JOÃO ANTONIO GIMENES JÚNIOR

**BUSCA ALIMENTAR, MEMÓRIA ESPACIAL E ANSIEDADE EM RATOS:
POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO MAMILAR MEDIAL**

**SÃO PAULO
2008**

JOÃO ANTONIO GIMENES JÚNIOR

BUSCA ALIMENTAR, MEMÓRIA ESPACIAL E ANSIEDADE EM RATOS:
POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO NÚCLEO MAMILAR MEDIAL

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências, na área de Fisiologia Geral.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Fernando
Xavier

SÃO PAULO
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS/USP

Gimenes-Júnior, João Antonio

G 491b Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em
ratos: possível participação do núcleo mamilar medial /
João Antonio Gimenes Júnior. -- São Paulo : J. A. G. J.
2008
163 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia,
2008.

1. aprendizagem e memória espacial 2. busca
alimentar 3. tarefa de aprendizagem de pares associados
4. núcleo mamilar medial 5. ansiedade I. Universidade
de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento
de Fisiologia. II. Título.

LC QP 408
QP 406

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Antonio Gimenes Júnior

Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em ratos: possível participação do núcleo mamilar medial

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiologia Geral.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dissertação defendida e aprovada em: ____/____/____

Dedico este trabalho ao meu pai, João,
às minhas duas mães, Maria e Roseli,
e ao meu irmão, Marcelo. Agradeço
por excederem, sempre, às minhas
expectativas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e por todo o amparo.

Ao Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, por ter oferecido os recursos necessários para a realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho (Processo nº 05/52043-9).

Ao Prof. Gilberto Xavier, por ter me admitido como aluno, me confiado este projeto e me ajudado a resolver os problemas de forma inteligente, crítica e criativa. Por todas as oportunidades de aprendizagem que muito contribuíram para a minha formação profissional.

Ao Prof. Newton Canteras, pela boa vontade com que disponibilizou o seu laboratório e todo o material necessário para que parte do trabalho pudesse ser realizado, por ter me ensinado os macetes da cirurgia estereotáxica e me ajudado na análise das lâminas histológicas.

Ao Prof. Jackson Bittencourt, pela proposta do projeto temático no qual se insere este trabalho, pelas sugestões essenciais e pela dedicação em esclarecer o papel do MCH no complexo comportamento alimentar.

Às Professoras Andréa, Cida e Marilene, por terem constituído a banca do exame de qualificação e pela relevância das apreciações emitidas naquela ocasião. Ainda, à Andréa pela boa vontade em discutir sobre memória espacial, mapa cognitivo etc.

À Prof^a. Rita Coimbra, pela ajuda imprescindível na montagem da sala do labirinto aquático e pela disponibilidade com que sempre me atendeu.

Aos Professores constituintes da banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura desta dissertação.

À Paula, pelo impulso inicial e fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui. Por todos os momentos que dividimos ao longo desses anos com amizade, confiança e respeito. Pelo seu entusiasmo a cada alcance meu. Obrigado por ter feito parte de todo este processo de amadurecimento de uma maneira singularmente valiosa e por toda a sua inestimável ajuda, em todos os aspectos, da minha vida. (Agora vai, conseguimos!)

À Lotte e à Verónica, por terem guiado meus primeiros passos quando ingressei no laboratório e me socorrido em todas as situações. A contribuição de vocês no início dessa jornada foi de essencial importância para a continuidade deste estudo.

Ao pessoal do Laboratório de Neurociências e Comportamento, incluindo ex-alunos e agregados: Adriano, André Chagas, André Kanamura, Andréa, Arnaldo, Barbara, Cláudia Marote, Cláudia Sallai, Cyrus, Edson, Elaine, Felipe, Frazão, Guilherme, Graciele, Ilton, Joice, Lotte, Luana, Luiz, Maria Helena, Mariana, Marson, Neander, Paula Ito, Paula Moura, Rodrigo Colino, Rodrigo Pavão, Sylvinha, Tatiana, Valéria, Verónica, Viviane e Wataru, pelo convívio harmonioso, apoio e discussões essenciais.

Ao pessoal do Laboratório de Neuroanatomia Funcional: Amanda, Cibele, Eduardo, Flávia, Isadora, Márcia, Raquel, Sanda, Simone e Wagner, por terem me recebido de braços abertos, por terem me ajudado em todos os momentos e pela torcida. Ao Eduardo, pela amizade e por todas as conversas que nortearam as minhas decisões. Em especial agradeço à Simone, Flávia e Raquel, por terem me ensinado todas as técnicas que precisei, pelo suporte constante, pelas diversas cirurgias, microtomias, perfusões e tantos outros procedimentos que vocês fizeram comigo e na maioria das vezes mais do que eu mesmo. Vocês me mostraram que trabalhar em equipe é muito fortalecedor, e que nos promove grandes alegrias e amizades. Valeu muito, por tudo!

Aos alunos do Departamento de Fisiologia, em especial aos amigos mais próximos: Bruno, Camila, Cyrus, Fernando, Honji, Mara, Marina e Wataru, pela amizade, pelas conversas diárias e pelos bons momentos de descontração. Cada um de vocês, à sua maneira, contribuiu de forma indispensável para este processo.

Ao Arnaldo e à Cintia, pela amizade, pela agradável companhia durante estes anos, por terem suportado a chatice das minhas reclamações, pelos cafés, pelas opiniões sempre sensatas e por terem me apoiado em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia: D. Irani, Érika, Francisco, Gisele, Helder, Ricardo, Rose e Roseli, por terem me ajudado em tudo que precisei, por estarem sempre acessíveis e pela competência com que sempre resolveram os problemas. Ao Henrique e ao Manoel, por terem cuidado tão bem dos animais.

À Luciane Sita e Luciana Vasconcelos, por terem me mostrado e explicado com paciência a reação de c-fos.

À Cida, por ter desempenhado um papel que foi além de professora de inglês, pelo encorajamento, conselhos e animadas pizzas de sábado à noite.

A todos os amigos que moram em São Paulo e que me acompanharam nessa trajetória, em especial ao Cleber, Flávio, Japão, Milene, Priscila. À Jo, pelo artigo de 1937 que me livrou do “apud”.

À Graziela, por assegurar que a distância não interfere no valor da amizade.

Aos amigos de Bandeirantes, de Presidente Prudente, e de tantos outros lugares, por me receberem tão bem a cada visita, pelos bons momentos juntos, embora que na maioria das vezes por tão pouco tempo.

A todos os meus familiares, em especial aos meus avôs e avós, à tia Lu e à Cida, por todo o afeto que acompanhou a minha infância e pela torcida em todos os momentos.

Agradeço de uma forma especial ao meu pai, João, às minhas duas mães, Maria e Roseli (tia Zu), e ao meu irmão, Marcelo, por todos os esforços e investimentos a mim dedicados para que os meus sonhos se realizassem. Pelo amor incondicional, apoio constante e exemplo de luta, simplicidade, coragem e honestidade. Por permitirem que eu contasse com vocês em todos os momentos da vida, por ouvirem incansavelmente as minhas reclamações, por dividirem comigo todas as conquistas e angústias, e por me manter sempre firme frente aos obstáculos.

Desculpem-me pela ausência, obrigado por tudo, amo vocês!

A todos aqueles que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho e cujos nomes não foram citados, o meu muito obrigado!

RESUMO

Gimenes-Júnior, J.A. Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em ratos: possível participação do núcleo mamilar medial. 2008. 163p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Seres humanos com danos nos corpos mamilares exibem prejuízos no funcionamento da memória episódica. O presente estudo investigou a possível participação do núcleo mamilar medial (MM), estrutura densamente inervada por fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina (MCH) potencialmente envolvida no comportamento alimentar, em processos de evocação de memórias sobre locais em que alimento foi previamente encontrado, em ratos. Investigou-se ainda seu envolvimento na memória espacial motivada aversivamente, por meio do labirinto aquático de Morris, e em processos de ansiedade, por meio do labirinto em cruz elevado. Descreve-se uma tarefa comportamental envolvendo busca alimentar orientada por memória espacial em ratos, funcionalmente análoga ao teste de aprendizagem de pares associados, utilizado para avaliar memória episódica em seres humanos. Ratos treinados a escavar numa arena para obter alimento foram expostos ao pareamento de um determinado sabor, e.g., amendoim, com um local da arena e, numa segunda tentativa, ao pareamento de um outro sabor, e.g., avelã, com um local diferente da mesma arena. Antes de uma terceira tentativa, ainda na “caixa de espera”, os animais receberam uma “amostra” de amendoim ou avelã. Então, inseridos na arena para uma terceira tentativa, deveriam procurar e escavar por alimento enterrado no local sinalizado pela amostra. As associações sabor-local, a seqüência das associações, os locais do pareamento e a amostra oferecida antes da terceira tentativa, variaram quase aleatoriamente a cada dia. O treinamento dos animais para a aquisição da tarefa foi prolongado. O número de visitas e o tempo de permanência no local da arena sinalizado pela amostra foram significativamente maiores em relação aos parâmetros correspondentes ao local pareado com alimento mas não sinalizado pela amostra,

quando o intervalo de tempo entre a 2ª e 3ª tentativas foi 60 ou 120 minutos; Testes de Avaliação sem oferta de alimento na arena na 3ª tentativa, permitiram excluir a hipótese de que os animais desempenharam essa tarefa com base em estímulos olfativos, levando à conclusão que o fizeram com base na memória das associações sabor-local. Ratos com danos seletivos do MM, induzidos pela aplicação tópica, micro-iontoforética, de N-Metil-D-Aspartato (NMDA), testados na tarefa de pares associados sabor-local, não exibiram prejuízo de desempenho em relação aos animais controle. Análises adicionais revelaram que houve uma redução da busca por alimento em ambos os grupos (lesado e controle) nos testes pós-operatórios, em relação ao seu próprio desempenho nos testes pré-operatórios; porém, essa redução foi mais acentuada em relação ao local sinalizado pela amostra, particularmente nos animais do grupo lesado. Estes resultados, embora não conclusivos, podem representar indícios em favor da idéia de que o MM estaria envolvido numa circuitaria relacionada à memória espacial voltada à busca alimentar. Mais estudos seriam necessários para avaliar essa possibilidade. Além disso, esses animais não exibiram qualquer prejuízo no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris e no paradigma do teste e re-teste no labirinto em cruz elevado, sugerindo que esse tipo de lesão não leva a deficiência no funcionamento da memória espacial motivada por estimulação aversiva, na memória aversiva por espaços abertos ou nos mecanismos responsáveis pela ansiedade.

Palavras-chave: aprendizagem e memória espacial; tarefa de aprendizagem de pares associados; busca alimentar; núcleo mamilar medial (MM); hormônio concentrador de melanina (MCH); labirinto aquático de Morris; ansiedade.

ABSTRACT

Gimenes-Júnior, J.A. Search for food, spatial memory and anxiety in rats: possible participation of the medial mammillary nucleus. 2008. 163p. Masters Dissertation (in General Physiology) - Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, 2008.

Human beings with damage to the mammillary bodies exhibit episodic memory disruption. This study investigated the potential participation of the medial mammillary nucleus (MM), a structure that receives a high density of melanin-concentrating hormone immunoreactive fibers (MCH) potentially involved in food intake, in processes of retrieval of memory about places where food was previously found, in rats. In addition, we investigated the possible involvement of this brain structure in both aversively motivated spatial memory, using the Morris' water maze, and in anxiety, using the elevated plus maze. A behavioral task involving search for food guided by spatial memory, in rats, functionally analogous to the paired-associate learning task used for studying episodic memory in humans, was described. Rats trained to dig for food in an arena were exposed both to the pairing of a taste, peanut, with a specific place in the arena and, in a second trial, to the pairing of another taste, hazelnut, with another place in the arena. Immediately before a third trial, while still in the "waiting box", the animals received a "sample" of either peanut or hazelnut. Then, they were inserted into the arena for a third trial and could search and dig for food buried in the place previously associated with the sample. The taste-place associations, sequence of associations, pairing places and sample offered before the third trial, were all varied quasi-randomly every day. The animals took extensive training to learn this task. It was found that the number of visits and the time spent in the place indicated by the sample were significantly greater as compared to the corresponding parameters of the place previously associated with a taste but not indicated by the sample, when the time interval between the second and the third trials was both 60 and 120 min; probe tests with no food in the arena in the third trial allowed to exclude the hypothesis that

the rats were performing the task relying on olfactory cues, leading to the conclusion that the animals performed the task relying on the memory for the associations taste-food. Rats with selective damage to the MM, induced by topic, microiontophoretic, injections of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA), tested in the taste-place paired-associate learning task, did not exhibit any disruption of performance relative to the controls. Additional analyses revealed that both MM and control subjects exhibited a reduction of food search during the post-operative tests as compared to their own performance in pre-operative tests; however, this reduction was stronger towards the place indicated by the sample, particularly for the animals subjected to MM damage. Even though not conclusive, these results may suggest that the MM might be involved in search for food guided by spatial memory. More studies would be required to evaluate this possibility. Further, these rats did not exhibit any disruption of performance in the reference memory test in the water maze and in the test/re-test elevated plus maze, suggesting that this type of damage does not disrupt aversively motivated spatial memory, open-space aversive memory and anxiety.

Key words: spatial memory; spatial learning; paired-associate learning task; food search; medial mammillary nucleus (MM); melanin-concentrating hormone (MCH); Morris water maze; anxiety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema das principais conexões do núcleo mamilar medial e do núcleo mamilar lateral.....	27
Figura 2.	Representação esquemática da arena utilizada no experimento de Day et al. (2003).....	34
Figura 3.	Fotografia da arena utilizada no teste de aprendizagem de pares associados.....	47
Figura 4.	Computador e interface detectora de contraste, utilizados para registrar o trajeto dos animais na arena, a cada tentativa.....	48
Figura 5.	Representação esquemática da arena (vista de cima), mostrando os 4 quadrantes e os 4 contadores.....	49
Figura 6.	Fotografia da arena utilizada no teste de aprendizagem de pares associados com o alimento visivelmente disponível.....	54
Figura 7.	Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa.....	62
Figura 8.	Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa.....	64
Figura 9.	Média ($\pm$ E.P.M.) da percentagem de tempo nos quadrantes críticos certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa.....	67
Figura 10.	Média ($\pm$ E.P.M.) da percentagem relativa de tempo nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa.....	69

Figura 11.	Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados nos dias 53 (A) e 60 (B).....	84
Figura 12.	Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados nos dias 53 (A) e 60 (B).....	85
Figura 13.	Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de um animal do grupo controle-operado (A) e de um animal do grupo lesado (B), ao nível dos corpos mamilares.....	96
Figura 14.	Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa do Teste de Avaliação realizado nos 53º (A e B) e 60º (C e D) dias dos grupos lesado (A e C) e controle-operado (B e D), nos testes pré-operatórios.....	98
Figura 15.	Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa do Teste de Avaliação realizado nos 53º (A e B) e 60º (C e D) dias, dos grupos lesado (A e C) e controle-operado (B e D), nos testes pré-operatórios.....	101
Figura 16.	Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa, nos Testes de Avaliação dos grupos lesado no MM (A, C e E) e controle-operado (B, D e F), realizados nos 19º, 24º e 29º dias.....	103
Figura 17.	Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa, nos Testes de Avaliação dos grupos lesado no MM (A, C e E) e controle-operado (B, D e F), realizados nos 19º, 24º e 29º dias.....	105
Figura 18.	Média ($\pm$ E.P.M.) das médias do tempo de permanência nos contadores certo e errado dos animais do grupo lesado durante os testes pré- (A) (análise retrospectiva) e pós- (B) operatórios, e dos animais controle-operados durante os testes pré- (C) (análise retrospectiva) e pós- (D) operatórios.....	107

Figura 19.	Média ($\pm$ E.P.M.) das médias do número de entradas nos contadores certo e errado dos animais do grupo lesado durante os testes pré- (A) (análise retrospectiva) e pós- (B) operatórios, e dos animais controle-operados durante os testes pré- (C) (análise retrospectiva) e pós- (D) operatórios.....	110
Figura 20.	Média ($\pm$ E.P.M.) das latências dos animais lesados e controle-operados ao longo dos 15 dias de treinamento no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris.....	123
Figura 21.	Média ($\pm$ E.P.M.) dos comprimentos dos trajetos dos animais lesados e controle-operados ao longo dos 15 dias de treinamento no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris.....	124
Figura 22.	Média ($\pm$ E.P.M.) das velocidades médias de nado dos animais lesados e controle-operados ao longo dos 15 dias de treinamento no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris.....	125
Figura 23.	Fotografia do labirinto em cruz elevado utilizado para avaliar o nível de ansiedade.....	132
Figura 24.	Média ($\pm$ E.P.M.) da percentagem de entradas nos braços abertos (A) e da percentagem de tempo nos braços abertos (B), dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado.....	135
Figura 25.	Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos braços fechados, dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado.....	136
Figura 26.	Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência no quadrado central, dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado.....	137
Figura 27.	Média ($\pm$ E.P.M.) do número de cruzamentos no quadrado central, dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado.....	138

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CM	corpos mamilares
FH	formação hipocampal
fx	fórnix
GD	giro denteado
HDC	head direction cells
i.c.v.	intra-cérebro-ventricular
ITI	intervalo entre as tentativas
LHA	área hipotalâmica lateral
LM	núcleo mamilar lateral
MCH	hormônio concentrador de melanina
MM	núcleo mamilar medial
MMb	porção basal do núcleo mamilar medial
MMl	porção lateral do núcleo mamilar medial
MMm	porção medial do núcleo mamilar medial
MMn	porção mediana do núcleo mamilar medial
Mp	porção posterior do núcleo mamilar medial
MSH	hormônio estimulante de melanócitos
mt	trato mamiló-talâmico
NMDA	n-methyl-d-aspartic acid
SNC	sistema nervoso central
SuM	núcleo supra-mamilar
TM	núcleo túberomamilar
ZIrm	zona incerta rostromedial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Memória espacial.....	20
1.2 Formação hipocampal e corpos mamilares.....	25
1.3 Memória episódica.....	30
1.4 Hormônio concentrador de melanina (MCH).....	34
1.5 Associação entre lesões seletivas de estruturas nervosas e testes comportamentais específicos.....	38
1.6 Justificativa para as estratégias comportamental e neurológica adotadas no estudo.....	41
2. OBJETIVOS.....	42
3. EXPERIMENTO 1.....	44
3.1 Materiais e Métodos.....	45
3.2 Resultados.....	60
3.3 Discussão.....	70
4. EXPERIMENTO 2.....	79
4.1 Materiais e Métodos.....	79
4.2 Resultados.....	83
4.3 Discussão.....	85
5. EXPERIMENTO 3.....	87
5.1 Materiais e Métodos.....	89
5.2 Resultados.....	95
5.3 Discussão.....	111
6. EXPERIMENTO 4.....	116
6.1 Materiais e Métodos.....	117
6.2 Resultados.....	121
6.3 Discussão.....	126
7. EXPERIMENTO 5.....	130
7.1 Materiais e Métodos.....	131
7.2 Resultados.....	134
7.3 Discussão.....	138
8. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	141
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150

1. INTRODUÇÃO

O comportamento alimentar é essencial para a sobrevivência dos animais.

Nos últimos dez anos houve significativos avanços no conhecimento sobre controle central do comportamento alimentar. A regulação deste comportamento envolve diversos mecanismos, podendo ser visto como um conjunto de subcomponentes (ou elementos subjacentes), incluindo (1) a sensação de fome, (2) o ato de ingerir alimento, (3) a atividade locomotora envolvida na busca alimentar, (4) o comportamento exploratório, (5) o comportamento emocional, (6) a ansiedade e (7) a aprendizagem e a memória.

Este trabalho propõe-se investigar o envolvimento de uma estrutura encefálica específica, o núcleo mamilar medial (MM), parte integrante dos corpos mamilares (CM), no processamento da memória de natureza espacial, particularmente no que se refere à sua participação na busca alimentar.

O MM é uma estrutura densamente innervada por fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina (MCH). Estudos recentes vêm mostrando a relação do MCH com o comportamento de ingestão de alimentos. Dentre as funções em que o MM parece estar envolvido, destacam-se o controle alimentar (Presse et al., 1996; Qu et al., 1996; Herve e Fellmann, 1997; Rossi et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Shimada et al., 1998; Tritos et al., 2001; Borowsky et al., 2002; Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002; Sahu, 2002; Takekawa et al., 2002; Abbott et al., 2003; Clegg et al., 2003; Gomori et al., 2003; Shearman et al., 2003), a aprendizagem e memória espaciais (McBride et al., 1994; Monzon et al., 1999; Santin et al., 1999; Varas et al.,

2002a; Varas et al., 2002b) e a ansiedade (Gonzalez et al., 1996; Monzon e De Barioglio, 1999; Monzon et al., 2001; Borowsky et al., 2002) (ver adiante).

Assim, é hipoteticamente plausível que o MM esteja numa posição privilegiada para contribuir para o comportamento de busca alimentar, em que a atividade de neurônios que liberam MCH poderia contribuir para a recordação de memórias espaciais relacionadas a fontes alimentares previamente exploradas, ou influenciar os níveis de ansiedade que influenciariam o comportamento exploratório relacionado ao forrageamento.

Os sistemas que envolvem a busca alimentar são complexos. Neste trabalho, pretende-se investigar a memória espacial relacionada à busca por alimento; admite-se que a fome elicia a recordação de memórias sobre locais visitados onde alimento foi previamente encontrado.

1.1 Memória espacial

Memória é a capacidade que os animais têm de modular seu comportamento de acordo com experiências prévias (Xavier, 1993).

Animais aprendem a se deslocar no ambiente onde vivem de uma forma um tanto flexível. Esta aprendizagem se constitui, segundo Xavier (1989), um elemento fundamental para a sobrevivência das espécies.

O estudo da memória espacial de animais em ambientes naturais é relativamente difícil, dadas as dificuldades de se controlar os estímulos que influenciam sua orientação. Desta forma, testes de memória espacial vêm sendo

realizados em laboratório onde o ambiente é controlado; labirintos, principalmente, são utilizados com esta finalidade.

Diferentes tipos de labirintos vêm sendo utilizados na investigação da neurobiologia da memória espacial em roedores. Dentre eles estão o labirinto radial de 8 braços (Olton e Samuelson, 1976), o labirinto aquático de Morris (Morris, 1981; Santos, 1999), o labirinto em T (Costa et al., 2005), entre outros.

A navegação nestes labirintos pode ser guiada de diferentes maneiras. O'Keefe e Nadel (1978) distinguiram diversas estratégias utilizadas pelos animais para navegar no ambiente e sugeriram que mais de uma estratégia pode ser utilizada simultaneamente para resolver tarefas espaciais. Esses autores propuseram a teoria do mapa cognitivo, que discute os mecanismos de orientação espacial no ambiente e como essas informações são arquivadas no sistema nervoso. Essencialmente, O'Keefe e Nadel (1978) sugerem que os animais aprendem relações (espaciais) existentes entre os objetos e utilizam essas relações para se localizarem em um determinado ambiente. Isto é, um animal parece detectar as múltiplas relações entre os objetos e estímulos do ambiente, independentemente de sua própria localização, como se dispusesse de um mapa aloentríco daquele ambiente. Esse mapa seria construído por meio da atividade exploratória, durante a qual o animal estabelece triangulações entre pares de estímulos e ele próprio como um dos vértices; múltiplas triangulações seriam registradas. Porém, como o sistema nervoso é capaz de detectar que essas relações se alteram com o próprio deslocamento, e são estabelecidas múltiplas relações envolvendo os estímulos disponíveis, esse mesmo sistema nervoso “subtrai” o próprio animal das relações resultando num mapa aloentríco que representa aquele ambiente. De acordo com esta

teoria, a formação hipocampal (FH) participa dessa codificação do ambiente em mapas cognitivos, e contribui também para o armazenamento dessas informações (O'Keefe e Nadel, 1978). Ainda segundo esses autores, outros dois sistemas utilizados na orientação espacial, independeriam da FH; o sistema de táxon em que a orientação ocorre com base num estímulo preponderante, envolvendo estratégias de guiamento, e o sistema de orientação egocêntrico, que envolveria rotações do próprio eixo do corpo.

Estratégias de guiamento envolveriam a aproximação ou distanciamento de estímulos particulares; assim, é possível treinar um animal a mover-se em uma direção arbitrária em relação a um estímulo proeminente que indica a localização do alvo. Os animais não precisam estabelecer relações espaciais (ver adiante) entre os objetos; eles orientam-se em relação a uma pista específica. Por exemplo, próximo ao local que o animal deve alcançar para encontrar a plataforma no labirinto aquático de Morris, há um objeto saliente de forma quadrada, fixado na parede. Assim, o animal pode orientar-se sem estabelecer qualquer tipo de relação entre esse estímulo saliente e os demais estímulos da sala para se situar no ambiente.

Estratégias de orientação egocêntricas envolvem rotações do eixo do próprio corpo em relação a algum eixo conhecido. Os animais orientam-se a partir de informações egocêntricas e aprendem uma seqüência de movimentos corporais. Por exemplo, o animal aprenderia que seria necessário girar para a direita, numa rotação de 50°, depois de deslocar-se certa distância, para atingir seu alvo. Para utilizar-se desta estratégia, tomando como exemplo o labirinto aquático de Morris, o animal, partindo do mesmo ponto da borda da piscina, aprenderia sobre as rotações corpóreas

necessárias que teria de realizar para encontrar a plataforma submersa. As estratégias de guiamento e de orientação, segundo esta teoria, independem da integridade da FH.

No sistema de mapeamento cognitivo, os animais utilizam a estratégia de lugar (alocêntrica) para se localizarem no ambiente. A estratégia de lugar requer um “mapa cognitivo”, i.e., o conhecimento das posições (espaciais) relativas entre os vários estímulos do ambiente, obtido por meio de atividade exploratória. Por exemplo, numa sala onde se localiza o labirinto aquático de Morris existem várias pistas, i.e., “estímulos salientes diferentes entre si”, fixados nas paredes para que os ratos as visualizem e a partir dessas construam um “mapa cognitivo” para se localizarem espacialmente. Ou seja, os animais se baseiam nas relações espaciais existentes entre essas pistas, não dependendo de qualquer uma delas exclusivamente, conseguindo assim navegar na piscina por meio de um mapa cognitivo, e a partir daí encontrar a plataforma para escapar da água. Essa estratégia permite a navegação para um dado local a partir de diferentes pontos de partida, e a adoção de um trajeto novo quando o caminho conhecido não está disponível. Além disso, a remoção de algumas pistas não impede a orientação espacial desde que algumas poucas pistas utilizadas na elaboração do mapa cognitivo (alocêntrico) sejam mantidas em suas posições.

O labirinto aquático de Morris vem sendo intensamente utilizado em estudos envolvendo memória espacial em roedores (Santos, 1999). A tarefa consiste em o rato encontrar uma plataforma submersa, não visível, em determinada localização dentro de uma piscina, a fim de escapar da água. Whishaw e Mittleman (1986) mostraram que ratos normais são capazes de utilizar estratégias de lugar, de orientação e de guiamento simultaneamente para solucionar a tarefa de navegação espacial no labirinto aquático

de Morris. Ratos treinados a buscar a plataforma partindo de diferentes pontos da borda da piscina devem aprender sobre as posições relativas dos estímulos distais e da plataforma submersa em relação a esses estímulos de modo a desempenhar a tarefa; isto demanda o uso da estratégia de lugar (que envolve orientação allocêntrica). Diferentemente, ratos treinados partindo de um único ponto da borda da piscina podem utilizar estratégias de guiamento e/ou de orientação. Além disso, se a localização da plataforma é mantida constante ao longo das sessões de treino, é possível avaliar a memória de referência espacial (um tipo de memória de longa duração; o animal deve diariamente procurar a plataforma no mesmo local, que assim independente do contexto temporal). Por outro lado, se a plataforma é apresentada numa localização diferente a cada dia, com pelo menos duas tentativas por dia, é possível avaliar a memória operacional espacial, um tipo de memória temporária em que o animal deve, a cada dia, procurar pela plataforma em um local diferente do dia anterior; assim esse tipo de memória é dependente do contexto espacial e temporal específico, e pode ser apagado após o uso. Isto é na memória operacional espacial, a informação sobre a localização da plataforma adquirida na primeira tentativa do dia é utilizada na segunda e demais tentativas do mesmo dia para facilitar o desempenho do animal, mas deixa de ser útil quando as tentativas daquele dia são concluídas (Olton, 1983; Santos, 1999); ademais, o intervalo de tempo entre as tentativas pode ser variado, permitindo avaliar também o tempo de retenção da informação espacial.

1.2 Formação hipocampal e corpos mamilares

Diversos relatos na literatura sugerem que a FH exerce um papel importante no processamento da memória (O'Keefe e Nadel, 1978; Weiskrantz, 1978; Squire e Zola-Morgan, 1991) e, como vimos, tem sido ressaltado seu envolvimento crítico na memória espacial (Olton, 1978; Parkinson et al., 1988; Smith e Milner, 1981).

A FH pode ser dividida em seis regiões citoarquiteticamente distintas: giro denteado, corno de Ammon ou hipocampo propriamente dito, subículo, pré-subículo, para-subículo e córtex entorrinal. O corno de Ammon, com base na morfologia celular e projeções de fibras é ainda subdividido em três campos: CA1, CA2 e CA3 (Amaral e Witter, 1995).

Por meio da fimbria e fórnix passam as principais vias aferentes e eferentes do hipocampo. Resumidamente, as principais eferências do hipocampo (vias que saem do hipocampo), destinam-se a estruturas subcorticais (corpos mamilares, núcleos talâmicos anteriores e área septal) e corticais (córtex de associação nas áreas pré-frontal, temporal e cingulada). Já as principais aferências (axônios que chegam à FH), provém de áreas de associação cortical, claustró, bulbo olfatório, córtex auditivo, amígdala, septo, tálamo e hipotálamo (Jarrard, 1980; Xavier, 1985).

A FH integra informações advindas de diferentes regiões encefálicas; está envolvida no circuito de Papez, descrito por Papez, em 1937. De forma resumida, o hipocampo transfere informações por meio do fórnix aos corpos mamilares (CM); destes, as informações seguem pelo feixe mamilo-talâmico para o núcleo anterior do tálamo e daqui para o giro do cíngulo, que então se projeta para o hipocampo. Lesões

produzidas especificamente nas estruturas que integram o circuito de Papez, incluindo os CM, geram dificuldades nos processos de memória (Vertes et al., 2001).

Do ponto de vista neuroanatômico, os CM localizam-se no diencéfalo, fazem parte do hipotálamo e incluem os núcleos mamilares laterais (LM) que são pequenos e contêm células grandes e os núcleos mamilares mediais (MM) que são maiores quando comparado ao LM. Os MM incluem uma porção mediana (MMn), uma porção medial (MMm), uma porção lateral (MMl), uma porção posterior (Mp) e uma porção basal (MMb) (Vann e Aggleton, 2004).

O LM e o MM possuem conexões paralelas com estruturas da formação hipocampal, do tálamo e da área tegmental (Vann e Aggleton, 2004) (Figura 1). Porém, enquanto o núcleo mamilar medial (MM) (particularmente o MMl) recebe grande quantidade de projeções do subículo e córtex entorrinal medial por meio do fórnix pós-comissural, as projeções para o núcleo mamilar lateral (LM) surgem do pré-pára- e pós-subículo. Relativamente às projeções talâmicas, enquanto o MMl projeta-se ipsilateralmente para os núcleos ântero-medial e ântero-ventral, o LM projeta-se bilateralmente para os núcleos anteriores-dorsais. Em relação às conexões tegmentais, enquanto o MM mantém projeções recíprocas com o núcleo tegmental ventral, o LM mantém projeções recíprocas com o núcleo tegmental dorsal; ademais, o LM e o MM projetam-se para porções diferentes do núcleo tegmental reticular. Também as conexões septais são distintas; enquanto o MM recebe projeções do septo medial, o LM recebe projeções do septo lateral. Por outro lado, tanto o LM como o MM recebem projeções do núcleo supra-mamilar (SuM) e do núcleo túbero-mamilar (TM).

Essas distinções hodológicas sugerem a existência de funções ao menos em parte distintas envolvendo o LM e o MM.

Figura 1. Esquema das principais conexões do núcleo mamilar medial e do núcleo mamilar lateral. Esses núcleos possuem conexões com regiões específicas do tálamo, da formação hipocampal e da área tegmental (Modificado de Vann e Aggleton, 2004).

De fato, existem evidências nesse sentido. Por exemplo, registros eletrofisiológicos em ratos mostram a existência de “Head Direction Cells” (HDC) (células que disparam seletivamente quando a cabeça do animal volta-se para uma direção específica do ambiente) no LM, mas não no MM (Blair et al., 1998; Stackman e Taube, 1998; Taube, 1998; Blair et al., 1999). Assim, especula-se que as deficiências de memória espacial observadas em roedores após danos nos corpos mamilares sejam decorrentes de danos no LM. Há demonstrações de que atividade das HDC pode auxiliar na orientação do comportamento espacial no labirinto radial (Dudchenko e Taube, 1997). Por outro lado, as deficiências espaciais decorrentes de danos no tálamo anterior (que conecta-se ao MM e não ao LM), são maiores que as decorrentes de

danos no tálamo dorsal (que conecta-se ao LM e não ao MM) (Aggleton et al., 1995), representando evidências indiretas da importância do MM para a orientação espacial.

As deficiências de memória descritas em pacientes com a síndrome amnésica de Wernicke-Korsakoff (relacionada à ingestão abusiva e prolongada de álcool com conseqüente carência do complexo de vitaminas B) são freqüentemente associadas com lesões nos CM (Sullivan et al., 1999). Essa síndrome é caracterizada pela dificuldade de adquirir e reter novas informações na memória declarativa (amnésia anterógrada) e pela dificuldade de evocar informações previamente arquivadas (amnésia retrógrada). É possível que a amnésia retrógrada seja secundária à amnésia anterógrada, dada a evolução lenta da patologia. Esta interpretação corrobora a observação de que pacientes com danos mecânicos dos CM, ou produzidos por tumores circunvizinhos, exibem amnésia anterógrada, mas não amnésia retrógrada (Dusoir et al., 1990; Kapur et al., 1998). Kopelman (1995) ressaltou que o MM sempre está disfuncional em pacientes com a síndrome de Korsakoff. Por outro lado, Harding et al. (2000) descreveram evidências de que lesões dos CM nem sempre levam à amnésia; segundo eles, a amnésia associada à síndrome de Korsakoff está relacionada à neurodegeneração dos núcleos talâmicos anteriores. Outros autores ressaltaram a importância do núcleo talâmico médio-dorsal (Paller et al., 1997) e dos núcleos talâmicos da linha média (Mayes et al., 1988) nesses processos. É provável que essa controvérsia esteja relacionada às limitações na resolução anatômica dos métodos empregados nesses estudos, associada à extensão das lesões em cada um deles; ademais, uma vez que essas regiões nervosas mantêm conexões entre si, parece hipoteticamente plausível que elas cooperem no processo de formação de memórias.

Diversos estudos relacionam os CM com memória espacial em roedores. Alguns dos experimentos citados na literatura apontam que os danos nos CM ou no trato mamilotálâmico prejudicam o desempenho (1) em tarefas de alternância espontânea no labirinto em “T” (Field et al., 1978; Beracochea e Jaffard, 1987; Aggleton et al., 1995; Gaffan et al., 2001), (2) no labirinto radial de 8 braços (Saravis et al., 1990; Sziklas e Petrides, 1993; Vann e Aggleton, 2003) e (3) no teste de memória de referência (Sutherland e Rodriguez, 1989) e de memória operacional (Santin et al., 1999; Vann e Aggleton, 2003), ambos no labirinto aquático de Morris. Alguns desses estudos mostraram que o prejuízo é mais evidente quanto maior o intervalo entre as tentativas (e.g., Beracochea e Jaffard, 1987; Saravis et al., 1990; Sziklas e Petrides, 1993), sugerindo o envolvimento desta estrutura na manutenção temporária de informações de natureza espacial na memória ou na codificação desse tipo de informação. Interessantemente, esse mesmo tipo de lesão parece não interferir no desempenho de tarefas que requerem discriminação visual ou de objetos (e.g., Saravis et al., 1990; Sziklas e Petrides, 1993; Aggleton et al., 1995).

O’Keefe (1983) mostrou que o labirinto radial de 8 braços pode ser desempenhado com sucesso por animais com danos hipocâmpais, com base em estratégias de guiamento e de orientação. Assim, é possível que os animais com danos no MM e SuM do estudo de Sziklas e Petrides (1993) tenham exibido dificuldades na adoção de estratégias de lugar (portanto, dificuldades na memória aloentrica), mas tenham sido capazes de desempenhar a tarefa com base em estratégias de guiamento e/ou de orientação. Corroborando com esta interpretação os resultados de Neave et al. (1997) mostrando que danos citotóxicos no MM, LM e SuM não interferem na

habilidade dos animais utilizarem estratégias egocêntricas para solucionar uma tarefa espacial no labirinto radial de 8 braços.

Além dos achados acerca do envolvimento dos CM na memória espacial, estudos recentes desenvolvidos com humanos apontam que os CM também estariam relacionados com a memória do tipo episódica.

1.3 Memória episódica

Memória episódica refere-se à lembrança conjunta de um evento particular “o que”, associado ao local em que ocorreu “onde”, num determinado momento do tempo “quando”, que em conjunto conferem a ela um caráter único, considerada privativa da espécie humana (Tulving, 1983).

Estudos neuropsicológicos têm mostrado fortes evidências de que os CM estão envolvidos na memória episódica (Van der Werf et al., 2003; Vann e Aggleton, 2004). Os CM apresentam conexões diretas com regiões encefálicas que seriam cruciais para a memória episódica, sendo estas o hipocampo e o núcleo anterior do tálamo (Aggleton e Brown, 1999). Além disso, Vann e Aggleton (2004) defendem a hipótese de que se os CM estão envolvidos na memória episódica, as suas projeções devem envolver estruturas também relacionadas a essa função; sendo assim, o trato mamilotálamico e o núcleo anterior do tálamo seriam essenciais para o funcionamento deste tipo de memória. Ademais, o estudo de Van der Werf et al. (2003) envolvendo humanos com lesões talâmicas mostrou déficit na memória episódica com relativa limitação de capacidades intelectuais e memória de curta duração quando o trato mamilotálamico foi também lesado.

A memória episódica em seres humanos é frequentemente avaliada em tarefas que requerem a lembrança de itens previamente associados (Tulving, 1983), como as tarefas de pares associados. Isto é, numa primeira fase a pessoa é exposta, uma única vez, a uma lista de pares de itens (sapato-orelha, automóvel-cabelo, árvore-boca etc); numa segunda fase apresenta-se um dos itens do par (e.g., sapato) e a pessoa deve recordar-se do item a ele associado (neste caso, orelha). Assim, o desempenho depende do relato verbal sobre a lembrança da associação prévia dos dois itens.

Modelos animais utilizados para investigar memória episódica em aves estocadoras de sementes também incluem a lembrança de locais (“onde”) em que alimentos com diferentes sabores (“o que”) foram estocados, associados a taxa de deterioração dos mesmos ao longo do tempo (“quando”) (Clayton e Dickinson, 1998).

Atualmente, diversos laboratórios investigam tarefas comportamentais que permitam avaliar a memória episódica em roedores de forma que os animais sejam capazes de utilizar informações sobre “o que”, “onde” e “quando” um dado evento ocorreu.

Por exemplo, Ennaceur e Delacour (1988) descreveram a tarefa de reconhecimento de objetos para ratos, que se baseia no comportamento espontâneo do animal e que aparentemente independe de aprendizagem ou reforço para que seja executada. Resumidamente, nesta tarefa, dois objetos idênticos são expostos ao animal que os explora em uma primeira tentativa. Após o intervalo de um minuto, numa segunda tentativa, um dos objetos da primeira tentativa (objeto familiar) e um novo objeto são apresentados ao animal. A habilidade dos animais distinguirem entre os dois objetos na segunda tentativa é revelada se o animal investe mais tempo

explorando o novo objeto em relação ao familiar. Como os resultados deste experimento mostram que os animais exploram mais o novo objeto em relação ao familiar, sugere-se que há discriminação dos dois objetos e recordação do familiar.

Diversas modificações e/ou variações na versão original desta tarefa vêm sendo utilizadas para testar a memória do tipo episódica em roedores (Dere et al., 2006), e também avaliar o envolvimento de estruturas nervosas relacionadas a este tipo de memória. Por exemplo, a noção de que objeto é mais explorado pelo animal na apresentação simultânea de mais de uma unidade, caracterizando o “o que”, em que lugar este objeto está posicionado na determinada tentativa do animal, relacionando-se ao “onde” e qual a ordem de aparecimento desses objetos, integrando o “quando”, vêm sendo investigado (1) em tarefas de reconhecimento de objetos e o envolvimento do fórnix (Eacott e Normann, 2004), (2) em tarefas de reconhecimento de objeto e o envolvimento do CA3 dorsal (Li e Chao, 2008), (3) em tarefas de reconhecimento de objetos e o efeito do stress (Kart-Teke et al., 2006) e (4) em tarefas de reconhecimento de objetos em camundongos (Dere et al., 2005a; Dere et al., 2005b).

Day et al. (2003) descreveram uma tarefa envolvendo aprendizagem de pares associados em ratos, sendo estes pares o sabor do alimento e sua localização, em que cada associação “sabor-local” é apresentada apenas uma vez, garantindo assim uma associação única. A tarefa envolve uma arena quadrada com 49 buracos no assoalho preenchidos com areia (e que contém tampa) (Figura 2), dispostos de acordo com uma matriz 7 x 7, que podem ser apresentados seletivamente (pela remoção da tampa) para que o animal “escave” na areia em busca do alimento que está enterrado (os animais eram treinados previamente a escavar na areia para obter alimento). Em cada uma das

paredes laterais da arena há uma caixa de partida, o que permite variar, a cada tentativa, o local de onde o animal deve partir para realizar sua busca. Na primeira tentativa, o animal é liberado para a arena com o intuito de buscar o alimento no buraco destampado, escavar e obter o alimento flavorizado 1. Encontrado o alimento, o animal é retirado da arena. No intervalo de 2 minutos entre a primeira e segunda tentativa, o experimentador coloca a tampa neste buraco e destampa um outro diferente, que será utilizado para a segunda tentativa. Nesta, o rato é liberado na arena e encontra outro local destampado contendo o alimento flavorizado 2. Numa terceira tentativa, após 30 segundos de intervalo, ainda na caixa de partida (que é diferente das duas anteriores), o animal recebe uma pequena amostra do alimento flavorizado utilizado em uma das tentativas anteriores; sua tarefa consiste em buscar na arena o alimento flavorizado correspondente ao recebido na caixa de espera. Nesta terceira tentativa, os dois locais que o animal escavou, na primeira e na segunda tentativas, estavam destampados. Os animais deveriam lembrar-se dos pares “sabor-local” associados, e escavar no local correspondente ao alimento sinalizado na caixa de partida. Cuidados especiais foram tomados para evitar que os animais desempenhassem a tarefa com base em pistas olfativas; eles incluíam adicionar uma mistura de todos os flavorizantes utilizados no experimento com a areia que preenche todos os buracos da arena. Esta tarefa poderia corresponder a um modelo para testar a memória do tipo episódica em ratos. No entanto, a principal crítica que se pode fazer é que os animais respondem apenas ao “o que” e ao “onde”, sendo o componente “quando” ainda obscuro nesta tarefa. Além disso, na terceira tentativa desta tarefa são apresentados dois buracos destampados para que o animal escolha um para escavar,

configuração esta que se baseia em pistas proximais para a orientação espacial dos animais, não requerendo necessariamente a utilização do mapa cognitivo (alocêntrico), embora esses animais sejam liberados de diferentes caixas de partida a cada tentativa. Ademais, teria sido interessante realizar testes de avaliação sem qualquer alimento na terceira tentativa, para garantir que a escolha dos animais não foi dirigida por pistas olfativas.

Figura 2. Representação esquemática da arena utilizada no experimento de Day et al. (2003) contendo 49 buracos organizados conforme uma matriz 7 x 7, preenchidos com areia e seletivamente expostos para os animais em cada tentativa pela remoção da tampa (Modificado de Day et al., 2003).

1.4 Hormônio concentrador de melanina (MCH)

O núcleo mamilar medial é uma estrutura encefálica densamente innervada por fibras imunorreativas a um neuropeptídeo de expressão hipotalâmica denominado hormônio concentrador de melanina (MCH). Este hormônio parece estar relacionado,

dentre diversas funções, ao comportamento alimentar, memória e aprendizagem espacial e ansiedade.

O MCH é um neuropeptídeo produzido por neurônios hipotalâmicos, em todos os vertebrados. Foi descoberto concomitantemente às pesquisas da alteração da pigmentação dos teleósteos (peixes ósseos), cuja propriedade antagonizaria a ação do hormônio estimulante de melanócitos (MSH) (Rance e Baker, 1979).

No estudo da distribuição do MCH no sistema nervoso do rato, realizado por Bittencourt et al. (1992) por meio de técnicas de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, revelou que a distribuição das células imunorreativas ao MCH é essencialmente diencefálica, principalmente na área hipotalâmica lateral (LHA) e zona incerta rostromedial (ZIrm). Casatti et al. (2002) mostraram que a porção lateral do núcleo mamilar medial (MMl) possui uma densa inervação por fibras imunorreativas ao MCH, oriundas da área hipotalâmica lateral, zona incerta rostromedial e também do núcleo túbero-mamilar. Como vimos, o MM parece uma estrutura essencial para a memória espacial (Aggleton e Mishkin, 1985; Saravis et al., 1990; Sziklas e Petrides, 1993; Santin et al., 1999).

Diversas funções vêm sendo relacionadas ao MCH incluindo (1) atividade locomotora (Monzon e De Barioglio, 1999), (2) sono e vigília (Verret et al., 2003), (3) comportamento exploratório (Elias et al., 1997), (4) comportamento emocional (Gonzalez et al., 1996), (5) atenção e alerta (Miller et al., 1993), (6) ansiedade (Monzon e De Barioglio, 1999) e (7) aprendizagem e memória espacial (McBride et al., 1994; Monzon et al., 1999; Santin et al., 1999; Varas et al., 2002a; Varas et al., 2002b).

Em relação ao efeito do MCH na ansiedade, o primeiro relato foi feito por Gonzalez et al. (1996); esses autores descreveram um efeito ansiogênico da administração de MCH na área pré-óptica medial de ratas fêmeas, testadas no labirinto em cruz elevado. Coerentemente, o bloqueio do receptor do MCH por um antagonista específico, SNAP-7941, resulta em um efeito antidepressivo, ansiolítico e anorético (Borowsky et al., 2002). De forma aparentemente paradoxal, estudos de Monzon e De Barioglio (1999), usando o labirinto em cruz elevado, mostram que a administração intra-cerebro-ventricular de MCH produz um efeito ansiolítico. Ademais, a administração intra-amigdalар ou intra-hipocampal de MCH gera efeitos ansiolíticos no labirinto em cruz elevado (Monzon et al., 2001). Outros estudos indicam que testes de ansiedade podem gerar resultados distintos quando animais de sexos diferentes são utilizados (Johnston, 1991), talvez por haver diferenças na ação de hormônios gonadais (Zimmerberg, 1993). Alguns estudos vêm defendendo a noção de que o MCH atua ansioliticamente em tarefas comumente utilizadas no estudo da ansiedade (Monzon et al., 1999); porém, o papel do MCH nessa resposta ainda não está totalmente esclarecido.

Estudos comportamentais têm analisado a relação do MCH com o aprendizado e memória, utilizando testes de esQUIVA inibitória em ratos (McBride et al., 1994; Monzon et al., 1999). Dois mecanismos foram descritos para explicar a ação do MCH no hipocampo; um deles é a promoção de uma potenciação de longa duração no giro denteado (Varas et al., 2002a) e o outro é o aumento dos níveis de óxido nítrico no hipocampo (Varas et al., 2002b).

Não surpreende que a FH, principalmente a região dorsal que parece especialmente envolvida em memória espacial (Moser et al., 1995), é densamente innervada por fibras imunorreativas ao MCH quando comparada à sua parte ventral. Além da innervação direta, o MCH influencia a FH indiretamente através do núcleo septal medial e pela densa innervação da porção lateral do MM (Bittencourt et al., 1992). Os achados sobre a participação do hipocampo dorsal nos processos de memória espacial são corroborados por Broadbent et al. (2004), que mostram ainda que o campo CA3 é crítico para a retenção da memória espacial.

Desde a primeira descrição dos seus efeitos orexígenos (Qu et al., 1996), o MCH vem ocupando um papel de destaque nas pesquisas sobre comportamento alimentar. Diversos estudos mostram a relação do MCH com o comportamento alimentar. Por exemplo (1) o RNAm do precursor do MCH está super-expresso no hipotálamo de camundongos obesos (Qu et al., 1996), (2) o jejum aumenta a expressão do RNAm do precursor MCH em animais normais e obesos (Presse et al., 1996; Qu et al., 1996; Herve e Fellmann, 1997; Tritos et al., 2001), (3) a injeção intra-cerebro-ventricular (i.c.v.) de MCH provoca hiperfagia (aumento da ingestão de alimentos) e aumento de peso do animal (Qu et al., 1996; Rossi et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Sahu, 2002; Abbott et al., 2003; Gomori et al., 2003), além de aumento da ingestão de líquidos (Clegg et al., 2003), (4) a injeção de MCH no núcleo arqueado, núcleo paraventricular do hipotálamo ou núcleo dorsomedial do hipotálamo, que expressam o receptor do MCH, também provoca hiperfagia (Rossi et al., 1997; Abbott et al., 2003), (5) camundongos com deleção do gene MCH, apresentam diminuição do peso corporal, tanto por hipofagia (diminuição da fome) quanto por aumento do

catabolismo (Shimada et al., 1998), (6) camundongos com deleção do gene do receptor de MCH são magros, embora hiperfágicos (Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002) e (7) o bloqueio do receptor do MCH com antagonistas específicos provoca diminuição do ganho de peso (Takekawa et al., 2002; Borowsky et al., 2002; Shearman et al., 2003).

Assim, uma vez que o MM recebe projeções de fibras imunorreativas ao MCH, neuropeptídeo este produzido pelo hipotálamo e parece estar envolvido principalmente no comportamento alimentar, aprendizagem e memória espacial, parece plausível investigar seu possível envolvimento na busca alimentar guiada por memórias sobre locais em que alimento foi obtido anteriormente, por meio da tarefa de aprendizagem de pares associados (descrita acima), cujo desempenho requer a utilização dessas funções.

1.5 Associação entre lesões seletivas de estruturas nervosas e testes comportamentais específicos

Conceituações acerca da organização do sistema nervoso e das categorias comportamentais eleitas para observação após manipulações neurológicas têm implicações na escolha da metodologia empregada em estudos sobre as relações entre o sistema nervoso e o comportamento (Xavier, 1994). Isto é, o método é escolhido em função dos conceitos do experimentador acerca do objeto em estudo, determinando a escolha das variáveis e condições experimentais em que essas variáveis serão avaliadas. A associação de técnicas para indução de danos seletivos em determinadas estruturas encefálicas com abordagens comportamentais que focalizam especificamente as funções em que essas estruturas estão, supostamente, envolvidas,

vem contribuindo para o entendimento do funcionamento do sistema nervoso (Xavier, 1994).

O envolvimento da FH e dos CM na aprendizagem e memória vêm sendo investigado, entre outras, por meio de técnicas cirúrgicas que promovem lesões dessas regiões. Lesões hipocampais conduzidas por meio de técnicas de aspiração ou lesão eletrolítica danificam não só as fibras de passagem, mas também as estruturas adjacentes, o que pode confundir a interpretação dos resultados dos experimentos comportamentais (Bouffard e Jarrard, 1988). Para tanto, novas técnicas cirúrgicas que envolvem a aplicação de neurotoxinas têm sido empregadas com sucesso. Essas neurotoxinas evitam danos às fibras de passagem ou regiões adjacentes permitindo lesões de áreas neuroanatomicamente distintas do hipocampo. A aplicação dessas técnicas cirúrgicas vem permitindo revelar que regiões particulares do hipocampo estão envolvidas em diferentes processos comportamentais.

Xavier et al. (1999) testaram ratos com cerca de 90% de perda seletiva das células granulares do giro denteado, lesados pela aplicação múltipla e tópica de colchicina, nas versões que avaliam memória de referência e memória operacional, ambas espaciais, no labirinto aquático de Morris, com os animais partindo de diferentes pontos da borda da piscina. Os animais lesados exibiram um prejuízo dramático do desempenho em ambas as versões da tarefa espacial, indicando desorganização do sistema de orientação aloentríca; porém, os resultados mostraram que esses animais foram capazes de adquirir informações relevantes para o desempenho da tarefa de memória de referência, com base em estratégias de orientação e de guiamento. Já na versão do labirinto aquático de Morris que requer

memória operacional, os ratos não exibiram qualquer melhora em seu desempenho mesmo quando o intervalo entre as tentativas foi virtualmente zero. Esses achados exemplificam como uma lesão específica numa estrutura encefálica pode levar a diferentes alterações dependendo do tipo de parâmetro comportamental é escolhido para sua investigação.

Na maioria dos estudos envolvendo lesões nos CM, os danos incluem o MM, o LM, os núcleos supra-mamilar (SuM) e túbero-mamilar (TM), e estruturas adjacentes aos CM. Ademais, diferentes experimentos apontam que a extensão da lesão dos CM interfere diretamente nos resultados comportamentais. Por exemplo, Sziklas e Petrides (1993) mostraram que lesões eletrolíticas restritas ao MM e SuM não interferem no desempenho de ratos no labirinto radial de 8 braços adquirido pré-operatoriamente, mesmo quando há um período, entre as escolhas, de 15 segundos de confinamento na plataforma central. Diferentemente, danos mais extensos que incluem o MM, o SuM, o LM e estruturas adjacentes como a porção posterior do núcleo mamilar medial (Mp) e área tegmental medial, produzem prejuízos de desempenho equivalentes aos observados após danos no hipocampo dorsal, efeito que se intensifica com o confinamento do animal entre as escolhas, por 15 segundos, na plataforma central. Esses resultados podem ser interpretados como sugestivos do envolvimento seletivo de porções da região mamilar em aprendizagem e memória espaciais, como proposto pelos autores.

Neste trabalho objetivou-se restringir os danos citotóxicos especificamente ao MM, e avaliar o seu papel na memória espacial relacionada ou não à busca alimentar.

1.6 Justificativa para as estratégias comportamental e neurológica adotadas no estudo

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas tarefas comportamentais vêm permitindo o direcionamento da pesquisa para aspectos mais específicos e sutis das funções cognitivas, tornando a compreensão dessas funções mais precisa e completa.

Por outro lado, o desenvolvimento de técnicas para indução de danos seletivos em regiões específicas do sistema nervoso, preservando os neurônios das regiões circunvizinhas, vem permitindo identificar a contribuição de diferentes populações de neurônios, que integram os circuitos neurais investigados, no controle do comportamento adaptativo. No presente trabalho, associaremos essas duas abordagens.

2. OBJETIVOS

Um dos objetivos do presente trabalho foi desenvolver uma tarefa comportamental inspirada no método utilizado por Day et al. (2003), envolvendo aprendizagem de pares associados, com intuito de avaliar a busca alimentar baseada em memória espacial aloccêntrica sobre locais anteriormente visitados, em que alimento foi obtido.

Além disso, considerando (1) que o MM é uma estrutura encefálica que parece estar envolvida no processamento da memória de natureza espacial e que (2) este núcleo é densamente innervado por fibras imunorreativas ao MCH, pareceu hipoteticamente plausível que dentre suas possíveis contribuições para o comportamento adaptativo estaria a busca alimentar direcionada por memórias sobre locais anteriormente visitados, em que alimento foi encontrado. Assim, um segundo objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de danos seletivos no MM sobre a busca alimentar de ratos na tarefa de pares associados, envolvendo a associação “sabor-local”, como forma de avaliar aquela hipótese. Isso será implementado pela indução de danos seletivos restritos ao MM, pela aplicação tópica, micro-iontoforética, de N-Metil-D-Aspartato (NMDA), e avaliação do desempenho na tarefa de pares associados “sabor-local”. Como forma de avaliar o desempenho de animais portadores desse tipo de lesão em uma tarefa espacial que independe do comportamento alimentar, testamos esses animais também no labirinto aquático de Morris, um teste amplamente utilizado para investigar as funções de memória em ratos (ver Santos, 1999).

Considerando ainda relatos prévios sobre o envolvimento do MCH na ansiedade, resolveu-se investigar em que extensão animais portadores de danos seletivos no MM exibem alterações de desempenho num modelo clássico de estudos de ansiedade, i.e., o labirinto em cruz elevado, na ausência de privação alimentar.

3. EXPERIMENTO 1

DESEMPENHO DE RATOS NUMA TAREFA DE APRENDIZAGEM DE PARES ASSOCIADOS “SABOR-LOCAL”, ENVOLVENDO DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO ENTRE A AQUISIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO E A RECORDAÇÃO

Como vimos anteriormente, Day et al. (2003) descreveram uma tarefa envolvendo a aprendizagem de pares associados “sabor-local”. Resumidamente, a tarefa consiste numa arena quadrada contendo buracos no assoalho preenchidos com areia, que são apresentados seletivamente (pela remoção da tampa) para que o animal escave na areia em busca do alimento que está enterrado, a cada tentativa. É importante ressaltar que, na terceira tentativa, são apresentados dois buracos destampados para que o animal escolha um para escavar; assim, esta configuração permite a orientação dos animais com base em pistas proximais, além das pistas distais. Portanto, não é inequívoco que os animais tenham sido forçados a se utilizar de um mapa cognitivo (alocêntrico), mesmo porque houve o cuidado de liberar os animais de diferentes caixas de partida, a cada tentativa.

No presente experimento propõe-se contornar essas limitações por meio do desenvolvimento de uma nova tarefa comportamental que exige do animal uma real navegação espacial, baseada apenas em estímulos distais, em que os animais partem de diferentes pontos da arena para realizarem sua busca alimentar. Os testes foram realizados numa arena circular totalmente preenchida por bolinhas de polipropileno onde alimento era enterrado, como se fosse uma versão seca do labirinto aquático de Morris, de modo que as pistas proximais sinalizando o provável local onde o alimento

se encontrava fossem completamente eliminadas. Ou seja, ao invés de dois buracos destampados para que o animal escolhesse um deles para escavar na terceira tentativa (Day et al., 2003), o animal deveria esquadrinhar toda a arena, cujo assoalho era uniforme e lembrar-se do local em que o alimento estava enterrado para então escavar, utilizando para isso as informações sobre as associações “sabor-local” realizadas na primeira e segunda tentativas, e o sabor do alimento indicando onde escavar, antes da terceira tentativa. Pistas distais eram abundantemente disponíveis nas paredes da sala.

Adicionalmente, testamos diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30, 60 e 120 minutos) entre a segunda e terceira tentativas como forma de avaliar a capacidade dos ratos de reterem a informação recebida sobre as associações “sabor-local”, na primeira e segunda tentativas, e usarem essa informação para escavarem na busca por alimento quando solicitada no teste.

3.1 Materiais e Métodos

Sujeitos

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos, adultos, provenientes do biotério do Instituto de Biociências da USP, com idade de aproximadamente 4 meses e pesando entre 300 e 400g no início dos experimentos. Deste total, apenas 11 ratos concluíram todas as etapas da tarefa. Os demais animais não aprenderam a tarefa e foram retirados do experimento.

Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno (medindo 40 x 33 x 16 cm) forradas com maravalha (serragem). Estes permaneciam em

ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luz acesa das 7h00 às 19h00).

Os animais permaneceram sob restrição alimentar, sendo privados de ração por 22 horas diárias; i.e., e tiveram acesso a ração por 2 horas (30 minutos após cada sessão de treino/teste), procedimento este que perdurou durante todo o experimento, sendo a água oferecida *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente no início do experimento e depois quinzenalmente. Esse monitoramento permitiu controlar o peso dos animais de modo a manterem pelo menos 80% do peso esperado para ratos desta idade com alimentação *ad libitum* (Andersen, 2004).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Aparelho

A arena utilizada para avaliar os animais na tarefa de aprendizagem de pares associados inclui uma piscina circular de fibra de vidro pintada de preto, cujo assoalho é construído de compensado de madeira, circular, medindo 186 cm de diâmetro (Figura 3). A borda do assoalho, também de madeira, mede 15 cm de altura e circunda por inteiro a base do labirinto. O assoalho é preenchido com bolinhas de polipropileno de baixa densidade (cada bolinha com cerca de 3 mm de diâmetro) na cor azul escura, até a altura de aproximadamente 10 cm (utilizamos o polipropileno por ser mais leve e de fácil higienização quando comparado com areia). Um sistema automatizado de detecção de contraste (VP112, HVS Image Ltda, Hampton, UK) permite registrar o deslocamento do animal na arena e o tempo despendido nos setores do labirinto. A

arena localiza-se em uma sala medindo 3 x 4,5 m, com diversos estímulos salientes visíveis nas suas paredes a partir do assoalho da arena, utilizados como pistas distais já que permitem ao animal se localizar no espaço. Toda a sala é iluminada com luz indireta; a quantidade de luz no assoalho corresponde a cerca de 300 Lux.

Figura 3. Fotografia da arena utilizada no teste de aprendizagem de pares associados.

O desempenho dos animais foi registrado por uma câmera de vídeo posicionada aproximadamente 290 cm acima do centro da arena e acoplada, por uma interface, a um microcomputador com software capaz de registrar e armazenar numericamente todo o trajeto dos animais na arena (Figura 4).

Figura 4. Computador e interface detectora de contraste, utilizados para registrar o trajeto dos animais na arena, a cada tentativa.

Programas específicos permitem calcular diferentes parâmetros, incluindo o tempo total de permanência do animal na arena e nos seus diferentes setores (Figura 5), o número total de entradas nos contadores (áreas circulares imaginárias de 27 cm de diâmetro, ao redor dos locais em que alimento é oferecido para os animais), entre outros.

Para a análise descritiva dos dados, a arena é dividida em quatro quadrantes com a mesma área, formados por linhas imaginárias, as quais se cruzam no centro da arena, formando ângulos de 90° (Figura 5). As fronteiras dos quadrantes encontram-se na margem da arena e nas linhas imaginárias ligando o norte ao sul e o leste ao oeste. Pontos arbitrariamente denominados (N), (S), (E) e (W), além de outros quatro pontos situados a nordeste (R), noroeste (T), sudoeste (O) e sudeste (D), todos na borda da arena, foram utilizados como pontos de partida dos animais.

A cada dia de treinamento dois locais, dentre os quatro possíveis, cada qual situado no centro de um quadrante, foram utilizados para disponibilizar alimentos; os locais em que o alimento é disponibilizado são alterados, de forma aleatória, diariamente. Cada rato foi submetido a três tentativas por dia, sendo que a cada tentativa, apenas um local da arena continha alimento. Contadores e quadrantes “críticos” em cada dia referem-se aos locais em que alimento foi oferecido num determinado dia, enquanto contadores e quadrantes “não críticos” referem-se aos outros dois contadores em que alimento não foi oferecido naquele dia. O tempo despendido pelos animais nos contadores críticos, bem como o número de entradas nesses contadores provê índices específicos de localização espacial.

Figura 5. Representação esquemática da arena (vista de cima), mostrando os 4 quadrantes e os 4 contadores (locais onde o alimento foi disponibilizado, individualmente, em cada tentativa). As 8 letras existentes na borda da arena representam possíveis pontos de partida dos animais.

Alimentos utilizados na tarefa

Os alimentos utilizados na tarefa incluíram amendoins e avelãs crus. Foram oferecidos pedaços de amendoim e avelã pesando aproximadamente 500 mg (cerca de meia semente) nas duas primeiras tentativas e uma semente inteira de amendoim ou avelã pesando aproximadamente 1000 mg na terceira tentativa. Os alimentos foram envolvidos por “parafilm” (Pechiney Plastic Packaging) para minimizar a liberação de odores.

Procedimento experimental

Nas duas primeiras tentativas, quando se associava os sabores aos locais em que alimento era oferecido, as bolinhas de polipropileno eram afastadas, formando uma “depressão” no assoalho do aparelho, onde era depositado o alimento embrulhado com parafilm, ficando visível aos animais. Já na terceira tentativa o alimento encontrava-se enterrado nas bolinhas de polipropileno (sob uma altura de 10 cm, aproximadamente). Nesta terceira tentativa, era utilizado um disco de acrílico preto, de 7 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura (completamente embrulhado com parafilm), no centro do qual era depositado o alimento, também embrulhado com parafilme; o disco contendo a semente era enterrado aproximadamente sob 10 cm da superfície do polipropileno, não sendo visível na superfície homogênea de bolinhas. Assim, se o animal iniciasse sua escavação no local correto, a presença do acrílico sinalizaria isso.

Embora cuidados especiais tenham sido tomados para minimizar o uso de pistas olfativas pelos animais, não se podia garantir que as mesmas não estivessem presentes nessas condições de treino. Alguns dos cuidados foram tomados incluindo, por

exemplo, retirar o animal do aparelho assim que o mesmo encontrava o alimento durante o desempenho da tarefa e sua transferência para a caixa de espera para comer, evitando o acúmulo de resíduos de alimento na arena. Além disso, luvas descartáveis de plástico (Waripaer, comumente utilizadas na preparação de alimentos) foram usadas para embrulhar as sementes (avelãs e amendoins) com parafilm, bem como o disco de acrílico, minimizando a impregnação desses materiais com odores. Outro cuidado adicional foi tomado em relação às possíveis pistas geradas pelas marcações deixadas pelos animais ao caminhar sobre as bolinhas de polipropileno em cada tentativa, bem como pistas olfativas. Para tanto, após cada tentativa, as bolinhas eram totalmente espalhadas e “embaralhadas” com o auxílio de um rodo de madeira (medindo 15 x 15 x 3 cm), e depois o polipropileno era nivelado de forma que a superfície ficasse a mais uniforme possível, evitando pistas proximais. Durante o treinamento na tarefa, o animal não tinha contato com qualquer outro animal para evitar a transferência de informações sobre o odor dos alimentos entre eles.

Porém, mesmo com esses cuidados havia a possibilidade do uso de pistas olfativas eventualmente não controladas. Assim, procedimentos durante o teste foram também adotados para evitar o desempenho com base nesse tipo de pista (ver adiante).

O treinamento e os testes foram realizados rotineiramente entre 08h00 e 13h00.

Antes do início dos treinos, cada animal foi previamente habituado à manipulação do experimentador por cinco minutos durante 3 dias consecutivos. No primeiro dia de manipulação deu-se início ao esquema de restrição alimentar (22 horas de privação alimentar e 2 horas de acesso a ração). Água foi oferecida *ad libitum*. No terceiro dia, os ratos receberam, em momentos distintos, pedaços de avelã ou de

amendoim em suas respectivas gaiolas, a fim de se habituarem ao sabor desses alimentos.

Durante os 9 dias que se sucederam, os animais foram submetidos à habituação ao substrato coberto por polipropileno, com o intuito de se adaptarem ao novo material e a aprenderem escavar para obter alimento. A caixa utilizada era igual à gaiola-moradia de polietileno, medindo 40 x 33 x 16 cm; porém, ao invés de maravalha, a mesma foi forrada com as bolinhas de polipropileno até a altura de 10 cm aproximadamente. Nos primeiros quatro dias os animais aprenderam a desembrulhar as sementes envolvidas pelo parafilm; inicialmente as sementes inteiras eram disponibilizadas semi-embrulhadas (pela metade) com o parafilm e, com o passar dos dias, foram totalmente embrulhadas. Os animais aprenderam que para comer era necessário desembrulhar as sementes; ao final do quarto dia isso era feito sem dificuldade. Então, ao longo dos cinco dias subseqüentes os animais foram treinados a escavar o polipropileno para obter sementes embrulhadas. No início o alimento era exposto semi-enterrado nas bolinhas de polipropileno, e foi paulatinamente enterrado até o fundo da caixa para que os animais aprendessem escavar para obtê-lo.

Após essa fase inicial, deu-se início ao treinamento na arena. Por dois dias, os animais apenas exploraram a arena, durante 5 minutos em cada dia, sem oferta de alimento, para se habituarem ao aparelho. Iniciou-se, então, o treino para busca alimentar na arena.

Foram realizadas três tentativas por dia para cada animal. O ponto de partida em cada tentativa foi variado aleatoriamente. Quando o animal era liberado na arena, seu focinho sempre estava voltado para a parede da piscina.

Na primeira tentativa, antes do animal ir para a arena, ele recebia ainda na caixa de espera (sendo esta uma caixa de polietileno, medindo 40 x 33 x 16 cm, com o fundo sem qualquer preenchimento, i.e., sem bolinhas de poliprolileno ou maravalha) um pedaço pequeno (aproximadamente 200 mg) do alimento correspondente ao que encontraria na arena; imediatamente após comer era liberado de um dos pontos de partida da margem da arena para procurar o alimento (um pedaço com aproximadamente 500 mg embrulhado em parafilm) disponibilizado visivelmente em um dos locais pré-definidos do assoalho da arena (Figura 6), em um espaço circular de aproximadamente 10 cm de diâmetro sem polipropileno (local 1); o objetivo da sinalização era servir como pista para o animal encontrar o alimento com facilidade. Encontrado o alimento 1 (e.g., avelã), o animal era transferido de volta para a caixa de espera para consumi-lo.

Terminado o consumo do alimento, i.e., após cerca de dois minutos, dava-se início à segunda tentativa. Ainda na caixa de espera o animal recebia um pedaço pesando aproximadamente 200 mg do outro alimento (e.g., amendoim) e em seguida era liberado na arena; o ponto de partida e o local onde estava disponível o alimento 2 (local 2) eram diferentes dos utilizados na primeira tentativa. O alimento embrulhado em parafilm foi também exposto de forma visível no assoalho da arena, seguindo a mesma sinalização utilizada na primeira tentativa (como na Figura 6, porém em um local diferente). Ao encontrar o alimento, o animal era imediatamente transferido para a caixa de espera para consumi-lo.

Figura 6. Fotografia da arena utilizada no teste de aprendizagem de pares associados com o alimento visivelmente disponível (como ocorre na primeira e segunda tentativas, sendo um local distinto em cada tentativa).

Decorrido o intervalo de 2 minutos, ocorre uma terceira tentativa. Nesta, quando ainda na caixa de espera o animal recebia um pedaço de aproximadamente 500 mg de amendoim ou avelã, sabor utilizado como amostra que indicava em qual local o alimento seria disponibilizado na arena na terceira tentativa em função das associações prévias realizadas nas tentativas 1 e 2. Isto é, no caso deste exemplo, se a amostra da tentativa 3 fosse amendoim, então o animal deveria procurar pelo alimento no local previamente associado ao amendoim (local 2). Diferentemente, se a amostra de alimento fosse avelã, então o animal deveria procurar pelo alimento no local previamente associado à avelã (local 1). Findo o consumo dessa amostra, o animal era liberado na arena a partir de um ponto diferente dos anteriores. Nesta tentativa, o alimento embrulhado em parafilm era enterrado no polipropileno, no local

previamente associado à amostra. Isto é, nesta terceira tentativa não havia qualquer sinalização para o animal sobre onde se encontrava o alimento; todo o polipropileno foi distribuído de maneira uniforme no assoalho da arena. Assim, o animal dependia de sua memória espacial em relação aos locais previamente associados com os diferentes sabores de alimento para fazer sua busca, devendo escavar no local sinalizado pela amostra para obtê-lo.

Em resumo, se o alimento oferecido na caixa de espera antes da terceira tentativa era o 1 (no caso do exemplo, a avelã), o animal deveria escavar no local 1 para obter alimento. Diferentemente, se o alimento oferecido era o 2 (no caso do exemplo, o amendoim), o animal deveria escavar no local 2. Para isso, os animais deveriam lembrar-se das associações “sabor-local” realizadas nas primeira e segunda tentativas. Nos dias que se seguiram, foi utilizado esse mesmo esquema básico de treinamento; porém, novos locais e novas associações foram selecionados aleatoriamente.

Embora a escolha das associações entre sabor e local e os próprios locais tenham sido aleatórios, cuidou-se para que o alimento disponibilizado em cada tentativa e em cada um dos quatro locais da arena ao longo do treinamento ocorresse igual número de vezes. Além disso, o número de vezes em que a amostra da tentativa 3 sinalizava a presença do alimento no local da arena em função da associação realizada na tentativa 1 era igual ao número de vezes em que a amostra sinalizava para a presença do alimento no local da arena em função da associação realizada na tentativa 2. Os pontos de partida dos animais, em cada tentativa, variaram aleatoriamente entre os 8 possíveis de forma equilibrada, i.e., em igual quantidade de vezes. Ademais, o

sabor do alimento a ser buscado na tentativa 3 foi avelã em 50% das vezes e amendoim nas demais 50% das vezes. Assim, tentou-se evitar vieses na busca dos animais, induzidos por maiores taxas de reforço em determinados locais ou associações.

A duração máxima de cada tentativa foi de 180 segundos. Se nesse período de tempo os animais não encontrassem o alimento, eles eram guiados pelo experimentador até o local certo para obtê-lo.

Os animais foram treinados diariamente ao longo de 150 dias. Durante todo o período de treinamento, as duas primeiras tentativas foram realizadas de acordo com a descrição acima, sempre da mesma forma. Já em relação à terceira tentativa houve algumas modificações ao longo das sessões de treino.

Nas sessões iniciais de treinamento, na tentativa 3, a semente era disponibilizada “sobre” o polipropileno de forma visível, sem o disco de acrílico (porém sem a sinalização pelo afastamento do polipropileno existente nas tentativas anteriores); à medida que os animais aprendiam a encontrar o alimento sobre o polipropileno, o mesmo era paulatinamente enterrado, até que ficasse totalmente coberto pelo polipropileno e a escavação fosse necessária para sua obtenção. Neste contexto, foi introduzido o uso do disco de acrílico, quando a semente estava completamente enterrada. Quando o animal não encontrava o alimento na terceira tentativa, ele era guiado pelo experimentador até o local onde o mesmo encontrava-se enterrado e era estimulado a escavar; após o 58º dia de treino, se o animal não encontrasse o alimento, apenas era retirado da arena ao final dos 180 segundos e

devolvido a sua gaiola-moradia, sem receber o alimento, como forma de sinalizar que erraram.

O intervalo de tempo entre a segunda e terceira tentativas foi de 2 minutos nas 82 sessões iniciais do treinamento; porém, este intervalo foi sucessivamente aumentado ao longo das sessões de treino e correspondentes Testes de Avaliação (ver adiante) até atingir 120 minutos. A partir do 82º dia de treinamento, o intervalo de tempo entre a segunda e terceira tentativas passou a ser de 5 minutos, perdurando por 11 dias, seguido de um Teste de Avaliação. Nos 13 dias seguintes, o intervalo foi de 15 minutos, até o Teste de Avaliação. Na sequência, o intervalo foi aumentado para 30 minutos e assim seguiu pelos 12 dias consecutivos até o Teste de Avaliação. Continuando o treinamento, o intervalo foi aumentado para 60 minutos, fase que durou 12 dias, seguido do Teste de Avaliação. Por último, foi empregado o intervalo de 120 minutos ao longo de 15 dias e finalizando o experimento com o Teste de Avaliação. Em outras palavras, ao final de cada fase de treino com um intervalo de tempo distinto entre a segunda e terceira tentativas, houve um Teste de Avaliação. Durante estes intervalos de tempo, os animais eram individualmente mantidos em caixas de espera, até o início da terceira tentativa.

Testes de Avaliação

Depois que os animais passaram a escavar no polipropileno, na terceira tentativa, para obterem alimento no local da arena correspondente ao sabor da amostra recebida na caixa de espera, passou-se a realizar Testes de Avaliação inseridos entre sessões de treino comuns.

No Teste de Avaliação as duas primeiras tentativas foram idênticas às do treino; diferentemente, na terceira tentativa, embora o animal tenha recebido a amostra de alimento quando ainda se encontrava na caixa de espera, não foi inserido qualquer alimento na arena, assim como não foi inserido o disco de acrílico. Assim, é possível assegurar que o desempenho nos Testes de Avaliação não foram guiados por pistas olfativas. Registrou-se o tempo total de permanência dos animais no contador certo (i.e., aquele onde o animal deveria escavar, já que o mesmo foi sinalizado pela amostra do alimento ofertado na caixa de espera, antes da terceira tentativa do Teste de Avaliação) e no contador errado (i.e., aquele onde o animal não deveria escavar, já que o mesmo não foi sinalizado pelo sabor do alimento ofertado na caixa de espera, antes da terceira tentativa do Teste de Avaliação), o número total de entradas nesses contadores, a percentagem de tempo de permanência nos quadrantes que continham esses contadores e a percentagem relativa de tempo de permanência nesses contadores.

A duração total da tentativa 3 foi sempre 180 segundos. Porém, como forma de avaliar a atividade de busca dos animais ao longo da tentativa, analisou-se os parâmetros registrados nos intervalos de 0 a 20, de 0 a 40, de 0 a 60, de 0 a 80, de 0 a 100, de 0 a 120, de 0 a 140, de 0 a 160 e de 0 a 180 segundos, correspondendo, assim, a um registro cumulativo ao longo do tempo. Doravante, nos referiremos a esses intervalos utilizados na análise dos resultados da 3ª tentativa como janelas de tempo.

Como vimos acima, o intervalo de tempo entre a segunda e terceira tentativas foi paulatinamente aumentado; foram utilizados os intervalos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Isto é, após a realização de cerca de dez sessões de treino com um determinado intervalo de tempo, seguiu-se um Teste de Avaliação com o mesmo

intervalo. Na etapa seguinte, aumentou-se o intervalo entre a segunda e a terceira tentativas em novo conjunto de sessões de treino seguido de um Teste de Avaliação, com esse novo intervalo. Deve-se ressaltar, portanto, que a quantidade de treino prévio a que os animais foram submetidos aumentou ao longo dos sucessivos Testes de Avaliação.

Ressalte-se que nesse tipo de arranjo experimental o animal é controle de si mesmo, pois compara-se seu direcionamento para o local certo em relação ao seu próprio direcionamento para o local errado.

Assim, o Teste de Avaliação permitiu avaliar se os animais desempenharam a tarefa com base em pistas olfativas. Isto é, se a busca alimentar fosse direcionada por pistas olfativas, esperar-se-ia que sua eliminação fizesse o desempenho dos animais reduzir-se ao nível do acaso. Diferentemente, se a busca alimentar fosse baseada na memória dos pares associados nas tentativas 1 e 2, o desempenho no Teste de Avaliação deveria ser mantido mesmo na ausência das pistas olfativas no local indicado pela amostra recebida na caixa de espera.

Os mesmos tipos de cuidados adotados durante o treinamento foram também adotados durante os testes. É importante notar que em 50% dos Testes de Avaliação o local certo, i.e., onde os animais deveriam buscar alimento na tentativa 3, correspondeu ao local onde receberam alimento na tentativa 1; nos demais 50% dos Testes de Avaliação ele correspondeu ao local onde os animais receberam alimento na tentativa 2. Ademais, o alimento oferecido nessas tentativas também foi contra-balanceado. Os Testes de Avaliação se deram entre dias comuns de treino.

Análise estatística

O tempo total de permanência dos animais nos contadores certo e errado, o número total de entradas nesses contadores, a percentagem de tempo de permanência nos quadrantes certo e errado e a percentagem relativa de tempo de permanência nos contadores certos ou errados em relação ao tempo de permanência em todos os quatro contadores simetricamente dispostos na arena, foram submetidos a uma Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA); os escores obtidos nos contadores certos e errados foram considerados variáveis intra-sujeitos. Foi realizada uma ANOVA separada para cada um dos parâmetros mensurados e para cada janela de tempo. Quando a ANOVA indicou a existência de diferença significativa, realizou-se um teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn para identificar a origem da diferença. Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc.) e os gráficos construídos com auxílio do programa Sigma Plot (versão 9.0).

3.2 Resultados

As Figuras 7, 8, 9 e 10 mostram o direcionamento dos animais para os locais críticos (certo e errado) da terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5, 15, 30, 60 e 120 minutos depois da segunda tentativa, em termos, respectivamente, do tempo total de permanência nos contadores certo (onde os animais deveriam escavar) e errado (onde os animais não deveriam escavar) (Figura 7), do número total de entradas nesses contadores (Figura 8), da percentagem de tempo de permanência nos

quadrantes que continham os contadores certo e errado (Figura 9), e da percentagem relativa de tempo em cada contador (Figura 10), ao longo dos primeiros 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 segundos (note que esse registro é cumulativo) dos Testes de Avaliação realizados 5, 15, 30, 60 ou 120 minutos após a segunda tentativa; as diferenças estatísticas relevantes foram apresentadas também nas Figuras.

A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao tempo de permanência dos animais nos contadores certo e errado (Figura 7) quando os intervalos de tempo entre a segunda e a terceira tentativas foram 5 ($F_{1,10} = 0,02 - 0,67$, $P > 0,05$) (Figura 7A), 15 ($F_{1,10} = 0,47 - 3,56$, $P > 0,05$) (Figura 7B), 30 ($F_{1,10} = 0,04 - 1,33$, $P > 0,05$) (Figura 7C) ou 60 ($F_{1,10} = 0,34 - 4,34$, $P > 0,05$) (Figura 7D) minutos. Diferentemente, quando o intervalo de tempo entre a segunda e terceira tentativas foi 120 minutos, os animais permaneceram significativamente mais tempo no contador certo em relação ao contador errado (Figura 7E), particularmente quando as janelas de tempo consideradas foram 40 ($F_{1,10} = 4,64$, $P < 0,05$) e 60 ($F_{1,10} = 6,33$, $P < 0,03$) segundos, sugerindo que os animais realizaram a associação “sabor-local” nas tentativas 1 e 2, e utilizaram essa informação para direcionar sua busca por alimento durante a terceira tentativa.

Figura 7. Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa. “a”, $p < 0,01$, “b”, $p < 0,03$ e “c”, $p < 0,05$, expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado.

A ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao número de entradas nos contadores certo e errado, quando o Teste de Avaliação foi realizado 5 ($F_{1,10} = 0,01 - 1,20$, $P > 0,05$) (Figura 8A), 15 ($F_{1,10} = 0,01 - 1,96$, $P > 0,05$) (Figura 8B) ou 30 ($F_{1,10} = 0,00 - 2,76$, $P > 0,05$) (Figura 8C) minutos após a segunda tentativa. Diferentemente, porém, o número de entradas no contador certo foi significativamente maior quando o Teste de Avaliação foi realizado 60 ($F_{1,10} = 0,00 - 9,11$, $P < 0,05$) (Figura 8D) ou 120 ($F_{1,10} = 2,36 - 9,38$, $P < 0,05$) (Figura 8E) minutos após a segunda tentativa. Interessantemente, quando o Teste de Avaliação foi realizado 60 minutos após a segunda tentativa, a diferença significativa restringiu-se às janelas de tempo de 60 ($F_{1,10} = 9,11$, $P < 0,01$) e 80 ($F_{1,10} = 6,03$, $P < 0,03$) segundos (Figura 8D), ao passo que quando esse intervalo foi de 120 minutos, a diferença significativa foi observada em todas as janelas de tempo superiores a 20 segundos [40s ($F_{1,10} = 4,81$, $P < 0,05$), 60s ($F_{1,10} = 8,97$, $P < 0,01$), 80s ($F_{1,10} = 9,38$, $P < 0,01$), 100s ($F_{1,10} = 8,22$, $P < 0,01$), 120s ($F_{1,10} = 7,09$, $P < 0,02$), 140s ($F_{1,10} = 5,70$, $P < 0,03$), 160s ($F_{1,10} = 4,76$, $P < 0,05$) e 180s ($F_{1,10} = 7,13$, $P < 0,02$)] (Figura 8E), indicando que houve aquisição da tarefa de pares associados.

Figura 8. Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa. “a”, $p < 0,01$, “b”, $p < 0,03$ e “c”, $p < 0,05$, expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado.

Em relação à percentagem de tempo nos quadrantes críticos certo e errado, a ANOVA revelou um efeito curioso; os animais despenderam significativamente maior percentagem de tempo no quadrante errado em relação ao quadrante certo quando o intervalo entre a segunda e a terceira tentativas foi 5 [Figura 9A, janelas de 60 ($F_{1,10} = 9,99$, $P < 0,01$), 140 ($F_{1,10} = 4,66$, $P < 0,05$), 160 ($F_{1,10} = 6,78$, $P < 0,02$) e 180 segundos ($F_{1,10} = 6,17$, $P < 0,03$)], 15 [Figura 9B, janelas de 20 ($F_{1,10} = 4,95$, $P < 0,05$), 40 ($F_{1,10} = 6,16$, $P < 0,03$), 60 ($F_{1,10} = 10,46$, $P < 0,009$), 80 ($F_{1,10} = 5,76$, $P < 0,03$), 100 ($F_{1,10} = 5,73$, $P < 0,03$), 120 ($F_{1,10} = 5,06$, $P < 0,04$) e 180 segundos ($F_{1,10} = 4,81$, $P < 0,05$)] e 30 minutos [Figura 9C, janela de 20 segundos ($F_{1,10} = 7,71$, $P < 0,01$)]. Porém, esse quadro se inverte quando os intervalos entre a segunda e terceira tentativas é aumentado para 60 minutos [Figura 9D, janela de 20 segundos ($F_{1,10} = 4,63$, $P < 0,05$)], tornando-se ainda maior quando esse intervalo é de 120 minutos [Figura 9E, janelas de 60 ($F_{1,10} = 5,74$, $P < 0,03$), 80 ($F_{1,10} = 11,00$, $P < 0,007$), 100 ($F_{1,10} = 12,80$, $P < 0,005$), 120 ($F_{1,10} = 9,53$, $P < 0,01$), 140 ($F_{1,10} = 7,44$, $P < 0,02$), 160 ($F_{1,10} = 13,10$, $P < 0,004$) e 180 segundos ($F_{1,10} = 14,48$, $P < 0,003$)].

O parâmetro percentagem de tempo nos quadrantes críticos certo e errado refere-se a áreas maiores do labirinto. Nota-se nesses resultados que nos Testes de Avaliação cujos intervalos entre a segunda e terceira tentativas foram 5, 15 e 30 minutos, a percentagem de tempo de permanência dos animais no quadrante errado foi maior que a percentagem de tempo no quadrante certo. Uma avaliação pormenorizada em relação aos pontos de partida dos animais nesta terceira tentativa permitiu constatar que esse efeito não decorre de vieses gerados pelos pontos utilizados para inserir os

animais na arena. Interessantemente, no Teste de Avaliação cujo intervalo entre a segunda e terceira tentativas foi 60 minutos os resultados se inverteram, i.e., os animais permanecem mais tempo no quadrante certo, efeito que torna-se particularmente evidente quando aquele intervalo foi 120 minutos. É possível que esse efeito tenha relação com o acúmulo de treino que acompanha os sucessivos testes de avaliação.

Figura 9. Média ($\pm$ E.P.M.) da percentagem de tempo nos quadrantes críticos certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa. “a”, $p < 0,01$, “b”, $p < 0,03$ e “c”, $p < 0,05$, expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado.

A ANOVA revelou que a percentagem relativa de tempo nos contadores certo e errado difere, sendo significativamente maior no contador certo em relação ao contador errado, quando o Teste de Avaliação envolve o intervalo de tempo entre a segunda e terceira tentativas de 120 minutos [Figura 10E, janelas de 60 ($F_{1,10} = 7,41$, $P < 0,02$), 80 ($F_{1,10} = 5,27$, $P < 0,04$) e 100 segundos ($F_{1,10} = 4,65$, $P < 0,05$)], mas não nos demais intervalos ($F_{1,10} = 0,00 - 4,26$, $P > 0,05$).

Figura 10. Média ($\pm$ E.P.M.) da percentagem relativa de tempo nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 120 (E) minutos após a segunda tentativa. “a”, $p < 0,01$, “b”, $p < 0,03$ e “c”, $p < 0,05$, expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado.

3.3 Discussão

O quadro geral que emerge desses resultados é que nos Testes de Avaliação cujos intervalos de tempo entre a segunda e terceira tentativas foram 5, 15 e 30 minutos há relativamente poucas diferenças significantes entre os escores indicadores de permanência nos locais certo e errado da arena; em alguns casos há uma tendência dos animais no sentido de direcionarem-se para o local errado, diferença esta que em alguns casos chega a ser significativa, como foi o caso da percentagem de tempo nos quadrantes críticos. Uma análise pormenorizada dessas ocorrências revelou que nessas sessões os animais tenderam a retornar ao local que havia sido reforçado na segunda tentativa, e não ao local sinalizado pelo alimento oferecido na caixa de espera antes da terceira tentativa. No caso de outros parâmetros, e.g., o número de entradas no contador, aparece uma tendência à alteração desse comportamento, que se torna evidente quando o intervalo entre a segunda e terceira tentativas é de 60 minutos, efeito que é confirmado pelos demais parâmetros, i.e., os animais passam a direcionar-se para o local certo, indicando que se lembram da localização do alimento pela associação do sabor com o local. Nesse contexto, é importante ressaltar que nos Testes de Avaliação cujos intervalos entre a segunda e terceira tentativas foram maiores, e.g., 60 e 120 minutos, a quantidade de treinamento prévio foi maior; assim, parece hipoteticamente plausível que devido à maior quantidade de treino os animais estejam adquirindo maior proficiência no desempenho da tarefa.

Essencialmente, os resultados dos Testes de Avaliação envolvendo intervalos de tempo entre a segunda e terceira tentativas de 60 e 120 minutos deixam claro que os

animais são capazes de desempenhar a presente tarefa de pares associados, indicando que aprenderam a associar o sabor do alimento ao local de sua apresentação e a se direcionarem para esse local quando o mesmo é sinalizado na caixa de espera, pela oferta de alimento do sabor previamente associado ao local.

No experimento descrito por Day et al. (2003), envolvendo uma arena quadrada contendo 49 buracos no assoalho, apresentados seletivamente pela remoção da tampa para que o animal pudesse escavar para obter o alimento, pode-se questionar se realmente os animais fizeram uso da memória espacial para encontrar alimento na terceira tentativa, uma vez que nesta tentativa eram apresentados apenas dois locais para que o animal escolhesse onde escavar e a arena incluía estímulos proximais. No presente trabalho utilizou-se uma arena preenchida uniformemente com bolinhas de polipropileno, sem a presença de qualquer estímulo proximal na arena; assim, os animais são forçados a utilizar sua memória espacial para identificar o local em que deveriam escavar, tarefa que requer a utilização de estratégias de lugar, além da recordação sobre a associação prévia “sabor-local”. É importante ressaltar que esta versão da tarefa de pares associados vale-se das vantagens usualmente encontradas no labirinto aquático de Morris, no que se refere às possibilidades de avaliar a memória espacial. Desde sua descrição, o labirinto aquático de Morris (1981) tornou-se o paradigma comportamental preferido na avaliação da memória espacial em roedores, pela sua especificidade na identificação do uso de estratégias aloentrícas de orientação. Ressalte-se, porém, que em sua versão aquática o agente motivador do comportamento do animal é aversivo (permanência na água) dado que envolve uma condição de perigo potencial para o animal, além de ser desconfortável para o mesmo

dado que envolve a imersão em água usualmente a 26 graus. Diferentemente, na tarefa de pares associados aqui descrita, exceto pela exposição repetitiva a um espaço aberto, a arena, não existem estímulos predominantemente aversivos; pelo contrário, o agente motivador do comportamento é a busca de alimento com valor hedônico para o animal. Assim, entendemos que a presente versão da tarefa de pares associados apresenta diversas vantagens em relação àquela proposta por Day et al. (2003).

No presente estudo amendoins e avelãs crus foram utilizados como reforço. Além de fácil controle experimental, esses alimentos exibem valor hedônico, distinção de sabor, são de fácil obtenção, além do custo acessível. Ademais, os animais não exibiram diferenças na busca por esses dois alimentos. Como é comum em estudos envolvendo novos alimentos, antes do início dos experimentos, foram oferecidos amendoins e avelãs para os animais a fim de se adaptarem aos novos sabores que seriam ofertados, evitando assim a neofobia (rejeição a um novo sabor quando o mesmo é oferecido aos animais pela primeira vez - Lubow, 1989 apud Manrique, 2007).

Barbano e Cador (2005) defendem que privação alimentar resulta em substancial melhora de desempenho em testes apetitivos. Considerando que a restrição alimentar pode causar alterações fisiológicas e comportamentais variadas (Boulamery-Velly et al., 2005), é importante controlar essa variável de modo a garantir que o animal mantenha boas condições fisiológicas. Durante todo o período de treinamento, os ratos permaneceram sob privação alimentar, mas com atenção especial para que a diminuição do peso corpóreo não ultrapassasse 20% do peso “basal”, ou seja, do peso que é esperado para ratos daquela idade com alimentação *ad libitum* (Andersen, 2004).

Nos últimos 30 anos, diferentes estudos têm mostrado que ratos são capazes de escolher um, dentre dois alimentos equipalatáveis e desconhecidos, de acordo com a experiência de um outro rato (Galef, 1983; Galef e Wigmore, 1983; Galef et al., 1985; Galef et al., 1988). No paradigma denominado preferência alimentar transferida socialmente, ratos (observadores) são expostos por meio de contato indireto (uma grade dividindo a caixa) a ratos (demonstradores) que comeram ração flavorizada, e.g., cacau ou canela; quando o observador privado de alimento pode escolher entre duas rações, o mesmo prefere àquela que o demonstrador comeu. Essa preferência não se deve apenas da exposição prévia ao odor, mas ao pareamento alimento com o odor de um rato (Galef et al., 1988). Para evitar que os animais do presente estudo desenvolvessem preferências decorrentes desse tipo de experiências, os animais foram alojados em caixas separadas, e também o contato social durante a tarefa foi evitado. Assim, considerando-se os cuidados tomados durante a realização dos experimentos, pode-se assegurar que os animais fizeram uso apenas das informações sobre as associações sabor-local estabelecidas nas primeira e segunda tentativas, e da pista recebida na caixa de espera para a busca do alimento na arena.

Bolinhas de polipropileno, ao invés de areia, foram utilizadas por serem mais leves, mais fáceis de manusear e pela facilidade de limpeza e eliminação de pistas olfativas. A cada nova tentativa, essas bolinhas foram totalmente embaralhadas no assoalho da arena, para evitar pistas proximais, incluindo, por exemplo, odores potencialmente deixados pelos animais em locais específicos da arena.

Os resultados dos Testes de Avaliação deixam claro que os animais não desempenharam a tarefa baseando-se em pistas olfativas, pois não havia alimento ou

disco de acrílico na arena que pudessem servir como fonte direcional desse tipo de informações. Além disso, a cada nova tentativa as bolinhas de polipropileno foram totalmente embaralhadas e espalhadas de modo a obter-se uma superfície uniforme, sem pistas proximais de natureza visual.

O tipo de memória espacial requerida para o desempenho deste tipo de tarefa parece envolver componentes de curta e de longa duração. Como os locais de oferta do alimento na arena variam a cada dia, a manutenção de informações sobre as associações específicas sabor-local são adquiridas “de novo” a cada dia, envolvendo memória operacional (Olton, 1979). Já a manutenção de informações sobre a disposição espacial das pistas do ambiente, mantida constante ao longo de todos os testes, assim como as regras embutidas nos procedimentos requeridos para o desempenho da tarefa (os animais aprendem que são três tentativas por dia, que nas duas primeiras tentativas são estabelecidas associações entre sabor e local e, mediante a amostra ofertada antes da terceira tentativa, devem direcionar-se para o local correspondente, no qual o alimento encontra-se enterrado) requerem memória de longa duração.

Não surpreende que a aquisição de uma tarefa com esse nível de complexidade envolva um longo período de treinamento dos animais (cerca de 150 dias); é possível que parte desse longo período esteja relacionado às dificuldades iniciais de identificação dos parâmetros mais adequados na padronização da metodologia experimental. Isto é, no início do treinamento, na primeira e segunda tentativas, os animais tinham dificuldade de encontrar a semente enterrada dentro do intervalo de tempo pré-estipulado (3 minutos); quando não encontravam a semente, eram guiados

pelo experimentador até o local. Com isso, alguns animais aprenderam que não seria necessário realizar a busca alimentar, pois ao final desse período, o experimentador, de qualquer maneira, o levaria até o alimento. Esse tipo de observação levou à adoção da estratégia de sinalizar o local do alimento na primeira e segunda tentativas pelo “afastamento” das bolinhas, facilitando a busca, e eliminando a necessidade de guiá-los até o alimento, facultando sua localização nos 3 minutos disponíveis. Também os procedimentos envolvendo a terceira tentativa requereram padronização. Inicialmente a semente (avelã ou amendoim) era disponibilizada visivelmente sobre uma “depressão” gerada na superfície das bolinhas de polipropileno de modo a servir como pista; esta abordagem inicial foi adotada partindo-se da premissa de que os animais teriam dificuldade de encontrar a semente quando esta se encontrava completamente enterrada nas bolinhas; à medida que os animais passaram a estabelecer uma relação entre o local sinalizado pela depressão com a oferta de alimento naquele local, a semente foi paulatinamente enterrada nas bolinhas, ficando completamente invisível; porém, durante algum tempo a “depressão” continuou existindo como pista. Assim, os animais persistiram no comportamento de busca, na região da “depressão” e escavavam para obter a semente. A medida que esse comportamento se estabelecia, a depressão no assoalho era reduzida ao longo dos treinamentos até sua completa eliminação. Porém, num primeiro momento, observamos que quando esta sinalização desaparecia, os animais deixavam de escavar na arena, sugerindo que associaram o alimento à “depressão”, e extinguiram o comportamento quando essa pista desapareceu. Então, adotou-se a estratégia de guiá-los até o local e estimulá-los a escavar. Porém, essa estratégia também não foi efetiva já que os animais deixaram de

se empenhar na busca, aguardando serem guiados até ao alimento. Novamente a estratégia na terceira tentativa foi alterada. A semente foi disponibilizada de forma “semi-enterrada”, com uma pequena porção visível; porém, o animal deveria estar nas proximidades do local para visualizá-la. A medida que o animal retomou a busca pela semente, a mesma foi paulatinamente enterrada. Foi necessário incluir uma etapa em que os animais foram retirados da arena e devolvidos às suas gaiolas-moradia, ao final do período de três minutos disponíveis, mesmo que eles não encontrassem a semente. Então, ao longo dos dias, os animais parecem ter aprendido que deveriam procurar pela semente na terceira tentativa mesmo na ausência de qualquer sinalização no assoalho da arena, caso contrário não receberiam qualquer semente.

Após o aprendizado dos animais no sentido de que para obter alimento na terceira tentativa seria necessária a escavação nas bolinhas, notou-se que, quando os animais iam para o local certo e não encontravam a semente nos primeiros segundos de escavação, eles extinguiram o comportamento de escavar naquele local (embora estivessem no local certo) e dirigiam-se para outro local qualquer da arena e retomavam a escavação no novo local. Em outras palavras, como a semente é relativamente pequena e estava embrulhada em parafilm, o que minimizava a liberação de estímulos olfativos, foi relativamente comum observarmos que os animais iniciavam a escavação no local correto, mas não encontrando a semente de imediato, deixavam de buscar naquele local. Assim, sua aprendizagem estava sendo comprometida. Nesse estágio, passamos a apresentar a semente posicionada sobre o disco de acrílico de 7 cm de diâmetro, ambos enterrados, com o intuito de “aumentar a área” da região que continha a semente. Assim, ao escavar no local certo prontamente

o animal encontrava o disco o que sinalizava que ele deveria persistir na sua busca naquele local já que a semente era apresentada nesse mesmo local.

É provável que a grande quantidade de treinamento requerido neste primeiro experimento (150 dias) tenha sido decorrência dessas diversas modificações descritas na metodologia até se encontrar uma estratégia eficaz para que os animais aprendessem a tarefa de maneira satisfatória.

Day et al. (2003) treinaram ratos ao longo de seis dias numa arena que continha 49 buracos, e observaram que no final do sexto dia o animal havia aprendido a tarefa. Nesse estudo, o rato quando era liberado para a arena deveria localizar um único buraco destampado na primeira e segunda tentativa, e nele escavar para obter o alimento. Na terceira tentativa, em que apenas esses dois buracos encontravam-se destampados, o animal dirigia-se para o local correto para escavar. É possível que essa facilidade na aquisição da tarefa esteja relacionada com a utilização, pelos animais, de pistas proximais, incluindo pistas olfativas oriundas dos buracos, fartamente disponíveis, pois em todos os buracos da arena contendo areia havia uma mistura de todos os flavorizantes utilizados no estudo de Day et al. (2003). Deve-se ressaltar que esse tipo de pista era inexistente no presente experimento, cuja orientação dependia de um mapa cognitivo do ambiente.

Na presente tarefa, a associação “sabor-local” ocorre apenas uma única vez a cada dia (nas duas primeiras tentativas) e a busca alimentar, na terceira tentativa, é guiada pelo mapa cognitivo, sem qualquer pista local de natureza olfativa ou visual, sendo, portanto, uma tarefa adequada para avaliar a busca alimentar guiada pela memória espacial sobre fontes alimentares previamente visitadas. Como foram feitas

diversas manipulações e alterações nos procedimentos de treinamento dos animais, julgou-se necessário replicar o teste, com os parâmetros e procedimentos já identificados nesse experimento como efetivos, num novo lote de animais.

4. EXPERIMENTO 2

APRENDIZAGEM DA TAREFA DE BUSCA ALIMENTAR ENVOLVENDO PARES ASSOCIADOS - UMA REPLICAÇÃO

Os resultados do Experimento 1 mostraram que a tarefa de aprendizagem de pares associados, envolvendo associações “sabor-local” adquiridas após um único pareamento diário entre esses estímulos, permite avaliar a busca alimentar guiada por memória espacial. Porém, o prolongado treinamento requerido para aprendizagem da tarefa pode se constituir num forte elemento restritivo ao seu uso como instrumento experimental para avaliar essas funções em ratos.

Não ficou claro em que extensão esse treinamento prolongado foi decorrente das diversas alterações introduzidas ao longo do Experimento 1, visando o ajuste de parâmetros e de estratégias de manipulação dos animais, ou se de fato a aquisição da tarefa requer treinamento tão prolongado dos animais. Assim, pareceu pertinente testar um novo lote de animais, levando em consideração parâmetros e estratégias identificados como efetivos no experimento anterior, para avaliar se a extensão do treinamento pode ser reduzida.

4.1 Materiais e Métodos

Sujeitos

Foram utilizados 25 ratos Wistar, machos, adultos, provenientes do biotério do Instituto de Biociências da USP, com idade de aproximadamente 5 meses, pesando

entre 350 e 450g no início do experimento. Destes, apenas 13 concluíram a tarefa. Os animais que não aprenderam a tarefa foram retirados do experimento ao longo do treinamento.

Os animais foram mantidos individualmente em caixas de polietileno (medindo 40 x 33 x 16 cm) forradas com maravalha. Estes permaneciam em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luz acesa das 7h00 às 19h00).

Os animais permaneceram sob restrição alimentar, sendo privados de ração por 22 horas diárias e acesso a mesma por 2 horas (30 minutos após cada sessão de treino/teste), procedimento este que perdurou durante todo o experimento, sendo a água oferecida *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente no início do experimento e depois quinzenalmente. Esse monitoramento permitiu controlar o peso dos animais de modo a manterem pelo menos 80% do peso inicial (Andersen, 2004).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Procedimento Comportamental

O aparelho e os alimentos utilizados na tarefa foram exatamente os mesmos já descritos no Experimento 1.

Como no Experimento 1 foram realizadas diversas manipulações relacionadas à metodologia para o treinamento dos animais na tarefa de pares associados, no presente experimento resolveu-se seguir etapas que, de acordo com a observação prévia do experimentador no teste anterior, parecem ser efetivas.

Durante três dias consecutivos, os animais foram submetidos à manipulação pelo experimentador, e, concomitantemente, iniciou-se a restrição alimentar. No quarto dia receberam, em momentos distintos, sabores de avelã e amendoim, em sua gaiola-moradia. Nos seguintes seis dias, os animais foram habituados ao polipropileno, numa caixa cujo assoalho era forrado por bolinhas de polipropileno, e, também, treinados a desembrulhar as sementes envolvidas por parafilm e escavar nas bolinhas para obter alimento. Nos 11º e 12º dias, os animais foram apenas expostos à arena, por 5 minutos, a fim de se adaptarem ao equipamento. Iniciou-se, então, o treinamento para buscar alimento na arena. Desde o início, os ratos foram submetidos a três tentativas por dia. O animal recebia, na caixa de espera, antes de cada tentativa, um pequeno pedaço do alimento que encontraria na arena, como pista para fazer sua busca. Nas duas primeiras tentativas, o local onde estava disponibilizado o alimento na arena era marcado pelo afastamento das bolinhas (ver Figura 6), o que facilitava aos animais visualizar e encontrar a semente. O intervalo entre a segunda e a terceira tentativa foi sempre 60 minutos, ao longo do experimento.

Desde o início do treinamento na arena, na terceira tentativa, o alimento era oferecido sobre o disco de acrílico (para aumentar a área da semente) e, o disco com a semente encontrava-se completamente enterrado nas bolinhas de polipropileno, ficando a superfície do polipropileno homogênea, sem marcações que poderiam funcionar como pistas proximais. Nesta terceira tentativa, nos primeiros 20 dias do treinamento, os animais foram guiados pelo experimentador até o local onde a semente estava enterrada e estimulados a escavar. Após esse período, os animais eram colocados na arena e, quando não escavavam e encontravam a semente nos 180

segundos da tentativa, eram retirados e devolvidos à sua gaiola-moradia sem receber a semente; não mais eram guiados até o local onde alimento havia sido enterrado. Pela aplicação dessa metodologia, quase todos os animais aprenderam que era necessário escavar na terceira tentativa, e que ao encontrar o disco de acrílico receberiam a semente. Quando o animal escavava muito próximo ao local correto onde estava depositada a semente e o disco, mas não a encontrava, o experimentador o ajudava guiando-o até o local (ao lado), pois com esse estímulo o aprendizado tornava-se, aparentemente, mais eficaz. Alguns animais, porém, escavavam também em locais em que nenhuma associação havia ocorrido. Outros, ao longo dos dias, desistiam do comportamento de escavar; neste último caso, o experimentador novamente os guiava e os estimulava a escavar, e, com isso, alguns deles retomavam suas buscas, outros que não aprendiam eram retirados da tarefa. Os animais foram treinados por 60 dias, finalizando com um Teste de Avaliação.

O experimento foi realizado diariamente entre 08h00 e 13h00.

Testes de Avaliação

Dois Testes de Avaliação foram utilizados, sendo um no 53º dia e o outro no 60º dia de treinamento, quando o experimento foi concluído. Os procedimentos adotados nesses Testes foram os mesmos descritos no Experimento 1.

Análise estatística

Foi registrado o tempo de permanência no contador certo e no contador errado e o número de entradas nesses contadores. Uma ANOVA separada foi realizada para

cada parâmetro mensurado e para cada janela de tempo, conforme descrito no Experimento 1. Os escores mensurados nos contadores certo e errado e os testes dos dias 53 e 60 foram incluídos como fatores intra-sujeitos. Quando a ANOVA indicou a existência de diferença significativa, realizou-se um teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn para identificar a origem da diferença.

Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc.) e os gráficos construídos com auxílio do programa Sigma Plot (versão 9.0).

4.2 Resultados

As Figuras 11 e 12 mostram, respectivamente, o tempo de permanência e o número de entradas nos contadores certos e errados, ao longo de janelas de tempo de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 180 segundos, nos Testes de Avaliação realizados no dia 53 (Figuras 11A e 12A) e no dia 60 (Figuras 11B e 12B).

Em relação ao tempo de permanência nos contadores (Figuras 11A e 11B) a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes, quando as janelas de tempo consideradas foram de 20, 40 e 60 segundos ($F_{1,12} = 0,02 - 2,26$, $P > 0,05$). Diferentemente, quando as janelas de tempo foram 80 ($F_{1,12} = 10,27$, $P < 0,007$), 100 ($F_{1,12} = 8,43$, $P < 0,01$), 120 ($F_{1,12} = 5,33$, $P < 0,03$), 140 ($F_{1,12} = 7,03$, $P < 0,02$), 160 ($F_{1,12} = 14,21$, $P < 0,002$) e 180 ($F_{1,12} = 13,01$, $P < 0,003$) segundos os animais permaneceram significativamente mais tempo no contador certo em relação ao contador errado, indicando aprendizagem da tarefa de pares associados.

Figura 11. Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados nos dias 53 (A) e 60 (B). * $< 0,05$, expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado.

Em relação ao número de entradas nos contadores (Figuras 12A e 12B), a ANOVA revelou ausência de diferença significativa apenas em relação aos resultados referentes à janela de tempo de 20 segundos ($F_{1,12} = 2,12$, $P > 0,05$). Em outras palavras, houve diferença significativa em relação ao número de entradas nos contadores certo e errado em todas as demais janelas de tempo [40 ($F_{1,12} = 5,22$, $P < 0,04$), 60 ($F_{1,12} = 10,22$, $P < 0,007$), 80 ($F_{1,12} = 16,36$, $P < 0,001$), 100 ($F_{1,12} = 30,60$, $P < 0,0001$), 120 ($F_{1,12} = 31,09$, $P < 0,0001$), 140 ($F_{1,12} = 33,95$, $P < 0,0001$), 160 ($F_{1,12} = 27,27$, $P < 0,0002$) e 180 ($F_{1,12} = 25,42$, $P < 0,0003$) segundos].

Figura 12. Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos Testes de Avaliação realizados nos dias 53 (A) e 60 (B). * $< 0,05$, expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado.

4.3 Discussão

Resumidamente, na terceira tentativa de ambos os testes de avaliação os animais permaneceram mais tempo no contador certo em relação ao contador errado, bem como entraram mais vezes neste contador, indicando que foram capazes de se recordar do local específico onde alimento estaria enterrado nesta tentativa. Dados os cuidados adotados no delineamento e execução dos experimentos, pode-se excluir a hipótese de que os animais se utilizaram de pistas olfativas para realizar sua busca, uma vez que o alimento e o disco de acrílico sobre o qual o alimento era oferecido não estavam presentes na arena na terceira tentativa dos Testes de Avaliação, e que as bolinhas do assoalho foram embaralhadas e espalhadas por toda a arena a cada tentativa, sendo distribuídas de forma uniforme, sem gerar pistas proximais.

Assim, os resultados do presente experimento confirmam os resultados de Day et al. (2003) mostrando que ratos aprendem a associar os sabores de dois alimentos, cada qual com o local de sua apresentação. Os resultados mostram ainda que esses animais são capazes de resgatar essas informações da memória espacial 60 minutos depois de sua aquisição, direcionando sua busca alimentar preferencialmente para um dos locais previamente associados ao sabor, depois de receberem uma amostra de alimento correspondente ao local para onde devem direcionar-se. Mais interessante, esse desempenho foi possível com base em memória espacial do ambiente, sem o uso de pistas proximais no labirinto, indicando que esta aquisição da tarefa de aprendizagem de pares associados pode assentar-se em orientação e memória espaciais, desde que cuidados especiais sejam tomados na realização dos experimentos.

A substancial redução da quantidade de dias de treino necessário para a aquisição da tarefa, em particular quando comparado com o Experimento 1, provavelmente deve-se ao uso de parâmetros de treinamento adequados, na medida em que eles foram identificados.

5. EXPERIMENTO 3

EFEITOS DE DANOS SELETIVOS NO NÚCLEO MAMILAR MEDIAL NO DESEMPENHO DA TAREFA DE APRENDIZAGEM DE PARES ASSOCIADOS: UM ESTUDO PRELIMINAR

Os corpos mamilares são estruturas encefálicas que se conectam a formação hipocampal (Papez, 1937), estrutura que parece desempenhar um papel central no processamento da memória de natureza espacial (O'Keefe e Nadel, 1978; Olton, 1978).

Estudos prévios envolvendo danos seletivos nos sub-componentes da formação hipocampal ou sua circuitaria demonstram a ocorrência de prejuízo no funcionamento da memória espacial (O'Keefe e Nadel, 1978; Milani et al., 1998; Xavier et al., 1999; Vertes et al., 2001; Costa et al., 2005).

Lesões dos CM ou do trato mamiló-talâmico em roedores prejudicam o desempenho em tarefas que requerem memória, sugerindo também a contribuição desta estrutura nervosa no processamento da memória espacial. Por exemplo, danos nos CM de roedores levam a prejuízos de desempenho (1) em tarefas de alternância espontânea no labirinto em "T" (Field et al., 1978; Beracochea e Jaffard, 1987; Aggleton et al., 1995; Gaffan et al., 2001), (2) no labirinto radial de 8 braços (Saravis et al., 1990; Sziklas e Petrides, 1993; Vann e Aggleton, 2003) e (3) no teste de memória de referência (Sutherland e Rodriguez, 1989) e de memória operacional (Santin et al., 1999; Vann e Aggleton, 2003), ambos no labirinto aquático de Morris. Danos nos CM de macacos também geram prejuízos de desempenho em testes que requerem memória espacial (Holmes et al., 1983). Em humanos, a síndrome amnésica

de Wernicke-Korsakoff é freqüentemente associada com danos nos CM (Sullivan et al., 1999). Essa síndrome é caracterizada pela dificuldade de adquirir e reter novas informações na memória declarativa (amnésia anterógrada) e pela dificuldade de evocar informações previamente arquivadas (amnésia retrógrada). Kopelman (1995) ressaltou que o núcleo mamilar medial sempre está disfuncional em pacientes com a síndrome de Korsakoff.

Assim, a literatura é consistente no que se refere ao envolvimento dos CM na memória. Porém, como vimos, os CM não correspondem a uma única estrutura, mas a um conjunto de estruturas nervosas, não estando claro o papel desempenhado por cada um deles nessa função.

O núcleo mamilar medial é um sub-componente dos CM amplamente innervado por fibras imunorreativas ao MCH. Este hormônio está relacionado, entre outras funções, com o comportamento alimentar (Presse et al., 1996; Qu et al., 1996; Herve e Fellmann, 1997; Rossi et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Shimada et al., 1998; Tritos et al., 2001; Borowsky et al., 2002; Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002; Sahu, 2002; Takekawa et al., 2002; Abbott et al., 2003; Clegg et al., 2003; Gomori et al., 2003; Shearman et al., 2003) e memória e aprendizagem espacial (McBride et al., 1994; Monzon et al., 1999; Santin et al., 1999; Varas et al., 2002a; Varas et al., 2002b).

Assim, é hipoteticamente plausível que o MM esteja numa posição privilegiada para contribuir para o comportamento de busca alimentar, em que a atividade de neurônios que liberam MCH poderia induzir a recordação de memórias espaciais relacionadas a fontes alimentares previamente exploradas. Em outras palavras, quando em estado de jejum haveria aumento na liberação de MCH levando à estimulação do

MM; esta estimulação, por sua vez, teria reflexos sobre a atividade da formação hipocampal. A atividade conjunta dessas estruturas nervosas poderia levar à ativação de circuitos neurais que representam locais em que alimento foi anteriormente encontrado, fazendo com que o animal se recorde desses locais. Essa recordação em associação com o estado de jejum poderia contribuir para o deslocamento do animal até aquele local, aumentando assim, em função de suas experiências anteriores, as chances de encontrar alimento.

No presente experimento nos propusemos investigar a possível participação do MM nos processos de memória espacial relacionada à busca alimentar, por meio da tarefa de aprendizagem de pares associados descrita no Experimento 2.

Depois que os animais adquiriram a tarefa de aprendizagem de pares associados (baseada na memória espacial para busca alimentar), com intervalo fixo de 60 minutos entre a segunda e terceira tentativas (Experimento 2), os mesmos foram submetidos à cirurgia estereotóxica para indução de lesão citotóxica seletiva do MM, pela micro-infusão de NMDA. Após a cirurgia, os animais foram re-treinados e testados na tarefa de aprendizagem de pares associados, mantendo a mesma estrutura metodológica utilizada no treinamento pré-operatório (ver Experimento 2).

5.1 Materiais e Métodos

Sujeitos

Os treze animais previamente submetidos ao treinamento na tarefa de aprendizagem de pares associados no Experimento 2 foram submetidos à cirurgia

estereotóxica para compor os grupos lesado e controle-operado deste experimento. A escolha dos animais que foram incluídos nesses dois grupos foi realizada por meio de sorteio, seguido de uma análise estatística preliminar para averiguar que os grupos assim constituídos exibiam o mesmo nível de desempenho pré-operatório na tarefa de aprendizagem de pares associados (foram analisados os resultados do Experimento 2). Desses 13 animais, restaram 7 ao final dos experimentos, sendo 4 pertencentes ao grupo com danos seletivos no MM e 3 pertencentes ao grupo controle-operado (ver adiante); dentre os animais excluídos deste experimento, 2 faleceram logo após a cirurgia e 4 faleceram ao longo dos treinos pós-operatórios, antes da conclusão do re-treinamento e testes.

Face à alteração na constituição dos grupos, foi realizada uma nova análise estatística para avaliar se o desempenho durante o treinamento pré-operatório desses grupos assim constituídos diferia. Felizmente, constatou-se que não havia diferenças significativas no desempenho desses dois grupos na tarefa de aprendizagem da tarefa de pares associados.

Esses animais foram mantidos individualmente, nas mesmas condições descritas no Experimento 2. Após o término do Experimento 2, os animais tiveram livre acesso a água e ração; assim, os animais tiveram a oportunidade de se recuperar de eventuais deficiências de saúde provocadas pela privação alimentar. Durante este período foram realizadas as cirurgias. Três dias antes da retomada dos treinos comportamentais pós-cirurgia, os animais foram novamente incluídos num esquema de privação alimentar similar ao utilizado no Experimento 2, procedimento este que perdurou durante todo o experimento, sendo a água oferecida *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Os animais estavam com cerca de 12 meses de idade quando foi realizada a cirurgia.

Antes da cirurgia, foram realizadas cirurgias piloto em animais não incluídos nos experimentos (10 cirurgias) com depósito de fluorogold (um tipo de marcador) que só foram utilizados para identificação e ajuste das coordenadas posteriormente utilizadas na indução de danos seletivos no MM por meio da micro-infusão de NMDA.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma injeção intra-peritoneal (i.p.) de Equitesina na dose de 0,3ml/100g de peso corporal. Após anestesia, o animal era colocado no aparelho estereotático. Logo em seguida à tricotomia, era efetuada uma incisão longitudinal da pele sobre o crânio. As bordas da pele eram rebatidas e o periósteo removido. Então, efetuava-se a abertura do crânio, com o auxílio de uma broca odontológica e de um escareador, de tamanho suficiente para a passagem da micropipeta que permitia realizar o depósito micro-iontoforético de NMDA (N-Methyl-D-Aspartic Acid, Sigma) a 0,15M, bilateralmente, no MM. As coordenadas estereotáticas utilizadas, baseadas no atlas de Paxinos e Watson (1998), foram: ântero-posterior = ± 10.0 mm a partir do polo frontal, meso-lateral = ± 0.4 mm a partir da linha mediana e dorso-ventral = 8.7 mm a partir da superfície do córtex. Os depósitos foram feitos por meio de micropipetas de vidro estirado com diâmetro interno de ponta na ordem de 40 μ m, mediante aplicação de -15 μ A de corrente pulsátil (7 segundos “on”,

seguidos de 7 segundos “off”) ao longo de 10 minutos, proveniente de uma fonte de corrente constante (Midgard Eletronics); após o término da injeção, a pipeta permaneceu no local por 5 minutos adicionais antes de ser retirada do encéfalo, com o objetivo de se evitar rastros de NMDA ao longo do seu trajeto. Um grupo de animais foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem receber a infusão de NMDA (salina foi utilizada em seu lugar, cuja aplicação também se deu por meio de $-15\mu\text{A}$ de corrente pulsátil (7 segundos “on”, 7 segundos “off”) ao longo de 10 minutos), sendo denominado grupo controle-operado.

Procedimento comportamental

O aparelho, os alimentos utilizados na tarefa e os cuidados no controle experimental foram exatamente os mesmos já descritos no Experimento 2.

Quarenta dias após o procedimento cirúrgico, portanto após completa recuperação dos animais, os retomou-se no treinamento na tarefa de aprendizagem de pares associados, no mesmo horário e sob as mesmas condições descritas no Experimento 2. Como os animais já haviam aprendido a tarefa pré-operatoriamente, os mesmos foram submetidos diretamente ao treino, incluindo três tentativas por dia, com o alimento semi-enterrado na terceira tentativa, i.e., com uma pequena parte visível na superfície do polipropileno, sendo paulatinamente enterrado ao longo dos dias; no 10º dia de treino a semente já estava totalmente coberta pelo polipropileno, juntamente com o disco de acrílico. O intervalo entre a segunda e terceira tentativas foi mantido em 60 minutos desde o primeiro dia de treino pós-operatório. Os animais foram treinados diariamente ao longo de 29 dias.

Testes de Avaliação

Foram realizados três Testes de Avaliação, nos 19º, 24º e 29º dias de treino/teste comportamentais pós-operatórios. Os procedimentos adotados nesses Testes foram os mesmos descritos no Experimento 1.

Perfusão

Ao final de todos os testes comportamentais (que incluiu esta tarefa de pares associados e o labirinto em cruz elevado - ver adiante) os ratos foram anestesiados com uma injeção intra-peritoneal de hidrato de cloral (Merk) a 0.2%, na proporção 0,4 ml/100g de peso corporal. Em seguida, por meio de uma bomba peristáltica (Cole Parmer) os animais foram perfundidos por via trans-aórtica inicialmente com 300ml de solução salina 0.9%, seguida de 1000 ml de solução fixadora de formalina a 10%. Os encéfalos permaneciam na caixa craniana por 2 horas na geladeira e só então eram removidos do crânio e transferidos para uma solução contendo sacarose a 20% em tampão fosfato de potássio 0.02M, onde permaneciam por 24 horas, sob temperatura de 4°C.

Histologia

Vinte e quatro horas após a perfusão, secções coronais seriadas de 30 µm de espessura foram obtidas, utilizando-se micrótomo de congelamento (Reicher-Young). As secções eram colhidas na região dos corpos mamilares, em intervalos regulares de 120 µm e mantidas em solução fosfato de potássio até a montagem. As secções foram montadas em lâminas e coradas com tionina para evidenciar a presença de corpúsculos

de Nissl e para a avaliação da localização e extensão das perdas celulares produzidas pelas injeções de NMDA.

Análise histológica

As secções histológicas foram analisadas ao microscópio; apenas os resultados de animais com lesão bilateral do MM foram incluídos nas análises estatísticas. Foram realizadas análises qualitativas da extensão da lesão e da seletividade das perdas celulares decorrentes da injeção de NMDA.

Análise estatística

Testes pré- e pós-operatório

Foi realizada uma ANOVA do tempo de permanência nos contadores críticos e do número de entradas nesses contadores nos Testes de Avaliação da tarefa de aprendizagem de pares associados realizados pré- e pós-operatoriamente incluindo apenas os animais que sobreviveram às neurocirurgias e que foram também incluídos nos testes pós-operatórios. Como descrito acima, isso envolveu 4 animais do grupo com danos no MM e 3 animais do grupo controle-operado; esses grupos foram tratados como fator entre-sujeitos. A ANOVA incluiu ainda os escores referidos acima nos contadores certos e errados, bem como os escores dos diferentes Testes de Avaliação, como fatores intra-sujeitos. Quando a ANOVA indicou a existência de diferença significativa, realizou-se um teste *post hoc* de comparações múltiplas de Dunn para identificar a origem da diferença.

Além disso, calculou-se a média do número de entradas nos contadores críticos, por animal, a partir dos resultados obtidos nos testes de avaliação realizados antes da lesão (dias 43 e 49) e depois da lesão (dias 19, 24 e 29), para fins de comparação do desempenho pré- e pós-operatório; essas médias foram submetidas a uma ANOVA tendo grupo (lesado *versus* controle) como fator entre-sujeitos, e contador (certo *versus* errado) e momento dos testes (pré- *versus* pós-operatório) como fatores intra-sujeitos. Procedimento similar foi aplicado em relação ao tempo de permanência nos contadores críticos.

Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc.) e os gráficos construídos com auxílio do programa Sigma Plot (versão 9.0).

5.2 Resultados

Resultados histológicos

A análise qualitativa das secções histológicas revelou que os quatro animais incluídos no grupo lesado exibiram lesão relativamente extensa, porém não completa de todo o núcleo MM, bilateralmente. Em dois desses animais a lesão incluiu ainda uma pequena parte do núcleo mamilar lateral. A Figura 13A mostra uma fotomicrografia do MM e de regiões circunvizinhas de um animal do grupo controle-operado, cujas células estão íntegras. Já a Figura 13B mostra um exemplo típico de lesão bilateral e seletiva do MM, com presença de grande quantidade de células gliais na região, caracterizando uma cicatriz nervosa, e desordem neuronal no MM, produzida pela aplicação micro-iontoforética de NMDA.

Figura 13. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de um animal do grupo controle-operado (**A**) e de um animal do grupo lesado (**B**), ao nível dos corpos mamilares, coradas com tionina. Legendas: núcleo mamilar medial (MM), fórnix (fx), núcleo supra-mamilar (SuM) e núcleo mamilar lateral (LM) (aumento de 4x).

Resultados comportamentais

Pré-operatórios

Os resultados relativos ao tempo de permanência nos locais críticos nos Testes de Avaliação realizados durante o Experimento 2, incluindo apenas os animais que sobreviveram a neurocirurgia e subseqüentes testes comportamentais, separando, retrospectivamente os grupos posteriormente constituídos, são mostrados na Figura 14 (foram incluídos os resultados dos dias 53 e 60, do Experimento 2). Na ANOVA, desses resultados foram incluídos apenas os 4 animais do grupo lesado e os 3 animais do grupo controle-operado; observou-se, em relação ao tempo de permanência nos

contadores certo e errado, ausência de diferenças significativas entre os grupos antes da cirurgia ($F_{1,5} = 0,01-1,78$, $P > 0,10$) (comparar Figuras 14A e 14B, e as Figuras 14C e 14D). A ANOVA revelou a existência de diferenças significantes entre os escores de tempo de permanência nos locais certo e errado, interagindo com o dia de Teste de Avaliação, apenas na janela de tempo de 20 segundos ($F_{1,5} = 6,78$, $P < 0,05$). A inspeção da Figura 14 revela que esse efeito está relacionado à diferença no tempo de permanência nos contadores certo e errado, que é maior no dia 60 em relação ao dia 53. Nenhuma outra diferença significativa foi encontrada nesses resultados.

Esses resultados, em comparação com os resultados completos do Experimento 2, sugerem que, em relação ao tempo de permanência nos locais críticos, a redução do número de animais compromete a detecção estatística de diferenças.

Figura 14. Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa do Teste de Avaliação realizado nos 53° (A e B) e 60° (C e D) dias dos grupos lesado (A e C) e controle-operado (B e D), nos testes pré-operatórios (note que como os testes foram realizados antes da neurocirurgia, a análise relativa aos grupos é apenas retrospectiva. * $< 0,05$ expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado. Note alteração de escala dos gráficos.

Os resultados relativos ao número de entradas nos contadores certo e errado nos Testes de Avaliação realizados durante o Experimento 2, incluindo apenas os animais que sobreviveram a neurocirurgia e subseqüentes testes comportamentais, separando, retrospectivamente, os grupos posteriormente constituídos, são mostrados na Figura 15. A ANOVA envolvendo os escores mensurados nos Testes de Avaliação (dias 53 e 60, do Experimento 2), incluindo apenas os 4 animais do grupo lesado e os 3 animais do grupo controle-operado, revelou, em relação ao número de entradas nos contadores certo e errado, ausência de diferenças significativas entre os grupos antes da cirurgia em todas as janelas de tempo consideradas ($F_{1,5} = 0,01-1,28$, $P > 0,20$) (comparar Figuras 15A e 15B, e as Figuras 15C e 15D). Além disso, a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação ao número de entradas nos contadores certo e errado, quando as janelas de tempo foram 20, 40 e 60 segundos ($F_{1,5} = 0,00-2,18$, $P > 0,05$). Porém, a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes entre o número de entradas nos contadores certos e errados quando as janelas de tempo foram de 80 ($F_{1,5} = 6,62$, $P < 0,05$), 100 ($F_{1,5} = 21,36$, $P < 0,006$), 120 ($F_{1,5} = 22,23$, $P < 0,006$), 140 ($F_{1,5} = 23,93$, $P < 0,005$), 160 ($F_{1,5} = 14,56$, $P < 0,02$) e 180 ($F_{1,5} = 12,13$, $P < 0,02$) segundos (Figuras 15A e 15B, e as Figuras 15C e 15D), indicando que mesmo havendo um reduzido número de animais em cada grupo experimental, a estatística foi sensível o suficiente para detectar a aprendizagem da tarefa de pares associados em ambos os grupos. Nenhuma outra diferença estatística entre os fatores comparados foi detectada.

No conjunto, essa análise retrospectiva dos escores dos animais posteriormente incluídos nos grupos lesado e controle-operado revela que seu desempenho não diferia

significativamente antes da neurocirurgia, indicando que a separação dos animais resultou em grupos estatisticamente equivalentes em termos de desempenho pré-operatório, validando assim comparações entre os resultados comportamentais pós-operatórios. Além disso, tanto o desempenho dos animais do grupo que viria a ser lesado como o dos animais do grupo que viria a ser controle são indicativos de que houve aprendizagem da tarefa de pares associados, uma vez que os animais de ambos os grupos permanecem mais tempo realizando busca por alimento no local correto, em relação ao tempo de permanência no local errado.

Figura 15. Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa do Teste de Avaliação realizado nos 53° (A e B) e 60° (C e D) dias, dos grupos lesado (A e C) e controle-operado (B e D), nos testes pré-operatórios (note que como os testes foram realizados antes da neurocirurgia, a análise relativa aos grupos é apenas retrospectiva. $* < 0,05$ expressam os p-valores da comparação dos escores nos contadores certo e errado. Note alteração de escala dos gráficos.

Pós-operatórios

Além do re-treino dos animais, foram realizados também 3 Testes de Avaliação, nos dias 19, 24 e 29 da fase comportamental pós-operatória. Os resultados, em termos do tempo de permanência nos contadores certos e errados e do número de entradas nesses contadores são mostrados, respectivamente, nas Figuras 16 e 17.

Em relação ao tempo de permanência dos animais nos contadores certo e errado nos Testes de Avaliação (Figura 16) as únicas diferenças significantes detectadas pela ANOVA referem-se à interação entre os fatores contador (certo *versus* errado), dia (19°, 24° *versus* 29°) e grupo (lesado *versus* controle-operado) ($F_{2,10} = 4,84$, $P < 0,04$) na janela de tempo de 160 segundos, e à interação entre os fatores contador (certo *versus* errado) e grupo (lesado *versus* controle-operado) ($F_{1,5} = 7,34$, $P < 0,05$) na janela de 180 segundos. Ainda, em relação à interação entre os fatores contador, dia e grupo, os valores de “F” da ANOVA exibiram p-valores menores do que 0,10 nas janelas de tempo de 100 ($F_{2,10} = 3,26$, $P = 0,084$), 120 ($F_{2,10} = 3,01$, $P = 0,094$) e 140 ($F_{2,10} = 3,08$, $P = 0,091$) segundos. Todas as demais comparações não revelaram quaisquer diferenças significantes. De fato, como ilustrado na Figura 16, enquanto no dia 19° os animais do grupo controle operado exibiram marcada preferência pela busca alimentar no local errado (Figura 16B), o que se acentua nas janelas de tempo maiores, esse quadro se inverte completamente no dia 29° (Figura 16F), ou seja, esses animais exibem marcada preferência pela busca no local certo. O mesmo não é observado nos animais do grupo lesado, que não exibiram qualquer tendência à busca preferencial por um desses locais (Figuras 16A, 16C e 16E), como se sua habilidade para lidar com os requisitos da tarefa envolvendo a busca preferencial tivesse sido comprometida.

Figura 16. Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa, nos Testes de Avaliação dos grupos lesado no MM (A, C e E) e controle-operado (B, D e F), realizados nos 19º, 24º e 29º dias. Note alteração de escala dos gráficos.

Embora tentadora, deve-se ser cuidadoso em relação a essa interpretação; o reduzido número de animais incluídos nessa análise, associada à busca preferencial pelo local errado no dia 19º e ausência de busca preferencial pelo local certo no dia 24º, por parte dos animais do grupo controle-operado, sugerem que o efeito detectado no Experimento 2, envolvendo a busca preferencial pelo local certo em relação ao local errado, pode ser comprometido quando o número de animais inserido na análise é reduzido. Também os resultados da fase pré-operatória, mostrando que este parâmetro (tempo de permanência nos locais críticos) deixa de revelar diferenças significantes com a redução do número de animais nos grupos, apontam nessa direção.

Em relação ao número de entradas nos contadores certo e errado nos Testes de Avaliação (Figura 17), a ANOVA não detectou a existência de qualquer diferença significativa seja em relação aos fatores individuais (contador, dia e grupo) ou em relação à interação entre eles.

Assim, não ficam claras as razões que levam a essa perda da capacidade para desempenhar a tarefa de pares associados, presente antes da neurocirurgia pelo menos em relação a este parâmetro. É possível que o intervalo de tempo requerido para se realizar a cirurgia nos animais tenha levado a essa instabilidade no seu desempenho. Por outro lado, é possível também que o comprometimento dessa capacidade tenha relação com os procedimentos neurocirúrgicos empregados, uma vez que tanto os animais do grupo lesado como os animais do grupo controle exibiram prejuízo dessa habilidade. Mais experimentos seriam necessários para se avaliar essas possibilidades.

(A) LESADO (19º DIA) **(B) CONTROLE-OPERADO (19º DIA)** **(C) LESADO (24º DIA)** **(D) CONTROLE-OPERADO (24º DIA)** **(E) LESADO (29º DIA)** **(F) CONTROLE-OPERADO (29º DIA)**

Figura 17. Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa, nos Testes de Avaliação dos grupos lesado no MM (A, C e E) e controle-operado (B, D e F), realizados nos 19º, 24º e 29º dias. Note alteração de escala dos gráficos.

Comparação dos resultados pré- versus pós-operatórios

As Figuras 18 e 19 mostram, respectivamente, a média das médias do tempo de permanência e do número de entradas nos contadores críticos, dos animais dos grupos lesado e controle-operados durante os testes pré- (análise retrospectiva) e pós-operatórios.

Em relação ao tempo de permanência nos contadores críticos (Figura 18), a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes ou próximas da significância estatística em relação ao fator momento dos testes, quando as janelas de tempo foram 20 ($F_{1,5} = 8,79$, $P < 0,04$), 40 ($F_{1,5} = 5,30$, $P = 0,069$), 60 ($F_{1,5} = 10,09$, $P < 0,03$), 80 ($F_{1,5} = 23,36$, $P < 0,005$), 100 ($F_{1,5} = 27,92$, $P < 0,004$), 120 ($F_{1,5} = 23,53$, $P < 0,005$), 140 ($F_{1,5} = 18,99$, $P < 0,008$), 160 ($F_{1,5} = 17,77$, $P < 0,009$) e 180 ($F_{1,5} = 15,84$, $P < 0,02$) segundos, indicando que o tempo de permanência de ambos os grupos, lesado e controle-operado nos locais críticos (certo e errado) foi significativamente menor nos testes realizados depois da neurocirurgia em relação aos testes realizados antes da neurocirurgia. Como nenhuma outra diferença significativa envolvendo fatores isolados ou a interação entre os fatores analisados foi identificada, pode-se concluir que essa redução no tempo de permanência nos locais em que alimento tinha sido oferecido anteriormente, durante as tentativas 1 e 2, foi independente da sinalização, por meio da oferta de um dado sabor antes da terceira tentativa, indicando para qual dos locais o animal deveria direcionar sua busca alimentar.

Figura 18. Média ($\pm$ E.P.M.) das médias do tempo de permanência nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos animais do grupo lesado durante os testes pré- (A) (análise retrospectiva já que os dados referem-se aos testes pré-operatórios) e pós- (B) operatórios, e dos animais controle-operados durante os testes pré- (C) (análise retrospectiva) e pós- (D) operatórios. Note alteração de escala dos gráficos.

Em relação ao número de entradas nos contadores críticos (Figura 19), a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes ou próximas da significância estatística em relação ao fator momento dos testes (pré- *versus* pós-operatório), quando as janelas de tempo foram 60 ($F_{1,5} = 8,30$, $P < 0,04$), 80 ($F_{1,5} = 11,29$, $P < 0,02$), 100 ($F_{1,5} = 12,01$, $P < 0,02$), 120 ($F_{1,5} = 12,38$, $P < 0,02$), 140 ($F_{1,5} = 9,28$, $P < 0,03$), 160 ($F_{1,5} = 7,76$, $P < 0,04$) e 180 ($F_{1,5} = 5,64$, $P = 0,063$) segundos; além disso, a ANOVA revelou a existência de interação significativa entre os fatores momento dos testes (pré- *versus* pós-operatório) e número de entradas nos contadores (certo e errado), quando as janelas de tempo foram 60 ($F_{1,5} = 8,02$, $P < 0,04$), 80 ($F_{1,5} = 16,42$, $P < 0,01$), 100 ($F_{1,5} = 68,61$, $P < 0,01$), 120 ($F_{1,5} = 102,05$, $P < 0,0002$), 140 ($F_{1,5} = 76,70$, $P < 0,0003$), 160 ($F_{1,5} = 49,53$, $P < 0,0009$) e 180 ($F_{1,5} = 38,39$, $P < 0,002$) segundos, indicando não apenas que o tempo de permanência nos locais em que alimento foi encontrado anteriormente se reduziu dramaticamente depois da neurocirurgia, mas também que essa redução foi mais dramática em relação ao local correto sendo tímida ou mesmo inexistente em relação ao local errado (Figura 19). Por fim, a ANOVA revelou uma interação próxima da significância estatística em relação aos fatores momento dos testes (pré- *versus* pós-operatório), número de entradas nos contadores (certo *versus* errado) e grupo (lesado *versus* controle-operado), quando a janela de tempo foi de 120 segundos ($F_{1,5} = 6,42$, $P = 0,0523$). De fato, a Figura 19 ilustra que antes da neurocirurgia os animais do grupo lesado exibiam marcada busca pelo alimento no local correto e que esse efeito que se reduziu dramaticamente após a neurocirurgia; efeito similar não foi observado em relação ao local errado. Resultados parecidos foram observados nos animais do grupo controle-operado; porém, as

diferenças pré- e pós-operatórias neste grupo foram bem mais tímidas, efeito que foi detectado pela ANOVA, expresso pela diferença próxima de significativa na interação que inclui o fator grupo.

No conjunto, esses resultados sugerem que houve marcada redução da busca nos locais previamente reforçados tanto nos animais lesados como nos animais controle, que essa redução foi mais pronunciada no local certo do que no local errado, e que na janela de tempo de 120 segundos, esse efeito parece ter sido mais pronunciado no grupo lesado em relação ao grupo controle-operado. É relevante lembrar, neste contexto, que o número de animais incluídos na presente análise foi relativamente reduzido, o que limita o alcance das discussões possíveis a partir deste estudo.

Figura 19. Média ($\pm$ E.P.M.) das médias do número de entradas nos contadores certo e errado na terceira tentativa dos animais do grupo lesado durante os testes pré- (A) (análise retrospectiva já que os dados referem-se aos testes pré-operatórios) e pós- (B) operatórios, e dos animais controle-operados durante os testes pré- (C) (análise retrospectiva) e pós- (D) operatórios. Note alteração de escala dos gráficos.

5.3 Discussão

Deve-se ressaltar, de imediato, que com a perda de animais ao longo da realização deste experimento, chegou-se ao final do mesmo com um número relativamente reduzido de animais em cada grupo (4 animais no grupo lesado e 3 animais no grupo controle-operado), restringindo o alcance das conclusões.

Os testes pré-operatórios mostraram, como esperado, que o número de entradas no contador certo é maior do que no contador errado, indicando que os animais são capazes de desempenhar a tarefa de pares associados “sabor-local”. Essa mesma diferença não foi observada nos testes pós-operatórios, tanto nos animais lesados como nos animais controle-operados, sugerindo que houve uma desorganização do desempenho no teste de aprendizagem de pares associados, também observado ao longo dos treinamentos pós-operatórios diários, além dos dias em que houve Testes de Avaliação. Isto é, em alguns dias do treino pós-operatório os animais desempenharam a tarefa como esperado a partir dos resultados do teste pré-operatório, i.e., direcionaram-se para o local correto na terceira tentativa do Teste de Avaliação; em outros dias simplesmente não desempenharam conforme esperado. Por essa razão o número de Testes de Avaliação na fase pós-operatória foi aumentado em relação ao realizado durante a fase pré-operatória. Isto é, como constatamos, ao longo dos treinos pós-operatórios, essa instabilidade no desempenho dos animais, incluímos sessões adicionais de treino seguidas de sessões de teste. Porém, como os animais passaram a exibir saúde debilitada, resolvemos concluir o experimento antes que se tornasse impossível obter seus encéfalos para o processamento histológico.

A comparação dos resultados pré- e pós-operatórios mostrou que houve redução da busca alimentar nos locais em que alimento foi ofertado numa dada sessão, tanto nos animais lesados como nos animais controle; essa redução, maior no local certo em relação ao local errado, foi particularmente pronunciada nos animais lesados, quando a janela de tempo considerada para a análise foi de 120 segundos.

O MM é uma estrutura encefálica densamente innervada por fibras imunorreativas ao MCH, que se acredita estar envolvido em funções de aprendizagem e memória espacial (McBride et al., 1994; Monzon et al., 1999; Santin et al., 1999; Varas et al., 2002a; Varas et al., 2002b) e comportamento alimentar (Presse et al., 1996; Qu et al., 1996; Herve e Fellmann, 1997; Rossi et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Shimada et al., 1998; Tritos et al., 2001; Borowsky et al., 2002; Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002; Sahu, 2002; Takekawa et al., 2002; Abbott et al., 2003; Clegg et al., 2003; Gomori et al., 2003; Shearman et al., 2003). Partindo dessas interpretações, pode-se postular que o MM poderia contribuir para o comportamento de busca alimentar motivado por fome, em que o MCH contribuiria para a ativação de circuitos neurais que levariam à recordação de memórias espaciais relacionadas a fontes alimentares previamente exploradas.

Nesse sentido, embora os resultados do presente conjunto de experimentos não possam ser tomados como definitivos, uma vez que o número de animais testados pré- e pós-operatoriamente foi relativamente reduzido, o fato de ter havido redução no tempo de permanência e no número de entradas dos animais nos locais em que alimento foi anteriormente oferecido parece favorecer aquela interpretação. Deve-se

ressaltar, porém, que além dos animais lesados também os animais controle exibiram essa redução do comportamento de busca alimentar.

Diversas hipóteses podem ser aventadas para explicar esses resultados. Por exemplo, (1) é possível que os procedimentos cirúrgicos empregados nos animais controle-operados tenham resultado em algum tipo de dano em aferências ou eferências (ou ambos) do MM, não detectáveis por meio da análise histológica empregada neste estudo, que teriam interferido no comportamento de busca alimentar dos animais. É importante lembrar, nesse contexto, que os animais do grupo controle-operado, como os lesados, também foram expostos à corrente pulsátil, ao longo de 10 minutos, sendo sua principal diferença em relação aos animais lesados o fato de que nestes últimos a micropipeta estava preenchida por NMDA e a corrente pulsátil implicou na administração micro-iontoforética dessa substância, ao passo que nos animais controle-operados a micropipeta continha salina fisiológica de modo que a corrente pulsátil não implicou em administração da droga. Alternativamente, pode-se supor que (2) o número de sessões de treino pós-operatório não tenha sido suficiente para que os animais resgassem o nível de desempenho atingido na fase pré-operatória. Pode-se ainda supor que (3) a idade dos animais, relativamente avançada na fase pós-operatória, tenha influenciado o desempenho.

Em relação a esta última hipótese, sabe-se que a aprendizagem e memória são afetados pela idade (Beatty, 1988; Albert, 1993). Distúrbios na aprendizagem e memória espacial ocorrem com o aumento da idade tanto em ratos como em humanos. Ratos senis apresentam prejuízos no desempenho em tarefas que requerem o uso da aprendizagem e memória espacial, i.e., a habilidade para adquirir uma representação

cognitiva de localização no espaço e eficazmente navegar no ambiente (Barnes, 1988; Gallagher e Pellemounter, 1988; Brandeis et al., 1989; Ingran et al., 1994). Shukitt-Hale et al. (2004) realizaram um estudo utilizando o labirinto radial de oito braços, conjuntamente com o labirinto aquático de Morris, para avaliar a aprendizagem espacial em ratos novos (6 meses de idade) e senis (21 meses). Os ratos senis apresentaram prejuízo no desempenho da tarefa, mostrando maior tempo para encontrar a plataforma quando comparado aos ratos jovens. Ratos senis exibem desempenho mais variável e necessitam de maior tempo de treinamento para aprender tarefas espaciais quando comparado aos ratos adultos-jovens (Gallagher et al., 1993). Além disso, a função motora é significativamente deteriorada com o aumento da idade (Gallagher e Rapp, 1997; Lindner, 1997; Wisniewska et al., 2004), o que pode interferir no desempenho. Diversos estudos têm sugerido que a relação da idade com o declínio na habilidade da aprendizagem espacial é resultado de mudanças na função e morfologia da FH (Gallagher et al., 1993; Gallagher e Nicolle, 1993; Bodno et al., 1994; Geinisman et al., 1995). Déficits na memória e aprendizagem espacial em ratos relacionados com a idade são similares aos déficits encontrados em animais com danos hipocampais (Morris, 1984). A neurogênese, i.e., a produção de novas células neuronais, tem sido amplamente estudada em ratos, camundongos, macacos e humanos adultos (Kuhn et al., 1996; Gould et al., 1997; Eriksson et al., 1998). Achados estereológicos recentes têm mostrado que há conservação do número total de neurônios no giro denteado em ratos senis (Rapp e Gallagher, 1996; Rasmussen et al., 1996). A neurogênese em ratos parece relacionar-se com os processos de aprendizagem e memória; esse processo parece diminuir com o aumento da idade

(Kuhn et al., 1996, Kempermann et al., 1998; Gould et al., 1999). As células granulares do giro denteado são produzidas continuamente. Isto é, as células granulares progenitoras da região subgranular do giro denteado proliferam durante toda a vida, e as células geradas migram para a camada granular do giro denteado, tornando-se integradas na circuitaria hipocampal e funcionalmente envolvidas nos processos de aprendizagem (Gould et al., 1999; Nilsson et al., 1999; Shors et al., 2001; Praag et al., 2002). Em ratos senis, essa proliferação é reduzida entre 10 e 17% abaixo dos níveis adultos-jovens (Kuhn et al., 1996); por outro lado, o número de células granulares já existentes parece preservado (Rapp e Gallagher, 1996).

Porém, contrariamente às duas últimas hipóteses mencionadas acima, apresenta-se o fato de que nos animais lesados a redução da busca alimentar no local certo após a neurocirurgia foi maior em relação aos níveis pré-operatórios do que aquela observada nos animais controle, resultado que favorece a hipótese do envolvimento do MM nos processos de busca alimentar direcionada para o local certo do ambiente. Restaria avaliar em que extensão esses resultados decorrem de alterações nos processos de busca alimentar ou se estão associados a falha no funcionamento do sistema de mapeamento espacial.

O Experimento 4 representa uma tentativa de avaliar se danos no MM, como os produzidos nas presentes condições experimentais, levam a prejuízos de desempenho no labirinto aquático de Morris, um teste clássico e amplamente aceito na literatura da área, por ser sensível a falhas no funcionamento do sistema de mapeamento espacial.

6. EXPERIMENTO 4

EFEITOS DE DANOS SELETIVOS NO NÚCLEO MAMILAR MEDIAL NO DESEMPENHO DA TAREFA DE MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL NO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS: UM ESTUDO PRELIMINAR

Diferentes fontes de evidências sugerem o envolvimento dos corpos mamilares estão no processamento da memória. Por exemplo, a inativação dessa estrutura em ratos resulta em prejuízo de desempenho em tarefas que requerem a utilização da memória de natureza espacial (Vann e Aggleton, 2004).

Santin et al. (1999) testaram ratos com danos nos corpos mamilares por meio de lesão eletrolítica e observaram prejuízo de desempenho no teste de memória operacional no labirinto aquático de Morris; porém, esses autores não observaram qualquer prejuízo no teste de memória de referência espacial. Em contrapartida, Sutherland e Rodriguez (1989) que também testaram animais com danos nos corpos mamilares, observaram deficiência de desempenho no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris.

Estudos envolvendo lesões dos corpos mamilares geralmente incluem o MM e o LM, além do SuM e do TM, por serem núcleos muito próximos. Alguns experimentos vêm apontando que a extensão da lesão produzida nos corpos mamilares influencia nos resultados comportamentais de alguns testes. Por exemplo, Sziklas e Petrides (1993) realizaram um estudo executando lesões eletrolíticas restritas ao MM e SuM, e mostraram que os danos produzidos não interferiram no desempenho dos animais no labirinto radial de 8 braços adquirido antes da lesão. Por outro lado, danos maiores que

abrangem o MM, o SuM, o LM e algumas estruturas vizinhas como a porção posterior do núcleo mamilar medial (Mp) e a área tegmental medial, promovem prejuízos de desempenho equivalentes aos observados após lesão no hipocampo dorsal. Esses resultados sugerem que porções seletivas da região mamilar podem estar envolvidas na aprendizagem e memória espaciais.

No presente experimento, avaliou-se o desempenho ratos portadores de danos restritos ao MM, e seus respectivos controle-operados, na versão que requer memória de referência no labirinto aquático de Morris, numa tarefa que demanda memória espacial mas independe de busca alimentar, já que a motivação envolvida no desempenho desta tarefa envolve sair da água. Os animais foram submetidos ao treino na tarefa memória de referência espacial, por meio da manutenção da plataforma numa mesma localização ao longo das sessões de treino.

6.1 Materiais e Métodos

Sujeitos

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, provenientes do biotério do Instituto de Biociências da USP, com 12 meses de idade no início do experimento. Vinte e cinco animais ingênuos do ponto de vista experimental foram submetidos à cirurgia estereotáxica para compor os grupos lesado no MM e controle-operado. Destes, 6 desenvolveram labirintite e não foram utilizados e 5 morreram após a cirurgia; restaram 14 animais (sendo 9 do grupo lesado e 5 do grupo controle-operado) que foram submetidos ao experimento para avaliar a memória de referência espacial

no labirinto aquático de Morris e ao experimento para avaliar o nível de ansiedade no labirinto em cruz elevado (Experimento 5, ver adiante). Desses 9 animais que pertenciam ao grupo lesado e que foram submetidos aos testes comportamentais, 5 foram excluídos da análise estatística por não apresentarem lesão no MM ou por esta ser unilateral e pequena. Em resumo, foram utilizados 9 animais, sendo 4 do grupo lesado e 5 do grupo controle-operado.

Os animais foram mantidos em grupos de 3 a 4 em caixas de polietileno (medindo 40 x 33 x 16 cm) forradas com maravalha do nascimento até o início dos experimentos. Após o procedimento cirúrgico, os mesmos foram acondicionados individualmente e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luz acesa das 7h00 às 19h00).

Água e ração foram oferecidas *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi idêntico ao descrito no Experimento 3.

Aparelho

O labirinto aquático de Morris consiste de uma piscina circular, construída em fibra de vidro, de 200 cm de diâmetro e 50 cm de profundidade, que repousa sobre uma armação de madeira. As paredes internas são pretas de modo a torná-las homogêneas. A piscina e foi mantida em uma sala medindo 3,0 x 3,0 m com vários

estímulos salientes nas paredes, além do experimentador que se posicionava num mesmo local da sala durante todo o período de experimento.

A cada dia de treino a piscina era preenchida com água a $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ até a altura de aproximadamente 27 cm. Uma plataforma colocada cerca de 1,5 cm abaixo do nível da água, construída de acrílico preto medindo 9 cm de diâmetro serviu como local para que os animais pudessem subir e escapar da água. Como não existem estímulos proximais indicando a localização da plataforma (a parede da piscina é homogeneamente preta), o animal navegava com base em pistas distais, i.e., objetos fixados nas paredes da sala.

Uma câmera de vídeo posicionada aproximadamente a 180 cm acima do centro da piscina, conectada a um microcomputador, registrou e armazenou numericamente todos os dados referentes à trajetória dos animais dentro da piscina. O programa Ethovision (Noldus, versão 3) permitiu calcular diferentes parâmetros, incluindo (1) a latência, i.e., o tempo decorrido desde a liberação do animal na piscina até que ele encontre e suba na plataforma, (2) o comprimento do trajeto traçado na piscina e (3) a velocidade de nado.

Para a análise descritiva dos dados, a piscina foi dividida em quatro quadrantes com a mesma área, formados por linhas imaginárias, as quais se cruzam no centro da piscina, formando ângulos de 90° (Figura 5). As fronteiras dos quadrantes encontram-se na margem da arena e nas linhas imaginárias ligando o norte ao sul e o leste ao oeste. Pontos de partida arbitrariamente denominados (N), (S), (E) e (W), além de outros quatro pontos situados a nordeste (R), noroeste (T), sudoeste (O) e sudeste (D), todos na borda da arena, foram utilizados. Toda a sala era iluminada com luz indireta.

Procedimento comportamental

Cinquenta dias após os procedimentos cirúrgicos, tiveram início os testes de memória de referência espacial. Este experimento foi realizado entre 14h00 e 17h00.

A plataforma foi mantida numa única localização, no centro do quadrante 3 (ver Figura 5), em todas as tentativas e durante todos os dias de treinamento. Cada animal foi submetido ao treinamento envolvendo 2 tentativas por dia, durante 15 dias; o intervalo de tempo entre as tentativas (ITI) foi de 10 minutos. O ponto de onde os animais eram liberados na piscina variou a cada dia e a cada tentativa, numa ordem aleatória e balanceada para não enviesar a busca espacial do animal.

Em cada tentativa, o animal foi liberado de um dos pontos (dentre 8) da borda da piscina com o focinho voltado para a parede da piscina. No momento em que o animal era liberado pelo experimentador iniciava-se o registro. Quando o animal subia na plataforma, o sistema de registro era desligado e o trajeto do animal na piscina, naquela tentativa, era gravado para posterior análise; o animal permanecia sobre a plataforma por cerca de 10 segundos. Se o animal não encontrasse a plataforma em até 120 segundos (que era a duração máxima de cada tentativa) ele era manualmente guiado até a plataforma pelo experimentador, onde permanecia por cerca de 10 segundos, findos os quais era transferido para uma caixa de espera até a próxima tentativa ou para sua própria gaiola ao final das tentativas daquele dia.

Perfusão, histologia e análise histológica

Os procedimentos de perfusão (que incluiu esta tarefa de memória de referência e o labirinto em cruz elevado - ver adiante), processamento histológico e de análise histológica foram idênticos aos descritos no Experimento 3.

Análise estatística

Foi utilizada uma Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA) separada para cada um dos parâmetros mensurados, incluindo latência, comprimento do trajeto e velocidade do nado, tendo grupos (lesado *versus* controle-operado) como fator entre-sujeitos, e tentativas (primeira *versus* segunda) e dias (de 1 a 15) como fatores intra-sujeitos. Quando a ANOVA indicou a existência de diferenças significantes, realizou-se um teste *post hoc* de comparações múltiplas de Duncan para identificar a origem da diferença. Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc.) e os gráficos construídos com auxílio do programa Sigma Plot (versão 9.0).

6.2 Resultados

Resultados histológicos

A análise qualitativa das secções histológicas revelou que dentre os nove animais do grupo lesado que realizaram os testes comportamentais, cinco não apresentaram lesão ou esta foi pequena ou unilateral no MM, sendo estes animais excluídos da análise estatística. Em relação aos quatro animais que apresentaram lesão

no MM, três exibiram lesão de tamanho moderado no MM, bilateralmente, e um exibiu lesão de tamanho pequeno no MM, bilateralmente.

Resultados comportamentais

Em relação à latência, a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes no fator grupo (Figura 20) ($F_{1,7} = 1,60$, $P > 0,24$), indicando que a lesão do MM, como produzida no presente conjunto de experimentos, não gera qualquer prejuízo de desempenho neste teste de memória espacial. Por outro lado, a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes em relação ao fator dia ($F_{14,98} = 1,97$, $P < 0,03$) e ausência de diferenças significantes em relação ao fator tentativa ($F_{1,7} = 1,55$, $P > 0,25$), indicando que o desempenho dos animais variou ao longo dos dias de teste. De fato, a Figura 20 ilustra que houve melhora de desempenho tanto dos animais lesados como dos animais controle-operados ao longo dos 15 dias de teste, indicando que houve aquisição da tarefa de navegação espacial. Além disso, como não houve quaisquer interações significantes entre os fatores incluídos na ANOVA, deve-se concluir que a lesão do MM não interferiu na aquisição e desempenho da tarefa de navegação espacial no labirinto aquático de Morris.

Figura 20. Média ($\pm$ E.P.M.) das latências dos animais lesados e controle-operados ao longo dos 15 dias de treinamento no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris. Embora tenham sido realizadas duas tentativas por dia, calculou-se a média do dia apenas para efeitos de representação (i.e., na ANOVA os resultados de ambas as tentativas foram incluídos separadamente).

Em relação ao comprimento do trajeto, a ANOVA revelou ausência de quaisquer diferenças significantes em relação aos fatores individuais investigados ($F_{1,7} = 0,12-0,96$ $P > 0,25$), bem como em relação à sua interação ($F_{1,7} = 0,25$, $P > 0,60$) ($F_{14,98} = 0,36-0,39$, $P > 0,40$) (Figura 21), embora haja uma tendência não significativa à redução do trajeto dos animais de ambos os grupos ao longo dos dias de treino.

Figura 21. Média ($\pm$ E.P.M.) dos comprimentos dos trajetos dos animais lesados e controle-operados ao longo dos 15 dias de treinamento no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris. Embora tenham sido realizadas duas tentativas por dia, calculou-se a média do dia apenas para efeitos de representação (i.e., na ANOVA os resultados de ambas as tentativas foram incluídos separadamente).

Em relação à velocidade de nado (Figura 22), a ANOVA revelou (1) a existência de diferenças próximas da significância estatística em relação ao fator grupo ($F_{1,7} = 4,34$, $P = 0,075$), (2) diferenças significantes em relação aos fatores dia ($F_{14,98} = 8,68$, $P < 0,0001$) e tentativa ($F_{1,7} = 7,24$, $P < 0,04$), e (3) diferenças significantes em relação à interação entre os fatores dia e grupo ($F_{14,98} = 4,36$, $P < 0,002$) e dia e tentativa ($F_{14,98} = 2,39$, $P < 0,007$) (Figura 22). De fato, a Figura 22 ilustra que nos três dias iniciais de treino o desempenho dos grupos lesado e controle-operado, em relação ao parâmetro velocidade do nado, foi similar; porém, a partir do quarto dia de treino os

animais do grupo lesado exibiram redução da velocidade de nado ao passo que os animais do grupo controle parecem ter mantido velocidades de nado equivalentes à mostradas nos estágios iniciais de treino.

Figura 22. Média ($\pm$ E.P.M.) das velocidades médias de nado dos animais lesados e controle-operados ao longo dos 15 dias de treinamento no teste de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris. Embora tenham sido realizadas duas tentativas por dia, calculou-se a média do dia apenas para efeitos de representação (i.e., na ANOVA os resultados de ambas as tentativas foram incluídos separadamente).

6.3 Discussão

Os resultados envolvendo os parâmetros latência e comprimento do trajeto (Figuras 20 e 21), usualmente tomados como indicadores da capacidade de aprendizagem e navegação espacial no labirinto aquático de Morris (Morris et al., 1982; Morris, 1983; Xavier et al., 1999), sugerem que não houve qualquer diferença significativa no desempenho dos animais lesados em relação ao desempenho dos animais controle-operados. Por outro lado, os resultados envolvendo a latência para encontrar a plataforma mostram que ambos os grupos exibiram melhora de desempenho ao longo dos dias de treinamento (Figura 20), indicando que esses animais foram capazes de adquirir informações relevantes para o desempenho da tarefa. Surpreendeu, no entanto, que a taxa de redução desses escores assim como o desempenho final atingido pelos animais de ambos os grupos ao final do treino não tenham sido melhores, face ao que a literatura usualmente descreve sobre a aprendizagem de ratos nesse tipo de tarefa (Morris et al., 1982; Morris, 1983) e nossa própria experiência prévia com a mesma (Xavier et al., 1999). Isto é, ratos jovens treinados no labirinto aquático de Morris exibem acentuada curva de aprendizagem, i.e., atingem níveis de desempenho expressos por menores latências e comprimentos de trajeto, com menor quantidade de treino. Por exemplo, no estudo de Xavier et al. (1999) que comparou o desempenho de ratos com lesão no GD com animais controle, ambos com cerca de 5-6 meses de idade, a curva de aprendizagem revelou aquisição completa da tarefa em 12 dias de treinamento na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris, com duas tentativas por dia.

Assim, é possível que a idade dos animais do presente experimento tenha contribuído para o surgimento dessa tímida aquisição da tarefa, apesar dos 15 dias de treinamento. Como vimos acima, diversos estudos da literatura mostram que a idade avançada pode comprometer a aprendizagem e memória dos animais (ver discussão do experimento anterior). Os animais incluídos neste experimento estavam com aproximadamente 15 meses de idade no início do treinamento no labirinto aquático de Morris.

As razões que levaram a esse procedimento estão relacionadas ao planejamento experimental inicialmente proposto. Isto é, como o objetivo era comparar a memória espacial relacionada à busca alimentar (na tarefa de pares associados) e a memória espacial independente da busca alimentar (no labirinto aquático de Morris), animais pertencentes a uma mesma ninhada foram destinados a esses dois experimentos; assim, seria possível comparar o impacto de danos no MM no desempenho de ambos os tipos de tarefas, que envolvem motivações distintas. Nesse contexto, parte importante do planejamento envolveu a realização da neurocirurgia para indução de danos no MM numa mesma idade. Como o desenho experimental envolveu treinar os animais na tarefa de aprendizagem de pares associados antes da neurocirurgia, e esse treinamento prolongou-se muito além do que foi inicialmente previsto, houve um atraso na realização das neurocirurgias para os animais de ambos os experimentos e, conseqüentemente, nos testes pós-operatórios; assim, os animais encontravam-se com 15 meses de idade quando os testes pós-operatórios tiveram início. É possível que neste estágio de seu desenvolvimento os animais já tivessem algum prejuízo da

memória espacial, comprometendo a avaliação do impacto de danos no MM sobre essa mesma função.

Também surpreenderam os resultados envolvendo a velocidade média do nado. Como este parâmetro é calculado a partir do comprimento do trajeto e da latência, i.e., divide-se o comprimento do trajeto pela latência, é curioso notar que embora não tenha havido diferenças significantes entre os grupos quanto à latência e ao comprimento do trajeto, essa diferença foi significativa em relação à velocidade do nado na interação entre dia e grupo, indicando que os animais do grupo lesado exibiram redução deste escore ao longo dos dias de treinamento, o que não foi observado nos animais controle-operados (Figura 22). Uma possível razão para esse fenômeno pode estar relacionada com a variabilidade dos resultados, que é relativamente elevada, inclusive pelo reduzido número de animais nos grupos, associada a pequenas diferenças, não significantes, em cada um daqueles parâmetros (latência e comprimento do trajeto) utilizados para o cálculo final da velocidade média de nado. A Figura 22 mostra também que ambos os grupos exibiram velocidades de nado semelhantes nos primeiros três dias de treino; porém, a partir do quarto dia de treino o grupo lesado exibiu redução desse escore ao passo que o grupo controle-operado manteve o mesmo patamar de desempenho até o final do treino. As razões para esse efeito não estão claras, mas parecem estar relacionadas à aquisição de informações relevantes para o desempenho da tarefa, uma vez que o efeito começa a aparecer somente a partir do quarto dia de treino. Isto é, a Figura 20 sugere que as latências exibidas pelos animais lesados são, no geral, ligeiramente maiores do que as exibidas pelos animais controle-operados. Já a Figura 21 sugere, de modo inverso, que os comprimentos dos trajetos

exibidos pelos animais lesados são ligeiramente menores do que os exibidos pelos animais do grupo controle-operado. Como a velocidade do nado envolve a razão entre comprimento do trajeto e latência, nos animais controle-operados isso envolve a razão entre comprimentos de trajeto ligeiramente maiores e latências ligeiramente menores resultando em maiores velocidades de nado. Inversamente, nos animais lesados isso envolve a razão entre comprimentos de trajeto ligeiramente menores e latências ligeiramente maiores, resultando em velocidades de nado significativamente menores.

Usualmente, a velocidade do nado no labirinto aquático é tomada como indicador da motivação dos animais para saírem da água (Morris et al., 1982; Morris, 1983). Nesse contexto, os resultados do presente estudo podem ser sugestivos de que a lesão do MM leva a um comprometimento dessa motivação. O que não fica claro é porque esse fenômeno se manifesta apenas a partir do quarto dia de treinamento dos animais lesados. Assim, o presente conjunto de resultados não permite oferecer uma interpretação mais consistente sobre esse fenômeno.

7. EXPERIMENTO 5

EFEITOS DE DANOS SELETIVOS NO NÚCLEO MAMILAR MEDIAL NOS NÍVEIS DE ANSIEDADE AVALIADOS NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: UM ESTUDO PRELIMINAR

Como descrito acima, o MM é inervado por fibras imunorreativas ao hormônio concentrador de melanina que, de acordo com a literatura, parece interferir nos níveis de ansiedade (Gonzalez et al., 1996; Monzon e De Barioglio, 1999).

Gonzalez et al. (1996) mostraram que a administração de MCH na área pré-óptica medial de ratos fêmeas testadas no labirinto em cruz elevado leva a um efeito ansiogênico, o que é condizente com observação de Borowsky et al. (2002) no sentido de que o bloqueio o receptor do MCH no rato gera efeitos antidepressivo, ansiolítico e anorético. Em contrapartida, Monzon e De Barioglio (1999) mostraram que a administração intra-cerebro-ventricular de MCH antes da exposição dos ratos no labirinto em cruz elevado produz um efeito ansiolítico; além disso, a administração intra-amigdalal ou intra-hipocampal de MCH gera efeitos ansiolíticos na mesma tarefa comportamental (Monzon et al., 2001).

É possível que resultados distintos sejam observados em animais de sexos diferentes (Johnston, 1991), talvez pela influência dos hormônios gonadais (Zimmerberg, 1993). Tem havido propostas no sentido de que o MCH atua ansioliticamente em tarefas comumente utilizadas no estudo da ansiedade (Monzon et al., 1999); porém, o papel do MCH nessa questão ainda não está totalmente esclarecido.

Neste experimento, avaliou-se os níveis de ansiedade em animais com lesão seletiva no MM, por meio do paradigma de teste e re-teste no labirinto em cruz elevado; paralelamente, avaliou-se também a atividade locomotora e o comportamento de avaliação de risco no mesmo paradigma comportamental.

Participaram deste experimento tanto os animais que haviam sido expostos previamente à tarefa de aprendizagem de pares associados como os animais que haviam sido expostos à tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris.

7.1 Materiais e Métodos

Sujeitos

Foram utilizados 16 animais, incluindo os lesados no MM e controle-operados, previamente submetidos ao experimento de aprendizagem de pares associados (Experimento 3) ou à tarefa de memória espacial de referência no labirinto aquático de Morris (Experimento 4). Desses 16 animais, 4 deles caíram do labirinto durante o teste e foram excluídos do experimento, restando 12 animais (5 com lesão no MM e 7 do grupo controle-operado).

Todos os animais foram mantidos nas mesmas condições descritas nos experimentos anteriores, com livre acesso à água e ração.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Aparelho

O labirinto em cruz (Figura 23) elevado foi construído com acrílico branco, conforme as medidas descritas por Pellow et al. (1985); cada um dos quatro braços media 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, sendo dois deles, opostos pelo centro, com paredes laterais de 40 cm de altura, denominados braços fechados, e dois deles, também opostos pelo centro, com paredes de 1 cm de altura, denominados braços abertos.

O aparelho é apoiado em suportes ficando a 50 cm do assoalho em sala isolada. Todo o procedimento foi filmado por meio de uma câmera de vídeo ligada a um sistema de vídeo-cassete.

Figura 23. Fotografia do labirinto em cruz elevado utilizado para avaliar o nível de ansiedade.

Procedimento comportamental

Após uma semana depois dos testes comportamentais anteriores (aprendizagem de pares associados ou labirinto aquático de Morris) deu-se início aos testes no labirinto em cruz elevado.

Os animais foram individualmente colocados no centro do labirinto, podendo percorrê-lo livremente ao longo de 5 minutos (sessão 1). Imediatamente após a colocação do animal no labirinto, o experimentador se retirava da sala, fazendo o monitoramento dos comportamentos do animal por meio da câmera de vídeo ligada a uma televisão; adicionalmente, a sessão foi registrada em fita de vídeo. Um programa computacional (X-Plo-Rat, versão 3.0) permitiu registrar o número de entradas nos braços abertos e fechados, o número de vezes que o animal passou pelo centro do labirinto (cruzamentos no quadrado central) e o tempo de permanência nos braços abertos, fechados e no centro do labirinto. O critério para se caracterizar a entrada e/ou a saída dos braços foi definido como a colocação das quatro patas nos braços e/ou no quadrado central (Rodgers et al., 1994). Ao término da sessão 1, o animal foi transferido para sua gaiola, onde permaneceu por 5 minutos. Durante esse período, o labirinto foi limpo com uma solução de álcool a 10%, para minimizar a interferência de odores eventualmente deixados pelo animal. A seguir, o mesmo animal foi submetido a uma segunda exposição ao labirinto idêntica à primeira (sessão 2). Quando algum animal caía do labirinto, este era retirado do experimento.

Os animais foram testados entre as 08h00 e 12h00.

Análise estatística

A partir dos escores mensurados, calculou-se a percentagem de entradas nos braços abertos (i.e., o número de entradas nos braços abertos dividido pela soma do número de entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados, multiplicado por 100) e a percentagem de tempo nos braços abertos (i.e., o tempo de permanência nos braços abertos dividido pela soma do tempo de permanência nos braços abertos e tempo de permanência nos braços fechados, multiplicado por 100).

A ANOVA permitiu comparar o desempenho dos animais dos grupos lesado e controle-operado, tomados como fator entre-sujeitos, nas duas sessões de teste, tomadas como fator intra-sujeitos. Foram realizadas ANOVAs independentes para cada um dos parâmetros comportamentais considerados relevantes, incluindo a percentagem de entradas nos braços abertos, a percentagem de tempo nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados, o tempo de permanência no quadrado central e o número de cruzamentos no quadrado central.

Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc.) e os gráficos construídos com auxílio do programa Sigma Plot (versão 9.0).

7.2 Resultados

Em relação à percentagem de entradas nos braços abertos (Figura 24A) a ANOVA revelou a existência de efeitos significantes em relação ao fator Sessão ($F_{1,10} = 16,21$, $P < 0,002$). Como esperado, a percentagem de entradas nos braços abertos na segunda sessão é menor do que a observada na primeira sessão. A ANOVA revelou

ainda que esse mesmo efeito foi similar tanto nos animais lesados como nos animais controle, uma vez que não houve diferenças significantes em relação ao fator grupo ($F_{1,10} = 1,37$, $P > 0,26$) ou em relação à interação entre os fatores grupo e sessão ($F_{1,10} = 0,12$, $P > 0,74$).

Similarmente, em relação à percentagem de tempo nos braços abertos (Figura 24B), a ANOVA revelou a existência de diferenças significantes em relação ao fator Sessão ($F_{1,10} = 13,33$, $P < 0,003$), sendo a percentagem de entradas nos braços abertos na segunda sessão menor do que a observada na primeira sessão. A ANOVA revelou ainda uma ausência de diferenças significantes em relação ao fator grupo ($F_{1,10} = 0,72$, $P > 0,41$) e em relação à interação entre os fatores grupo e sessão ($F_{1,10} = 0,29$, $P > 0,60$).

(A) % DE ENTRADAS NOS BRAÇOS ABERTOS

(B) % DE TEMPO NOS BRAÇOS ABERTOS

Figura 24. Média ($\pm$ E.P.M.) da percentagem de entradas nos braços abertos (A) e da percentagem de tempo nos braços abertos (B), dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado. * $< 0,05$ expressam os p-valores da comparação dos escores da primeira e segunda sessão.

Em relação ao número de entradas nos braços fechados (Figura 25), a ANOVA revelou ausência de diferenças significantes em relação aos fatores sessão ($F_{1,10} = 0,19$, $P > 0,67$) e grupo ($F_{1,10} = 1,14$, $P > 0,31$), e também em relação à interação entre sessão e grupo ($F_{1,10} = 0,03$, $P > 0,87$), sugerindo que a atividade locomotora dos animais não foi afetada pela lesão ou pela experiência prévia dos animais no aparelho.

NÚMERO DE ENTRADAS NOS BRAÇOS FECHADOS

Figura 25. Média ($\pm$ E.P.M.) do número de entradas nos braços fechados, dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado.

Quanto ao tempo de permanência no quadrado central (Figura 26), a ANOVA revelou uma diferença próxima da significância estatística em relação ao fator sessão ($F_{1,10} = 4,37$, $P = 0,062$), e ausência de diferenças significantes em relação ao fator grupo ($F_{1,10} = 0,00$, $P > 0,94$) e à interação entre sessão e grupo ($F_{1,10} = 0,26$, $P > 0,62$). De fato, a Figura 26 ilustra que o tempo de permanência no quadrado central na segunda sessão foi menor que na primeira, em ambos os grupos.

TEMPO DE PERMANÊNCIA NO QUADRADO CENTRAL

Figura 26. Média ($\pm$ E.P.M.) do tempo de permanência no quadrado central, dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado. * $< 0,05$ expressa o p-valor da comparação dos escores da primeira e segunda sessão.

Por fim, em relação ao número de cruzamentos no quadrado central (Figura 27), a ANOVA não revelou quaisquer diferenças significativa entre as sessões ($F_{1,10} = 0,96$, $P > 0,35$), grupos ($F_{1,10} = 0,86$, $P > 0,37$) ou interações significantes em relação a esses fatores ($F_{1,10} = 0,55$, $P > 0,47$).

NÚMERO DE CRUZAMENTOS NO QUADRADO CENTRAL

Figura 27. Média ($\pm$ E.P.M.) do número de cruzamentos no quadrado central, dos animais lesados e controle-operados, na primeira e segunda sessão de teste no labirinto em cruz elevado.

7.3 Discussão

No labirinto em cruz elevado, os braços abertos representam um ambiente aversivo. Na primeira exposição ao labirinto, os animais investigam tanto os braços abertos como os braços fechados; mas o fazem com cautela, em particular os braços abertos, pois esses animais aparentemente exibem medo incondicionado a espaços abertos e a altura (File, 1992; File, 1993; Wall e Messier, 2001; Pinheiro, 2007).

De fato, ratos tratados com drogas ansiolíticas tendem a aumentar a percentagem de tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que os animais tratados com drogas ansiogênicas tendem a permanecer relativamente menos tempo nesses braços (Pellow e File, 1986; Lister, 1987; Handley e Mcblane, 1993; Rodgers e Cole, 1994; Holmes e Rodgers, 1999). Pensa-se que a altura não é o fator crítico indutor de ansiedade, sendo a aversão decorrente do espaço aberto e da impossibilidade de realizar tigmotaxia positiva, i.e., o comportamento de exploração tátil do ambiente através das vibrissas, tão comum nesses animais (Falter et al., 1992; Treit et al., 1993), que também pode representar uma estratégia de defesa (Treit et al., 1993; Cardenas et al., 2001).

O desempenho no labirinto em cruz elevado parece depender de um conflito entre duas características dos ratos: aversão por espaços abertos e tendência de explorar ambientes novos (Pellow, 1985; Handley e McBlane, 1993; Treit et al., 1993; Fernandes e File, 1996). Assim, na primeira sessão os animais tendem a explorar o novo ambiente, adquirindo informações sobre o mesmo (File, 1992). Porém, depois dessa primeira experiência e, portanto, depois dessa aquisição de informações sobre esses ambientes, tipicamente ratos aumentam sua esquiva aos braços abertos, pois além do medo incondicionado, há também o medo condicionado decorrente da primeira experiência com esse estímulo aversivo (File, 1993; Graeff 1993; Graeff 1999). Assim, além de permitir a avaliação da ansiedade (quanto menor a percentagem de entradas e de tempo nos braços abertos maior a ansiedade), o labirinto em cruz elevado permite também avaliar a memória dos animais em relação àquele ambiente aversivo.

Os resultados do presente experimento mostraram que tanto os animais lesados no MM como os animais controle-operados exibiram uma redução na percentagem de entradas e na percentagem de tempo nos braços abertos na segunda sessão em relação à primeira (Figura 24). Assim, pode-se concluir não apenas que os níveis de ansiedade dos animais lesados no MM não diferiram dos exibidos pelos animais controle-operados, mas também que esse tipo de lesão não alterou a capacidade dos animais de adquirir a memória sobre a experiência aversiva que contribui para uma maior esquia dos braços abertos na segunda sessão.

De acordo com Graeff et al. (1993), o número de entradas nos braços fechados expressa o nível de atividade locomotora dos animais. Como no presente experimento não houve quaisquer diferenças significantes associadas à lesão ou à sessão (Figura 25), depreende-se que danos nos MM não levam a alterações na atividade locomotora dos animais. Por outro lado, o tempo de permanência e o número de cruzamentos no quadrado central refletiriam a avaliação do risco desse ambiente pelos animais. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada em relação a esses parâmetros (Figuras 26 e 27). Porém, ambos os grupos exibiram uma redução no tempo de permanência no quadrado central na segunda sessão em relação à primeira, sugerindo que o comportamento de avaliação de risco na segunda sessão foi menor, possivelmente em decorrência do fato de que os animais já haviam obtido informações sobre o ambiente, durante sua exposição ao aparelho na primeira sessão. Alternativamente, pode-se hipotetizar que essa redução do tempo de permanência no quadrado central na segunda tentativa esteja relacionada com a experiência aversiva sobre o espaço aberto, ocorrida durante a primeira tentativa.

8. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os resultados do conjunto dos experimentos aqui descritos mostraram que (1) ratos são capazes de utilizar efetivamente a memória de natureza espacial para buscar alimento numa arena destituída de pistas proximais, (2) nos intervalos de tempo iguais a 60 e 120 minutos entre a segunda e terceira tentativas da tarefa de aprendizagem de pares associados (intervalo entre a aquisição da associação e a recordação) os animais desempenharam satisfatoriamente a tarefa, (3) os ratos portadores de lesão no MM e também os controle-operados reduziram suas buscas por alimento na tarefa de aprendizagem de pares associados nos testes pós-operatórios, em relação desempenho pré-operatório, (4) ratos com lesão do MM e controle-operados aprenderam a encontrar a plataforma para escapar da água na tarefa de memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris, mesmo estando com 15 meses de idade, e (5) danos no MM não geram alterações nos níveis de ansiedade testados por meio do labirinto em cruz elevado.

Os resultados envolvendo os testes de memória espacial, que incluiu uma tarefa dependente (pares associados) e uma independente (labirinto aquático) da busca alimentar, apóiam a teoria do mapa cognitivo proposta por O'Keefe e Nadel (1978), que propõe que ratos aprendem sobre as relações espaciais existentes entre as pistas distais e utilizam essas relações para se localizarem no ambiente.

A tarefa de aprendizagem de pares associados, proposta no presente estudo, representa um modelo comportamental para se avaliar a memória de natureza espacial relacionada à busca alimentar; pistas proximais são eliminadas da arena, devendo os

animais utilizarem-se de pistas distais para formar o mapa cognitivo e realizarem suas buscas pelo alimento oferecido na arena. Deve-se ressaltar que o presente modelo experimental difere daquele proposto por Day et al. (2003), que oferece pistas proximais para os animais; isso pode possibilitar a utilização de estratégias não aloclétricas de navegação, permitindo questionar sobre o real envolvimento de um mapa cognitivo, característica fundamental da memória espacial, em seu desempenho.

As evidências descritas no presente estudo sugerem que a tarefa de aprendizagem de pares associados baseia-se na orientação aloclétrica e envolve componentes de longa duração associados a componentes que permitem reter a informação por cerca de uma ou duas horas, pelo menos. Isto é, como os locais de disponibilização de alimento, além dos sabores associados a esses locais, variaram a cada dia em quatro possíveis locais da arena, sendo dois locais eleitos por dia de treinamento, pode-se dizer que trata-se de um tipo de memória espacial dependente do contexto temporal. Isto requer memória operacional (Olton, 1979), dado que a informação sobre os dois locais e sabores é específica para aquele dia, não sendo válida para os demais dias, pois, outros locais serão eleitos para disponibilizar o alimento, em combinações aleatórias. Por outro lado, as regras de funcionamento da tarefa, i.e., o procedimento básico utilizado no treinamento dos animais, envolvendo a realização de três tentativas por dia, sendo as duas primeiras tentativas de apresentação de informações sobre os locais em que alimento é oferecido, e a terceira tentativa, em que o alimento é enterrado no polipropileno (sem pistas proximais de sua localização), de busca do alimento envolvendo o estabelecimento de uma relação entre o alimento recebido na caixa de espera, antes da tentativa, e a escolha sobre onde escavar,

envolvem memória de longa duração, pois estas mesmas regras e informações gerais serão utilizadas em todos os dias de treinamento, não devendo ser apagadas após seu uso, sendo, portanto, independentes do contexto temporal específico.

É interessante ressaltar que o melhor desempenho na tarefa foi observado quando o intervalo de tempo entre a segunda e a terceira tentativas foi 60 ou 120 minutos. Por outro lado, não se pode descartar a hipótese de que esse resultado está relacionado a um aumento concorrente na quantidade de treino a que os animais foram expostos ao longo do treinamento, até se atingir aqueles intervalos. Mais estudos seriam necessários para avaliar essas hipóteses.

É relevante ressaltar que, na presente tarefa, a escolha do local em que a busca pelo alimento deve ser realizada, na terceira tentativa, está associada à amostra recebida na caixa de espera. Assim, durante as tentativas 1 e 2, em que se estabelecem as associações únicas entre “sabor e local” para aquele dia, o animal não tem como saber onde será essa busca. Portanto, ele deve reter ambas as associações, que são únicas, para ser capaz de desempenhar a tarefa na terceira tentativa. Então, ao receber a amostra de alimento antes da terceira tentativa, o animal deve recordar-se da associação para direcionar sua busca em função dessa informação. Segundo Tulving (1983), memória episódica caracteriza-se pela lembrança de um evento único, associando “o que” ao “onde” conjuntamente ao “quando”. No caso da presente tarefa, como dois locais variaram a cada dia de treino e dois diferentes alimentos (amendoim e avelã) foram utilizados, considera-se que, para ter aprendido a tarefa, o animal associasse “o que” (sabor do alimento nas duas primeiras tentativas) e “onde” (locais em que esses alimentos foram encontrados nas duas primeiras tentativas), para realizar

sua busca e escavar na arena no local correto na terceira tentativa. Como os locais mudaram a cada dia de treino/teste, confere-se então a este fenômeno um caráter de associação única “sabor-local” em cada dia. Porém, o componente “quando” da memória do tipo episódica não foi estabelecido, limitando as implicações desta tarefa como um modelo experimental para avaliar a memória episódica em ratos. Restrição similar pode ser dirigida ao estudo de Day et al. (2003), cujo componente “quando” não foi avaliado explicitamente.

Há relatos na literatura sugerindo que o MM participa da circuitaria nervosa envolvida em memória espacial e busca alimentar. Essa estrutura nervosa é densamente inervada por fibras imunorreativas ao MCH que, entre outras funções, está também envolvida na aprendizagem e memória espaciais e busca alimentar (McBride et al., 1994; Monzon et al., 1999; Santin et al., 1999; Varas et al., 2002a; Varas et al., 2002b) e comportamento alimentar (Presse et al., 1996; Qu et al., 1996; Herve e Fellmann, 1997; Rossi et al., 1997; Ludwig et al., 1998; Shimada et al., 1998; Tritos et al., 2001; Borowsky et al., 2002; Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002; Sahu, 2002; Takekawa et al., 2002; Abbott et al., 2003; Clegg et al., 2003; Gomori et al., 2003; Shearman et al., 2003).

O desenho experimental envolvendo animais com lesão seletiva no MM e sua avaliação na tarefa de aprendizagem de pares associados, almejou investigar esta proposta adicionalmente. Os resultados indicaram que danos seletivos nessa estrutura nervosa não geraram marcado prejuízo no desempenho dos animais, tanto na tarefa de aprendizagem de pares associados como na tarefa de memória de referência no labirinto aquático de Morris, em relação ao desempenho do grupo controle. Ademais,

esses animais não exibiram qualquer alteração de desempenho no paradigma de teste e re-teste no labirinto em cruz elevado, em relação aos animais controle. Esses resultados conflitam com os relatos prévios (mencionados acima) sobre o envolvimento dos corpos mamilares no desempenho de tarefas que envolvem memória espacial.

Por outro lado, uma análise adicional dos resultados da tarefa de aprendizagem de pares associados, comparando o desempenho dos animais antes e depois da cirurgia, revelou que nos Testes de Avaliação pós-operatórios houve uma redução na busca por alimento em ambos os grupos (lesado e controle); porém, essa redução foi mais acentuada em relação ao local certo quando comparado ao errado e, além disso, quando a janela de tempo considerada foi de 120 segundos, o efeito de redução da busca foi mais evidente no grupo lesado. Estes resultados podem ser vistos como indícios, ainda não conclusivos, que corroboram com a literatura de que o MM está envolvido na circuitaria relacionada à memória espacial e busca alimentar. Para que se possa ser mais definitivo em relação a essa questão, mais estudos seriam necessários.

As razões para esses resultados menos expressivos em relação à literatura da área não estão claras. Algumas hipóteses podem ser levantadas. Por exemplo, enquanto no presente estudo foram induzidos danos seletivos no MM por meio de administração micro-iontoforética de NMDA, o que restringe substancialmente a perda neuronal à região de interesse, os estudos da literatura induzem danos mais amplos, incluindo vários núcleos dos corpos mamilares. É possível que essa redução na quantidade de danos permita explicar o aparecimento de resultados comportamentais mais sutis, como os observados no presente estudo.

Essa questão envolvendo a avaliação do impacto comportamental de danos seletivos numa dada região nervosa é delicada. Por um lado, deseja-se que a lesão seja suficientemente seletiva, restringindo-se à estrutura de interesse, e não atinja as estruturas circunvizinhas. Neste caso, a ocorrência de alterações comportamentais pode ser atribuída aos danos na estrutura investigada e não a eventuais danos em outras regiões nervosas. Por outro lado, deseja-se também que sua extensão seja suficientemente grande para garantir que a maior parte da estrutura (idealmente toda) seja atingida. Neste caso, quando não há alterações comportamentais após o dano, pode-se descartar o envolvimento da estrutura investigada no processo funcional avaliado. A indução neuro-cirúrgica de danos restritos a uma única estrutura nervosa de forma suficientemente ampla e a identificação dos limites entre esses dois extremos não são tarefas simples. Não raro, a tentativa de induzir danos seletivos resulta em danos incompletos. Neste caso, a ausência de prejuízo comportamental pode ser atribuída às porções não danificadas da estrutura. Nos animais do presente estudo, os danos direcionados para o MM não foram completos. Assim, parece plausível admitir que uma das razões para o aparecimento de resultados comportamentais menos expressivos esteja relacionada a essa lesão reduzida do MM.

Por outro lado, no presente estudo, os animais foram submetidos a um extenso treinamento pré-operatório para a aquisição da tarefa de pares associados. A realização da neurocirurgia, tanto para indução de danos seletivos no MM como nos animais controle, levou a prejuízos de desempenho em relação aos níveis pré-operatórios. É possível que esse efeito esteja relacionado (1) ao longo período de tempo sem treinamento desde o final dos treinos pré-operatórios (aproximadamente 6 meses), (2)

à idade dos animais nessa fase (aproximadamente 15 meses) e (3) à debilidade física que provavelmente decorre de não serem animais jovens e terem passado por um processo cirúrgico.

A idade dos animais influencia a aprendizagem e memória (Beatty, 1988; Albert, 1993). Ratos senis apresentam prejuízos no desempenho em tarefas cognitivas que requerem o uso da aprendizagem e memória espacial, i.e., a habilidade para adquirir uma representação cognitiva de localização no espaço e eficazmente navegar no ambiente (Barnes, 1988; Gallagher e Pelley, 1988; Brandeis et al., 1989; Ingran et al., 1994). É possível que parte dos resultados comportamentais desse estudo estejam relacionados com a idade dos animais no momento da realização dos testes pós-operatórios.

Os animais do presente estudo foram também submetidos a teste numa tarefa de memória de referência espacial independente de busca alimentar, o labirinto aquático de Morris. Os resultados mostraram que danos no MM não alteram o desempenho na tarefa, em relação aos animais controle-operados. Merece menção o fato de que a curva de aprendizagem tanto dos animais lesados como dos animais controle foi menos acentuada ao longo das sessões de treino, em relação à observada em estudos prévios de nosso próprio laboratório (Xavier, 1999), denotando menor aprendizagem da tarefa, o que pode estar relacionado, como vimos acima, com a idade dos animais (ver Brandeis et al., 1989; D'Hooge e De Deyn, 2001; Gallagher et al., 1993; Gower e Lamberty, 1993; Lindner, 1997).

Um efeito curioso observado no desempenho dos animais expostos ao labirinto aquático de Morris refere-se à velocidade de nado dos animais, que foi menor no

grupo lesado em relação ao grupo controle-operado, a partir do terceiro dia de treinamento; como os animais de ambos os grupos tinham a mesma idade, não há como atribuir essa diferença a esse fator. Usualmente, a velocidade de nado no labirinto aquático é considerada um indicador da motivação dos animais para o desempenho da tarefa; animais mais motivados nadariam mais rapidamente. O interessante nesse resultado é que essa diferença surgiu apenas depois do terceiro dia do treino, mas não nos dois primeiros dias. Como esse parâmetro é calculado a partir do comprimento do trajeto dividido pela latência dos animais, mas não houve diferenças significantes entre lesados e controle em relação a esses escores, o significado dessa diferença de velocidade não fica claro. É possível que o resultado tenha sido casual e, talvez, associado ao reduzido número de animais incluídos no estudo.

Os resultados do presente estudo sugerem que danos no MM não interferem nos níveis ansiedade dos animais; esse resultado refletiu-se numa ausência de diferença significativa no desempenho dos animais lesados em relação aos controle-operado, testados no paradigma do teste e re-teste no labirinto em cruz elevado. Além disso, confirmando as observações anteriores indicativas de ausência de deficiência no funcionamento da memória dos animais lesados, os animais de ambos os grupos entraram menos nos braços abertos do labirinto na segunda sessão e permaneceram menos tempo nestes, em relação à primeira, indicando que aprenderam que o ambiente é aversivo, evitando esses locais numa segunda sessão (File, 1993; Graeff, 1993). Portanto, danos no MM não interferem tanto na ansiedade avaliada por meio do labirinto em cruz elevado quando na memória aversiva. Ademais, na atividade

locomotora e o comportamento de avaliação de risco também foram observados, não tendo sido observada qualquer diferença dos animais portadores de lesão no MM em relação aos controles.

Em conclusão, a tarefa de aprendizagem de pares associados descrita no presente estudo, envolvendo a associação sabor-local, permite avaliar funções de memória de natureza espacial relacionadas à busca alimentar e também o tempo de retenção dessa informação. Assim, representa um interessante instrumento comportamental para futuros estudos sobre a neurobiologia da memória espacial relacionada à busca alimentar. A estratégia neuro-cirúrgica empregada no presente trabalho, envolvendo a administração micro-iontoforética de NMDA no MM foi efetiva em induzir danos seletivos nessa estrutura nervosa. O desempenho de ratos portadores desse tipo de lesão na tarefa de pares associado parece sutilmente alterado pós-operatoriamente; porém, não se deve ser conclusivo em relação a esse aspecto, uma vez que nesse estágio do experimento o número de animais lesados era relativamente reduzido e os mesmos se encontravam com cerca de 15 meses de idade, o que pode ter influenciado os resultados. Além disso, essa lesão não gerou alterações no desempenho dos animais no teste de memória de referência no labirinto aquático de Morris e no paradigma do teste e re-teste no labirinto em cruz elevado, sugerindo, respectivamente, que a memória espacial que não envolve busca alimentar, os níveis de ansiedade, e a memória aversiva desses animais não estava alterada depois da lesão.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, C.R.; KENNEDY, A.R.; WREN, A.M.; ROSSI, M.; MURPHY, K.G.; SEAL, L.J.; TODD, J.F.; GHATEI, M.A.; SMALL, C.J.; BLOOM, S.R. Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. **Endocrinology**, v. 144, p. 3943-49, 2003.

AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 22, p. 425-89, 1999.

AGGLETON, J.P.; MISHKIN, M. Mammillary-body lesions and visual recognition in monkeys. **Experimental Brain Research**, v. 58, p. 190-97, 1985.

AGGLETON, J.P.; NEAVE, N.; NAGLE, S.; HUNT, P.R. A comparison of the effects of anterior thalamic, mamillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. **Behavioural Brain Research**, v. 68, p. 91-101, 1995.

ALBERT, M. Neuropsychological and neurophysiological changes in healthy adult humans across the age range. **Neurobiology of Aging**, v. 14, p. 623-25, 1993.

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. Hippocampal Formation. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1995, p. 443-93.

ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, G.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo, 2004.

BARBANO, M.F.; CADOR, M. Various aspects of feeding behavior can be partially dissociated in the rat by the incentive properties of food and the physiological state. **Behavioral Neuroscience**, v. 119, p. 1244-53, 2005.

BARNES, C.A. Aging and the physiology of spatial memory. **Neurobiology of Aging**, v. 9, p. 563-68, 1988.

BARNES, C.A.; SUSTER, M.S.; SHEN, J. MCNAUGHTON, B.L. Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. **Nature**, v. 388, p. 272-55, 1997.

BEATTY, W.W. Preservation and loss of spatial memory in aged rats and humans: implications for the analysis of memory dysfunction in dementia. **Neurobiology of Aging**, v. 9, p. 557-61, 1988.

BERACOCHEA, D.J.; JAFFARD, R. Impairment of spontaneous alternation behavior in sequential test procedures following mammillary body lesions in mice: evidence for time-dependent interference-related memory deficits. **Behavioral Neuroscience**, v. 101, p. 187-97, 1987.

BITTENCOURT, J.C.; PRESSE, F.; ARIAS, C.; PETO, C.; VAUGHAN, J.; NAHON, J.L.; VALE, W.; SAWCHENKO, P.E. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 319, p. 218-45, 1992.

BLAIR, H.T.; CHO, J.; SHARP, P. Role of the lateral mammillary nucleus in the rat head direction circuit: a combined single unit recording and lesion study. **Neuron**, v. 21, p. 1387-97, 1998.

BLAIR, H.T.; CHO, J.; SHARP, P.E. The anterior thalamic head-direction signal is abolished by bilateral but not unilateral lesions of the lateral mammillary nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, p. 6673-83, 1999.

BODNO, S.R.; HUMPHREY, A.G.; LEHMANN, J.C.; DIAMOND, D.M.; ROSE, G.M.; MEANEY, M.J. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 61-69, 1994.

BOROWSKY, B.; DURKIN, M.M.; OGOZALEK, K.; MARZABADI, M.R.; DELEON, J.; LAGU, B.; HEURICH, R.; LICHTBLAU, H.; SHAPOSHNIK, Z.; DANIEWSKA, I.; BLACKBURN, T.P.; BRANCHEK, T.A.; GERALD, C.; VAYSSE, P.J.; FORRAY, C. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. **Nature Medicine**, v. 8, p. 825-30, 2002.

BOUFFARD, J.P.; JARRARD, L.E. Acquisition of a complex place task in rats with selective ibotenate lesions of hippocampal formation: combined lesions of subiculum and entorhinal cortex versus hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, p. 828-84, 1988.

BOULLAMERY-VELLY, A.; SIMON, N.; VIDAL, J. MOUCHET, J. BRUGUEROLLE, B. Effects of three-hour restricted food access during the light period on circadian rhythms of temperature, locomotor activity, and heart rate in rats. **Chronobiology International**, v. 22, p. 489-98, 2005.

BRANDEIS, R.; BRANDYS, Y.; YEHUDA, S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 48, p. 29-69, 1989.

BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 14515-20, 2004.

CALTON, J.L.; STACKMAN, R.W.; GOODRIDGE, J.P.; ARCHEY, W.B.; DUDCHENKO, P.A.; TAUBE, J.S. Hippocampal place cell instability after lesions of the head direction cell network. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 9719-31, 2003.

CARDENAS, F.; LAMPREA, M.R.; MORATO, S. Vibrissal sense is not the main sensory modality in rat exploratory behavior in the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 122, p. 169-74, 2001.

CASATTI, C.A.; ELIAS, C.F.; SITA, L.V.; FRIGO, L.; FURLANI, V.C.; BAUER, J.A.; BITTENCOURT, J.C. Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. **Neuroscience**, v. 115, p. 899-915, 2002.

CHEN, Y.; HU, C.; HSU, C.K.; ZHANG, Q.; BI, C.; ASNICAR, M.; HSIUNG, H.M.; FOX, N.; SLIEKER, L.J.; YANG, D.D.; HEIMAN, M.L.; SHI, Y. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. **Endocrinology**, v. 143, p. 2469-77, 2002.

CLAYTON, N.S.; DICKINSON, A. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. **Nature**, v. 395, p. 272-74, 1998.

CLEGG, D.J.; AIR, E.L.; BENOIT, S.C.; SAKAI, R.S.; SEELEY, R.J.; WOODS, S.C. Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, p. 494-99, 2003.

COSTA, V.C.I.; BUENO, J.L.O.; XAVIER, G.F. Dentate gyrus-selective colchicines lesion and performance in temporal and spatial tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 160, p. 286-303, 2005.

D'HOOGE, R.; DE-DEYN, P.P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60-90, 2001.

DAY, M.; LANGSTON, R.; MORRIS, R.G. Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. **Nature**, v. 424, p. 205-9, 2003.

DERE, E.; HUSTON, J.P.; SILVA, M.A.S. Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. **Brain Research Protocols**, v. 16, p. 10-19, 2005a.

DERE, E.; HUSTON, J.P.; SILVA, M.A.S. Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 84, p. 214-21, 2005b.

DERE, E.; KART-TEKE, E.; HUSTON, J.P.; SILVA, M.A.S. The case for episodic memory in animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 1206-24, 2006.

DUDCHENKO, P.A.; TAUBE, J.S. Correlation between head direction cell activity and spatial behavior on a radial arm maze. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, p. 3-19, 1997.

DUSOIR, H.; KAPUR, N.; BYRNES, D.P.; MCKINSTY, S.; HOARE, R.D. The role of diencephalic pathology in human memory disorder. Evidence from a penetrating paranasal brain injury. **Brain**, v. 113, p. 1695-706, 1990.

EACOTT, M.J.; NORMAN, G. Integrated memory for object, place and context in rats: a possible model of episodic-like memory? **The Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1948-53, 2004.

ELIAS, C.F.; FRIGO, L.; BITTENCOURT, J.C. Origins of melanin-concentrating hormone immunoreactive projections to the motor cortex and pedunculo pontine nucleus. **Society for Neuroscience's Annual Meetings**, v. 23, p. 1484, 1997.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 47-59, 1988.

ERICKSON, C.A.; BARNES, C.A. The neurobiology of memory changes in normal aging. **Experimental Gerontology**, v. 38, p. 61-69, 2003.

ERIKSSON, P.S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, p. 1313-17, 1998.

FALTER, U.; GOWER, A.J.; GOBERT, J. Resistance of baseline activity in the elevated plus-maze to exogenous influences. **Behavioral Pharmacology**, v. 3; p.123-28, 1992.

FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 54: 31-40, 1996.

FILE, S.E. Behavioral detection of anxiolytic action. In: ELLIOT, J.M.; HEAL, D.J.; MARSDEN, C.A. **Experimental approach to anxiety and depression**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1992, p. 25-44.

FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 125, p. 151-57, 2001.

FILE, S.E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 199-202, 1993.

FIELD, T.D.; ROSENSTOCK, J.; KING, E.C.; GREENE, E. Behavioral role of the mammillary efferent system. **Brain Research Bulletin**, v. 3, p. 451-6, 1978.

GAFFAN, E.A.; BANNERMAN, D.M.; Warburton, E.C.; Aggleton, J.P. Rats' processing of visual scenes: effects of lesions to fornix, anterior thalamus, mamillary nuclei or the retrohippocampal region. **Behavioural Brain Research**, v. 121, p. 103-17, 2001.

GALEF, B.G.; KENNETT, D.J.; STEIN, M. Demonstrator influence on observer diet preference: effects of simple exposure and the presence of a demonstrator. **Animal Learning and Behavior**, v. 13, p. 25-30, 1985.

GALEF, B.G. Utilization by norway rats (*R. Norvegicus*) of multiple messages concerning distant foods. **Journal of Comparative Psychology**, v. 97, p. 364-71, 1983.

GALEF, B.G.; WIGMORE, S.W. Transfer of information concerning distant foods: A laboratory investigation of the "information centre" hypothesis. **Animal Behaviors**, v. 31, p. 748-58, 1983.

GALEF, B.G.; MASON, J.R.; PRETI, G.; BEAN, N.J. Carbon disulfide: a semiochemical mediating socially-induced diet choice in rats. **Physiology and Behavior**, v. 42, p. 119-24, 1988.

GALLAGHER, M.; BURWELL, R.; BURCHINAL, M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. **Behavioral Neuroscience**, v. 107, p. 618-626, 1993.

GALLAGHER, M.; NICOLLE, M.M. Animals models of normal aging: relationship between cognitive decline and markers in hippocampal circuitry. **Behavioural Brain Research**, v. 57, p. 155-162, 1993.

GALLAGHER, M.; PELLEYMOUNTER, M.A. Spatial learning deficits in old rats: a model for memory decline in the aged. **Neurobiology of Aging**, v. 9, p. 549-56, 1988.

GALLAGHER, M.; RAPP, P. The use of animal models to study the effects of aging on cognition. **Annual Review of Psychology**, v. 48, p. 339-70, 1997.

GEINISMAN, Y.; DETOLEDDO-MORRELL, L.; HELLER, R.E. Hippocampal markers of aged-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. **Progress in Neurobiology**, v. 45, p. 223-52, 1995.

GOMORI, A.; ISHIHARA, A.; ITO, M.; MASHIKO, S.; MATSUSHITA, H.; YUMOTO, M.; TANAKA, T.; TOKITA, S.; MORIYA, M.; IWAASA, H.; KANATANI, A. Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 284, p. 583-88, 2003.

GONZALEZ, M.I.; VAZIRI, S.; WILSON, C.A. Behavioral effects of alpha-MSH and MCH after central administration in the female rat. **Peptides**, v. 17, p. 171-77, 1996.

GOULD, E.; MCEWEN, B.S.; TANAPAT, P.; GALEA, L.A.M.; FUCHS, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 2492-98, 1997.

GOULD, E.; BEYLIN, A.; TANAPAT, P.; REEVES, A.; SHORS, T.J. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience**, v. 2, p. 260-65, 1999.

GOWER, A.J.; LAMBERTY, Y. The aged mouse as a model of cognitive decline with special emphasis on studies in NMRI mice. **Behavioural Brain Research**, v. 57, p. 163-73, 1993.

GRAEFF, F.G. Ansiedade. In GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 5. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 1999, p. 144.

GRAEFF, F.G.; SILVEIRA, M.S.L.; NOGUEIRA, R.L.; AUDI, E.A.; DE OLIVEIRA, R.M.W. Role of the amygdale and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 123-31, 1993.

HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W. 5HT drugs in animal models of anxiety. **Psychopharmacology**, v. 112, p. 13-20, 1993.

HARDING, A.; HALLIDAY, G.; CAINE, D.; KRIL, J. Degeneration of anterior thalamic nuclei differentiates alcoholics with amnesia. **Brain**, v. 123, p. 141-54, 2000.

HERVE, C.; FELLMANN, D. Changes in rat melanin-concentrating hormone and dynorphin messenger ribonucleic acids induced by food deprivation. **Neuropeptides**, v. 31, p. 237-42, 1997.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 971-80, 1999.

- HOLMES, E.J.; JACOBSON, S.; STEIN, B.M.; BUTTERS, N. Ablations of the mammillary nuclei in monkeys: effects on postoperative memory. **Experimental Neurology**, v. 81, p. 97-113, 1983.
- INGRAM, D.K.; JUCKER, M.; SPANGLER, E.L. Behavioral manifestations of aging. In: MOHR, U.; CUNGWORTH, D.L.; CAPEN, C.C. **Pathobiology of the aging rat**. Washington: ILSI Press, 1994, p. 149-70.
- JARRARD, L.E. Selective hippocampal lesions and behavior. **Physiological Psychology**, v. 8, p. 198-206, 1980.
- JOHNSTON, A.L.; FILE, S.E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology and Behavior**, v. 49, p. 255-50, 1991
- KAPUR, N.; MILLAR, J.; ABBOTT, P.; CARTER, M. Recovery of function processes in human amnesia: evidence from transient global amnesia. **Neuropsychologia**, v. 36, p. 99-107, 1998.
- KART-TEKE, E.; SILVA, M.A.S.; HUSTON, J.P.; DERE, E. Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 85, p. 173-182, 2006.
- KEMPERMANN, G.; KUHN, H.G.; GAGE, F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 3206-12, 1998.
- KOPELMAN, M.D. The Korsakoff Syndrome. **British Journal Psychiatry**, v. 166, p. 154-73, 1995.
- KUHN, H.G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 2027-33, 1996.
- LI, J.S.; CHAO, Y.S. Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, p. 192-198, 2008.
- LINDNER, M.D. Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 203-20, 1997.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.
- LUBOW, R.E. **Latent inhibition and conditioned theory**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

LUDWIG, D.; MOUNTJOY, K.G.; TATRO, J.B.; GILLETTE, J.A.; FREDERICH, R.C.; FLIER, J.S.; MARATOS-FLIER, E. Melanin-concentrating hormone: a functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 627-33, 1998.

MANRIQUE, T.; MORON, I.; BALLESTEROS, M.A.; GUERRERO, R.M.; GALLO, M. Hippocampus, ageing, and taste memories. **Chemical Senses**, v. 32, p. 111-117, 2007.

MARSH, D.J.; WEINGARTH, D.T.; NOVI, D.E.; CHEN, H.Y.; TRUMBAUER, M.E.; CHEN, A.S.; GUAN, X.M.; JIANG, M.M.; FENG, Y.; CAMACHO, R.E.; SHEN, Z.; FRAZIER, E.G.; YU, H.; METZGER, J.M.; KUCA, S.J.; SHEARMAN, L.P.; GOPAL-TRUTER, S.; MACNEIL, D.J.; STRACK, A.M.; MACINTYRE, D.E.; VAN DER PLOEG, L.H.; QIAN, S. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 3240-45, 2002.

MAYES, A.R.; MEUDELL, P.R.; MANN, D.; PICKERING, A. Location of lesions in Korsakoff's syndrome: neuropsychological and neuropathological data on two patients. **Cortex**, v. 24, p. 367-88, 1988.

MCBRIDE, R.B.; BECKWITH, B.E.; SWENSON, R.R.; SAWYER, T.K.; HADLEY, M.E.; MATSUNAGA, T.O.; HRUBY, V.J. The actions of melanin-concentrating hormone (MCH) on passive avoidance in rats: a preliminary study. **Peptides**, v. 15, p. 757-59, 1994.

MERRILL, D.A.; KARIM, R.; DARRAQ, M.; CHIBA, A.A. Tuszynski, M.H. Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 459, p. 201-07, 2003.

MILLER, C.L.; HRUBY, V.J.; MATSUNAGA, T.O.; BICKFORD, P.C. Alpha-MSH and MCH are functional antagonists in a CNS auditory gating paradigm. **Peptides**, v. 14, p. 431-40, 1993.

MILNER, B.A. Memory and the medial temporal regions of the brain. In: PRIBRAM, K.H.; BROADBENT, D.E. **Biology of memory**. New York: Academic Press, 1970, p. 29-50.

MONZON, M.E.; DE BARIOGLIO, S.R. Response to novelty after i.c.v. injection of melanin-concentrating hormone (MCH) in rats. **Physiology and Behavior**, v. 67, p. 813-17, 1999.

MONZON, M.E.; VARAS, M.M.; DE BARIOGLIO, S.R. Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone (MCH) in rat brain. **Peptides**, v. 22, p. 1043-47, 2001.

MORRIS, R.G.M. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.

MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, p. 681-83, 1982.

MORRIS, R.G.M. An attempt to dissociate "spatial-mapping" and "working-memory" theories of hippocampal function. In: SEIFERT, W. **Neurobiology of the hippocampus**. London: Academic Press, 1983, p. 405-32.

MORRIS, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, v. 12, p. 239-60, 1981.

MOSER, M.B.; MOSER, E.I.; FORREST, E.; ANDERSEN, P.; MORRIS, R.G. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 9697-701, 1995.

NEAVE, N.; NAGLE, S.; AGGLETON, J.P. Evidence for the involvement of the mammillary bodies and cingulum bundle in allocentric spatial processing by rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 9, p. 941-55, 1997.

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

O'KEEFE, J. Spatial memory within and without hippocampal system. In: SEIFERT, W. **Neurobiology of the hippocampus**. London: Academic Press, 1983.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, v. 34, p. 171-75, 1971.

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

OLER, J.A.; MARKUS, E.J. Age-related deficits on the radial maze and in fear conditioning: hippocampal processing and consolidation. **Hippocampus**, v. 8, p. 402-15, 1998.

OLTON, D.S. Mazes, maps and memory. **American Psychologist**, v. 34, p. 583-96, 1979.

OLTON, D.S. The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behaviour. In: **Functions of the Septo-Hippocampal System**. Ciba Foundation Symposium, 1978, p. 327-49.

OLTON, D.S. The use of animal models to evaluate the effects of neurotoxins on cognitive processes. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, v. 5, p. 635-40, 1983.

OLTON, D.S.; SAMUELSON, R.J. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, v. 2, p. 97-116, 1976.

PALLER, K.A. Consolidating dispersed neocortical memories: the missing link in amnesia. **Memory**, v. 5, p. 73-88, 1997.

PAPEZ, J.W. A proposed mechanism of emotion. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 38, p. 725-743, 1937.

PARKINSON, J.K.; MURRAY, E.; MISHKIN, M. A selective mnemonic role for the hippocampus in monkeys: memory for the location of objects. **The Journal of Neuroscience**, v. 8, p. 4159-67, 1988.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1998.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-67, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.24, p. 525-29, 1986.

PINHEIRO, S.H.; ZANGROSSI-JR, H.; DEL-BEM, C.M.; GRAEFF, F.G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 71-85, 2007.

PRAAG, H.; SCHINDER, A.F.; CHRISTIE, B.R.; TONI, N.; PALMER, T.D.; GAGE, F.H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, p. 1030-34, 2002.

PRESSE, F.; SOROKOVSKY, I.; MAX, J.P.; NICOLAIDIS, S.; NAHON, J.L. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. **Neuroscience**, v. 71, p. 735-45, 1996.

QU, D.; LUDWIG, D.S.; GAMMELTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; MATHES, W.F.; PRZYPEK, J.; KANAREK, R.; MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v. 380, p. 243-47, 1996.

RANCE, T.; BAKER, B.I. The teleost melanin-concentrating hormone - a pituitary hormone of hypothalamic origin. **General and Comparative Endocrinology**, v. 37, p. 64-73, 1979.

RAPP, P.R.; GALLAGHER, M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 9926-30, 1996.

RASMUSSEN, T.; SCHLIEMANN, T.; SORENSEN, J.C.; ZIMMER, J.; WEST, M.J. Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. **Neurobiology of Aging**, v. 17, p. 143-47, 1996.

RIEKKINEN, P.; MIETTINEN, R.; SIRVIO, J.; AALTONEN, M.; RIEKKINEN, P. The correlation of passive avoidance deficit in aged rat with the loss of nucleus basalis choline acetyltransferase-positive neurons. **Brain Research Bulletin**, v. 25, p. 415-17, 1990.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S.J.; HENDRIE, C.A. **Ethology and Psychopharmacology**. Chichester: Wiley, 1994, p. 9-44.

ROSENZWEIG, E.S.; REDISH, A.D.; MCNAUGHTON, B.L. BARNES, C.A. Hippocampal map realignment and spatial learning. **Nature Neuroscience**, v. 6, p. 609-15, 2003.

ROSSI, M.; CHOI, S.J.; O'SHEA, D.; MIYOSHI, T.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. **Endocrinology**, v. 138, p. 351-55, 1997.

SANTIN, L.J.; RUBIO, S.; BEGEGA, A.; ARIAS, J.L. Effects of mammillary body lesions on spatial reference and working memory tasks. **Behavioural Brain Research**, v. 102, p. 137-50, 1999.

SANTOS, A.M.G. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G.F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999, p. 131-54.

SARAVIS, S.; SZIKLAS, V.; PETRIDES, M. Memory for places and the region of the mamillary bodies in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 2, p. 556-64, 1990.

SAHU, A. Interactions of neuropeptide Y, hypocretin-I (orexin A) and melanin-concentrating hormone on feeding in rats. **Brain Research**, v. 944, p. 232-38, 2002.

SHEARMAN, L.P.; CAMACHO, R.E.; SLOAN STRIBLING, D.; ZHOU, D.; BEDNAREK, M.A.; HRENIUK, D.L.; FEIGHNER, S.D.; TAN, C.P.; HOWARD, A.D.; VAN DER PLOEG, L.H.; MACINTYRE, D.E.; HICKEY, G.J.; STRACK, A.M. Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 475, p. 37-47, 2003.

SHEN, J.; BARNES, C.A.; MCNAUGHTON, B.L.; SKAGGS, W.E.; WEAVER, K.L. The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 6769-82, 1997.

SHIMADA, M.; TRITOS, N.A.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.S.; MARATOS-FLIER, E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**, v. 396, p. 670-74, 1998.

SHORS, T.J.; MIESEGAES, G.; BEYLIN, A.; ZHAO, M.; RYDEL, T.; GOULD, E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. **Nature**, v. 410, p. 372-75, 2001.

SHUKITT-HALE, B.; MCEWEN, J.J.; SZPRENGIEL, A.; JOSEPH, J.A. Effect of age on the radial arm water maze - a test of spatial learning and memory. **Neurobiology of Aging**, v. 25, p. 223-29, 2004.

SMITH, M.L.; MILNER, B.A. The role of the right hippocampus in the recall of spatial location. **Neuropsychologia**, v. 19, p. 781-93, 1981.

SQUIRE, L.R.; ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v. 253, p. 1380-86, 1991.

STACKMAN, R.W.; TAUBE, J.S. Firing properties of rat lateral mammillary single units: head direction, head pitch, and angular head velocity. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 9020-37, 1998.

SULLIVAN, E.V.; LANE, B.; DESHMUKH, A.; ROSENBLOOM, M.J.; DESMOND, J.E.; LIM, K.O.; PFEFFERBAUM, A. In vivo mammillary body volume deficits in amnesic and nonamnesic alcoholics. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23, p. 1629-36, 1999.

SUTHERLAND, R.J.; RODRIGUEZ, A.J. The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 32, p. 265-77, 1989.

SZIKLAS, V.; PETRIDES, M. Memory impairments following lesions to the mammillary region of the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 5, p. 525-40, 1993.

TAKEKAWA, S.; ASAMI, A.; ISHIHARA, Y.; TERAUCHI, J.; KATO, K.; SHIMOMURA, Y.; MORI, M.; MURAKOSHI, H.; SUZUKI, N.; NISHIMURA, O.; FUJINO, M. T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 438, p. 129-35, 2002.

TAUBE, J.S. Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. **Progress in Neurobiology**, v. 55, p. 225-56, 1998.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 463-69, 1993.

TRITOS, N.A.; MASTAITIS, J.W.; KOKKOTOU, E.; MARATOS-FLIER, E. Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. **Brain Research**, v. 895, p. 160-66, 2001.

TULVING, E. **Elements of Episodic Memory**. New York: Oxford University Press, 1983.

VAN DER WERF, Y.D.; SCHELTENS, P.; LINDEBOOM, J.; WITTER, M.P.; UYLINGS, H.B.; JOLLES, J. Deficits of memory, executive functioning and attention following infarction in the thalamus: a study of 22 cases with localized lesions. **Neuropsychologia**, v. 41, p. 1330-44, 2003.

VANN, S.D.; AGGLETON, J.P. Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 3506-14, 2003.

VANN, S.D.; AGGLETON, J.P. The mammillary bodies: two memory systems in one? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, p. 35-44, 2004.

VARAS, M.; PEREZ, M.; RAMIREZ, O.; DE BARIOGLIO, S.R. Melanin concentrating hormone increase hippocampal synaptic transmission in the rat. **Peptides**, v. 23, p. 151-55, 2002a.

VARAS, M.; PEREZ, M.; MONZON, M.E.; DE BARIOGLIO, S.R. Melanin-concentrating hormone, hippocampal nitric oxide levels and memory retention. **Peptides**, v. 23, p. 2213-21, 2002b.

VERRET, L.; GOUTAGNY, R.; FORT, P.; CAGNON, L.; SALVERT, D.; LEGER, L.; BOISSARD, R.; SALIN, P.; PEYRON, C.; LUPPI, P.H. A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. **BMC Neuroscience**, v. 4, p. 19, 2003.

VERTES, R.P.; ALBO, Z.; PRISCO, V.D. Theta-rhythmically firing neurons in the anterior thalamus: implications for mnemonic functions of Papez's circuit. **Neuroscience**, v. 104, p. 619-25, 2001.

XAVIER, G.F. **Atividade exploratória em ratos com lesões no hipocampo e secção do fórnix. Implicações para as teorias sobre a função hipocampal**. 288f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1985.

XAVIER, G.F. Memória espacial no rato. In: ADES, C. **Etologia de animais e de homens**. São Paulo: Edicon, 1989, p. 61-74.

XAVIER, G.F. A modularidade da memória e o sistema nervoso. **Psicologia USP**. São Paulo, v. 4, p. 61-115, 1993.

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

XAVIER, G.F. Lesão e disfunção cognitiva no sistema nervoso central. In: **Revista Estudos Avançados da Universidade de São Paulo**. São Paulo, p. 62-67, 1994.

ZIMMERBERG, B.; FARLEY, M.J. Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. **Physiology and Behavior**, v. 54, p. 1119-24, 1993.

WALL, P.M.; MESSIER, C. Methodological and conceptual issues in the use of elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxietylike behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 275-86, 2001.

WEISKRANTZ, L. A comparison of hippocampal pathology in man and other animals. In: ELLIOT, K.; WHELAN, L. **Functions of the septohippocampal system**. Amsterdam: Elsevier, 1978.

WHISHAW, I.Q.; MITTLEMAN, G. Visits to starts, routes, and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. **Journal of Comparative Psychology**, v. 100, p. 422-31, 1986.

WILSON, I.A.; IKONEN, S.; GUREVICIENE, I.; MACMAHAN, R.W.; GALLAGHER, M.; EICHENBAUM, H.; TANILA, H. Cognitive aging and the hippocampus: how old rats represent new environments. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3870-78, 2004.

WISNIEWSKA, R.J.; CAR, H.; STEFANIUK, R. Age-related changes in the motor response after administration of MPEP. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 56, p. 216, 2004.