem para as adaptações nervosas necessárias para garantir a sobrevivência da prole e da própria genetriz.

Referências Bibliográficas

Abramov, U; Puussaar, T; Raud, S; Kurrikoff, K, et al. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. Neurosci. Lett., 443(3): 223-227, 2008.

Adams, MM; Fink, SE; Janssen, WG; Shah, RA, et al. Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. J. Comp. Neurol., 47: 419-426, 2004.

Aimone, JB; Deng, W; Gage, FH. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. Neuron, 70(4):589-596, 2011.

Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? Science, 135(3509):1127-1128, 1962.

Altman, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. Anat. Rec., 145, 573-591, 1963.

Altman, J & Das, GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J. Comp. Neurol. 124(3):319-335, 1965.

Altman, J. & Das, GD. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J. Comp. Neurol., 126(3):337-389, 1966.

Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis .II. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in infant rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. J. Comp. Neurol., 128, 431-474, 1966.

Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. J. Comp. Neurol., 137(4):433-457, 1969.

Andersen, P; Morris, R; Amaral, D; Bliss, T, et al. The hippocampal formation. Em: Andersen, P; Morris, R; Amaral, D; Bliss, T; O'Keefe, J (Eds), The hippocampus book. Oxford University Press, Oxford, p. 3-8, 2007.

Atkinson, HC; Waddell, BJ. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rat pregnancy and lactation: circadian variation and interrelationship of plasma adrenocorticotropin and corticosterone. Endocrinology, 136(2): 512-520, 1995.

Auer, RN; Jensen, ML; Whishaw, IQ. Neurobehavioral deficit due to ischemic brain damage limited to half of the CA1 sector of the hippocampus. J. Neurosci., 9(5):1641-1647, 1989.

Balderas, I; Rodriguez-Ortiz, CJ; Salgado-Tonda, P; Chavez-Hurtado, J, et al. The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. Learn. Mem., 15(9):618-624, 2008.

Barha, CK; Ishrat, T; Epp, JR; Galea, LA, et al. Progesterone treatment normalizes the levels of cell proliferation and cell death in the dentate gyrus of the hippocampus after traumatic brain injury. Exp. Neurol., 1(1):72-81, 2011.

Barha, CK; Lieblich, SE; Galea, LA. Different forms of oestrogen rapidly upregulate cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. J. Neuroendocrinol., 21(3):155-166, 2009.

Bakowska, JC & Morrell, JI. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. J. Comp. Neurol., 386(2):161-177, 1997.

Beck, CW. Mode of fertilization and parental care in anurans. Anim. Behav., 55:439-449, 1998.

Benaroya-Milshtein, N; Hollander, N; Apter, A; Kukulansky, T, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. Eur. J. Neurosci., 20(5):1341-1347, 2004.

Bethea, CL; Lu, NZ; Gundlah, C; Streicher, JM. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. Front. Neuroendocrinol., 23(1):41-100, 2002.

Bodensteiner, KJ; Cain, P; Ray, AS; Hamula, LA. Effects of pregnancy on spatial cognition in female Hooded Long-Evans rats. Horm Behav., 49(3): 303-314, 2006.

Bohacek, J; Bearl, AM; Daniel, JM. Long-term ovarian hormone deprivation alters the ability of subsequent oestradiol replacement to regulate choline acetyltransferase protein levels in the hippocampus and prefrontal cortex of middle-aged rats. J. Neuroendocrinol., 20(8):1023-1027, 2008.

Bowman, RE; Zrull, MC; Luine, VN. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. Brain Res., 904(2): 279-89, 2001.

Bridges, RS. A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. Endocrinology, 114(3):930-940, 1984.

Bridges, RS & Byrnes, EM. Reproductive experience reduces circulating 17beta-estradiol and prolactin levels during proestrus and alters estrogen sensitivity in female rats. Endocrinology, 147(5):2575-2582, 2006.

Bridges, RS; DiBiase, R; Loundes, DD; Doherty, PC. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. Science, 227(4688):782-784, 1985.

Bridges, RS; Numan, M; Ronsheim, PM; Mann, PE, et al. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 87(20):8003-8007, 1990.

Bridges, RS; Robertson, MC; Shiu, RP; Friesen, HG, et al. Endocrine communication between conceptus and mother: placental lactogen stimulation of maternal behavior. Neuroendocrinology, 64(1):57-64, 1996.

Bridges, RS; Robertson, MC; Shiu, RP; Sturgis, JD, et al. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. Endocrinology, 138(2):756-763, 1997.

Bridges, RS; Scanlan, VF. Maternal memory in adult, nulliparous rats: effects of testing interval on the retention of maternal behavior. Dev. Psychobiol., 46(1): 13-18, 2005.

Brown, JP; Couillard-Després, S; Cooper-Kuhn, CM; Winkler, J, et al. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. J. Comp. Neurol., 467(1):1-10, 2003.

Brown, RE & Wong, AA. The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice. Learn. Mem., 14(3): 134-144, 2007.

Brown, JR; Ye, H; Bronson, RT, Dikkes, P, et al. A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene fosB. Cell, 86(2):297-309, 1996.

Brummelte, S; Galea, LA. Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. Horm. Behav., 58(5):769-779, 2010.

Burgess, N; Recce, M; O'Keefe, J. A model of hippocampal function. Neural Networks, 7(6-7): 1065-1081, 1994.

Burghardt, NS; Park, EH; Hen, R; Fenton, AA. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. Hippocampus, 22(9):1795-1808, 2012.

Byrnes, EM & Bridges RS. Reproductive experience alters anxiety-like behavior in the female rat. Horm. Behav., 50(1):70-76, 2006.

Cameron, HA & McKay, RD. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. J. Comp. Neurol., 435(4):406-417, 2001.

Clutton-Brock, TH. The Evolution of Parental Care. Princeton (NJ): Princeton University Press, 1991.

Coburn-Litvak, PS; Pothakos, K; Tata, DA; McCloskey, DP; et al. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. Neurobiol. Learn. Mem., 80(1):11-23, 2003.

Cockburn, A. Prevalence of different modes of parental care in birds. Proceedings of the Royal Society B 273, 1375-1383, 2006.

Cohn, J & Gerall, AA. Pre and postpuberal medial preoptic area lesions and maternal behavior in the rat. Physiol. Behav., 46(2):333-336, 1989.

Couillard-Despres, S; Winner, B; Schaubeck, S; Aigner, R, et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. Eur. J. Neurosci., 21(1):1-14, 2005.

da Costa, AP; Wood, S; Ingram, CD; Lightman, SL. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. Brain Res., 742(1-2):177-184, 1996.

Darnaudéry, M; Perez-Martin, M; Del Favero, F; Gomez-Roldan, C, et al. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. Psychoneuroendocrinology, 32(7):803-812, 2007.

Deng, W; Mayford, M; Gage, FH. Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice. Elife, 2:e00312, 2013.

Deng, W; Saxe, MD; Gallina, IS; Gage, FH. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. J. Neurosci., 2009.

de Quervain, DJ; Roozendaal, B; McGaugh, JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. Nature, 394(6695):787-790, 1998.

Dere, E; Huston, JP; De Souza Silva, MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. Neurosci Biobehav Rev. 31(5):673-704, 2007.

D'Hooge, R; De Deyn, PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Rev. 36(1): 60-90, 2001.

Diana, G; Domenici, MR; Loizzo, A; Scotti de Carolis, A, et al. Age and strain differences in rat place learning and hippocampal dentate gyrus frequency-potentiation. Neurosci. Lett., 171(1-2): 113-6, 1994.

Dohanich, GP; Korol, DL; Shors, T. Steroids, learning and memory. Em: Hormones, Brain and Behavior, (Second Edition, Vol. 1), edited by D. W. Pfaff, A. P. Arnold, A, M. Etgen, S. E. Fahrbach, and R. T. Rubin. San Diego: Academic Press, pp. 539-576, 2009.

Eisch, AJ; Barrot, M; Schad, CA; Self, DW, et al. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 97(13):7579-7584, 2000.

Eichenbaum, H; Stewart, C; Morris, RG. Hippocampal representation in place learning. J. Neurosc., 10(11):3531-3542, 1990.

Epp, JR; Haack, AK; Galea, LA. Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. Neurobiol. Learn. Mem., 95(3):316-325., 2011.

Epp, JR; Scott, NA; Galea, LA. Strain differences in neurogenesis and activation of new neurons in the dentate gyrus in response to spatial learning. Neuroscience, 172: 342-354, 2011.

Eriksson, PS; Perfilieva, E; Björk-Eriksson, T; Alborn, AM, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat. Med., 4(11):1313-1317, 1998.

Fahrbach, SE; Morrell, JI; Pfaff, DW. Oxytocin induction of short-latency maternal behavior in nulliparous, estrogen-primed female rats. Horm. Behav., 18(3):267-286, 1984.

Fahrbach, SE & Pfaff, DW. Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. Horm. Behav., 20(3):354-363, 1986.

Fleming, AS & Luebke, C. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. Physiol. Behav., 27(5):863-868, 1981.

Fleming, AS; Miceli, M; Moretto, D. Lesions of the medial preoptic area prevent the facilitation of maternal behavior produced by amygdala lesions. Physiol. Behav., 31(4):503-510, 1983.

Fleming, AS; Rosenblatt, JS. Maternal behavior in the virgin and lactating rats. J. Comp. Physiol. Psychol., 86(5): 957-972, 1974.

Fleming, AS & Walsh, C. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. Psychoneuroendocrinology, 19(5-7):429-443, 1994.

Friske, JE & Gammie, SC. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. Physiol. Behav., 85(2):187-194, 2005.

Furuta, M & Bridges, RS. Effects of maternal behavior induction and pup exposure on neurogenesis in adult, virgin female rats. Brain Res. Bull., 80(6):408-413., 2009.

Gage, FH. Neurogenesis in the adult brain. J. Neurosci., 22(3): 612-613, 2002.

Galea, LA. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. Brain Res. Rev. 57(2):332-341, 2008.

Galea, LA; Kavaliers, M; Ossenkopp, KP. Sexually dimorphic spatial learning in meadow voles Microtus pennsylvanicus and deer mice Peromyscus maniculatus. J. Exp. Biol. (Pt 1): 195-200, 1996.

Galea, LA; Ormerod, BK; Sampath, S; Kostaras, X, et al. Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats. Horm. Behav., 37(1):86-95, 2000.

Galea, LA; Uban, KA; Epp, JR; Brummelte, S, et al. Endocrine regulation of cognition and neuroplasticity: our pursuit to unveil the complex interaction between hormones, the brain, and behaviour. Can. J. Exp. Psychol., 62(4):247-260, 2008.

Gallagher, M & Holland, PC. Preserved configural learning and spatial learning impairment in rats with hippocampal damage. Hippocampus, 2(1):81-88, 1992.

Galvão, RP; Garcia-Verdugo, JM; Alvarez-Buylla, A. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. J. Neurosci., 28(50):13368-13383, 2008.

Garthe, A; Behr, J; Kempermann, G. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. PLoS One, 4(5):e5464, 2009.

Gatewood, JD; Morgan, MD; Eaton, M; McNamara, IM; et al. Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. Brain Res. Bull., 66: 91-98, 2005.

Gaulin, SJ; FitzGerald, RW; Wartell, MS. Sex differences in spatial ability and activity in two vole species (Microtus ochrogaster and M. pennsylvanicus). J. Comp. Psychol., 104(1): 88-93, 1990.

Gerlai, R. Behavioral tests of hippocampal function: simple paradigms complex problems. Behav Brain Res., 125(1-2):269-277, 2001.

Goldman, SA & Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 80(8):2390-2394, 1983.

Good, MA; Barnes, P; Staal, V; McGregor, A, et al. Context-but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. Behav Neurosci., 121(1):218-223, 2007.

Gould, E; Tanapat, P; Rydel, T; Hastings, N. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. Biol. Psychiatry., 48(8):715-720, 2000.

Gubernick, DJ & Teferi, T. Adaptive significance of male parental care in a monogamous mammal. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 267:147–150, 2000.

Gross, MR & Shine, R. Parental care and mode of fertilization in ectothermic vertebrates. Evolution, 35(4):775-793, 1981.

Hao, J; Rapp, PR; Janssen, WG; Lou, W, et al. Interactive effects of age and estrogen on cognition and pyramidal neurons in monkey prefrontal cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 104(27):11465-11470, 2007.

Hapon, MB; Simoncini, M; Via, G; Jahn, GA. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. Reproduction, 126(3): 371-382, 2003.

Harker, KT; Whishaw, IQ. Impaired spatial performance in rats with retrosplenial lesions: importance of the spatial problem and the rat strainin identifying lesion effects in a swimming pool. J. Neurosci., 22(3):1155-1164, 2002.

Hastings, NB & Gould, E. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. J. Comp. Neurol., 413(1):146-154, 1999.

Hayes, NL & Nowakowski, RS. Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. Dev. Neurosci., 22(1-2):44-55, 2000.

Higashida, A; Ogawa, N. Differences in the acquisition process and the effect of scopolamine on radial maze performance in three strains of rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 27(3):483-489, 1987.

Hollaway, WR; Dollinger, MJ; Denenberg, VH. Parturition in the rat: description and assessment. Em: Bell, RW & Smotherman, WP (Ed), Maternal influences and early behavior. SP Med. Sci. Books, New York, p. 1-26, 1980.

Hrdy, SB. Mother Nature: A history of mothers, infants, and natural selection. New York: Pantheon, 1991.

Hughes, RN & Otto, MT. Anxiolytic effects of environmental enrichment attenuate sex-related anxiogenic effects ofscopolamine in rats. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry., 40:252-259, 2013.

Ishikawa, A. & Nakamura, S. Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat. J. Neurosci., 23(31):9987-9995, 2003.

Jacobson, CD; Terkel, J; Gorski, RA; Sawyer, CH. Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. Brain Res., 194(2):471-478, 1980.

Kempermann, G; Kuhn, HG; Gage, FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. Nature, 386(6624):493-495, 1997.

Kempermann, G; Kuhn, HG; Gage, FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. J. Neurosci., 18(9):3206-3212, 1998.

Kesner, RP; Hunt, ME; Williams, JM; Long, JM. Prefrontal cortex and working memory for spatial response, spatial location, and visual object information in the rat. Cereb. Cortex., 6(2):311-318, 1996.

Keverne, EB; Fundele, R; Narasimha, M; Barton, SC, et al. Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. Brain Res. Dev. Brain Res., 92(1):91-100, 1996.

Keyser-Marcus, L; Stafisso-Sandoz, G; Gerecke, K; Jasnow, A, et al. Alterations of preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. Brain Res. Bull., 55(6):737-745, 2001.

Kinsley, CH & Lambert, KG. The maternal brain: pregnancy and motherhood change the structure of the female mammal's brain, making mothers attentive to their young and better at caring for them. Sci. Am., 294, 72-79, 2006.

Kinsley, CH; Madonia, L; Gifford, GW; Tureski, K, et al. Motherhood improves learning and memory. Nature. 402: 137-138, 1999.

Kinsley, CH; Meyer, E; Rafferty, KA. Sex steroid hormone determination of the maternal brain: effects beyond reproduction. Mini Rev. Med. Chem., 12(11):1063-1070, 2012.

Kinsley, CH; Trainer, R; Stafisso-Sandoz, G; Quadros, P, et al. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. Horm. Behav. 49(2): 131-142, 2006.

Kitamura, T; Saitoh, Y; Takashima, N; Murayama, A, et al. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. Cell, 139(4):814-827, 2009.

Kleiman, DG & Malcolm JR. The evolution of male parental investment in mammals. In: DJ, Gubernick & PH, Klopfer (eds), Parental care in mammals, pp. 347-387. Plenum Press: New York, 1981.

Kokko, H & Jennions, MD. Parental investment, sexual selection and sex ratios. J. Evol Biol., 21(4):919-948, 2008.

Korányi, L; Phelps, CP; Sawyer, CH. Changes in serum prolactin and corticosterone in induced maternal behavior in rats. Physiol. Behav., 18(2):287-292, 1977.

Kornack, DR & Rakic, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 96(10):5768-5773, 1999.

Kuribara, H; Ohashi, K; Tadokoro, S. Rat strain differences in the acquisition of conditioned avoidance responses and in the effects of diazepam. Jpn. J. Pharmacol., 26(6):725-735, 1976.

Lambert, KG. The life and career of Paul MacLean. A journey toward neurobiological and social harmony. Physiol. Behav., 79(3):343-349, 2003.

Lambert, KG; Berry, AE; Griffins, G; Amory-Meyers, E., et al. Pup exposure differentially enhances foraging ability in primiparous and nulliparous rats. Physiol. Behav., 84(5):799-806, 2005.

Langston, RF & Wood, ER. Associative recognition and the hippocampus: differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. Hippocampus., 20(10):1139-1153, 2010.

Leal-Galicia, P; Saldívar-González, A; Morimoto, S; Arias, C. Exposure to environmental enrichment elicits differential hippocampal cell proliferation: role of individual responsiveness to anxiety. Dev. Neurobiol., 67(4):395-405, 2007.

Lee, AW & Brown, RE. Comparison of medial preoptic, amygdala, and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (Peromyscus californicus). Physiol. Behav., 92(4):617-628, 2007.

Lemaire, V; Billard, JM; Dutar, P; George, O, et al. Motherhood-induced memory improvement persists across lifespan in rats but is abolished by a gestational stress. Eur. J. Neurosci., 23(12):3368-3374, 2006.

Leon, M & Woodside, B. Energetic limits on reproduction: maternal food intake. Physiol. Behav., 30(6):945-957, 1983.

Leuner, B; Mirescu, C; Noiman, L; Gould, E. Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. Hippocampus, 17(6):434-442, 2007.

Leuner, B; Shors, TJ. Learning during motherhood: A resistance to stress. Horm. Behav. 50(1):38-51, 2006.

Lonstein, JS. Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. Horm. Behav., 47(3):241-255, 2005.

Lonstein, JS & Morrell, JI. Neuropharmacology and neuroendocrinology of maternal motivation and behavior. Em: Blaustein, JD (Ed), Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology, vol 18 - Behavioral Neurobiology. Springer Press, p. 195-245, 2007.

Love, G.; Torrey, N.; McNamara, I.; Morgan, M., et al. Maternal experience produces long-lasting behavioral modifications in the rat. Behav. Neurosci. 119(4):1084-1096, 2005.

Macbeth, AH; Gautreaux, C; Luine, VN. Pregnant rats show enhanced spatial memory, decreased anxiety, and altered levels of monoaminergic neurotransmitters. Brain Res., 1241:136-147, 2008a.

Macbeth, AH; Scharfman, HE; Maclusky, NJ; Gautreaux, C, et al. Effects of multiparity on recognition memory, monoaminergic neurotransmitters, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Horm Behav., 54(1):7-17, 2008b.

MacLean, PD. Women: a more balanced brain. Zygon, 31:421–439, 1996.

MacLean PD. Em: Squire, L (Ed), The history of neuroscience in autobiography. Academic Press, New York, p. 245– 275, 1999.

Madsen, TM; Kristjansen, PE; Bolwig, TG; Wörtwein, G. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. Neuroscience, 119(3):635-642, 2003.

Magavi, SS; Leavitt, BR; Macklis, JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature, 405(6789):951-955, 2000.

Magavi, SS & Macklis, JD. Identification of newborn cells by BrdU labeling and immunocytochemistry in vivo. Methods Mol. Biol., 438:335-343, 2008.

Manahan-Vaughan, D; Schwegler, H. Strain-dependent variations in spatial learning and in hippocampal synaptic plasticity in the dentate gyrus of freely behaving rats. Front. Behav. Neurosci., 5:7, 2011.

Mann, PE & Bridges, RS. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. Prog. Brain Res., 133:251-262, 2001.

Manns, JR & Eichenbaum, H. A cognitive map for object memory in the hippocampus. Learn. Mem., 16(10):616-624, 2009.

Mattson, BJ; Williams, S; Rosenblatt, JS; Morrell, JI. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. Behav. Neurosci., 115(3):683-694, 2001.

McClure, RE; Barha, CK; Galea, LA. 17β-Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. Horm. Behav. 63(1):144-157, 2013.

McEwen, BS. Corticosteroids and hippocampal plasticity. Ann. N Y Acad. Sci., 746:134-142, 1994.

McLay, RN; Freeman, SM; Zadina, JE. Chronic corticosterone impairs memory performance in the Barnes maze. Physiol. Behav., 63(5):933-937, 1998.

McNaughton, BL; Barnes, CA; Meltzer, J; Sutherland, RJ. Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. Exp. Brain Res., 76(3):485-496, 1989.

Mennella, JA & Moltz, H. Pheromonal emission by pregnant rats protects against infanticide by nulliparous conspecifics. Physiol. Behav., 46(4):591-595, 1989.

Morris, RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. Learn. Motiv., 12(2): 239-260, 1981.

Morris, R. The hippocampal formation. Em: Andersen, P; Morris, R; Amaral, D; Bliss, T; O'Keefe, J (Eds), The hippocampus book. Oxford University Press, Oxford, p. 581-713, 2007.

Morris, RG; Garrud, P; Rawlins, JN; O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature, 297(5868):681-683, 1982.

Morris, RG; Schenk, F; Tweedie, F; Jarrard, LE. Ibotenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. Eur. J. Neurosc., 2(12):1016-1028, 1990.

Mullen, RJ; Buck, CR; Smith, AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development, 116(1):201-211, 1992.

Mumby, DG; Gaskin, S; Glenn, MJ; Schramek, TE, et al. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. Learn Mem. 9(2):49-57, 2002.

Nilsson, M; Perfilieva, E; Johansson, U; Orwar, O, et al. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. J. Neurobiol., 39(4):569-578, 1999.

Numan, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 87(4): 746-759, 1974.

Numan, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. Behav. Cogn. Neurosci. Rev., 5(4):163-190, 2006.

Numan, M & Insel, TR. The Neurobiology of Parental Behavior. New York: Springer, 2003.

Numan, M & Numan, MJ. Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fosduring maternal behavior in female rats. J. Neuroendocrinol., 9(5):369-384, 1997.

Numan, M; Numan, MJ; Marzella, SR; Palumbo, A. Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. Brain Res., 792(2):348-352, 1998.

Numan, M; Roach, JK; del Cerro, MC; Guillamón, A, et al. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. Brain Res., 830(2):358-571, 1999.

Numan, M; Rosenblatt, JS; Komisaruk, BR. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. J. Comp. Physiol. Psychol., 91(1):146-164, 1977.

Numan, M & Stolzenberg, DS. Hypothalamic interaction with the mesolimbic dopamine system and the regulation of maternal responsiveness. Em: Bridges, RS (Ed), Neurobiology of the parental brain. Academic Press, London, p. 3-22, 2008.

O'Keeffe, GC; Barker, RA; Caldwell, MA. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. Cell Cycle, 8(18):2888-2894, 2009.

O'Keefe, J; Conway, DH. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. Exp. Brain Res., 31(4):573-590, 1978.

O'Keefe, J & Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. Brain Res. 34(1):171-175, 1971.

O'Keefe, J & Nadel, L. The hippocampus as a cognitive map. Oxford University Press, Oxford, 1978.

Olton, DS. Mazes, maps, and memory. Am. Psychol., 34(7): 583-596, 1979.

Olton, DS. Memory functions and the hippocampus. Em: Seifert, W (Ed), Neurobiology of the hippocampus. Academic Press, London, p. 335-332, 1983.

Olton, DS & Papas, BC. Spatial memory and hippocampal function. Neuropsychologia, 17(6):669-682, 1979.

Oxley, G & Fleming, AS. The effects of medial preoptic area and amygdala lesions on maternal behavior in the juvenile rat. Dev. Psychobiol., 37(4):253-265, 2000.

Paris, JJ; Walf, AA; Frye, CA. Cognitive performance of middle-aged female rats is influenced by capacity to metabolize progesterone in the prefrontal cortex and hippocampus. Brain Res., 1379:149-163, 2011.

Pawluski, JL; Barakauskas, VE; Galea, LA. Pregnancy decreases oestrogen receptor alpha expression and pyknosis, but not cell proliferation or survival, in the hippocampus. J. Neuroendocrinol. 22(4):248-257, 2010.

Pawluski, JL & Galea, LA. Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. J. Neurobiol., 66(1): 71-81, 2005.

Pawluski, JL & Galea, LA. Reproductive experience alters hippocampal neurogenesis during the postpartum period in the dam. Neuroscience, 149(1):53-67, 2007.

Pawluski, JL & Galea, LA. The role of reproductive experience on hippocampal function and plasticity. Em: Bridges, RS (Ed), Neurobiology of the parental brain. Academic Press, London, p. 493-508, 2008.

Pawluski, JL; Vanderbyl, BL; Ragan, K; Galea, LA. First reproductive experience persistently affects spatial reference and working memory in the mother and these effects are not due to pregnancy or "mothering" alone. Behav. Brain. Res., 175(1): 157-165, 2006a.

Pawluski, JL; Walker, SK; Galea, LA. Reproductive experience differentially affects spatial reference and working memory performance in the mother. Horm. Behav., 49(2):143-149, 2006b.

Pedersen, CA; Ascher, JA; Monroe, YL; Prange, AJ Jr. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. Science, 216(4546):648-650, 1982.

Reynolds, JD et al. Evolutionary transitions in parental care and live bearing in vertebrates. Philosophical Transactions of the Royal Society B 357, 269-281, 2002.

Rhodes, JS; van Praag, H; Jeffrey, S; Girard, I, et al. Exercise increases hippocampal neurogenesis to high levels but does not improve spatial learning in mice bred for increased voluntary wheel running. Behav Neurosci. 117(5):1006-1016, 2003.

Rosenblatt, JS. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. Science, 156(3781):1512-1514, 1967.

Rosenblatt, JS & Ceus, K. Estrogen implants in the medial preoptic area stimulate maternal behavior in male rats. Horm. Behav., 33(1):23-30, 1998.

Rosenblatt, JS; Olufowobi, A; Siegel, HI. Effects of pregnancy hormones on maternal responsiveness, responsiveness to estrogen stimulation of maternal behavior, and the lordosis response to estrogen stimulation. Horm. Behav., 33(2):104-114, 1998.

Rosenblatt, JS; Siegel, HI; Mayer, AD. Blood levels of progesterone,estradiol and prolactin in pregnat rats. Adv. Study Behav., 10: 225-311, 1979.

Rosenblatt, JS; Wagner, CK; Morrell, JI. Hormonal priming and triggering of maternal behavior in the rat with special reference to the relations between estrogen receptor binding and ER mRNA in specific brain regions. Psychoneuroendocrinology. 19(5-7):543-552, 1994.

Rosenzweig, MR. Environmental complexity, cerebral change, and behavior. Am. Psychol., 21(4):321-332, 1966.

Roy, V; Belzung, C; Delarue, C; Chapillon, P. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. Physiol. Behav., 74(3):313-320, 2001.

Rubin, BS; Menniti, FS; Bridges, RS. Intracerebroventricular administration of oxytocin and maternal behavior in rats after prolonged and acute steroid pretreatment. Horm. Behav., 17(1):45-53, 1983.

Shanks, N; Windle, RJ; Perks, P; Wood, S, et al. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin is attenuated during lactation. J. Neuroendocrinol., 11(11):857-865, 1999.

Shapiro, ML; Tanila, H; Eichenbaum, H. Cues that hippocampal place cells encode: dynamic and hierarchical representation of local and distal stimuli. Hippocampus, 7(6):624-642, 1997.

Shughrue, PJ; Lane, MV; Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. J. Comp. Neurol., 388(4):507-525, 1997.

Silva, IS; Freeman, KC; Kinsley, CH. The parents of neuroscience and the neuroscience of parents. Estud. Biol. Ambi. Divers., 34(83):113-127, 2012.

Stack, EC; Balakrishnan, R; Numan, MJ; Numan, M. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. Behav. Brain Res., 131(1-2):17-36, 2002.

Stack, EC & Numan, M. The temporal course of expression of c-Fos and Fos B within the medial preoptic area and other brain regions of postpartum female rats during prolonged mother-young interactions. Behav. Neurosci., 114(3):609-622, 2000.

Stafisso-Sandoz, G; Polley, D; Holt, E; Lambert, KG, et al. Opiate disruption of maternal behavior: morphine reduces, and naloxone restores, c-fos activity in the medial preoptic area of lactating rats. Brain Res. Bull., 45(3): 307-313, 1998.

Stein-Behrens, BA; Lin, WJ; Sapolsky, RM. Physiological elevations of glucocorticoids potentiate glutamate accumulation in the hippocampus. J. Neurochem., 63(2):596-602, 1994.

Stern, JM. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. Dev. Psychobiol, 31:19-37, 1997.

Stern, JM; Goldman, L; Levine, S. Pituitary-adrenal responsiveness during lactation in rats. Neuroendocrinology, 12(3):179-191, 1973.

Stern, JM & Keer, SE. Acute hunger of rat pups elicits increased kyphotic nursing and shorter intervals between nursing bouts: implications for changes in nursing with time postpartum. J. Comp. Psychol., 116(1):83-92, 2002.

Stern, JM & Lonstein, JS. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. Prog. Brain Res., 133:263-278, 2001.

Stern, JM & Mackinnon, DA. Postpartum, hormonal, and nonhormonal induction of maternal behavior in rats: effects on T-maze retrieval of pups. Horm. Behav., 7(3):305-316, 1976.

Swanson, LW. The hippocampus and the concept of limbic system. Em: Seifert, W (Ed), Neurobiology of the hippocampus. Academic Press, London, p. 3-19, 1983.

Sztainberg, Y; Kuperman, Y; Tsoory, M; Lebow, M, et al. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type1. Mol. Psychiatry., 15(9):905-917, 2010.

Tanapat, P; Galea, LA; Gould, E. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. Int. J. Dev. Neurosci., 16(3-4):235-239, 1998.

Tanapat, P; Hastings, NB; Reeves, AJ; Gould, E. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. J. Neurosci., 19(14):5792-5801, 1999.

Tanapat, P; Hastings, NB; Gould, E. Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose and time dependent manner. J. Comp. Neurol., 481(3):252-265, 2005.

Tolman, EC. Cognitive maps in rats and men. Psychol. Rev., 55(4):189-208, 1948.

Tomizawa, K; Iga, N; Lu, YF; Moriwaki, A., et al. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. Nat. Neurosci. 6(4): 384-390, 2003.

van der Staay, FJ. Spatial working memory and reference memory of Brown Norway and WAG rats in a holeboard discrimination task. Neurobiol. Learn. Mem., 71(1): 113-125, 1999.

van Praag, H; Christie, BR; Sejnowski, TJ; Gage, FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 96(23):13427-13431, 1999.

van Praag, H; Kempermann, G; Gage, FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat. Neurosci., 2(3):266-270, 1999.

van Praag, H; Kempermann, G; Gage, FH. Neural consequences of environmental enrichment. Nat. Rev. Neurosci., 1(3):191-198, 2000.

van Praag, H; Schinder, AF; Christie, BR; Toni, N, et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. Nature, 415(6875):1030-1034, 2002.

Walsh, RN. Effects of environmental complexity and deprivation on brain anatomy and histology: a review. Int. J. Neurosci., 12(1):33-51, 1981.

Wamboldt, MZ & Insel, TR. The ability of oxytocin to induce short latency maternal behavior is dependent on peripheral anosmia. Behav. Neurosci., 101(3):439-441, 1987.

Wartella, J; Amory, E; MacBeth, AH; McNamara, I; et al. (2003). Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. Physiol. Behav., 79:373-381, 2003.

Weiland, NG; Orikasa, C; Hayashi, S; McEwen, BS. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male andfemale rats. J. Comp. Neurol., 388(4):603-612, 1997.

Wellman, J; Carr, D; Graham, A; Jones, H, et al. Preoptic area infusions of morphine disrupt - and naloxone restores - parental-like behavior in juvenile rats. Brain Res. Bull., 44(2): 183-191, 1997.

Whishaw, IQ & Mittleman, G. Visits to starts, routes, and places by rats (Rattus norvegicus) in swimming pool navigation tasks. J. Comp. Psychol., 100(4):422-431, 1986.

Williams, George C. Adaptation and Natural Selection. Princeton: Princeton University Press. 1966.

Windle, RJ; Wood, S; Shanks, N; Perks, P, et al. Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. J. Neuroendocrinol., 9(6):407-414, 1997.

Winocur, G; Becker, S; Luu, P; Rosenzweig, S, et al. Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. Behav. Brain Res., 227(2):464-469, 2012.

Wiskott, L; Rasch, MJ; Kempermann, G. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. Hippocampus, 16(3):329-343, 2006.

Witty, CF; Gardella, LP; Perez, MC, Daniel, JM. Short-term estradiol administration in aging ovariectomized rats provides lasting benefits for memory and the hippocampus: a role for insulin-like growth factor-I. Endocrinology, 154(2): 842-852, 2013.

Wong-Goodrich, SJ; Glenn, MJ; Mellott, TJ; Liu, YB, et al. Water maze experience and prenatal choline supplementation differentially promote long-term hippocampal recovery from seizures in adulthood. Hippocampus, 21(6):584-608, 2011.

Wooley, C.S.; McEwen, B.S. Estradiol mediates fluctuations in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. J. Neurosci., 12(7): 2549-2554, 1992.

Woolley, CS; Weiland, NG; McEwen, BS; Schwartzkroin, PA. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. J Neurosci., 17(5):1848-1859, 1997.

Wyss, JM; Chambless, BD; Kadish, I; van Groen, T. Age-related decline in water learning and memory in rats: strain differences. Neurobiol. Aging, 21(5): 671-681, 2000.

Xavier, GF; Costa, VC. Dentate gyrus and spatial behaviour. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry., 33(5):762-773, 2009.

Xavier, GF; Oliveira-Filho, JB; Santos, AMG. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? Hippocampus, 9(6): 668-681, 1999.

Xavier, GF; Stein, C; Bueno, OF. Rats with dorsal hippocampal lesions do react to new stimuli but not to spatial changes of known stimuli. Behav Neural Biol. 54(2):172-183, 1990.

Xing, S; He, Y; Ling, L; Hou, Q, et al. Blockade of EphB2 enhances neurogenesis in the subventricular zone and improves neurological function after cerebral cortical infarction in hypertensive rats. Brain Res., 1230:237-246, 2008.

Yoerg, SI; Kamil, AC. Response strategies in the radial arm maze: Running around in circles. Anim. Learn. Behav., 10(4):530-534, 1982.

Zeh, DW & Smith, RL. Paternal investment by terrestrial arthropods. Amer. Zool., 25(3):785-805, 1985.

Zimberknopf, E; Xavier, GF; Kinsley, CH; Felicio, LF. Prior parity positively regulates learning and memory in young and middle-aged rats. Comp. Med., 61(4):366-377, 2011.

Anexo - Parecer do comitê de ética em experimentação animal do IB

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

Instituto de Biociências

OF.CEA/IB/034/2008
Ref. 2008.1.412.41.3

São Paulo, 01 de agosto de 2008.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB, em reunião realizada no dia 31/07/2008, **APROVOU** o Projeto "A experiência maternal em ratas altera funções de memória?" - **Protocolo 062/2008**, de sua responsabilidade.

Atenciosamente.

Profa. Dra. Eleonora Trajano
Coordenadora da Comissão de Ética em uso de Animais Vertebrados em Experimentação do IB

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. GILBERTO FERNANDO XAVIER
Departamento de Fisiologia do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-900 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - http://www.ib.usp.br