

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

THOMAZ LÜSCHER DIAS

**EXPOSIÇÃO A ODORES SOCIAIS: EFEITOS SOBRE A
NEUROGÊNESE ADULTA E A ATIVIDADE NEURONAL
DE CAMUNDONGOS C57BL/6J MACHOS**

Belo Horizonte

2015

THOMAZ LÜSCHER DIAS

**EXPOSIÇÃO A ODORES SOCIAIS: EFEITOS SOBRE A
NEUROGÊNESE ADULTA E A ATIVIDADE NEURONAL
DE CAMUNDONGOS C57BL/6J MACHOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Neurociências da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Grace Schenatto Pereira Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

Agências financiadoras: CAPES, FAPEMIG, CNPq

Belo Horizonte

2015

Dedico este trabalho aos
camundongos que doaram suas
vidas para que ele pudesse ser
realizado

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

O Encontro Marcado, Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Dedico meu primeiro agradecimento ao Brasil. Em uma nação em que poucos são privilegiados com acesso a Educação de qualidade, concluir o Mestrado em uma das melhores Universidades públicas do país é motivo de enorme gratidão para mim. Assim, agradeço à CAPES, à FAPEMIG, ao CNPq e à Universidade Federal de Minas Gerais a oportunidade e o privilégio de estudar de graça, receber bolsa e ter minha pesquisa de Mestrado financiada com recursos públicos.

Agradeço à minha orientadora, Professora Grace Schenatto Pereira Moraes, a confiança e a dedicação que recebi nos últimos dois anos. Juntar-me ao grupo de pesquisa do NNC foi um passo na minha carreira do qual me orgulho e você foi quem me motivou a fazer essa escolha tão importante. Ao meu co-orientador, Professor Márcio Flávio Dutra Moraes, também dedico um agradecimento especial. Se hoje posso me considerar um Neurocientista, devo a você e a Grace grande parte dos ensinamentos para tal. Professores André Ricardo Massensini, Juliana Carvalho Tavares e Bruno Rezende, obrigado por terem me auxiliado na construção desse trabalho durante os seminários, journal clubs e convivência diária no NNC.

Ana Raquel Caixeta e Vinícius Oliveira, obrigado por terem dedicado seu tempo e seus esforços para me ajudarem a concluir esse trabalho. Se alguém me perguntar no futuro sobre como fazer amigos, direi: passe noites em claro com alguém fazendo imunohistoquímica de bulbo olfatório e esse alguém será seu amigo pra sempre! À Hyorrana, Luciana, Leonardo, Daniel, Eduarda e a todos os colegas do NNC, agradeço o companheirismo, a competência impecável, a dedicação admirável e todos os momentos que partilhei com vocês durante o tempo em que trabalhamos juntos. Dedico

um agradecimento especial ao Flávio Mourão que, como ele mesmo costuma se referir às pessoas de quem ele gosta, é um grande “espírito de luz”.

Se felicidade só é real quando compartilhada, posso dizer que sou das pessoas mais felizes que conheço! Guá e Scarpelli, obrigado por estarem sempre ao meu lado. Bruno, Dudu e Rafa, mesmo distantes, saber que posso contar com cada um de vocês pro que der e vier é sempre um conforto e uma alegria. Gabriel, Inhotim, Cássio e Naíla, o Grupo Evolução em Foco pode ter acabado, mas o sentimento de inquietude e a curiosidade insaciável que nos motivaram a criá-lo continuam vivos em mim até hoje. Foi e sempre será um prazer tentar entender o mundo com vocês. Stella, Caê, Gabi, Raffaello, Dani, Pannain*, Verônica, Arthur, Mari, Caju, Carina e todos os amigos da Bio, até que eu gosto bem de estudar os animais, as plantas e os cérebros, mas, sinceramente, foram vocês que fizeram valer a pena ter escolhido fazer Biologia.

Pai, Mãe e Cecília, a vocês que me conhecem melhor que ninguém e que sabem como é importante para mim a conclusão de mais essa etapa, meu maior obrigado de todos! Amo vocês e agradeço pelo apoio constante e a segurança que me dão para seguir tranquilo meu caminho e construir minha história.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
SUMÁRIO	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Odores sociais	1
1.2. O processamento olfatório de odores sociais	3
1.3. Genes Imediatamente Expressos como marcadores da atividade neuronal	6
1.4. Armazenamento de informações de conteúdo social	7
1.5. Fatores ambientais que afetam a memória social em roedores	9
1.5.1. Isolamento social	9
1.5.2. Ambiente enriquecido	11
1.6. Neurogênese adulta	12
1.6.1. Descoberta	12
1.6.2. Distribuição cerebral da neurogênese adulta	13
1.6.3. A função da Neurogênese Adulta – armazenamento de memórias	14
1.7. Neurogênese adulta e memória social: o papel protetor do enriquecimento ambiental ...	16
2. OBJETIVO	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Neurogênese adulta	20
3.2.1. Desenho experimental: neurogênese	21
3.2.2. Obtenção de cérebros e fatias cerebrais	22
3.2.3. Imunofluorescência	23
3.2.4. Microscopia e quantificação	25
3.2.5. Análise	30
3.3. Atividade neuronal	31

3.3.1. Desenho experimental: c-Fos	32
3.3.2. Tarefa de encontro social	33
3.3.3. Obtenção de séries de fatias	33
3.3.4. Imunohistoquímica anti-c-Fos.....	34
3.3.5. Microscopia e quantificação.....	36
3.3.6. Análise.....	40
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Efeito do isolamento e do ambiente enriquecido por odores na proliferação celular e neurogênese.....	42
4.2. Padrão de ativação neuronal após encontro social	48
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÕES.....	90
7. REFERÊNCIAS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Visão superior e lateral do encéfalo e medula espinhal de camundongo

Figura 02. Esquema ilustrativo da conectividade dos Sistemas Olfatórios Principal e Acessório de roedores

Figura 03. Esquema ilustrativo de um corte sagital típico de cérebro de roedores com ênfase nas áreas neurogênicas

Figura 04. Esquema que ilustra como o isolamento social e o enriquecimento ambiental podem atuar na memória social

Figura 05. Desenho experimental utilizado no experimento de neurogênese

Figura 06. Ilustrações anatômicas de cortes coronais de cérebro evidenciando as áreas analisadas no experimento de neurogênese

Figura 07. Exemplo de demarcação de área de interesse em microfotografia de Hipocampo

Figura 08. Projeção plana de série Z de Giro Denteado e exemplo de contagem de células BrdU⁺

Figura 09. Planos focais de série Z com sobreposição dos canais NeuN e BrdU e exemplo de contagem de células colocalizadas

Figura 10. Desenho experimental utilizado no experimento de atividade neuronal após encontro social

Figura 11. Ilustrações anatômicas de cortes coronais de cérebro evidenciando as áreas analisadas no experimento de atividade neuronal após encontro social

Figura 12. Ilustração do processo de contagem de células c-Fos⁺ em exemplo de Amígdala Basolateral

Figura 13. Imagem ilustrativa do resultado de marcação de NeuN e BrdU no Hipocampo

Figura 14. Gráficos representativos dos resultados de contagem de células BrdU⁺ e BrdU⁺/NeuN⁺ no Hipocampo Total

Figura 15. Gráficos representativos dos resultados de contagem de células BrdU⁺ e BrdU⁺/NeuN⁺ no Hipocampo Dorsal e Ventral separadamente

Figura 16. Imagem ilustrativa do resultado de marcação de NeuN e BrdU no Bulbo Olfatório

Figura 17. Gráficos representativos dos resultados de contagem de células BrdU⁺ e BrdU⁺/NeuN⁺ no Bulbo Olfatório

Figura 18. Imagens ilustrativas dos resultados de marcação de c-Fos⁺ nas áreas analisadas

Figura 19. Gráficos de conectividade baseados nas correlações da atividade neuronal das áreas medidas nos grupos experimentais

Figura 20. Reprodução dos gráficos e tabelas contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão do efeito do isolamento social na proliferação, sobrevivência e neurogênese em roedores

Figura 21. Reprodução da Figura 07 (H, J e I) de Dranovsky et al., 2011

Figura 22. Reprodução da Figura 05 (F e G) e Figura 07 (K) de Dranovsky et al., 2011

Figura 23. Reprodução da Figura 08 de Dranovsky et al., 2011

Figura 24. Reprodução dos gráficos contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão do efeito do enriquecimento ambiental na proliferação, sobrevivência e neurogênese em roedores

Figura 25. Reprodução dos gráficos contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão das diferenças entre as porções Dorsal e Ventral do Hipocampo durante enriquecimento ambiental

Figura 26. Reprodução dos gráficos e esquemas contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão do efeito do encontro social na ativação cerebral em camundongos

Figura 27. Reprodução dos gráficos de Ferguson et al., 2001

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Resultados da contagem de células c-Fos⁺ após encontro social nas áreas analisadas

Tabela 02. Matrizes de correlação do número de células c-Fos⁺ entre as áreas analisadas

Tabela 03. Matriz evidenciando os pares de correlação significativa que foram observados nos dois grupos experimentais JuA e GV

Tabela 04. Matriz de correlação entre o Tempo de Exploração e o número de células c-Fos⁺ nas áreas analisadas no grupo JuA

LISTA DE ABREVIATURAS

AG – animais agrupados

AMG – amígdala

ANOVA – análise de variância

AOB – bulbo olfatório acessório

AP – anteroposterior

BLA – amígdala basolateral

BO – bulbo olfatório

BrdU – bromodesoxiuridina

CA – corno de Amon

CEBIO – centro de bioterismo

CEUA – comitê de ética no uso de animais

DAB - 3,3' - diaminobenzidina

DCX – *doublecortin*

DG – giro denteado

EYFP – proteína amarela fluorescente

GFAP – proteína acídica fibrilar da glia

GL – camada glomerular do bulbo olfatório

GR – camada granular do bulbo olfatório

GV – animais expostos a gaiola vazia

HC – hipocampo

HD – hipocampo dorsal

HV – hipocampo ventral

HY – hipotálamo

IEG – genes imediatamente expressos

IgG – imunoglobulina G

IL – córtex infra-límbico

IP – intraperitoneal

IS – animais isolados

IS+AE – animais isolados em ambiente enriquecido por odores sociais

JuA – animais expostos a juvenil

Ki67 – proteína marcadora de divisão celular

LH – hipotálamo lateral

LS – septo lateral

LSD – septo lateral dorsal

LSV – septo lateral ventral

LTD – depressão de longo prazo

LTP – potenciação de longo prazo

MEApd – amígdala medial posterodorsal

MHC – complexo maior de histocompatibilidade

MI – camada mitral do bulbo olfatório

MOB – bulbo olfatório principal

MUPs – proteínas urinárias principais

NA – abertura numérica

NeuN – proteína “núcleo neuronal”

NGS – soro normal de cabra

NSC – células tronco neurais

OE – epitélio olfatório

PBS – tampão fosfato-salina

PFA – paraformaldeído

PIR – córtex piriforme

PL – córtex pré-límbico

PVN – núcleo periventricular do hipotálamo

PVP – polivinilpirrolidona

RMS – via migratória rostral

S100 β – proteína ligante a cálcio S100 β

SEM – erro padrão

SGZ – zona subgranular

SVZ – zona subventricular

TOAD-64 – proteína *Turn On After Division of 64kDa*

Tuj1 – beta tubulina classe III específica de neurônio

VNO – órgão vomeronasal

RESUMO

Roedores, como camundongos e ratos, reconhecem seu coespecíficos principalmente por meio de odores sociais presentes na urina de cada indivíduo. Essa capacidade é chamada de memória social ou reconhecimento social. Sabe-se que isolamento social causa déficit de memória social em camundongos e que o enriquecimento ambiental por odores sociais – presença de fezes e urina de outros camundongos na gaiola - impede que esse déficit aconteça. Outros tipos de enriquecimento ambiental promovem melhora no desempenho em tarefas de memória declarativa e aumento da neurogênese adulta no Hipocampo e no Bulbo Olfatório. Os novos neurônios que surgem ao longo da vida no cérebro adulto parecem ter função fundamental na formação de novas memórias. Não se sabe, no entanto, se o efeito protetor do enriquecimento ambiental por odores sociais sobre a memória social de animais isolados acontece simultaneamente a um aumento da neurogênese adulta. Além disso, não se tem certeza de quais estruturas cerebrais são diferencialmente ativadas durante a aquisição de um novo traço de memória social, em particular se o Hipocampo tem importância especial. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da apresentação de odores sociais de forma prolongada (enriquecimento ambiental) na neurogênese adulta de camundongos isolados socialmente ou de forma pontual (encontro social) no padrão de ativação neuronal de camundongos controle. Para isso, foram feitos ensaios de imunofluorescência anti BrdU e NeuN para a quantificação do número de neurônios novos no Hipocampo e Bulbo Olfatório de camundongos isolados por uma semana em ambiente enriquecido por odores sociais e imunohistoquímica anti-c-Fos para a quantificação do número de neurônios ativados em diferentes regiões do cérebro após a apresentação pontual de um estímulo social desconhecido (animal juvenil) a camundongos controle. Os resultados obtidos mostraram que o isolamento social de uma semana foi capaz de aumentar proliferação celular no Hipocampo, mas também de fazer com que um percentual menor das novas células se diferenciasse em neurônios. O enriquecimento ambiental por odores sociais evitou esse efeito. Não foram vistos efeitos do isolamento ou do enriquecimento ambiental no Bulbo Olfatório. A apresentação de um juvenil desconhecido promoveu a ativação diferencial dos núcleos Basolateral e Medial posterodorsal da Amígdala, mas não de qualquer região do Hipocampo. Os resultados obtidos demonstraram que o isolamento social altera o surgimento de novas células no Hipocampo, mas não no Bulbo Olfatório, e que o enriquecimento ambiental por odores sociais evita essas alterações, assim como se observa com o déficit de memória social. No entanto, os resultados de atividade neuronal por meio da imunodetecção de c-Fos mostraram que o Hipocampo não é diferencialmente ativado durante o primeiro encontro entre animais desconhecidos, mas sim a Amígdala. Isso pode indicar que o Hipocampo não tem um papel crucial nos primeiros estágios da formação de memórias sociais.

Palavras-chave: isolamento social, enriquecimento ambiental, odores sociais, neurogênese adulta, atividade neuronal, Bulbo Olfatório, Hipocampo, Amígdala.

ABSTRACT

Rodents, such as mice and rats, recognize conspecifics from social odors present in each individual's urine. This ability is referred to as social memory or social recognition. It is established that social isolation leads to a social memory deficit in mice and that environmental enrichment by social odors – feces and urine from other mice placed in the cage bedding – prevents this deficit. Other forms of environmental enrichment lead to better performance in declarative memory tasks and increase adult neurogenesis in the Hippocampus and Olfactory Bulb of control mice. The new neurons that are born in the adult brain seem to have a crucial function in the establishment of new memories. Nevertheless, it has not been demonstrated whether the protective effect of environmental enrichment by social odors on social memory happens at the same time as an increase in the number of newborn neurons in the brain. Moreover, the brain structures activated during social memory processing are not fully described yet, and there is special doubt about whether the Hippocampus plays any important role in it. Thus, the main goal of this work was to assess the effect of prolonged social odor presentation (environmental enrichment) on the adult neurogenesis of socially isolated mice and the effect of brief presentation of social odors (social encounter) on the neuronal activation pattern of control mice. In order to do that, we performed BrdU and NeuN immunofluorescence to quantify the number of new neurons born in the Hippocampus and Olfactory Bulb of one week socially isolated mice kept in an environment enriched by social odors and c-Fos immunohistochemistry to quantify the number of activated neurons in several brain regions of control mice presented to an unknown set of social stimuli (novel juvenile). The obtained results show that one week social isolation increased proliferation in the Hippocampus, but that a lower percent of the newborn cells became differentiated into neurons compared to grouped house mice. Environmental enrichment by social odors was able to prevent this effect. No differences were seen in the Olfactory Bulb. The presentation of an unknown juvenile triggered differential neuronal activation only in the Basolateral and Medial posterodorsal nuclei of the Amygdala, but not in any of the Hippocampal regions accessed. These results demonstrate that social isolation alters how new cells proliferate and differentiate in the Hippocampus, but not the Olfactory Bulb, and that social odor environmental enrichment avoids such alterations in the same manner as it does on the social memory deficit cause by social isolation. However, neuronal activity detection by c-Fos immunoreaction results reveal that the Hippocampus is not differentially activated by an unknown set of social stimuli, but that the Amygdala is. This might indicate that the Hippocampus does not play a crucial role in the first stages of social memory formation.

Key words: social isolation, environmental enrichment, social odors, adult neurogenesis, neuronal activity, Olfactory Bulb, Hippocampus, Amygdala.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Odores sociais

Seres vivos são dotados de sistemas sensoriais capazes de perceber estímulos externos e de processá-los de forma a obterem informações relevantes sobre o ambiente. Plantas, animais e, mesmo organismos simples, como protozoários e bactérias, possuem a habilidade de processar esses estímulos, identificá-los, associá-los e memorizá-los, o que possui grande valor adaptativo. Essas capacidades permitem que organismos respondam em tempo real ao ambiente e reajam a mudanças de padrão e a novidades com maior eficiência do que se apenas possuíssem um programa pré-determinado de execução de tarefas (JULIUS et al., 2012).

Uma habilidade sensorial presente em seres vivos de praticamente todos os grupos atuais e que, provavelmente, já estava presente nos primeiros organismos vivos, é a capacidade de perceber, reconhecer e responder a substâncias químicas presentes no ambiente externo. Essa capacidade permite que o organismo não apenas responda à presença de alimentos, ameaças ou mudanças nas características químicas do ambiente, como permite a comunicação com outros indivíduos, por meio de componentes químicos produzidos e secretados por eles. Os mecanismos pelos quais diferentes organismos interpretam compostos químicos variam enormemente. Seres unicelulares recebem estímulos químicos diretamente sobre a superfície dos seus corpos, ao passo que organismos multicelulares, como os mamíferos, desenvolveram sistemas de órgãos dedicados exclusivamente à recepção e processamento de sinais químicos do ambiente (WICHER, 2012).

Em mamíferos, um dos sistemas sensoriais responsáveis pela percepção de substâncias químicas no ambiente é o sistema olfatório. Uma das principais funções

desse sistema é a de comunicação entre indivíduos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes. Mamíferos são capazes de identificar moléculas no ambiente provenientes de um coespecífico, e diferenciá-las daquelas produzidas por um predador, conseguem saber se foram produzidas por um macho ou por uma fêmea e até diferenciar se são provenientes de algum indivíduo específico (BRENNAN; KENDRICK, 2006; WYATT, 2003). Em roedores, essa capacidade permitiu o desenvolvimento e a manutenção de comportamentos sociais complexos, como a territorialidade, cuidado materno com a prole, cooperação, acasalamento preferencial, dentre outras estratégias sociais dependentes dessa habilidade (THOR; HOLLOWAY, 1982).

Diferentemente do que acontece em humanos, em que indivíduos se reconhecem, principalmente, devido a características visuais da face, a principal forma de reconhecimento intraespecífico em roedores se dá pelo olfato (BRENNAN; KENDRICK, 2006). Essa capacidade de ratos e camundongos de discriminar entre indivíduos da sua espécie tem sido amplamente estudada na literatura (BRENNAN; KENDRICK, 2006; CHEETHAM et al., 2007; SILVOTTI et al., 2011; WYATT, 2003).

A comunicação de características individuais em muitos mamíferos é feita por meio de moléculas que são genericamente chamadas de feromônios. Feromônios são produzidos e liberados de diversas formas, mas, em roedores, a principal forma de veiculação dessas substâncias é pela urina (BRENNAN; ZUFALL, 2006). Gusmão et al., 2012, utilizam o termo “odores sociais” para o conjunto de odores presentes na maravalha suja de urina e fezes de camundongos. Pode-se, então, fazer um paralelo conceitual próximo entre feromônios e odores sociais.

A urina de roedores apresenta uma diversidade de compostos proteicos e não proteicos, os quais possuem papel de sinalização e comunicação intra- e interespecífica.

A produção desses compostos pode ser afetada pela dieta, estado de saúde e idade do animal. Devido a esse caráter transitório e variável, essas substâncias são pouco informativas acerca da identidade individual de quem as produz, e informam apenas sobre o estado momentâneo do animal (BRENNAN; KENDRICK, 2006). No entanto, duas classes de peptídeos têm representação e composição constantes na urina de um mesmo indivíduo, independente do estado fisiológico ou de influências ambientais. Além disso, o conteúdo aminoacídico desses peptídeos é altamente relacionado com o perfil genético do animal (BOYSE et al., 1987). Essas duas características conferem a essas substâncias um valor informativo de identidade muito alto. Esses peptídeos são derivados de proteínas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*) e de uma classe de proteínas exclusivas da urina de camundongos, as MUPs (*Main Urinary Proteins*) (BOYSE et al., 1987; HURST et al., 2001; LIN et al., 2005). A função específica de cada classe para diferentes formas de reconhecimento social não está completamente elucidada, mas há evidências de que há tanto sobreposição de função como especialização em diferentes casos (MA et al., 2002; YAMAZAKI; BEAUCHAMP; WYSOCKI, 1983, HURST et al., 2001, YAMAZAKI; BEAUCHAMP; KUPNIEWSKI, 1988)

1.2. O processamento olfatório de odores sociais

A principal estrutura responsável pelo processamento primário de odores em roedores é o Bulbo Olfatório (BO). Essa estrutura localiza-se na porção mais rostral do encéfalo e é facilmente identificável, devido ao seu tamanho relativamente grande em relação ao restante do cérebro (*Olfactory bulb* na Figura 01) (BRENNAN; KENDRICK, 2006).

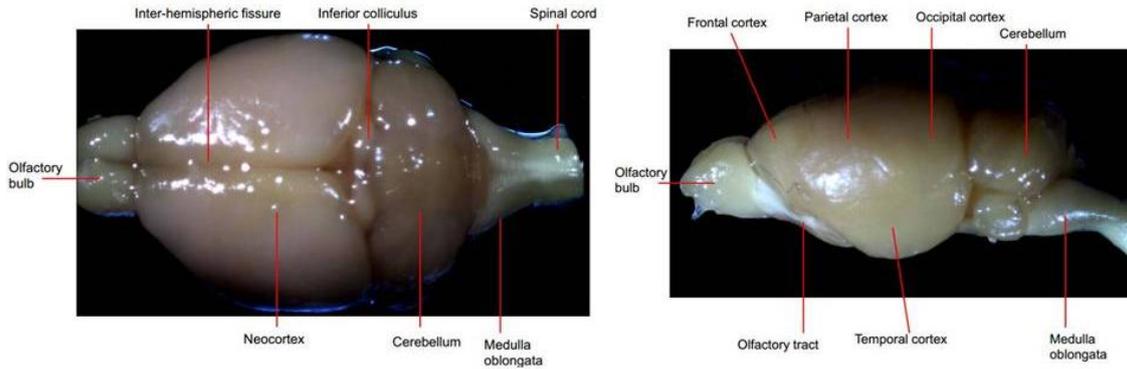


Figura 01: Visão superior e lateral do encéfalo e medula espinhal de camundongo. Bulbo Olfatório em evidência à esquerda nas duas visões.

O BO é composto por dois sistemas de maior relevância, o principal (MOB – *main olfactory bulb*) e o acessório (AOB – *accessory olfactory bulb*). Ambos possuem uma organização interna parecida, que consiste em várias camadas celulares interconectadas e especializadas em diferentes funções do processamento olfatório (para maiores detalhes, ver a revisão NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014). Resumidamente, o MOB recebe inervação de axônios provenientes de neurônios sensoriais localizados no Epitélio Olfatório (OE – *olfactory epithelium*), o qual é especializado no reconhecimento de moléculas voláteis. O AOB é inervado por neurônios presentes no Órgão Vomeronasal (VNO – *vomeronasal organ*), capaz de identificar moléculas não voláteis (BELLUSCIO et al., 1999). Em seguida, a informação recebida pelos neurônios sensoriais em ambos os sistemas olfatórios é repassada às células mitrais. Esta primeira sinapse ocorre em unidades funcionais denominadas glomérulos. Os feixes axonais das células mitrais irão compor os tratos olfatórios principal e acessório, os quais inervam estruturas mais caudais do encéfalo, para processamento secundário e terciário da informação olfativa (Figura 02).

A existência de dois sistemas olfatórios, física e funcionalmente separados, é frequentemente atribuída à especialização do AOB no reconhecimento e processamento de odores sociais, enquanto o MOB teria uma função menos importante nesse processo

e mais acentuada na identificação de odores de uma forma geral. No entanto, como revisto por Mucignat-Caretta et al., 2012, essa visão pode não ser a mais adequada, uma vez que há ampla convergência funcional entre os dois sistemas, o que torna difícil definir se são funcionalmente independentes e até se, realmente, processam estímulos olfativos com exclusividade. A conclusão mais atual, proposta na revisão de Mucignat-Caretta et al., 2012, é a de que ambos os sistemas participem no reconhecimento, tanto de odores sociais quanto não sociais, de forma sinérgica. Apesar disso, os autores sugerem que, devido à diferença acerca da volatilidade dos odores percebidos por cada um dos sistemas, o MOB tenha um papel mais importante na detecção de odores carregados pelo ar (mais relacionado com os peptídeos do MHC, mais voláteis), e que o AOB esteja mais envolvido na percepção de odores durante a exploração ativa de objetos, ambientes ou coespecíficos (mais relacionado com os peptídeos das MUPs, menos voláteis).

Finalmente, após o processamento primário que ocorre no BO, a informação sensorial olfatória codificada em linguagem neuronal é processada secundária e terciariamente pelo cérebro. As principais estruturas cerebrais envolvidas no processamento olfatório social estão ilustradas na Figura 02, retirada de Brennan e Kendrick, 2006.

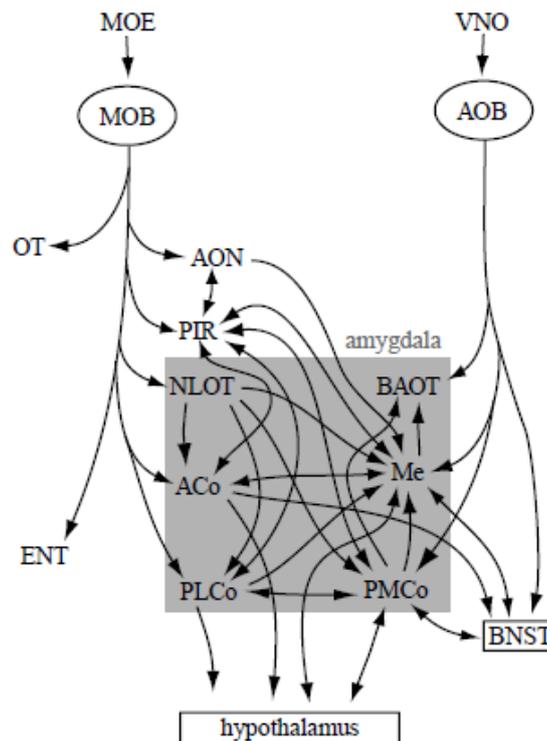


Figura 02: Esquema ilustrativo da conectividade dos dois sistemas olfatórios (Principal e Acessório) com estruturas de processamento secundário e terciário do cérebro de roedores. MOE: *main olfactory epithelium*; VNO: *vomer nasal organ*; MOB: *main olfactory bulb*; AOB: *accessory olfactory bulb*; OT: *olfactory tubercle*; AON: *anterior olfactory nucleus*; PIR: *piriform cortex*; ENT: *entorhinal cortex*; NLOT: *nucleus of the lateral olfactory tract*; ACo: *anterior cortical nucleus*; PLCo: *posterior lateral cortical nucleus*; PMCo: *posterior medial cortical nucleus*; Me: *medial nucleus*; BAOT: *bed nucleus of the accessory olfactory tract*; BNST: *bed nucleus of the stria terminalis*.

1.3. Genes Imediatamente Expressos como marcadores da atividade neuronal

As vias e conexões entre áreas do cérebro que estão envolvidas com comportamentos específicos podem ser mapeadas de diversas maneiras. Uma das técnicas mais utilizadas para esse fim é a utilização da imunodeteção em células nervosas de proteínas expressas a partir de genes chamados Genes Imediatamente Expressos (IEG – *immediate early genes*). Essas proteínas têm a característica de terem sua expressão significativamente aumentada em relação à expressão basal em curtos períodos de tempo (aproximadamente uma hora e meia) após a passagem de um potencial de ação por um neurônio, sendo assim marcadores moleculares da atividade neuronal. É possível realizar tarefas comportamentais diversas com animais experimentais e, após o tempo mínimo necessário para que a expressão dos IEGs atinja

seu pico, determinar o número de neurônios que deflagraram potencial de ação durante a atividade comportamental em questão. Dessa forma, muitos trabalhos têm sido capazes de correlacionar o aumento da quantidade de neurônios positivos para a expressão dessas proteínas e o aumento da atividade neuronal em áreas específicas do cérebro após a execução de tarefas comportamentais. Esses estudos permitem a proposição de hipóteses funcionais acerca da participação das estruturas avaliadas nos diferentes tipos de comportamento (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2005; BORELLI et al., 2009; VON HEIMENDAHL; RAO; BRECHT, 2012). Uma das proteínas expressas pelos IEGs mais utilizadas é aquela expressa pelo gene *c-fos* (DRAGUNOW; BAG, 1989).

1.4. Armazenamento de informações de conteúdo social

Como já comentado anteriormente, o processamento encefálico de odores sociais em roedores subserve uma função de grande importância adaptativa: **a capacidade de indivíduos serem reconhecidos e reconhecerem seus coespecíficos**. Trabalhos publicados sobre esse tema têm se referido a essa capacidade por meio de dois termos sinônimos: “memória social” e “reconhecimento social”. Outros termos sinônimos que também podem ser encontrados na literatura são: “identificação social”, “reconhecimento de coespecíficos” e “identificação de coespecíficos”, dentre outros de menor utilização.

Apesar de existirem problemas relacionados à terminologia variada, há também consensos na literatura. Em 1982, Thor e Holloway publicaram um trabalho que é utilizado até hoje como referência de uma metodologia confiável de avaliação e quantificação de memória social em roedores (a partir desse ponto, os termos “memória social”, “reconhecimento social” e demais termos similares passarão a ser utilizados como sinônimos conceituais). A metodologia de Thor e Holloway, 1982, por eles

padronizada em ratos, teve sua validade testada e comprovada para camundongos em trabalhos como o de Kogan et al., 2000. O método consiste na apresentação de um animal juvenil macho a um adulto, também macho, durante um período de tempo determinado, e.g. 5 minutos, durante o qual se cronometra o tempo que o animal adulto explora diretamente o juvenil. Por exploração, considera-se qualquer contato ou aproximação do focinho do adulto com o focinho ou ânus do juvenil, bem como os comportamentos de *grooming*, perseguição ou inspeção generalizada do corpo do juvenil pelo adulto. No paradigma para camundongos, exposto por Kogan e colaboradores, 2000, o juvenil é mantido dentro de uma gaiola menor dentro da caixa experimental, onde apenas os contatos focinho/focinho e focinho/região anal são possíveis.

Após o primeiro encontro entre adulto e juvenil, chamado consensualmente na literatura de “treino”, os animais são mantidos separados por tempos variáveis, dependendo do tipo de memória a ser testada: curta ou longa duração. Para o teste de memória de curta duração, o tempo normalmente utilizado é de 30 minutos, e para a de longa, 24 horas ou mais (GUSMÃO et al., 2012).

Decorrido o tempo estabelecido, é realizado um novo encontro entre os mesmos animais, durante o qual são realizadas as mesmas medidas feitas durante o treino. Devido a uma tendência inata de roedores de explorar mais intensa e demoradamente objetos e ambientes desconhecidos, assumiu-se que o mesmo deveria acontecer no padrão de exploração de coespecíficos. Portanto, após o segundo encontro, comumente chamado de “teste”, o tempo de exploração do juvenil pelo adulto é comparado entre o treino e o teste e, se houver diminuição significativa desse tempo no teste, conclui-se que o adulto foi capaz de se lembrar do juvenil (THOR; HOLLOWAY, 1982).

Em uma vertente diferente, Arakawa et al., 2008, desenvolveram um método de análise da memória social que se baseia na quantificação da urina produzida pelo animal experimental durante o encontro social. Os autores desse trabalho observaram que a quantidade de urina produzida por um camundongo macho exposto a um juvenil desconhecido é significativamente maior que a quantidade de urina produzida quando a exposição é feita a um juvenil previamente conhecido. Os resultados obtidos com esse paradigma foram significativamente correlacionados com resultados obtidos com os paradigmas que envolvem tempo de exploração. Soma-se a isso o fato de a medição da quantidade de urina ser menos dependente do viés da observação do experimentador que a medição do tempo de exploração, o que lhe garante uma confiabilidade adicional. O uso dessa técnica, no entanto, não está amplamente difundido no campo de pesquisa em memória social (vide trabalhos recentes em que ainda não é utilizado: FEIERSTEIN et al., 2010; HITTI; SIEGELBAUM, 2014; ISHIKAWA et al., 2014; MONTEIRO et al., 2014; STEVENSON; CALDWELL, 2014). Sua utilização paralela aos métodos baseados em tempos de exploração poderá servir de controle positivo para futuros estudos de reconhecimento social em camundongos. Além disso, esse método corrobora comportamentalmente a importância de odores sociais provenientes da urina de camundongos para o reconhecimento social, uma vez que a produção de urina em maior quantidade durante um encontro social entre desconhecidos parece acontecer devido à necessidade de os indivíduos estabelecerem reconhecimento mútuo (ARAKAWA et al., 2008).

1.5. Fatores ambientais que afetam a memória social em roedores

1.5.1. Isolamento social

Outra contribuição importante do trabalho publicado por Kogan et al., 2000, foi a demonstração de que o ambiente social desses animais influencia na persistência de

memórias sociais. Nesse trabalho, os autores confirmaram, em camundongos, resultados obtidos em ratos (BLUTHÉ; DANTZER, 1993; SEKIGUCHI; WOLTERINK; VAN REE, 1991; THOR; HOLLOWAY, 1982), ao demonstrarem que, se mantidos em isolamento social, mesmo que por apenas 24h, camundongos não são capazes de reconhecer um juvenil apresentado a eles um dia antes do teste da tarefa de memória social. A memória social de curto prazo (teste 30min após o treino) não foi afetada pelo isolamento, resultado também visto em ratos. Em contrapartida, ao se manterem os animais agrupados previamente à tarefa, o juvenil foi reconhecido pelos adultos após 24h e até 7 dias depois do treino. Com esse resultado, Kogan e seus colaboradores demonstraram pela primeira vez o efeito de modificações ambientais – no caso, a presença de coespecíficos – na memória social de longo prazo em roedores.

Trabalhos posteriores têm sido capazes de repetir os resultados obtidos por Kogan et al., 2000, e têm buscado compreender as bases neurofisiológicas de o isolamento social promover os déficits de memória social observados (DRANOVSKY et al., 2011; GUSMÃO et al., 2012; PEREDA-PÉREZ et al., 2013; VÕIKAR et al., 2005; MONTEIRO et al., 2014). Vale a pena ressaltar que, não apenas déficit de memória social, mas também de outros tipos de memória – espacial, condicionamento ao medo (PEREDA-PÉREZ et al., 2013; VÕIKAR et al., 2005) – são afetados negativamente pelo isolamento social em roedores, ao passo que outras, como a memória de objetos (GUSMÃO et al., 2012), não são. Essas evidências demonstram que o isolamento social tem um efeito seletivo na formação de novas memórias. O tempo de isolamento social de 1 semana foi utilizado nesse trabalho devido ao seu uso anterior em trabalhos do grupo de pesquisa do NNC e também devido à sua utilização no trabalho pioneiro de Kogan e colaboradores, 2000.

1.5.2. Ambiente enriquecido

Os efeitos da complexidade sensorial do ambiente sobre a memória e outros tipos de comportamento têm sido estudados desde o início da década de sessenta (KRECH et al., 1960; ROSENZWEIG; KRECH, 1962). O consenso atual é de que o aumento da complexidade do ambiente em que se mantém um animal experimental é diretamente proporcional ao desempenho desse animal em tarefas cognitivas de memória (como revisado por Bengoetxea et al., 2012). Atualmente, o nome mais comumente atribuído ao aumento da complexidade ambiental como ferramenta de modulação da capacidade cognitiva de animais é “enriquecimento ambiental”. No entanto, apesar da unanimidade do termo na literatura, não há um consenso fixo sobre os tipos de estímulos sensoriais que compõe um ambiente enriquecido. Dessa forma, podem-se elencar formas frequentemente utilizadas, como enriquecimento por objetos (LEGER et al., 2012), por promoção de atividade física (VAN PRAAG et al., 1999), pela presença de coespecíficos (KOGAN et al., 2000) ou por odores sociais (GUSMÃO et al., 2012).

Em relação ao efeito de ambientes enriquecidos sobre a memória social, a linha de pesquisa na qual o presente trabalho se insere tem sido pioneira. Gusmão et al., 2012, demonstraram que enriquecimento ambiental por odores sociais e não sociais é capaz de prevenir o efeito negativo de uma semana de isolamento social na memória social de longo prazo de camundongos. Monteiro et al., 2014, demonstraram o mesmo efeito quando o enriquecimento é feito por objetos. Além disso, esse trabalho demonstrou que o enriquecimento ambiental por objetos promove também um aumento da neurogênese adulta no Giro Denteado do Hipocampo dos animais isolados, em relação a animais mantidos agrupados ou isolados em ambientes sem enriquecimento.

As hipóteses mais bem embasadas acerca dos motivos pelos quais o isolamento social e o enriquecimento ambiental modulam a memória giram em torno da variação causada por essas condições ambientais nos níveis de neurogênese adulta no Giro Denteado do Hipocampo. A seguir, a Neurogênese adulta será introduzida e, em seguida, seu possível papel no efeito do enriquecimento ambiental na memória social será apresentado.

1.6. Neurogênese adulta

1.6.1. Descoberta

Durante muito tempo acreditou-se que o cérebro fosse incapaz de produzir células novas a partir de células tronco, como acontece em todos os demais órgãos e sistemas de mamíferos. No entanto, esse paradigma foi derrubado na década de 60, quando Altman e colaboradores demonstraram que neurônios do Córtex e do Hipocampo de ratos, gatos e cobaias adultos apresentavam marcação positiva para um composto radioativo que, após sua administração, é incorporado apenas em células que estejam sofrendo divisão celular (ALTMAN; DAS, 1965, 1967; ALTMAN, 1962, 1963, 1969). No entanto, esses trabalhos permaneceram pouco influentes durante quase três décadas, mesmo quando seus resultados foram confirmados independentemente na década de 80 (BAYER; YACKEL; PURI, 1982; BAYER, 1982). Apenas no final da década de 90 e início dos anos 2000, após estudos de neurogênese adulta em primatas e humanos, programas de pesquisa nessa área passaram a ter mais impacto na comunidade científica (ERIKSSON; PERFILIEVA, 1998; KITAMURA et al., 2009; LISMAN, 2011; SNYDER; KEE; WOJTOWICZ, 2001; STRANAHAN; KHALIL; GOULD, 2006; VAN PRAAG et al., 1999)

1.6.2. Distribuição cerebral da neurogênese adulta

Além do Hipocampo e do Córtex, outras regiões do cérebro têm sido apontadas como nichos de divisão celular pós-embriônica. As regiões onde o número de células neuronais produzidas no adulto (na maioria dos casos, roedores adultos) é mais significativo são o Hipocampo (Giro Denteado) e o Bulbo Olfatório (Camada Granular – maior quantidade – e Glomerular – menor quantidade), mas há relatos de importante atividade neurogênica também na Amígdala (MING; SONG, 2011).

No Hipocampo, os novos neurônios surgem na Zona Subgranular (SGZ – *subgranular zone*) e, à medida que amadurecem, migram internamente no Giro Denteado (DG – *dentate gyrus*), região imediatamente adjacente à SGZ do Hipocampo. As novas células nervosas que se integram ao Bulbo Olfatório são formadas na Zona Subventricular (SVZ – *subventricular zone*) e de lá, migram pela Via Migratória Rostral (RMS – *rostral migratory stream*) até as camadas granulares (GR) e os glomérulos (GL) do MOB e do AOB (MING; SONG, 2011). A Figura 03, retirada de Ming e Song, 2011, ilustra o que foi dito acima.

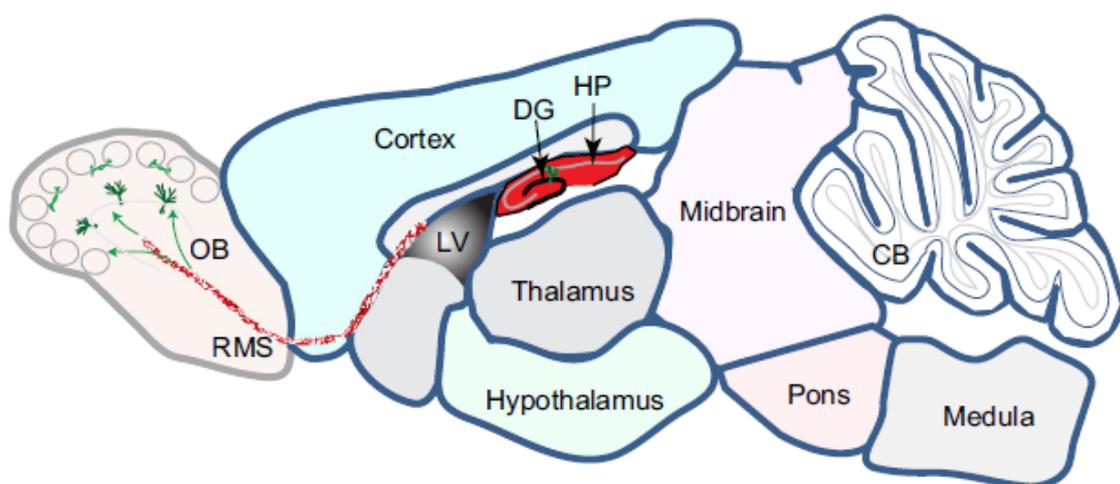


Figura 03: Esquema ilustrativo de um corte sagital do cérebro típico de um roedor com ênfase nas duas principais áreas neurogênicas do Sistema Nervoso Central. Em vermelho, a Via Migratória Rostral a partir da Zona Subgranular. Em verde, os novos neurônios nos locais onde se instalam após a migração. Siglas: HP: *hippocampus*, DG: *dentate gyrus*, LV: *lateral ventricle*, RMS: *rostral migratory stream*, OB: *olfactory bulb*, CB: *cerebellum*. Imagem retirada de Ming e Song, 2011.

1.6.3. A função da Neurogênese Adulta – armazenamento de memórias

Após sua descoberta na década de 60 e consolidação conceitual nos anos 90 e 2000, passou-se a buscar a função fisiológica da neurogênese adulta. Altman, 1967, já havia proposto que os novos neurônios nascidos no cérebro adulto poderiam estar envolvidos com a formação de memórias, e este tem sido o maior foco do estudo funcional da neurogênese adulta, especialmente no Hipocampo.

A princípio, os estudos envolvendo neurogênese e memórias limitaram-se à demonstração de correlações entre a quantidade de neurônios novos observados no Hipocampo após diferentes tipos de intervenções ambientais e farmacológicas e o desempenho dos animais experimentais em tarefas de memória de vários tipos (ERIKSSON; WALLIN, 2004; GOULD et al., 1999; REIF et al., 2004; VAN PRAAG et al., 1999). A maioria desses trabalhos, no entanto, possuía um caráter genérico de extrapolação das correlações observadas, ou seja, não era possível estabelecer, necessariamente, causalidade direta entre um maior número de neurônios novos nascidos no Hipocampo ou no Bulbo Olfatório e melhores performances em tarefas de memória, ou o contrário sobre a diminuição da neurogênese e um pior desempenho.

O desenvolvimento de novas técnicas permitiu que manipulações e análises mais precisas do papel dos neurônios novos na memória pudessem ser feitas. A irradiação focal ou a injeção de drogas antimetabólicas para diminuição da proliferação e neurogênese nas duas áreas de maior interesse permitiu que tarefas de memória específicas fossem executadas em animais onde a neurogênese fora alterada apenas no Bulbo ou apenas no Hipocampo. A ablação seletiva de neurogênese hipocampal permitiu, por exemplo, verificar que a formação de memórias de medo condicionado é dependente de células novas no Giro Denteado, mas apenas quando é feito um só pareamento, e não quando dois ou mais são realizados (DREW; DENNY; HEN, 2010).

No Bulbo Olfatório, observou-se que reduzir a neurogênese promove danos estruturais no órgão, e que o condicionamento olfativo contextual ao medo fica prejudicado (VALLEY et al., 2009).

A partir do trabalho de van Praag et al., 2002, o uso de retrovírus geneticamente manipulados que infectam exclusivamente neurônios novos no Hipocampo tornou-se ferramenta comum, que tem auxiliado na elucidação do papel dessas células na formação de novas memórias. Com o uso dessa técnica, foi demonstrado que a eliminação de neurônios novos após a aquisição de um traço de memória espacial causa a perda dessa memória (ARRUDA-CARVALHO et al., 2011). Essa técnica foi associada à optogenética, e permitiu que neurônios novos fossem inativados em diferentes momentos do processo de aquisição e reativação de um traço de memória espacial (GU et al., 2012). Observou-se que a inativação dos neurônios novos durante a aquisição do traço de memória não afeta negativamente a reativação da memória. No entanto, se neurônios novos estiverem ativos durante a aquisição, sua inativação durante a reativação promove resultado semelhante àquele observado por Arruda-Carvalho et al., 2011. Esses resultados demonstraram que a formação de traços de memória espacial não depende da presença de neurônios novos funcionais, mas que, caso eles estejam presentes durante a aquisição, sua atividade é essencial para a reativação do traço de memória.

A teoria mais atual sobre o papel das novas células neurais do Hipocampo na formação de memórias, principalmente espaciais, é que haja uma especialização dessas células na detecção e separação de elementos novos contidos nos padrões de estímulos provenientes de um contexto ambiental (como é o caso do contexto espacial de uma tarefa como o labirinto aquático de Morris, utilizado no estudo de memória espacial). Por sua vez, os neurônios antigos (nascidos durante o desenvolvimento, ou durante a

vida adulta, mas já recrutados em outros traços de memória) teriam o papel de completar o padrão sensorial processado a partir das informações previamente adquiridas pelo indivíduo durante sua vida. Ainda, as células novas seriam necessárias para a diferenciação de padrões parecidos, enquanto células velhas seriam capazes de codificar informações discrepantes sem, contudo, afetar negativamente a capacidade de reconhecimento do padrão pelo indivíduo (NAKASHIBA et al., 2012).

Para as novas células incorporadas no Bulbo Olfatório durante a vida adulta, Arruda-Carvalho e colaboradores, 2014, demonstraram que a eliminação pós-treino dessas células promove déficit de desempenho em uma tarefa de recompensa por odor. O mesmo não acontece quando as novas células são eliminadas previamente ao aprendizado da tarefa. Esses resultados são muito similares aos obtidos por esse mesmo grupo de pesquisadores para os efeitos da eliminação de neurônios novos no Hipocampo, como descrito no parágrafo anterior, o que indica que em ambos os locais a forma como os novos neurônios atuam na formação de memória é também similar.

1.7. Neurogênese adulta e memória social: o papel protetor do enriquecimento ambiental

Como já discutido anteriormente, o isolamento social causa déficit na memória social de longo prazo (KOGAN et al., 2000; GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014), enquanto enriquecimento ambiental por objetos ou odores (sociais ou não sociais) foi capaz de evitar esse efeito e ainda aumentar a persistência da memória social em animais agrupados (GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014; PEREIRA-CAIXETA, dados não publicados). Monteiro et al., 2014, demonstraram ainda que há um aumento no número de neurônios novos no Giro Denteado do Hipocampo e na Camada Glomerular do Bulbo Olfatório de animais isolados ou agrupados em ambiente enriquecido por objetos. Um aumento significativo também foi observado no número de

neurônios novos na Camada Granular do BO, mas apenas em animais agrupados nesse tipo de ambiente enriquecido. Não houve, no entanto, demonstração de que o isolamento social em ambiente não enriquecido tenha causado uma diminuição do número de células novas em nenhuma dessas regiões, em relação a animais agrupados também em ambiente padrão. Outros trabalhos, no entanto, já demonstraram que manter mamíferos em isolamento social leva a uma diminuição da neurogênese no Hipocampo e na Amígdala (FOWLER et al., 2002; LIEBERWIRTH et al., 2012). Estas discrepâncias podem ser consequências da duração do isolamento social, ou ainda da forma como a medição da Neurogênese é feita e como os resultados são interpretados.

O isolamento social também tem sido demonstrado como causador de diminuição da capacidade de plasticidade sináptica do Hipocampo. Vários trabalhos relatam uma diminuição na capacidade de indução de Potenciação de Longo Prazo (LTP – *long-term potentiation*) *in vivo* e *in vitro* em animais submetidos a isolamento social, em comparação a animais agrupados (LU, 2003; ROBERTS, 2003; TALANI; BIGGIO; SANNA, 2011). A LTP tem sido classicamente descrito como um dos mecanismos mais importantes na formação de memórias no Hipocampo, e sua diminuição após o isolamento social pode explicar o motivo de essa intervenção ambiental ser prejudicial para a memória. Animais em que a neurogênese foi abolida ou aumentada artificialmente também apresentaram LTP hipocampal alterada (SNYDER; KEE; WOJTOWICZ, 2001; VAN PRAAG et al., 1999).

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a hipótese de que o isolamento social, por reduzir a complexidade dos estímulos a que o indivíduo está exposto leva a uma série de efeitos sistêmicos que culminam com uma redução na capacidade plástica de regiões responsáveis pela formação de memórias sociais. Em contrapartida, a presença do ambiente enriquecido compensa a falta de estímulo social através da

inserção de novos estímulos sensoriais e, por isso, o déficit de memória não é observado. A Figura 04 esquematiza a cadeia de raciocínio exposta acima.

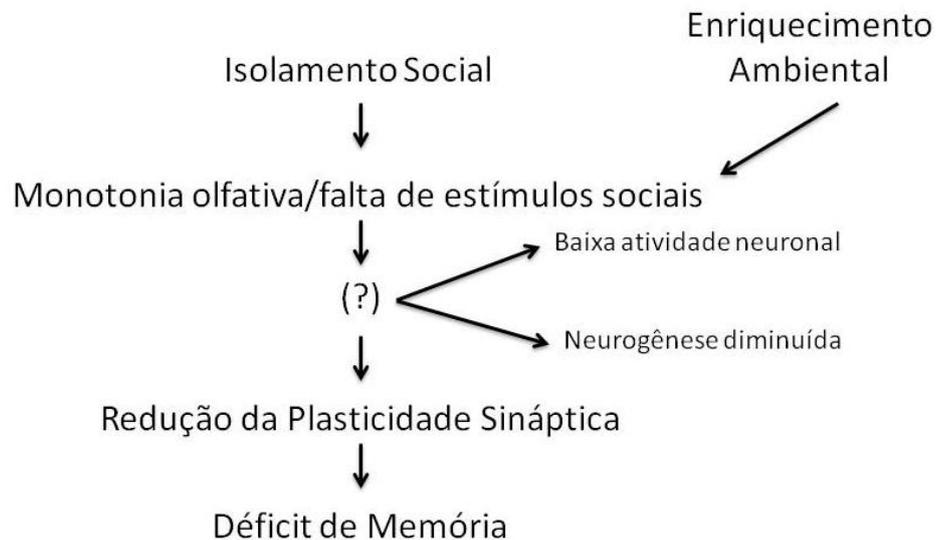


Figura 04: Esquema que ilustra como o isolamento social poderia causar seu efeito deletério na memória e como o enriquecimento ambiental pode atuar para evitar que esse efeito aconteça.

No presente trabalho, que está em consonância com a linha de pesquisa do nosso grupo, respondemos as seguintes perguntas:

- 1- A utilização de uma técnica de quantificação diferente é capaz de detectar um efeito deletério do isolamento social sobre a neurogênese?
- 2- O ambiente enriquecido apenas por odores é capaz de alterar a neurogênese, assim como foi efetivo na recuperação do déficit de memória social?
- 3- Qual o padrão de ativação neuronal no cérebro de um camundongo adulto em resposta a odores sociais de um camundongo juvenil?

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da apresentação de odores sociais de forma prolongada (enriquecimento ambiental) na neurogênese adulta de camundongos isolados socialmente ou de forma pontual (encontro social) no padrão de ativação neuronal de camundongos agrupados.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar a proliferação celular e a neurogênese no Giro Denteado do Hipocampo e na Camada Granular do Bulbo Olfatório de camundongos C57BL/6J machos adultos após 1 semana de isolamento social em ambiente não enriquecido ou em ambiente enriquecido por odores sociais;
- Verificar o padrão de atividade neuronal, por meio da expressão da proteína c-Fos, em várias regiões envolvidas no processamento olfativo de camundongos C57BL/6J machos expostos ou não a um encontro social.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J com idade variando entre 8 e 12 semanas (33 animais para o experimento de neurogênese e 16 para o experimento de c-Fos). Também foram utilizados 4 camundongos machos da linhagem SWISS juvenis de 28 a 30 dias de idade, para estímulo social no experimento de c-Fos. Todos os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG) e foram mantidos durante o período do experimento em biotério para camundongos no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG). Os animais foram mantidos à temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade de 40-70% e em ciclo de claro/escuro de 12h para cada fase e tiveram acesso livre a ração e água. Os procedimentos experimentais realizados com esses animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG) (protocolos 44/2013 e 206/2013).

3.2. Neurogênese adulta

Para o experimento de avaliação do efeito do enriquecimento ambiental por odores sociais na neurogênese adulta de animais isolados socialmente foi utilizada a metodologia de imunodeteção de proliferação celular por marcação com o análogo de Uridina, Bromodesoxiuridina (BrdU), de acordo com Monteiro et al., 2014. O BrdU é um nucleotídeo modificado que se incorpora ao DNA de células em mitose durante a fase S da divisão celular. Por isso, apenas células que tenham sofrido mitose durante o período de administração de BrdU terão a incorporação dessa molécula no seu DNA e poderão ser detectadas pela imunoreatividade do BrdU (WOJTOWICZ; KEE, 2006).

3.2.1. Desenho experimental: neurogênese

Os 33 animais foram divididos em 3 grupos: agrupados (AG) (n=9), isolados em ambiente não enriquecido (IS) (n=9), isolados em ambiente enriquecido por odores (IS+AE) (n=9). Duas gaiolas com 3 animais em cada foram mantidas com o propósito de serem “fornecedores de odores sociais”. Os animais do grupo AG foram mantidos em trios por 1 semana em caixa de tamanho padrão (28x17x12cm) contendo apenas maravalha (lascas de serragem que cobrem o fundo da caixa), ração e água. No grupo IS, os animais foram mantidos sozinhos em caixas com condições idênticas às do grupo AG, pelo mesmo período. Animais IS+AE foram mantidos isolados por 1 semana em caixas iguais às dos demais grupos, mas a cada 24h foi feita a troca da maravalha da caixa e o acréscimo de uma porção padrão (50g) de maravalha suja proveniente, alternadamente, da caixa de um dos dois grupos de fornecimento de odores sociais. Os animais desse último grupo foram divididos em duas caixas, contendo apenas maravalha, e foram mantidos separados dos demais grupos durante todo o experimento. Vale ressaltar que os animais do grupo IS+AE não foram familiarizados previamente com os camundongos do grupo de fornecimento de odores sociais, e que a alternância da origem da maravalha suja a cada dia teve como objetivo evitar que o enriquecimento se tornasse monótono para os indivíduos isolados.

Do primeiro ao sétimo dia em que os animais foram mantidos nas condições experimentais descritas acima, foram realizadas injeções diárias de BrdU (SIGMA) dissolvido em solução salina (NaCl 0,9% m/v) intraperitonealmente (IP) na dose de 50mg/kg em cada um dos animais. A Figura 05 esquematiza o desenho do experimento da forma como foi descrita acima.

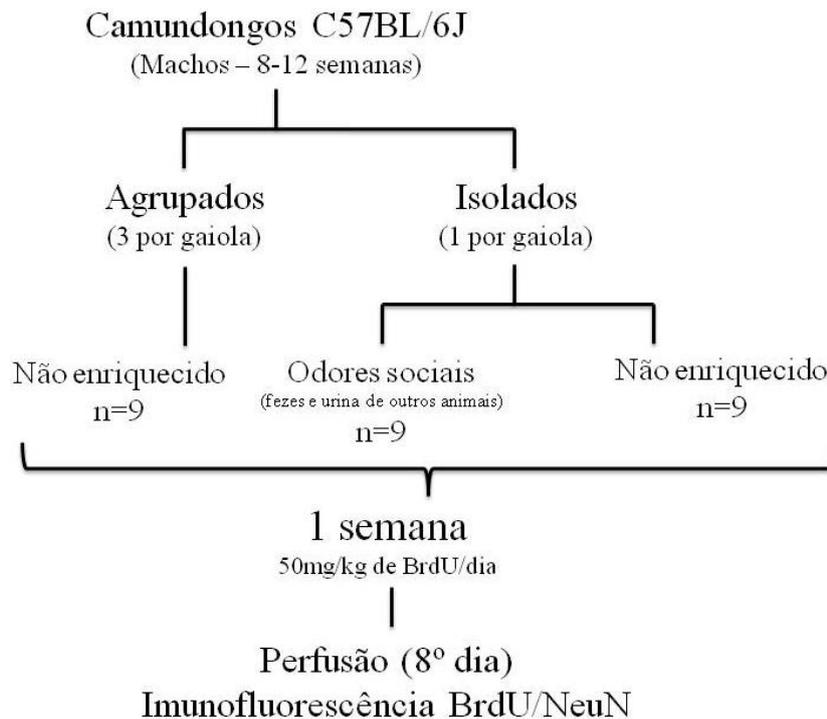


Figura 05: Desenho experimental utilizado para a avaliação do efeito do isolamento social em ambiente enriquecido por odores sociais na neurogênese adulta de camundongos.

3.2.2 Obtenção de cérebros e fatias cerebrais

No oitavo dia, os animais foram anestesiados profundamente com Xilazina (10mg/kg) e Cetamina (100mg/kg), administradas conjuntamente. Após a verificação de que os animais estavam em estado profundo de anestesia, foi realizada perfusão cardíaca com 5ml de Tampão Fosfato-Salina 10% (PBS 10%: Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, pH 7,4) e 10ml de Paraformaldeído 4% m/v. (PFA 4%) Em seguida à perfusão, foi realizada a dissecação e retirada do cérebro dos animais. Estes, então, foram armazenados em PFA 4% por 24h e transferidos para solução de Sacarose 30% para desidratação, onde permaneceram até o momento da obtenção de fatias dos cérebros. Os cérebros obtidos foram fatiados em um micrótomo de mesa associado a elemento peltier de congelamento rápido. Fatias de 50µm de espessura foram produzidas contendo toda a extensão do Bulbo Olfatório e do Hipocampo. As fatias foram armazenadas em solução crioprotetora (Sacarose 30% m/v,

Polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 10% e Etileno Glicol 30% v/v) até o posterior processamento.

3.2.3. Imunofluorescência

Para a detecção de células contendo o marcador de proliferação celular BrdU, as fatias obtidas foram submetidas a imunofluorescência anti-BrdU. Também foi feita imunodetecção da proteína NeuN, presente apenas em neurônio maduros, que serviu para a detecção de neurônios novos nas amostras (MONTEIRO et al., 2014).

Foram selecionadas de 8 a 10 fatias representativas de toda a extensão do Bulbo Olfatório e o mesmo número de fatias representativas do Hipocampo de cada um dos cérebros. As fatias foram distribuídas em placas de 12 poços, em que cada poço continha fatias de apenas um cérebro. Foram realizados dois controles de técnica: um poço contendo fatias onde os anticorpos primários não foram aplicados e um poço onde os anticorpos secundários não foram aplicados. Todos os passos do protocolo foram realizados à temperatura ambiente e com agitação mecânica, salvo exceções que estarão devidamente observadas.

As fatias foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em PBS 0,1M pH 7,4 para remoção da solução crioprotetora e 3 vezes por 5 minutos em PBS-T (PBS 0,1M + Triton-X 0,3% v/v) para início da solubilização da membrana plasmática das células do tecido pelo sabão Triton-X. Em seguida, foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em NaCl 0,9% m/v e incubadas seguidamente em HCl 2M por 10 minutos e HCl 3M por 30 minutos a 37°C. Esses passos são necessários para a desnaturação do DNA e exposição dos sítios onde o BrdU foi incorporado (WOJTOWICZ; KEE, 2006). Após essas incubações, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em Tampão Borato (Ácido Borico - H₃BO₃ - 0,1M) e 3 vezes por 5 minutos em PBS-T para neutralização do HCl e

término da desnaturação do DNA. A seguir, as fatias tiveram seus sítios imunoreativos inespecíficos bloqueados com Soro Normal de Cabra (NGS – *normal goat serum*) diluído a 5% em PBS-T, por 1 hora.

O próximo passo foi a incubação, por 72 horas, das fatias no anticorpo primário anti-BrdU produzido em rato (IgG de rato anti-BrdU – monoclonal Abcam[®]) na proporção de 1:800 v/v, diluído em PBS-T + NGS 5%. Após 48h de incubação do anticorpo primário anti-BrdU, foi adicionado o anticorpo primário anti-NeuN, produzido em camundongo (IgG de camundongo anti-NeuN – monoclonal Milipore[®]), na proporção de 1:500 v/v. Dessa forma, quando se completaram as 72 horas de incubação do anticorpo anti-BrdU, a incubação com o anticorpo anti-NeuN foi de 24 horas. Durante a incubação, as fatias foram mantidas em agitação constante e a 4°C.

Ao fim do período de incubação, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS 10% para evitar a ligação ou deposição de anticorpos primários em sítios inespecíficos. Em seguida, foram adicionados os anticorpos secundários associados a dois tipos de compostos fluorescentes diferentes para detecção e diferenciação dos sítios contendo anticorpos primários no tecido. O anticorpo secundário anti-IgG de rato associado ao composto Alexa Fluor 488[®] (Molecular Probes[®]) (1:400 v/v) foi utilizado para a detecção do anticorpo primário anti-BrdU e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo associado ao composto Alexa Fluor 647[®] (Molecular Probes[®]) (1:400 v/v) foi utilizado para detecção do anticorpo primário anti-NeuN. A incubação foi feita por 1 hora e 30 minutos, no escuro, para evitar o fotodecaimento precoce dos compostos fluorescentes. Após esse tempo, as fatias foram lavadas 4 vezes por 10 minutos em PBS, também no escuro.

Finalmente, as fatias foram montadas em lâminas de microscópio contendo cargas positivas na sua superfície (Superfrtos[®] Plus). As lâminas foram cobertas com gel aquoso de montagem especial para imunofluorescência (Hydromount[™]) e lamínula. Após o procedimento, as lâminas foram armazenadas em uma caixa própria para esse fim, a 4°C e com alta umidade.

3.2.4. Microscopia e quantificação

Microscopia

Uma vez montadas nas lâminas, as fatias foram fotografadas em um microscópio de fluorescência (*Axio Imager M2 - Zeiss system*). Com o software *Carl Zeiss Axiovision 4.8* foram feitas fotografias das duas áreas de interesse – Bulbo Olfatório e Hipocampo – em menor aumento (objetiva de 5X – NA 0,16) e das sub-regiões alvo – Camada Granular do BO e Giro Denteado do HC – em aumento maior (objetiva de 20X – NA0,5). As imagens obtidas no maior aumento (20X) foram utilizadas para quantificação e as de menor aumento (5X) para localização das áreas de interesse. O Bulbo Olfatório foi amostrado igualmente em toda sua extensão e o Hipocampo foi dividido para análise em Hipocampo dorsal (HD) e Hipocampo ventral (HV). As áreas de interesse foram determinadas utilizando-se o atlas anatômico *Allen Brain Atlas* (LEIN et al., 2007) e estão ilustradas na Figura 06.

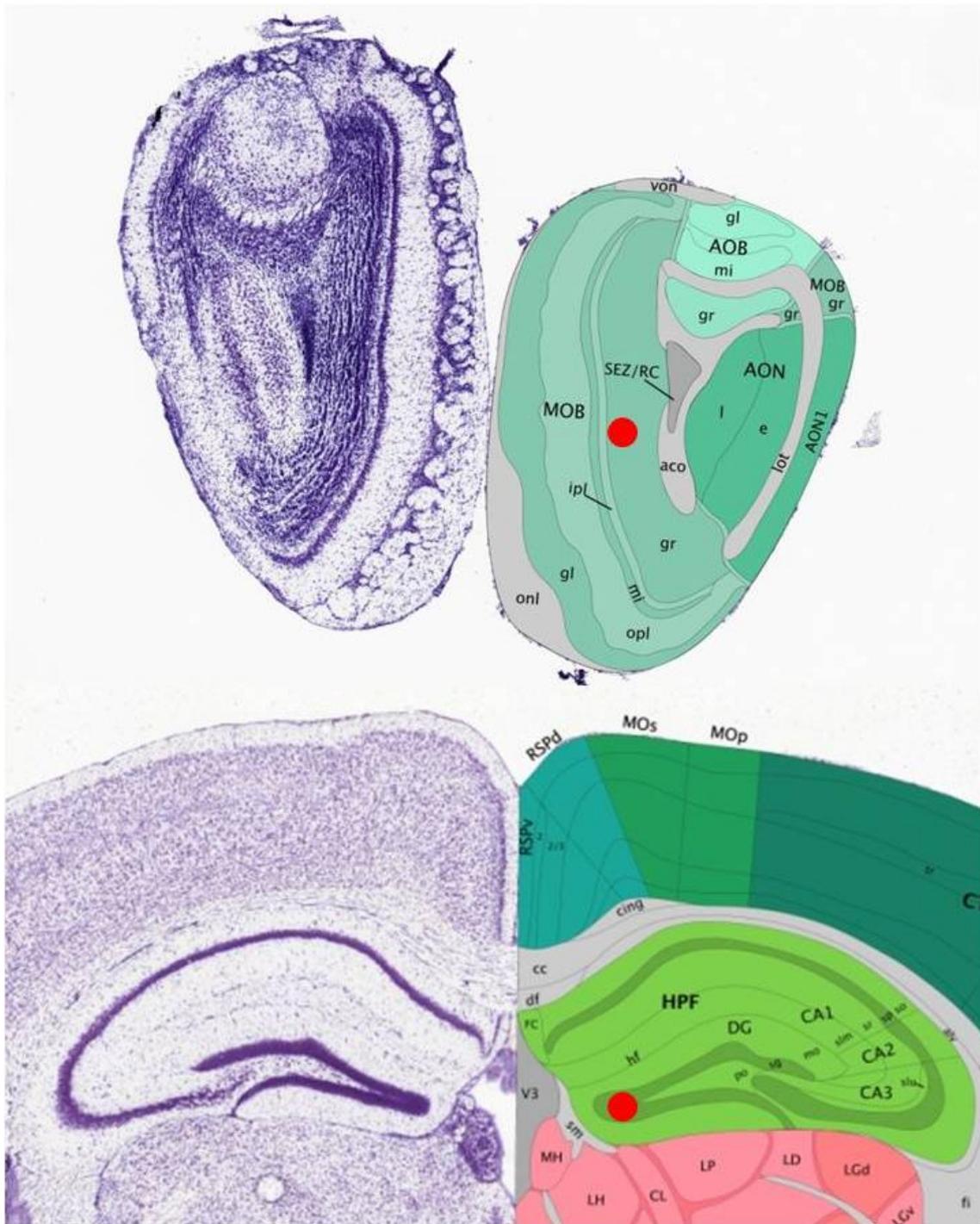


Figura 06: Painel superior – ilustração esquemática do Bulbo Olfatório contendo a Camada Granular do Bulbo Olfatório Principal (ponto vermelho). Painel inferior – ilustração esquemática do Hipocampo contendo o Giro Denteado (ponto vermelho).

Todos os campos foram fotografados duas vezes na mesma posição com filtros diferentes. O tempo de exposição para cada filtro foi determinado com base no histograma de saturação de pixels, de modo que o máximo possível de pixels estivesse abaixo do limite de saturação. Esse procedimento permite que toda intensidade

luminosa captada pela câmera seja adquirida e digitalizada sem perda de informação devida à saturação de pixels.

Na primeira foto de cada par, foi utilizado um filtro para a visualização da fluorescência emitida pelo composto Alexa Fluor 488 (excitação 450-530nm/emissão 500-610nm), associado ao anticorpo anti-BrdU, e a segunda, um filtro para a visualização do composto Alexa Fluor 647 (excitação 590-680nm/emissão 630-800nm), associado ao anticorpo anti-NeuN. Cada campo foi fotografado utilizando-se a metodologia de obtenção de série Z, que consiste em se fazer uma série de fotografias a partir do foco superior da fatia até o foco inferior a intervalos regulares. O microscópio utilizado possui essa função automatizada, bastando que o experimentador determine os focos superior e inferior por meio do micrométrico do aparelho e determine o intervalo de espaçamento entre as fotografias ou o número de fotografias desejado. De acordo com a espessura de cada fatia (determinada pela posição dos focos superior e inferior) foram tiradas de 5 a 10 fotografias por fatia. Uma vez que a variabilidade da espessura das fatias foi alta, optou-se por padronizar a quantidade de fotografias a serem tiradas por fatia, ao invés do intervalo entre elas. A metodologia de obtenção de série Z permite a reconstrução tridimensional ou vários tipos de projeção plana da estrutura fotografada. Por sua vez, isso permite a identificação de objetos na imagem de forma mais precisa do que por meio da observação de apenas um plano focal.

Quantificação

Após a digitalização das imagens, a quantificação da proliferação celular e da neurogênese adulta foi feita utilizando-se o software gratuito FIJI, compilação mais recente do software ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012). As imagens relativas ao filtro que permite a visualização de células NeuN⁺ foram utilizadas para a demarcação e

quantificação da área de interesse a ser analisada, devido à maior facilidade para a localização anatômica dos limites entre as estruturas. A área de interesse foi transferida para as imagens BrdU⁺ e isolada do restante da imagem para os passos seguintes (Figura 07).

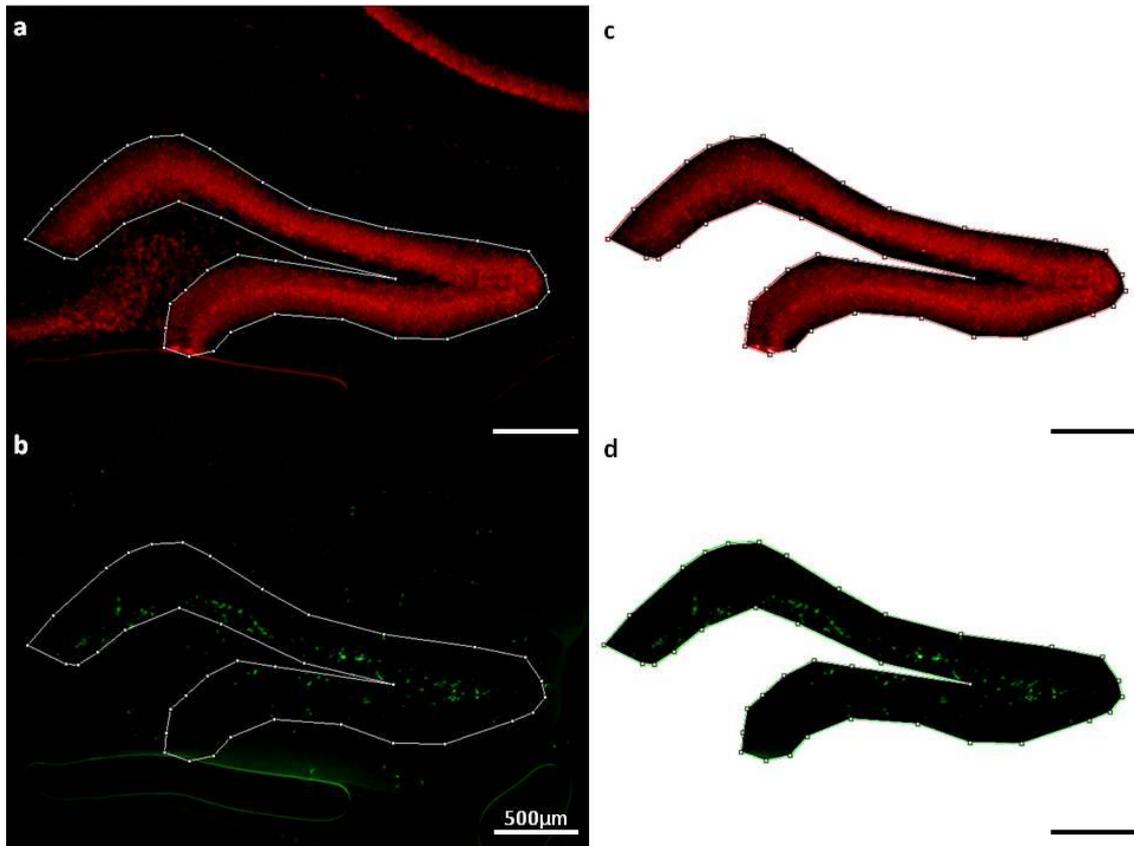


Figura 07: a. e b. exemplos de demarcação de área do Giro Denteado na imagem de um Hipocampo dorsal (a. NeuN; b. BrdU). c. e d. área de interesse isolada do restante da imagem para posterior análise (c. NeuN; d. BrdU). As imagens foram feitas no software FIJI.

A seguir, as imagens para visualização da marcação por BrdU foram submetidas à ferramenta *Z Project*, que realiza uma projeção de todas as imagens da série Z em uma única imagem (Figura 08a). O tipo de projeção feito foi o *Standard Deviation*. O número de células BrdU⁺ foi contado manualmente nas imagens projetadas. Foram consideradas células BrdU⁺ aquelas que apresentavam marcação bem definida (Figura 08b). A contagem foi feita no aumento de 300% da imagem original com o plugin *Multi point* (Figura 08b). Essa ferramenta permite que o experimentador clique seguidamente

sobre os objetos a serem contados e o programa registra graficamente cada clique na imagem e fornece o número ordinal da contagem a cada clique.

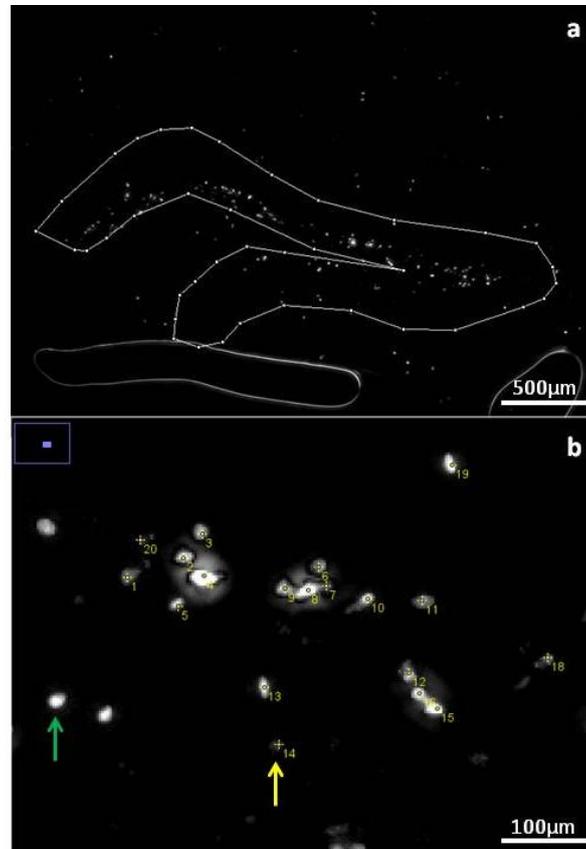


Figura 08: a. Projeção plana da série Z de um exemplo de imagem de Giro Denteado de Hipocampo dorsal para contagem de células BrdU⁺; b. ampliação a 300% de parte da imagem a. Seta verde: células BrdU⁺ típica. Seta amarela: marcação feita pela ferramenta *Multi point* sobre uma célula contada.

Após a contagem das células BrdU⁺, foi feita a sobreposição das imagens NeuN e BrdU utilizando-se a ferramenta *Merge channels* (Figura 09a). A imagem resultante foi submetida à ferramenta de projeção plana *Z Project (standard deviation)* para contagem de células BrdU⁺/NeuN⁺ (Figura 09b). Com as imagens em 300% de aumento, foi utilizada a ferramenta *Color balance* para a determinação de células com colocalização dos dois marcadores. Essa ferramenta permite o ajuste do contraste e da intensidade dos pixels das imagens individuais que compõe a imagem final. Dessa forma, é possível deixar apenas a marcação por BrdU visível (Figura 09c) e aumentar gradualmente a intensidade da marcação por NeuN até os valores originais. Assim, é

possível observar se, nas células onde foi detectada marcação positiva para BrdU (verde), também há marcação por NeuN (vermelho). À medida que se aumenta a intensidade da marcação por NeuN, locais onde há colocalização tornam-se gradualmente amarelados, enquanto locais onde há apenas marcação por BrdU permanecem verdes (Figura 09d,e). Para cada imagem, foi realizado esse procedimento e a contagem foi feita manualmente utilizando-se a ferramenta *Multi point*.

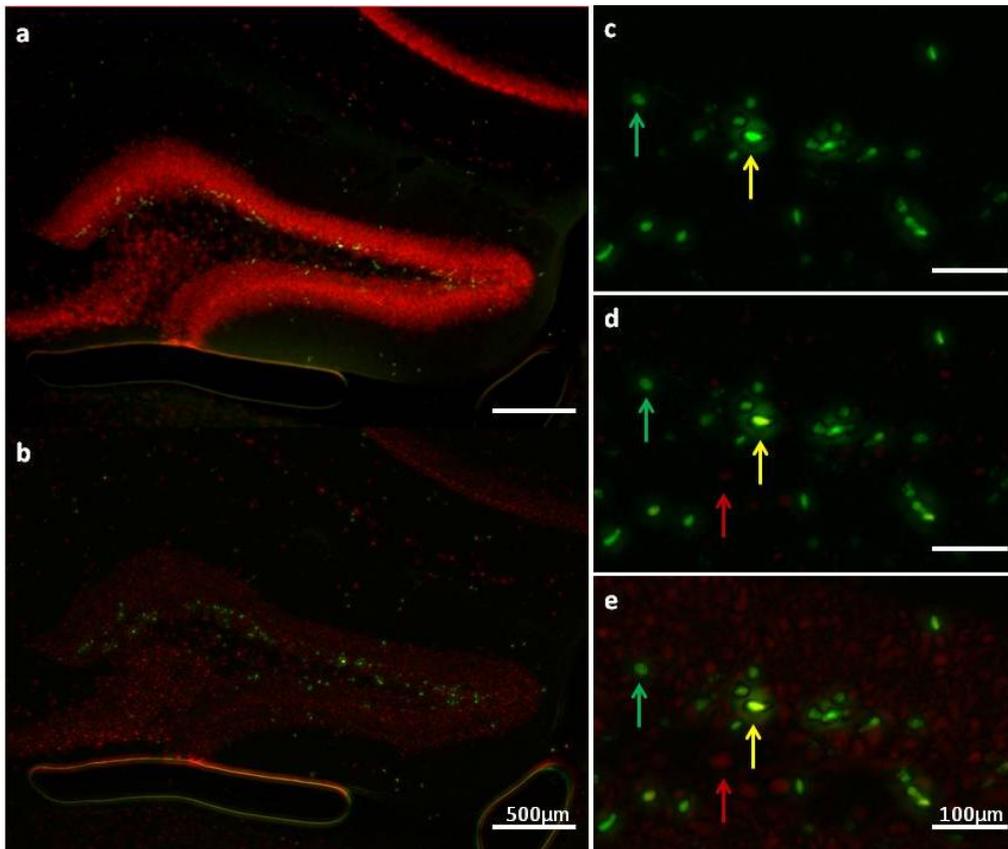


Figura 09: a. Imagem ilustrativa de um dos planos focais da série Z de um Giro Denteado de Hipocampo dorsal após sobreposição das imagens BrdU⁺ e NeuN⁺. b. Projeção plana da série Z ilustrada na imagem a. c. Porção da imagem b aumenta a 300% com a intensidade da imagem NeuN⁺ reduzida a zero. d,e. Aumento gradual da intensidade da imagem NeuN⁺ em sobreposição à imagem BrdU⁺ para detecção de colocalização dos dois marcadores nas mesmas células. Seta verde: células positiva apenas para BrdU. Seta vermelha: células positiva apenas para NeuN. Seta amarela: célula positiva para ambos os marcadores.

3.2.5. Análise

Após a contagem manual das células BrdU⁺ e BrdU⁺/NeuN⁺ nas imagens de Hipocampo e Bulbo Olfatório, os valores obtidos foram normalizados de duas maneiras. A primeira consistiu em dividir o total de células positivas contadas pela área da região

de interesse. Assim, foram obtidos os parâmetros **Proliferação por área** (número de células BrdU⁺/mm²) e **Neurogênese por área** (número de células BrdU⁺NeuN⁺/mm²). A segunda normalização foi feita dividindo-se o total de células positivas para ambos BrdU e NeuN pelo total de células positivas para BrdU. Dessa forma, obteve-se o parâmetro **Taxa de neurogênese** (número de células BrdU⁺NeuN⁺/número de células BrdU⁺). Esse parâmetro permite inferir o percentual das células novas produzidas (BrdU⁺) que efetivamente se tornaram neurônios maduros, ao expressar NeuN, além de BrdU.

Para a comparação entre os três grupos experimentais (AG, IS e IS+AE) foi feita Análise de Variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnett para comparação das médias dos grupos IS e IS+AE com o grupo controle AG. Primeiramente, foram realizados testes de normalidade nos conjuntos de dados obtidos das amostras para verificação do tipo de distribuição de cada conjunto. Em seguida, foi feita ANOVA de duas vias para a comparação entre os Hipocampos dorsal e ventral. As análises foram executadas no software GraphPadPrsim 6. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo valor de p (p-valor) associado à análise estatística foi menor que 0,05. Os resultados estarão representados pelos valores de média de cada grupo ± o erro padrão (SEM) da amostra.

3.3. Atividade neuronal

Para o experimento de avaliação da atividade neuronal de diversas áreas do cérebro de camundongos expostos a um encontro social, foi utilizada a metodologia de detecção da imunoreatividade da proteína c-Fos nos neurônios dessas áreas. Essa proteína é expressa pelo gene *cfos*, da família de Genes Imediatamente Expressos (IEG *immediate early genes*). Os genes dessa família têm sua expressão significativamente aumentada em relação à expressão basal no período de 1 a 2 horas após o disparo de

potencial de ação pelo neurônio. Dessa forma, marcações positivas para essa proteína permitem a detecção e quantificação de neurônios que tenham apresentado ativação pela passagem de um potencial de ação durante tarefas comportamentais, e.g., encontro social (DRAGUNOW; BAG, 1989).

3.3.1. Desenho experimental: c-Fos

Os 16 camundongos C57BL/6J foram divididos em 2 grupos experimentais: expostos a juvenil (JuA) e expostos a gaiola vazia (GV). Os animais SWISS compuseram o grupo “estímulo social”. Os animais do grupo JuA foram expostos a um juvenil SWISS por 5 minutos, enquanto os animais GV foram expostos a uma gaiola idêntica à que os animais JuA foram expostos, exceto pela ausência do juvenil. Foi dado a ambos os grupos o tempo de 1 hora e 30 minutos para que a proteína c-Fos pudesse ser expressa nos neurônios ativados na tarefa, e os animais foram sacrificados para análise imunohistoquímica da proteína nos seus cérebros. A Figura 10 ilustra o esquema do desenho experimental descrito acima.

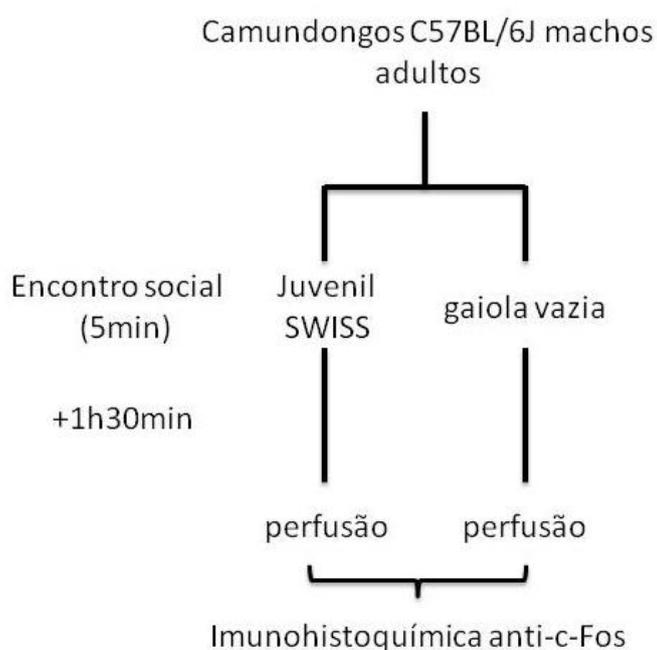


Figura 10: esquema do desenho do experimento de avaliação da atividade neuronal de camundongos expostos a um estímulo social por 5 minutos

3.3.2. Tarefa de encontro social

Até o dia do experimento, os animais de todos os grupos foram mantidos agrupados, sem acesso aos animais juvenis. Na véspera do dia do experimento, todos os animais foram transferidos para a sala onde seria realizada a tarefa. No dia seguinte, previamente ao início dos procedimentos, cada animal foi habituado por meia hora à gaiola onde a tarefa seria executada. Essa gaiola consistiu de uma caixa de tamanho padrão coberta por uma chapa de acrílico transparente, contendo maravalha cobrindo o fundo e um cilindro de plástico com tampa, com cerca de 60 furos ao longo de toda sua parede. Após o período de habituação, um juvenil SWISS foi colocado dentro do cilindro plástico para os animais do grupo JuA. Para animais do grupo GV, o animal SWISS não foi colocado no cilindro, mas houve manipulação equivalente do aparato, de modo que as condições experimentais entre os grupos mantiveram-se idênticas.

A partir da colocação do juvenil (ou manipulação do aparato, no grupo GV), os animais do grupo JuA foram observados pelo experimentador e o Tempo de Exploração do juvenil pelo adulto foi medido (KOGAN et al., 2000; GUSMÃO et al., 2012). Após 5 minutos, os camundongos foram retirados e retornados à gaiola original.

Após 1 hora e 30 minutos do fim da tarefa comportamental, os animais adultos C57BL/6J foram anestesiados profundamente, perfundidos e tiveram seus cérebros dissecados, retirados, pós-fixados e desidratados, de forma idêntica àquela descrita no item 3.2.2.

3.3.3. Obtenção de séries de fatias

Após a fixação e desidratação dos cérebros dos animais experimentais, estes foram fatiados seguindo o padrão descrito por Borelli et al., 2009. Foi utilizado o criostato Leica CM1860 para produzir séries de fatias de 30µm do cérebro dos

camundongos a partir da porção mais rostral dos cérebros, no início do Bulbo Olfatório, até o final da porção ventral do Hipocampo (PAXINOS; FRANKLIN, 2004). Foram coletadas 1 a cada 6 fatias para cada uma das 6 séries de fatias produzidas. As fatias foram armazenadas até posterior uso em solução crioprotetora. A produção de séries de fatias prevê que as estruturas a serem analisadas sejam homoganeamente amostradas ao longo de seus eixos principais e que possam ser feitas manipulações paralelas em séries consecutivas, as quais são praticamente idênticas entre si e, portanto, podem ser comparadas.

3.3.4. Imunohistoquímica anti-c-Fos

Para a reação de imunoreatividade de c-Fos, foram selecionadas fatias de uma das 6 séries de fatias contendo as seguintes estruturas, determinadas com base em Paxinos e Franklin, 2004: Bulbo Olfatório (BO), Córtex pré-límbico (PL), Córtex infra-límbico (IL), Córtex Piriforme (PIR), Hipotálamo (HY), Septo lateral (LS), Hipocampo (HC) e Amígdala (AMG). Essas estruturas foram selecionadas devido a relatos prévios de sua participação em reconhecimento social (BORELLI et al., 2009) e, no caso do Hipocampo, para investigar se essa estrutura seria diferencialmente ativada durante o encontro social. Um total de 15-20 fatias de cada cérebro foi selecionado para a execução do protocolo de imunomarcção de c-Fos.

Em seguida, as fatias de cada cérebro foram individualizadas em placas de 12 poços, contendo redes de tecido que permitiram a rápida transferência das fatias entre soluções diferentes. Dessa forma, cada poço recebeu fatias de apenas um cérebro, logo, de um animal específico. Foram também realizados dois controles da técnica, idênticos aos descritos anteriormente.

As fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em tampão Tris-salina 1X (TBS 1X: 50mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl) para remoção da solução crioprotetora. Em seguida, foi feita uma incubação em H₂O₂ 3%v/v por 10 minutos. Esse passo visa à neutralização de peroxidases intrínsecas do tecido que, posteriormente, poderiam gerar marcações inespecíficas. As fatias foram, então, lavadas 3 vezes por 6 minutos em TBS 1X e posteriormente incubadas em solução de bloqueio (NGS 5% em TBS 1X + Tween 20 0,1% v/v) por 2 horas. Em seguida, foi feita a incubação em anticorpo primário anti-c-Fos de camundongo, produzido em coelho (1:2500) por 24 horas.

Após o período de incubação do anticorpo primário, foram feitas 3 lavagens de 6 minutos em TBS-T 1X para eliminação do anticorpo primário. Em seguida, foi feita a incubação com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (1:1000) durante 2 horas. Depois, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em TBS-T 1X e foram incubadas no complexo AB em TBS-T (1:500 A; 1:500 B – Vectastain[®]). O complexo AB é composto por Avidina (A), que se liga à Biotina do anticorpo secundário, e peroxidase biotilada (B), que se liga também à Avidina do composto A, formando um complexo capaz de reagir com DAB (3,3'-diaminobenzidina), o qual se torna insolúvel após a reação e se deposita no local. Devido à sua coloração marrom, é possível visualizar os locais onde o DAB reagiu com a peroxidase do complexo anticorpo-AB.

Após a reação com o complexo AB, as fatias foram lavadas com TBS 1X 3 vezes por 6 minutos e com Tampão Acetato (Acetato de Sódio 175mM) 3 vezes por 6 minutos. Finalmente, as fatias foram incubadas por 10 minutos, no escuro, em Solução Corante (DAB 0,02mg/ml, NiSO₄.6H₂O 95mM, H₂O₂ 0,03% v/v em Tampão Acetato). Após a coloração, as fatias foram lavadas em Tampão Acetato 3 vezes por 6 minutos. Em seguida, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas. A montagem foi feita seguindo a ordem anteroposterior das fatias e cada cérebro teve suas fatias montadas em

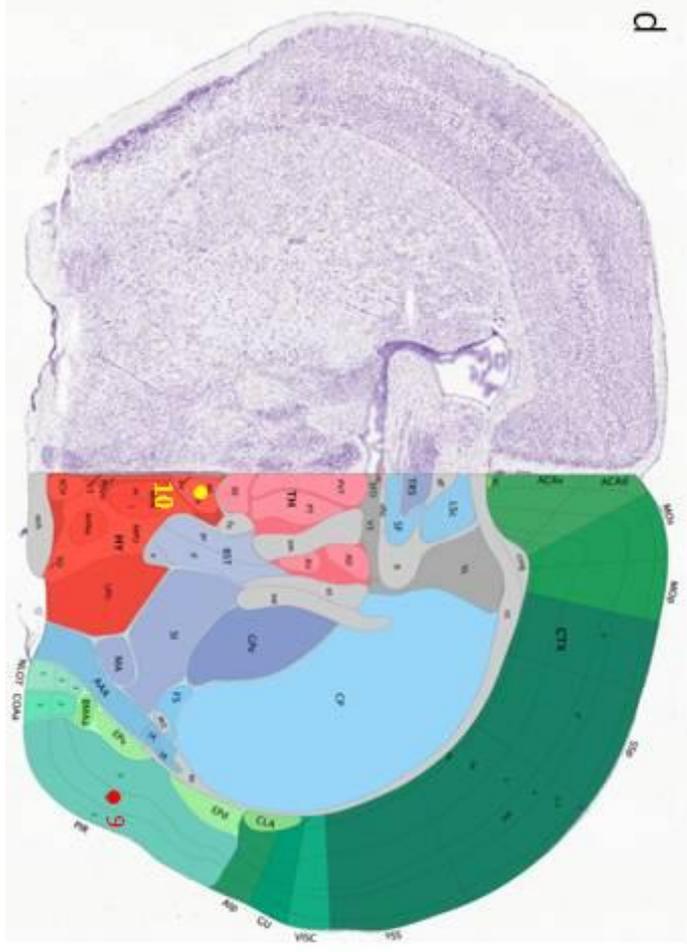
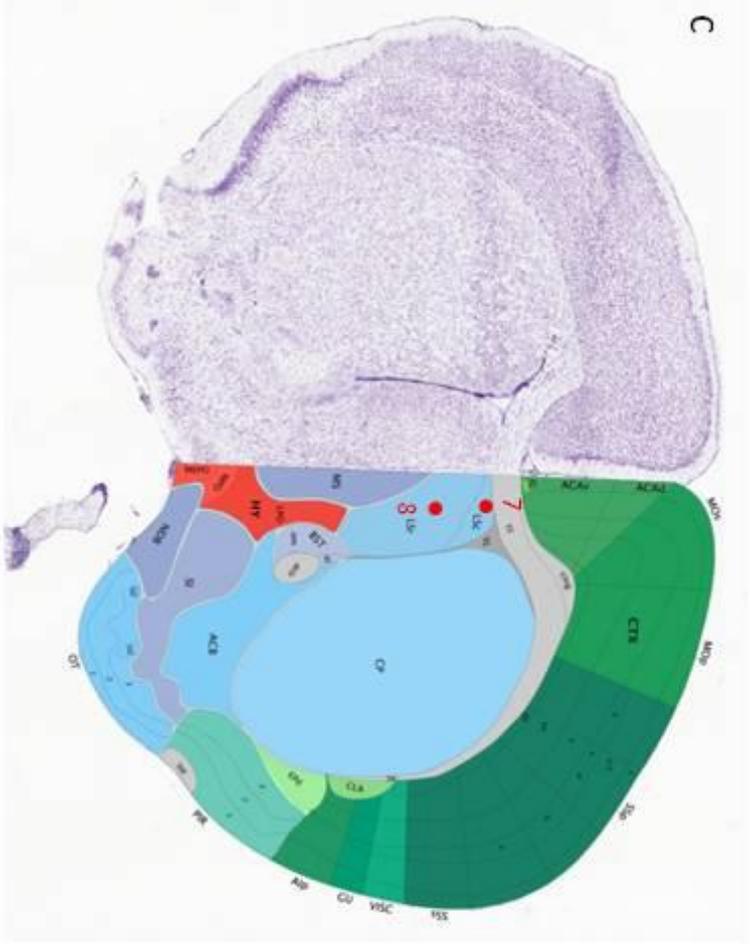
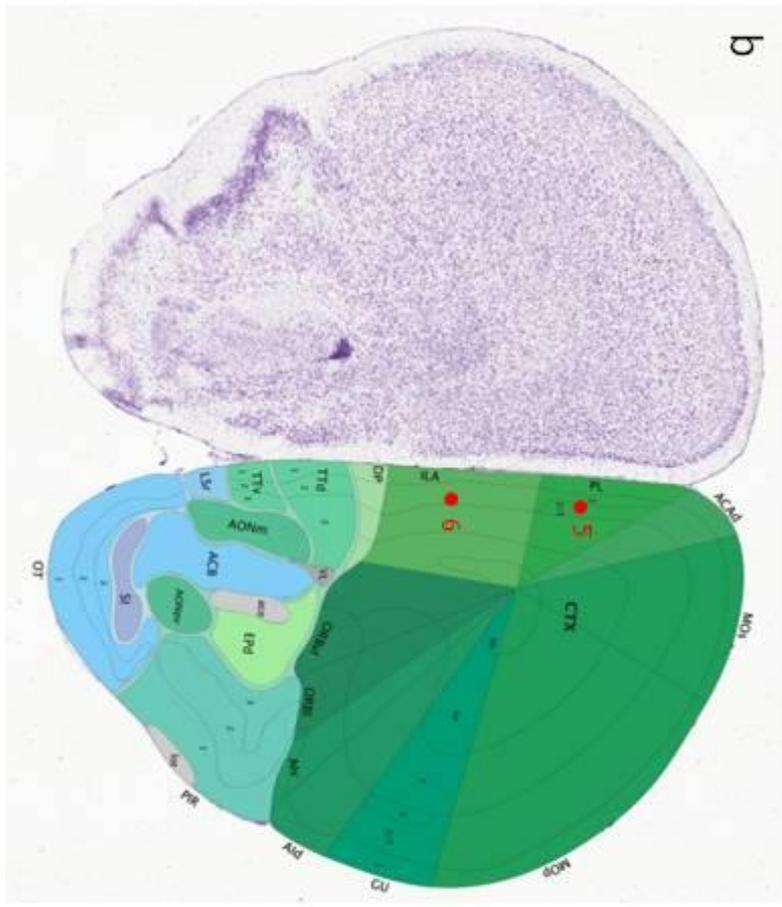
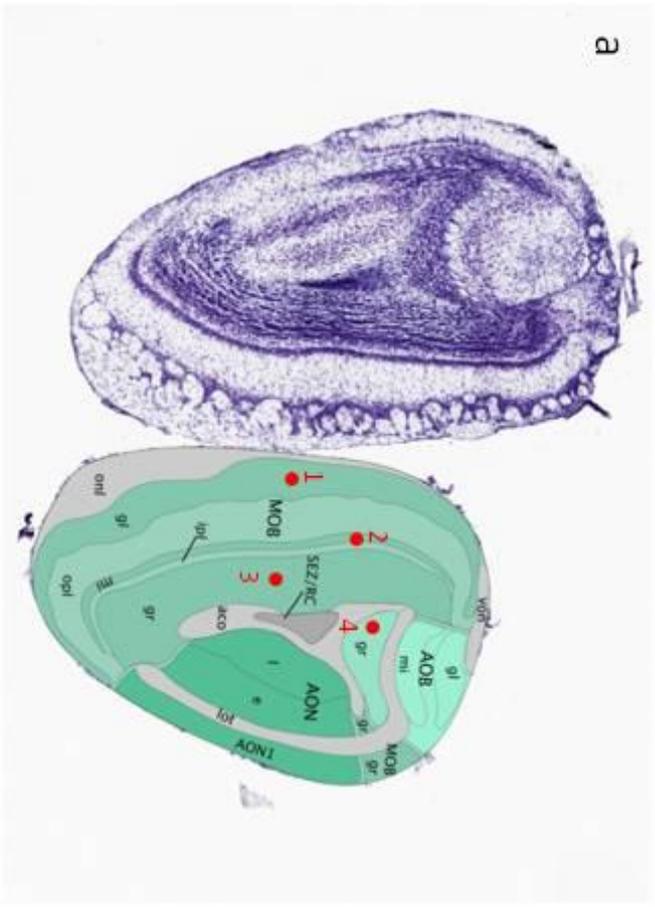
apenas uma lâmina. Após 24 horas de secagem, as lâminas foram cobertas com gel de montagem (Entellan[®]) e lamínula. As lâminas foram guardadas em uma caixa própria para esse fim e armazenadas à temperatura ambiente até o posterior processamento.

3.3.5. Microscopia e quantificação

Microscopia

As lâminas foram fotografadas utilizando a função de campo luminoso do microscópio de fluorescência *Axio Imager.M2 - Zeiss system* por meio do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*. Foram feitas fotografias no menor aumento (Objetiva 5X, NA 0,16) de todas as estruturas de interesse, já descritas, e fotografias em maior aumento (Objetiva 20X, NA 0,5) das áreas de interesse dentro de cada uma das estruturas. O tempo de exposição de todas as fotografias foi idêntico. As áreas fotografadas para análise foram determinadas com base em Paxinos e Franklin, 2004, e são as seguintes:

Camada Glomerular do MOB (GL), Camada Mitral do MOB (MI), Camada Granular do MOB (GR), Camada Granular do AOB (AOB); Córtex Infra-límbico (IL); Córtex Pré-límbico (PL); Córtex Piriforme (PIR); Núcleo periventricular do Hipotálamo (PVN), Hipotálamo lateral (LH); Septo lateral dorsal (LSD), Septo lateral ventral (LSV); Giro Denteado dorsal e ventral do Hipocampo (DGd e DGv), CA3, CA2 e CA1 dorsais e ventrais do Hipocampo (CAXd ou CAXv) (O Hipocampo também foi analisado em sua totalidade como DGt e CAXt); Amígdala basolateral (BLA), Amígdala Medial porção posterodorsal (MEApd) (Figura 11 – imagens obtidas do *Allen Mouse Brain Atlas*. Lein et al., 2007).



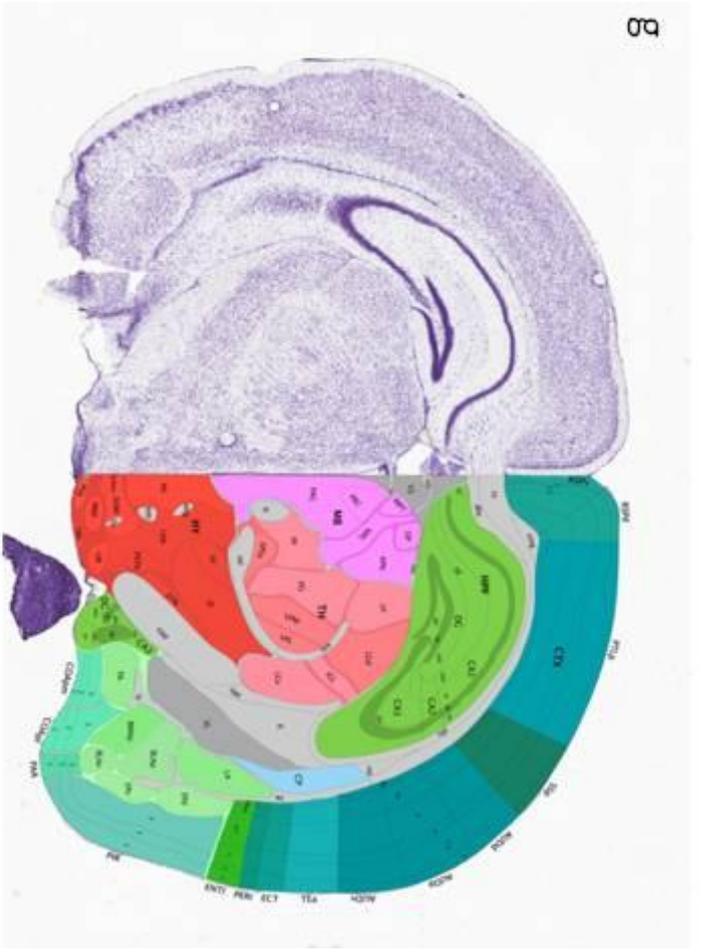


Figura 11: Imagens retiradas do *Allen Mouse Brain Atlas* (LEIN et al., 2007) para ilustração das áreas que foram analisada no experimento de mapeamento da atividade neuronal após encontro social. a. 1 - Camada Glomerular do MOB (GL), 2 - Camada Mitral do MOB (MI), 3 - Camada Granular do MOB (GR), 4 - Camada Granular do AOB (AOB); b. 5 - Córtex Pré-límbico (PL), 6 - Córtex Infra-límbico (IL); c. 7 - Septo lateral dorsal (LSc na imagem. LSD no texto), 8 - Septo lateral ventral (LSr na imagem. LSV no texto); d. 9 - Córtex Piriforme (PIR), d. 10 - Núcleo paraventricular do Hipotálamo (PVN); e. 11 - Giro Denteado do Hipocampo (DG na imagem. DGd ou DGv no texto); 12 a 14 - CA3, CA2 e CA1 do Hipocampo (CAXd ou CAXv no texto), 15 - Amígdala Basolateral (BLA), 16 - Hipotálamo Lateral (LH); f. 17 - Amígdala Medial, posterodorsal (MEApd); g e h. mesmas estruturas do Hipocampo, LH e BLA.

Quantificação

Após a digitalização das imagens, a quantificação do número de células c-Fos⁺ em cada área de cada uma das estruturas foi feita utilizando-se o software FIJI[®]. No programa, as imagens de menor aumento (5X) foram utilizadas para localização das áreas de interesse nas imagens de maior aumento (20X) (Figura 12a). Após a localização, a área foi delimitada e quantificada (Figura 12b). Em seguida, a área de interesse foi isolada do restante da imagem e submetida à eliminação de *background* com a ferramenta *Adjust threshold* (Figura 12c – acima e no meio). O valor de limiar utilizado para cada imagem variou, dependendo da intensidade do *background*. O critério utilizado para a escolha do valor de limiar foi a observação visual de que a maioria das células c-Fos⁺ seriam mantidas e que grande parte da marcação inespecífica fosse eliminada. Os valores de limiar utilizados variaram entre 1 e 5% da intensidade total da imagem original.

Após a aplicação do *threshold*, as imagens foram submetidas à ferramenta *Analyze particles* (Figura 12c – abaixo). Essa ferramenta identifica e conta partículas na imagem que obedeçam aos critérios estabelecidos pelo usuário. O critério principal foi a exclusão de partículas menores que 15 μm^2 na contagem. Partículas muito grandes (maiores que 50 μm^2) erroneamente incluídas na contagem e identificadas como não sendo células foram excluídas manualmente e a contagem foi refeita após a exclusão.

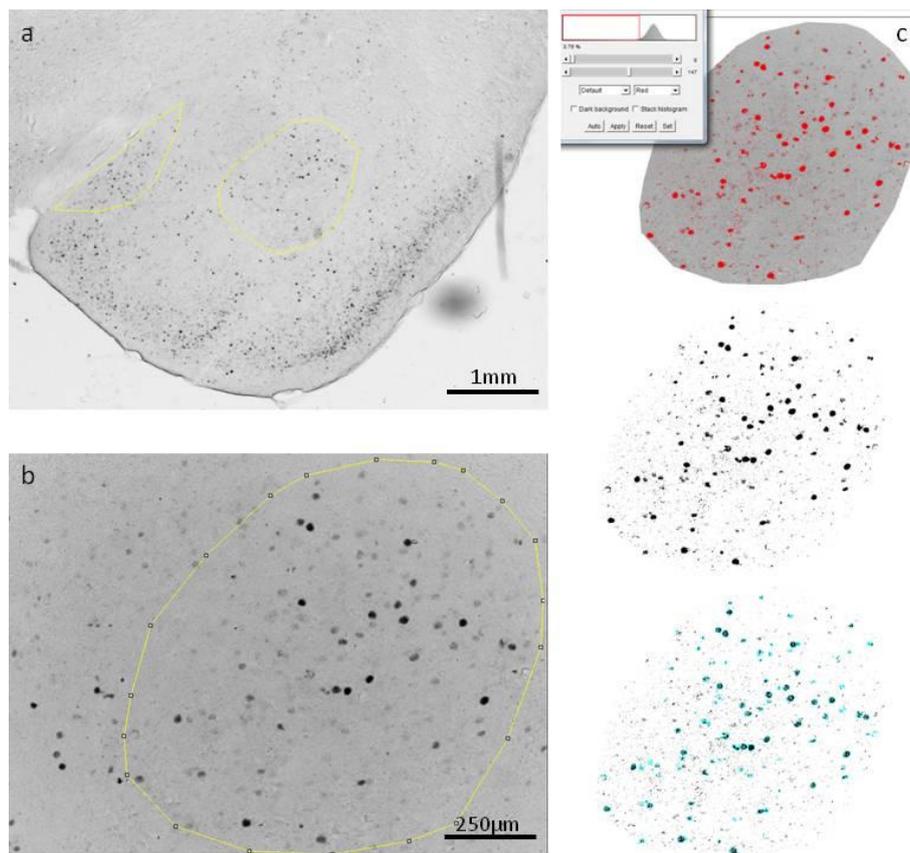


Figura 12: Ilustração do processo de contagem de células c-Fos⁺ em um exemplo na Amígdala. a. localização e demarcação das áreas de interesse (MEApd – esquerda, BLA – direita) em menor aumento (5X); b. demarcação da área da BLA em maior aumento (20X). c. Estabelecimento de limiar na área de interesse para eliminação do *background* (acima), após eliminação do *background* (meio), contagem das células c-Fos⁺ com a ferramenta *Analyze particles* (abaixo).

3.3.6. Análise

O número de células c-Fos⁺ para cada área foi normalizado utilizando-se a área da região de interesse. Dessa forma, foi obtido o parâmetro **Ativação neuronal por área** (número de células c-Fos⁺/0,1mm²). O valor desse parâmetro foi comparado entre os grupos JuA e GV. Foi realizado o teste t de *student* não pareado, após confirmação da normalidade dos dados, no software GraphPadPrism 6.0. para a comparação das médias dos grupos para cada área. Diferenças com p-valor menor que 0,05 foram consideradas significativas.

Além disso, foi feita uma análise de correlação cruzada entre os valores de Ativação neuronal por área entre todos as áreas dos animais dos grupos GV e JuA, separadamente, também utilizando-se o programa GraphPadPrism 6.0. Foram

consideradas correlações estatisticamente significativas aquelas cujo p-valor foi menor que 0,05. Com essa análise, é possível verificar se, dentro do mesmo grupo (GV ou JuA), áreas diferentes apresentam padrões de ativação neuronal com comportamento similar (alta ou baixa expressão de c-Fos concomitante no mesmo animal, de forma regular entre os animais do grupo). Dessa forma, torna-se possível propor hipóteses sobre a conexão e relações de subordinação entre as diferentes áreas analisadas durante a tarefa de encontro social.

Finalmente, foi feita uma análise de correlação entre o Tempo de Exploração medido e a Ativação neuronal por área em cada uma das áreas dos animais JuA. Com essa análise, o objetivo foi verificar se há alguma relação entre o tempo que o animal experimental explora o juvenil com a quantidade de células c-Fos⁺ nas áreas medidas, de modo que se possam propor hipóteses acerca de uma possível relação causal entre os fatores analisados.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do isolamento e do ambiente enriquecido por odores na proliferação celular e neurogênese

Como demonstrado por Gusmão, et al., 2012, o enriquecimento ambiental por odores sociais previne o efeito deletério causado por uma semana de isolamento social em camundongos C57BL/6J machos. No entanto, não se sabe se esse efeito pode ser correlacionado a variações na neurogênese adulta no Hipocampo desses animais, ou se o Bulbo Olfatório responde diferencialmente a um enriquecimento olfativo.

Assim, propôs-se avaliar a proliferação celular e a neurogênese adulta no Giro Denteado do Hipocampo (inteiro e separado em dorsal e ventral) e na Camada Granular do Bulbo Olfatório de camundongos C57BL/6J machos submetidos a isolamento social em ambiente enriquecido por odores sociais.

Para o Giro Denteado do Hipocampo inteiro (dorsal e ventral, juntos) (Figura 13), o teste ANOVA de uma via mostrou que há um efeito significativo da Condição Ambiental (AG, IS ou IS+AE) na Proliferação por área [$F(2,22) = 6,05$, $p = 0,0081$]. A comparação múltipla das médias dos grupos IS e IS+AE contra o controle AG pelo pós-teste de Dunnett revelou que essa diferença está entre as médias dos grupos IS e AG ($619,0 \pm 58,01$ x $507,4 \pm 90,96$, $p = 0,0072$) e não entre os grupos IS+AE e AG ($526,3 \pm 54,19$ x $507,4 \pm 90,96$, $p = 0,7969$). Para a Neurogênese por área, não houve efeito significativo da Condição Ambiental [$F(2,22) = 0,9266$, $p = 0,4108$], mas sim para a Taxa de Neurogênese [$F(2,22) = 9,758$, $p = 0,0009$]. A comparação múltipla de Dunnett revelou que a diferença na Taxa de Neurogênese encontra-se entre os grupos IS e AG ($30,68 \pm 8,30$ x $42,08 \pm 3,96$, $p = 0,001$) e não entre os grupos IS+AE e AG ($40,53 \pm 3,64$, $p = 0,795$) (Figura 14).

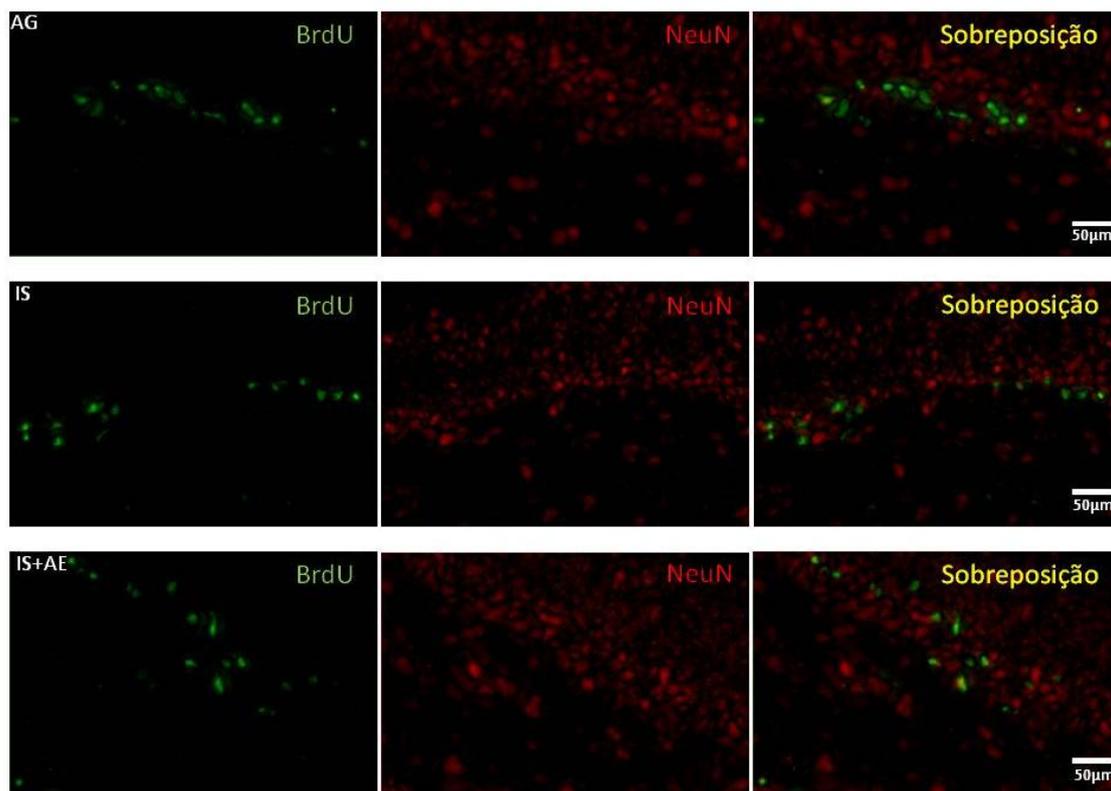


Figura 13: Imagem ilustrativa da marcação por BrdU (esquerda) e NeuN (meio) e sobreposição entre os dois marcadores (direita) em fatias de Giro Denteado do Hipocampo (dorsal e/ou ventral) de animais AG (cima), IS (meio) e IS+AE (baixo). As imagens foram obtidas no software FIJI.

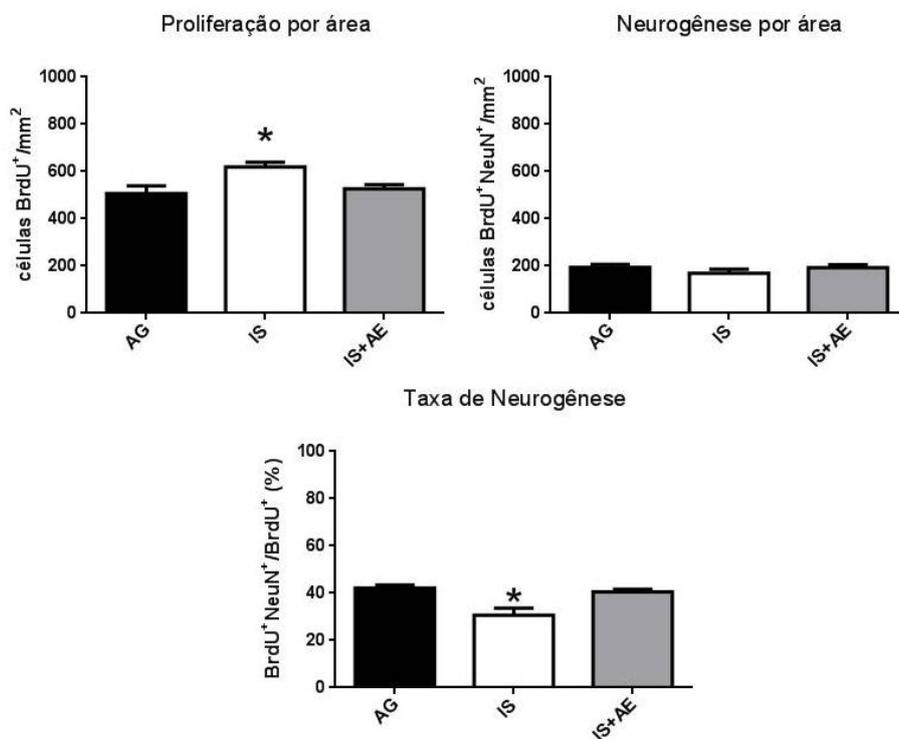


Figura 14: Gráficos representativos dos valores médios \pm erro padrão (SEM) da quantificação, no Hipocampo total, da Proliferação por área (acima, esquerda), Neurogênese por área (acima, direita) e Taxa de Neurogênese (abaixo) dos grupos AG, IS e IS+AE. Asteriscos representam diferença significativa em relação ao grupo controle (AG) (ANOVA de uma via, pós-teste de Dunnett).

Foram também realizadas as análises do hipocampo dorsal e ventral, separadamente (Figura 15). No Hipocampo dorsal não houve efeito significativo da Condição Ambiental para a Proliferação por área [$F(2,24) = 0.9763$, $p = 0,3912$]. Esse efeito foi significativo para o Hipocampo ventral [$F(2,22) = 4.204$, $p = 0,0284$]. No entanto, a comparação múltipla de Dunnett mostrou que essa diferença se deu entre os grupos IS e IS+AE ($459,90 \pm 94,38$ x $322,40 \pm 90,87$, $p = 0,0738$) e não nas comparações dos grupos IS e IS+AE com o controle AG [$459,90 \pm 94,38$ e $322,40 \pm 90,87$ x $337,60 \pm 128,70$, $p(\text{IS} \times \text{AG}) = 0,0738$, $p(\text{IS} + \text{AE} \times \text{AG}) = 0,9524$]. Para a Neurogênese por área, não houve efeito significativo da Condição Ambiental para ambos os Hipocampos, dorsal [$F(2,24) = 2,344$, $p = 0,1175$] e ventral [$F(2,22) = 0,8217$, $p = 0,4527$]. Para a Taxa de Neurogênese, não houve efeito significativo da Condição Ambiental no Hipocampo ventral [$F(2,22) = 1,781$, $p = 0,1920$], mas houve efeito significativo para o Hipocampo dorsal [$F(2,24) = 5,477$, $p = 0,0110$]. O pós-teste de Dunnett indicou que a diferença encontrada para o Hipocampo dorsal está entre os grupos IS e AG ($18,48 \pm 7,51$ x $29,44 \pm 9,21$, $p = 0,0214$) e não entre os grupos IS+AE e AG ($30,41 \pm 8,67$ x $29,44 \pm 9,21$, $p = 0,9579$).

Além disso, as variáveis condição ambiental (AG, IS ou IS+AE) e região hipocampal (dorsal ou ventral) também foram avaliadas em conjunto. Os resultados obtidos para a ANOVA de duas vias com pós-teste de Dunnett foram os que se seguem (Figura 15). Para o parâmetro Proliferação por área, o fator Porção do Hipocampo teve efeito significativo [$F(1,46) = 121.3$, $p < 0,0001$]. O fator Condição Ambiental também teve efeito significativo [$F(2,46) = 4,040$, $p = 0,0242$], no entanto, diferentemente do que foi observado pela análise por ANOVA de uma via, esse efeito não pôde ser observado após o pós-teste de Dunnett como estando relacionado a nenhum dos pares Experimento/Controle propostos (ISd x AGd; IS+AE d x AGd; ISv x AGv; IS+AE v x

AGv). Após a modificação do pós-teste para um teste que permite ver as diferenças entre todos os grupos amostrados (Tuckey), foi possível verificar que o efeito da Condição Ambiental se deveu às comparações entre os grupos do Hipocampo dorsal e ventral, e não entre os grupos da mesma porção do Hipocampo. Por isso, os resultados obtidos por ANOVA de uma via para os efeitos da Condição Ambiental foram mantidos, e os resultados da ANOVA de duas vias foram utilizados apenas para a observação do efeito da Porção do Hipocampo.

A análise do parâmetro Neurogênese por área não revelou efeito significativo da Porção do Hipocampo [$F(1,46) = 0,6285$, $p = 0,4320$] nem na Condição Ambiental [$F(2,46) = 0,4680$, $p = 0,6292$]. Para a Taxa de Neurogênese, houve efeito da Porção do Hipocampo [$F(2,46) = 0,3464$, $p < 0,0001$] e não houve efeito da Condição Ambiental [$F(2,46) = 1,827$, $p = 0,1723$]. Assim como no caso dos resultados da ANOVA de duas vias para a Proliferação por área, o fato de não ter havido efeito significativo da Condição Ambiental na Taxa de Neurogênese foi desconsiderado, e a análise da ANOVA de uma via para cada porção do hipocampo separadamente foi considerada. Já o efeito da Porção do Hipocampo para esse parâmetro mostrado pela ANOVA de duas vias foi mantido na análise.

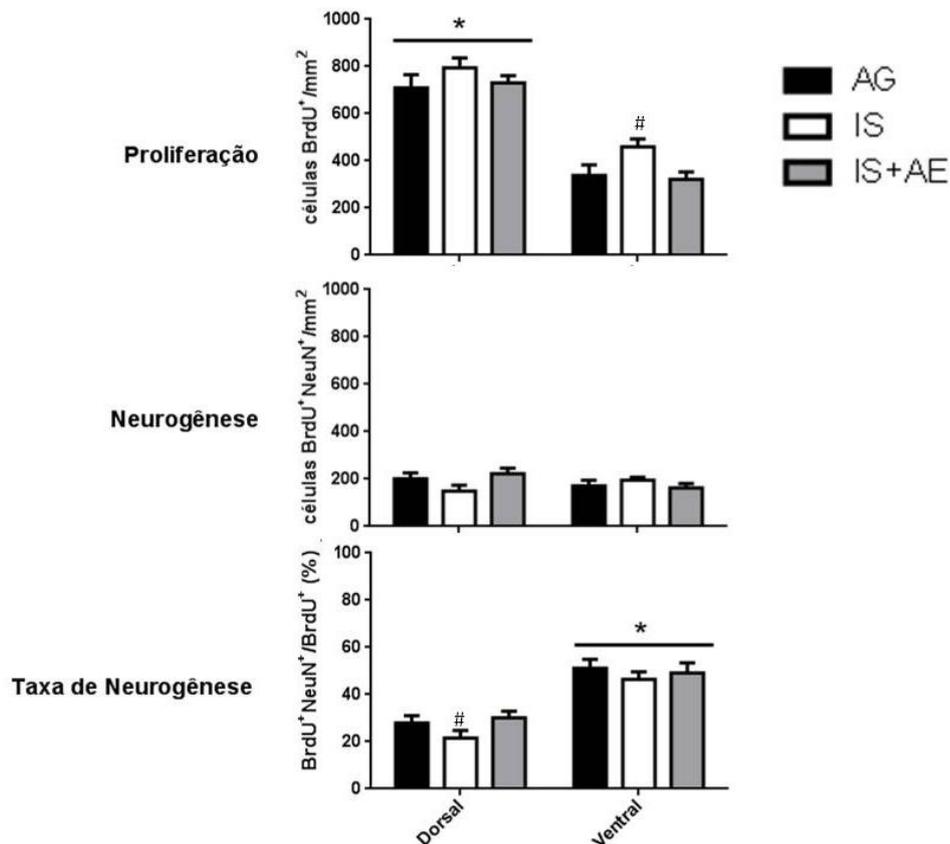


Figura 15: Gráficos representativos dos valores médios \pm erro padrão da quantificação, no Hipocampo dorsal (esquerda) e ventral (direita), da Proliferação por área (acima), Neurogênese por área (meio) e Taxa de Neurogênese (abaixo) dos grupos AG, IS e IS+AE. Cerquilhas (#) representam diferença significativa entre o grupo assinalado e o grupo controle (AG) para o parâmetro medido na mesma porção do hipocampo (ANOVA de uma via, pós-teste de Dunnett). Asteriscos (*) representam diferença significativa da porção do Hipocampo assinalada (dorsal ou ventral) em relação à outra porção (ANOVA de duas vias, efeito da Porção do Hipocampo).

No Bulbo Olfatório (Figura 16), para nenhum dos parâmetros medidos e analisados por ANOVA de uma via houve efeito significativo da Condição Ambiental. Proliferação por área [$F(2,23) = 0,2500$, $p = 0,7809$], Neurogênese por área [$F(2,23) = 1,151$, $p = 0,3340$] e Taxa de Neurogênese [$F(2,23) = 0,5100$, $p = 0,6071$] (Figura 17).

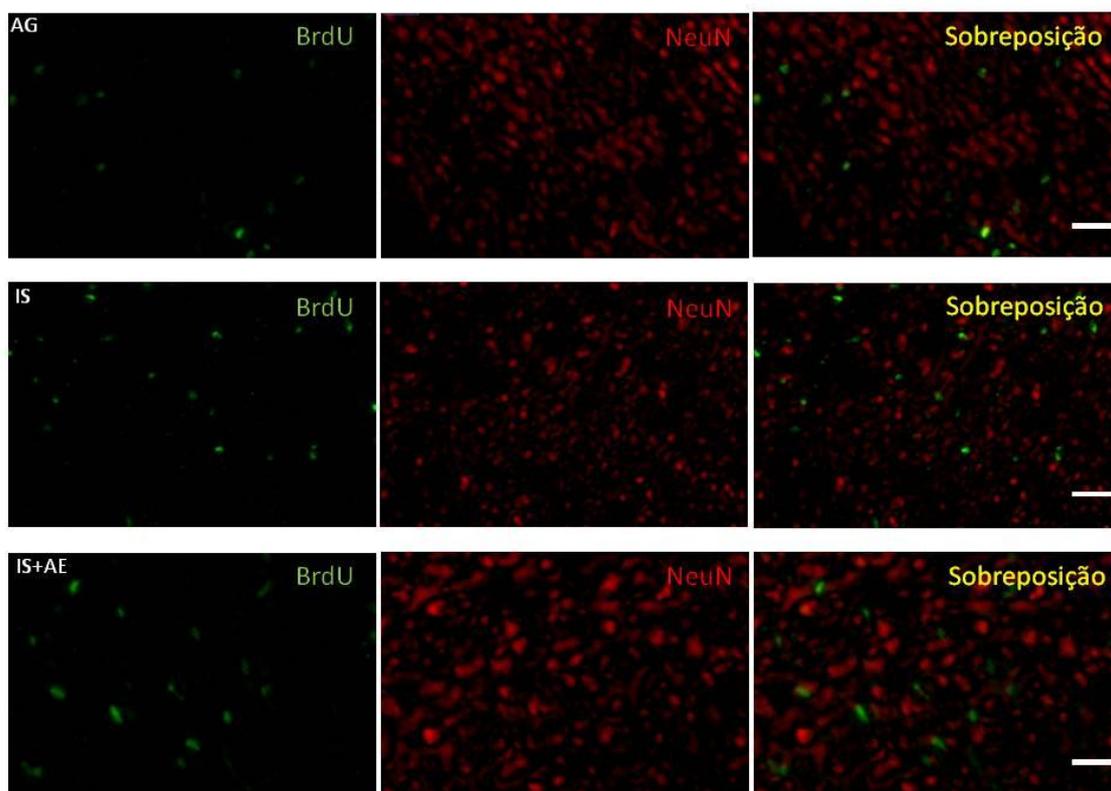


Figura 16: Imagem ilustrativa da marcação por BrdU (esquerda) e NeuN (meio) e sobreposição entre os dois marcadores (direita) em fatias de Camada Granular do Bulbo Olfatório Principal de animais AG (cima), IS (meio) e IS+AE (baixo).

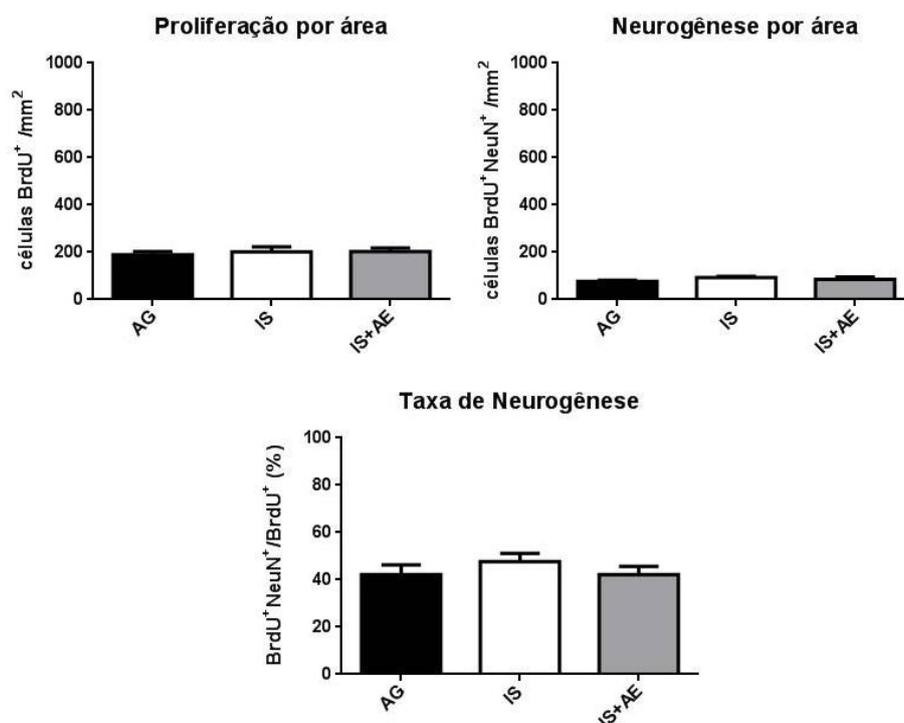


Figura 17: Gráficos representativos dos valores médios \pm erro padrão da quantificação, na Camada Granular Bulbo Olfatório Principal, da Proliferação por área (acima, esquerda), Neurogênese por área

(acima, direita) e Taxa de Neurogênese (abaixo) dos grupos AG, IS e IS+AE. ANOVA de uma via não revelou efeito significativo da Condição Ambiental (AG, IS ou IS+AE) em nenhum dos parâmetros.

4.2. Padrão de ativação neuronal após encontro social

Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado com a hipótese de que o isolamento social, por reduzir a complexidade dos estímulos a que o indivíduo está exposto, leva a uma série de efeitos sistêmicos que culminam com uma redução na capacidade plástica de regiões responsáveis pela formação de memórias sociais. Um dos primeiros passos na busca pela resposta desta pergunta é a verificação do padrão de ativação neuronal em resposta a um estímulo social num animal controle. Entretanto, ainda há controvérsia na literatura acerca da participação do Hipocampo no processamento de odores sociais (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2005; BORELLI et al., 2009; BRENNAN; KENDRICK, 2006; TONG; PEACE; CLELAND, 2014), com conseqüente dúvida de sua participação na formação de memórias sociais (BURTON et al., 2000; HITTI; SIEGELBAUM, 2014; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; SQUIRES et al., 2006). Logo, antes de avaliar os animais em isolamento social, decidimos realizar um mapeamento completo da atividade neuronal por meio da imunoreatividade da proteína c-Fos em várias regiões do cérebro de camundongos C57BL/6J machos adultos após um encontro social de 5 minutos com um juvenil macho da linhagem SWISS. As áreas mapeadas foram previamente descritas e a Figura 18, a seguir, contém imagens ilustrativas dos resultados obtidos para cada uma das áreas analisadas nos grupos GV e JuA.

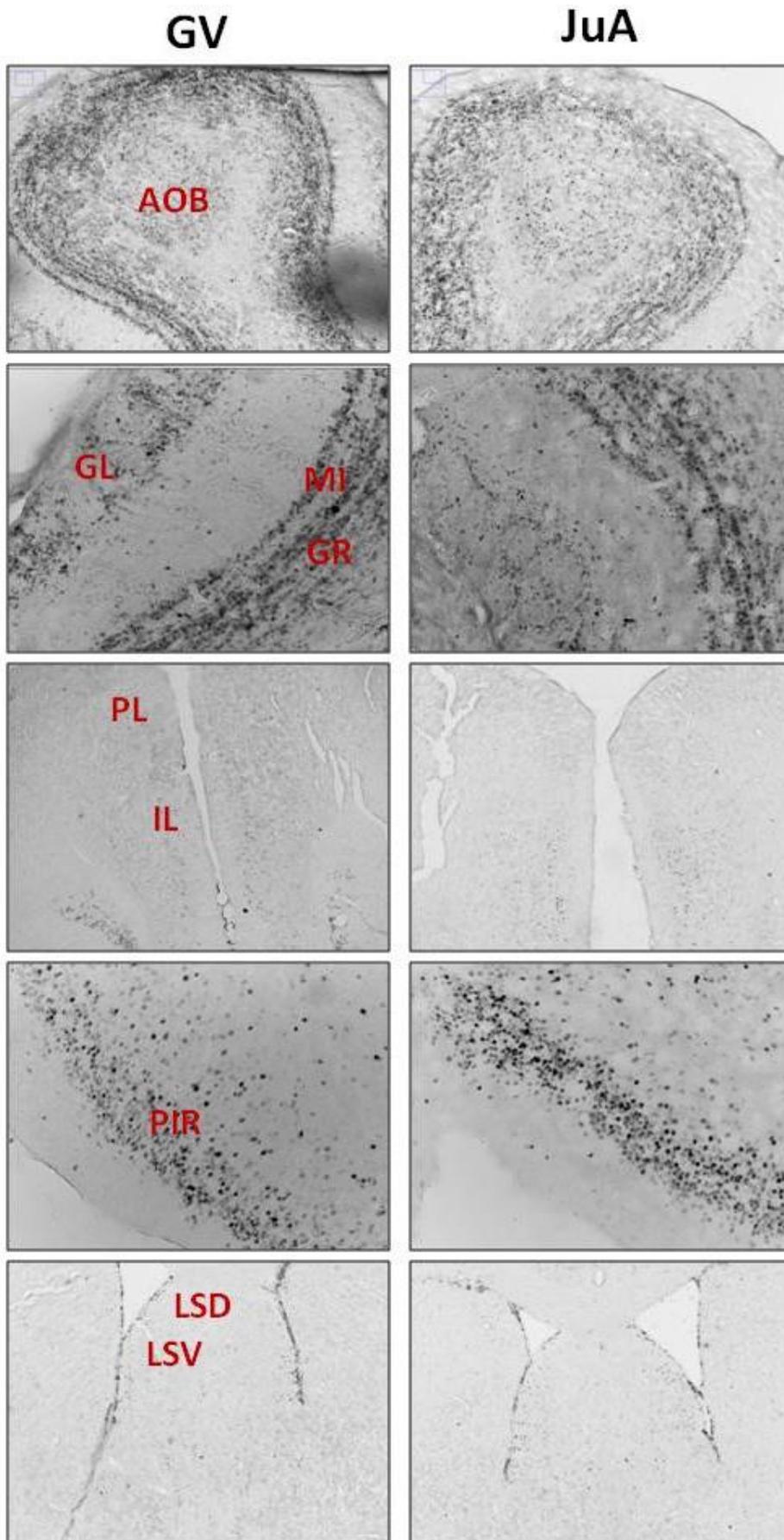


Figura 18

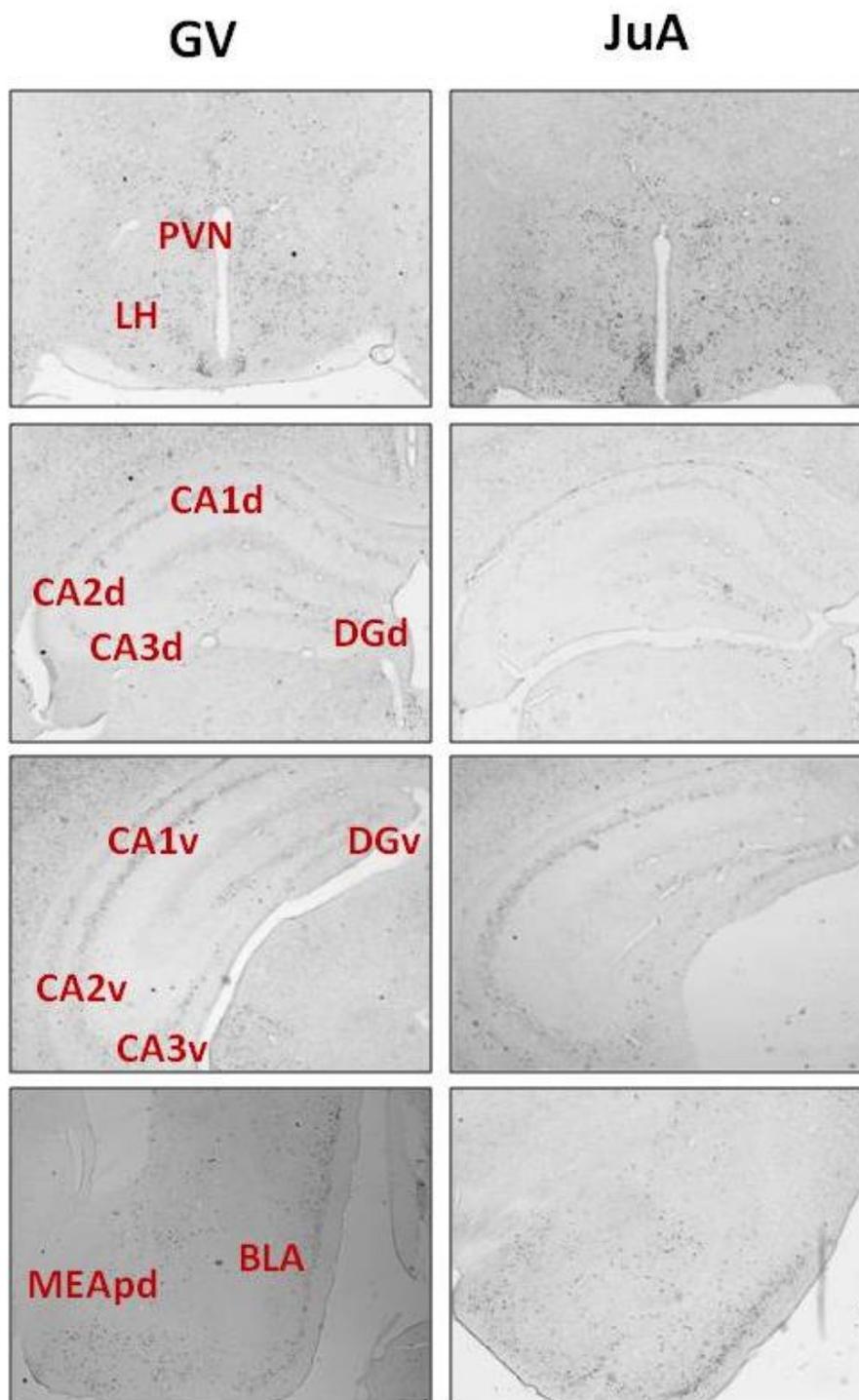


Figura 18 (continuação): imagens ilustrativas das áreas amostradas no mapeamento da atividade neuronal do cérebro de camundongos expostos a uma gaiola vazia (GV – esquerda) ou a um juvenil por 5 minutos (JuA – direita). As áreas e siglas são as mesmas descritas no item 3.5.2. e na Figura 12.

Foram realizados testes t de *student* para comparar os valores médios de contagem obtidos em cada uma das áreas entre os animais GV e JuA. Os valores de média \pm erro padrão medidos para cada par e o p-valor obtido no teste estatístico estão

expressos na Tabela 01. Observa-se que as únicas áreas onde houve diferença significativa do número de células c-Fos⁺ entre os grupos foram os dois núcleos da Amígdala: Amígdala Basolateral (GV: 36,97±5,912; JuA: 54,81±4,283, p = 0,0333) e Amígdala Medial, porção posterodorsal (GV: 1,442±0,305, JuA: 2,509±0,380, p = 0,0395).

Estrutura	GV	JuA	p-valor	Significativo
BULBO OLFATÓRIO				
GL	176,2 ± 12,31 N=7 379,0 ± 21,77 N=8	163,3 ± 10,95 N=7	0,4504	-
GR		376,4 ± 14,78 N=8	0,9227	-
AOB	207,0 ± 15,97 N=5	218,2 ± 38,74 N=4	0,7804	-
MI	379,0 ± 23,33 N=8	389,9 ± 17,77 N=8	0,7149	-
CÓRTICES				
PL	51,47 ± 5,411 N=8	44,65 ± 3,070 N=8	0,2916	-
IL	53,07 ± 6,911 N=8	47,50 ± 3,055 N=8	0,4732	-
PIR	154,0 ± 11,22 N=8	131,9 ± 4,877 N=8	0,0928	-
HIPOTÁLAMO				
PVN	62,15 ± 6,746 N=6	70,78 ± 10,37 N=7	0,5158	-
LH	262,8 ± 29,76 N=8	358,6 ± 42,81 N=7	0,0835	-
SISTEMA LÍMBICO				
SEPTO LATERAL				
LSD	27,69 ± 5,053 N=8	32,48 ± 5,215 N=8	0,5203	-
LSV	26,50 ± 4,523 N=8	35,55 ± 3,294 N=8	0,1281	-
HIPOCAMPO				
DORSAL				
DGd	42,72 ± 5,310 N=8	40,59 ± 1,836 N=8	0,7101	-
CA3d	62,95 ± 4,455 N=8	59,16 ± 3,799 N=8	0,5276	-
CA2d	29,85 ± 5,623 N=8	40,41 ± 6,899 N=8	0,2550	-
CA1d	119,1 ± 12,16 N=8	99,57 ± 8,456 N=8	0,2085	-
VENTRAL				
DGv	27,84 ± 1,860 N=7	31,02 ± 1,788 N=7	0,2406	-
CA3v	41,41 ± 4,542 N=7	47,78 ± 4,041 N=7	0,3159	-
CA2v	63,17 ± 8,164 N=6	56,37 ± 7,704 N=7	0,5572	-
CA1v	84,94 ± 12,09 N=7	96,93 ± 4,125 N=7	0,3661	-
TOTAL				
DGt	35,18 ± 3,241 N=7	35,38 ± 1,015 N=7	0,9540	-
CA3t	51,56 ± 2,491 N=7	53,33 ± 2,279 N=7	0,6105	-
CA2t	46,98 ± 6,881 N=6	49,02 ± 5,814 N=7	0,8239	-
CA1t	99,25 ± 7,928 N=7	96,07 ± 4,662 N=7	0,7348	-
AMÍGDALA				
BLA	36,97 ± 5,912 N=8	54,81 ± 4,283 N=7	0,0333	*
MEApd	1,442 ± 0,3050 N=6	2,609 ± 0,3804 N=7	0,0395	*

Tabela 01: Comparação da quantificação da expressão da proteína c-Fos nas áreas amostradas no mapeamento da atividade neuronal do cérebro de camundongos após encontro social. Diferenças cujo p-valor foi menor que 0,05 foram consideradas estatisticamente significativas (BLA e MEApd).

A segunda análise foi a de correlação cruzada dessa quantificação entre as áreas, em cada um dos grupos separadamente. Com isso, pretendeu-se verificar se, para animais que foram submetidos ao encontro social (JuA), diferentes áreas teriam ativação correlacionada, em relação às áreas correlacionadas nos animais em que não houve encontro social (GV). Além disso, a análise das áreas correlacionadas nos animais do grupo JuA permite a elaboração de hipóteses da participação de cada uma dessas áreas na resposta a estímulos sociais, baseado nos dados já conhecidos da literatura.

Os pares de áreas em que houve correlação (negativa ou positiva) estatisticamente significativa para o grupo JuA foram: AOBxCA3d (p=0,045), MIxGL (p=0,042), MIxIL (p=0,043), MIxPVN (p=0,047), MIxMEApd (p=0,001), GRxGL (p=0,041), GLxCA3d (p=0,041), GLxCA3v (p=0,01), GLAxCA1v (p=0,025), PLxIL (p=0,018), PLxLH (p=0,023), PLxBLA (p=0,011), ILxLH (p=0,025), ILxMEApd (p=0,048), PVNxLH (p=0,002), PVNxBLA (p=0,046), LHxDGt (p=0,049), LHxBLA (p=0,011), CA3dxCA2v (p=0,006), CA3dxCA1v (p=0,016), CA1dxCA1t (p=0,006), CA2vxCA1v (p=0,009).

Para o grupo GV, as correlação (positiva ou negativa) estatisticamente significativas foram: AOBxCA3v (p=0,004), MIxGR (p=0,012), MIxPIR (p=0,018), MIxLSD (p=0,016), GLxCA3v (p=0,027), ILxCA1d (p=0,013), PVNxCA2v (p=0,046), PVNxCA2t (p=0,008), LHxDGv (p=0,034), LHxCA3v (p=0,007), LHxCA1v (p=0,025), LHxCA1t (p=0,029), LHxBLA (p=0,041), LSVxCA3t (p=0,005), LSVxMEApd (p=0,035), DGdxDGt (p=0,001), CA2dxCA2t (p=0,025), DGvxCA3v (p=0,024), DGvCA1t (p=0,025), CA3vxCA1v (p=0,002), CA2vxCA2t (p=0,017), CA3txMEApd (p=0,001).

JuA	MI	GR	GL	IL	PIR	PVN	LH	LSD	CA3d	CA1d	DGv	CA3v	CA2v	CA1v	DGt	CA3t	CA2t	CA1t	BLA	MEApd
AOB									0,95											
MI			0,77	-0,72		-0,76														-0,95
GR			0,77																	
GL									0,77			-0,92		0,87						
PL				0,80			0,82													0,87
IL							0,82													0,76
PVN							0,96													0,82
LH															0,75					0,87
LSV																				
DGd																				
CA3d													0,89	0,85						
CA2d																				
CA1d																			0,90	
DGv																				
CA3v																				
CA2v														0,88						
CA3t																				

GV	MI	GR	GL	IL	PIR	PVN	LH	LSD	CA3d	CA1d	DGv	CA3v	CA2v	CA1v	DGt	CA3t	CA2t	CA1t	BLA	MEApd
AOB												-1,00								
MI		0,83			0,79			-0,80												
GR																				
GL												0,86								
PL																				
IL										0,82										
PVN													0,88				0,97			
LH											-0,79	0,89		0,82				0,81	0,73	
LSV																0,91				-0,84
DGd															0,96					
CA3d																				
CA2d																	0,87			
CA1d																				
DGv												-0,82							-0,82	
CA3v														0,93						
CA2v																	0,89			
CA3t																				-0,98

Tabela 02: Matrizes de correlação do número de células c-Fos⁺ em cada uma das áreas medidas nos animais JuA (painel superior) e GV (painel inferior). Apenas correlações com p-valor menor que 0,05 foram representadas. Valores em verde são correlações positivas e valores em vermelho, correlações negativas.

A Tabela 02 resume os resultados dessa análise. Cada célula contém o coeficiente de correlação de Pearson calculado para o par descrito. Nessa tabela, apenas as correlações cuja significância estatística foi validada por um p-valor menor que 0,05 foram ilustradas. Correlações positivas foram destacadas em verde, e correlações negativas em vermelho.

Ao se analisarem as tabelas contendo as matrizes de correlação do número de células c-Fos⁺ para os animais dos dois grupos, observa-se que apenas dois pares de correlação entre as mesmas áreas ocorrem em ambos os grupos (LHxBLA e GLxCA3v; Tabela 03). Desses, apenas um (LH x BLA) apresentou correlação de mesmo sinal em ambos os grupos (ambos positivos). O outro par (GL x CA3v) teve correlação positiva no grupo GV e negativa no grupo JuA.

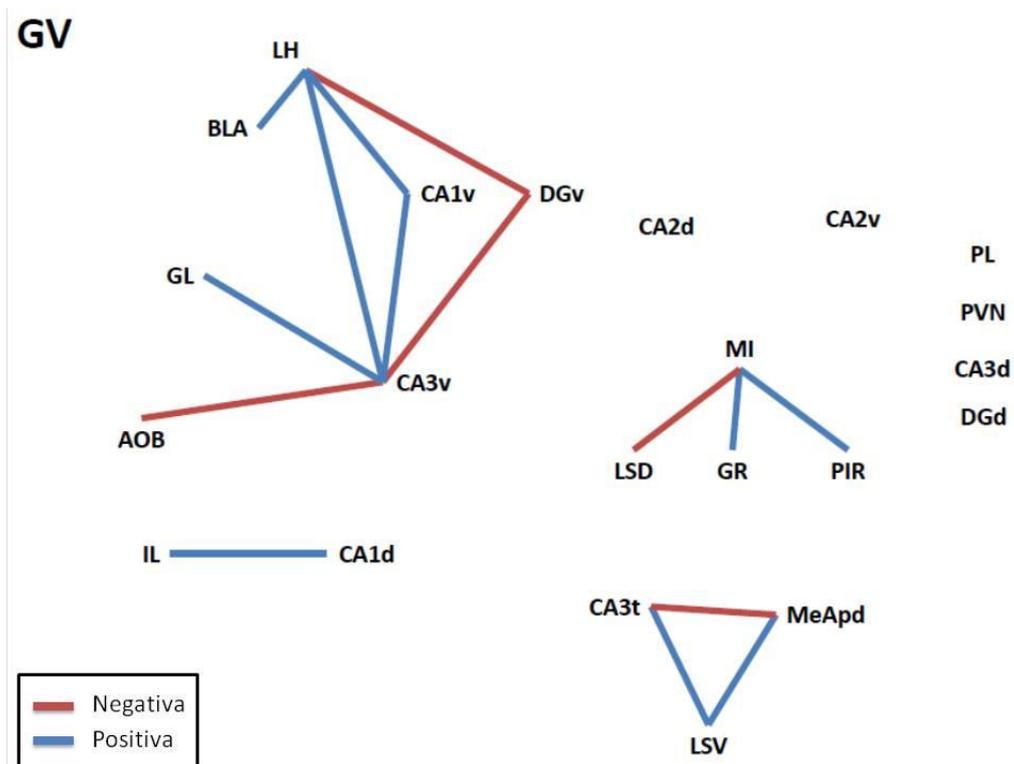
	MI	GR	GL	IL	PIR	PVN	LH	LSD	CA3d	CA1d	DGv	CA3v	CA2v	CA1v	DGt	CA3t	CA2t	CA1t	BLA	MEApd
AOB																				
MI																				
GR																				
GL											I									
PL																				
IL																				
PVN																				
LH																			D	
LSV																				
DGd																				
CA3d																				
CA2d																				
CA1d																				
DGv																				
CA3v																				
CA2v																				
CA3t																				

Tabela 03: Comparação das matrizes de correlação dos grupos JuA e GV. Apenas dois pares de correlação se repetem nos dois grupos (GLxCA3v e LHxBLA - amarelo), e apenas um (LHxBLA) possui o mesmo sinal de coeficiente de correlação nos dois grupos (I – correlação inversa; D – correlação direta).

Esses resultados indicam que, apesar de o encontro social promover poucas diferenças no valor absoluto de ativação neuronal (expressão de c-Fos) nas diferentes

áreas cerebrais dos animais expostos a um juvenil, em relação a animais não expostos, o padrão de coativação (correlação) entre as áreas nos dois grupos é diferente.

Essas diferenças puderam ser mais bem visualizadas após a construção de um gráfico de conectividade entre as áreas, baseado nas correlações observadas entre elas. Observou-se que, para o grupo GV, as áreas com atividade neuronal correlacionada formaram pequenos grupos onde houve correlação entre as mesmas áreas, e apenas um grupo maior onde as áreas do Hipocampo e Bulbo Olfatório se correlacionaram em conjunto. Para o grupo JuA, observa-se que há a formação de um grande agrupamento composto pelas áreas do Hipocampo e do Bulbo Olfatório correlacionadas entre si e conectadas às áreas da Amígdala e do Hipotálamo por meio da Camada Mitral do MOB com essas regiões. A Figura 19, a seguir, ilustra o que foi descrito acima.



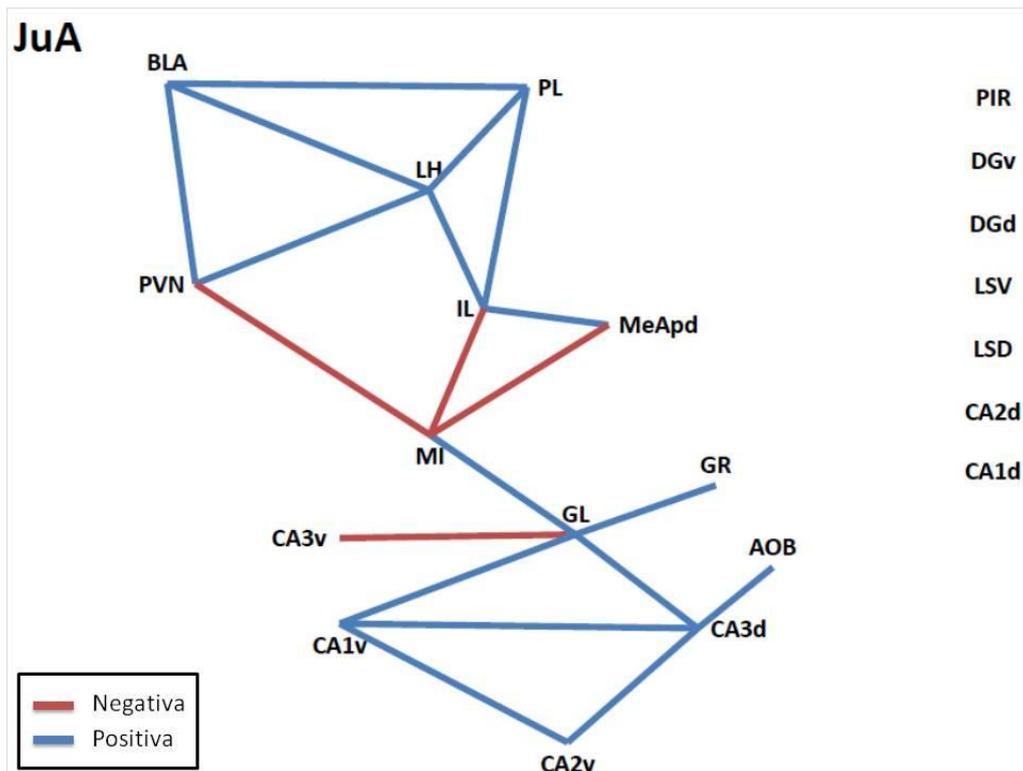


Figura 19: gráficos de conectividade baseado nas correlações da atividade neuronal das áreas medidas dos grupos GV (painel superior) e JuA (painel inferior).

A análise de correlação do Tempo de Exploração do juvenil pelos adultos do grupo JuA com a quantidade de células c-Fos⁺ para cada uma das áreas, observou-se que a única área onde houve correlação foi CA1v ($R^2 = 0,7256$, $p=0,015$). Todos os valores de coeficiente de correlação e p-valor estão listados na Tabela 04.

	AOB	MI	GR	GL	PL	IL	PIR	PVN	LH	LSD	LSV	DGd	CA3d
R²	0,4359	0,0023	0,1433	0,1556	0,0467	0,0123	0,1300	0,1240	0,1900	0,0140	0,4287	0,0673	0,4450
p-valor	0,3398	0,9101	0,3552	0,3812	0,6073	0,7940	0,3803	0,4386	0,3283	0,7799	0,0781	0,5350	0,0707
	CA2d	CA1d	DGv	CA3v	CA2v	CA1v	DGt	CA3t	CA2t	CA1t	BLA	MEApd	
R²	0,1038	0,0773	0,5608	0,0003	0,4031	0,7256	0,1032	0,3765	0,4356	0,3582	0,0415	0,0003	
p-valor	0,4364	0,5050	0,0527	0,9689	0,1255	0,0150	0,4824	0,1428	0,1067	0,1557	0,6612	0,9691	

Tabela 04: Valores de coeficiente de correlação (R^2) entre o Tempo de Exploração (TE) e a quantidade de células c-Fos⁺ em cada uma das áreas analisadas. Linhas 3 e 6: p-valor para cada uma das correlações. Verde: único par de correlação com p-valor menor que 0,05 (CA1v).

5. DISCUSSÃO

Efeito do isolamento e ambiente enriquecido por odores sobre a proliferação e neurogênese

Os nossos resultados mostraram que no Giro Denteado do Hipocampo há uma diminuição da taxa de neurogênese em animais isolados socialmente por uma semana, quando comparado ao que se observa em animais mantidos em agrupamento (Figura 14 – painel inferior). Animais isolados em ambiente enriquecido por odores sociais, por sua vez, não apresentaram essa diminuição, ou seja, o enriquecimento foi capaz de prevenir a redução dessa taxa causada pelo isolamento social. Quando comparada a Neurogênese por área, no entanto, a mesma diferença não foi observada (Figura 14 – painel superior, direita). Em animais isolados em ambiente não enriquecido, houve um aumento significativo de células novas (Proliferação por área) em relação aos animais agrupados. Novamente, o enriquecimento ambiental foi capaz de evitar esse efeito, pois manteve o número de células novas nos animais isolados igual ao de animais agrupados (Figura 14 – painel superior esquerda).

Ao contrário do que se esperava, no entanto, a neurogênese adulta na Camada Granular do Bulbo Olfatório Principal não foi afetada por nenhum dos fatores analisados (isolamento social ou isolamento social em ambiente enriquecido por odores sociais). Assim, não foram observadas diferenças significativas em relação a animais agrupados em nenhum dos parâmetros medidos (Figura 17).

Antes de qualquer comparação com outros trabalhos, é interessante que se definam os termos utilizados nos diferentes trabalhos publicados ao longo do tempo sobre neurogênese adulta, bem como que se apontem erros comuns de nomenclatura utilizados na literatura. Trabalhos mais antigos costumavam incluir sob a mesma

terminologia (“neurogênese adulta”) a medição do número de células BrdU⁺ presentes na estrutura analisada após um determinado tratamento e o número de células BrdU⁺ que também expressavam marcadores específicos de neurônio (FOWLER et al., 2002; STRANAHAN; KHALIL; GOULD, 2006). Atualmente, dão-se dois nomes à medida exclusiva de células BrdU⁺: proliferação, se a quantificação do número de células BrdU⁺ é feita pouco tempo após o fim do tratamento com a droga; ou sobrevivência, se um largo espaço de tempo é dado entre o fim das injeções de BrdU e a quantificação do número de células positivas (GRÉGOIRE et al., 2014). Estudos de proliferação, portanto, costumam investigar efeitos de tratamentos diferentes no número de células novas produzidas em função do tratamento. Estudos de sobrevivência pretendem, por sua vez, verificar o efeito do tratamento em células novas pré-existentes que foram marcadas por BrdU (ou outro marcador) antes do início do tratamento.

Qualquer medida que inclua a colocalização de um marcador de proliferação (BrdU ou Ki67, por exemplo) e um marcador de identidade neuronal (DCX para neurônios em diferenciação, NeuN para neurônios maduros, dentre outros) é hoje chamada de neurogênese. Da mesma forma, pode-se quantificar a diferenciação de células novas em outros tipos celulares, que não neurônios, por meio de marcadores específicos colocalizados com os marcadores de proliferação (GFAP para células da glia ou S100β para astrócitos, por exemplo) (DRANOVSKY et al., 2011).

Medidas de proliferação ou neurogênese podem ser expressas em termos do número total de células BrdU⁺ ou BrdU⁺NeuN⁺ (ou qualquer outra associação BrdU-Marcador específico) pela área ou volume da estrutura analisada. Assim, a comparação entre resultados de diferentes experimentos deve assumir que a área ou volume da região de interesse não varie entre eles. A esses parâmetros pode-se chamar de

Proliferação por área ou Neurogênese por área (ou por volume, caso tenha sido feita a normalização por essa medida).

Medidas de neurogênese, ou da gênese de qualquer outro tipo celular a partir de células novas, por sua vez, também podem ser expressas pelo percentual de células BrdU⁺ que também expressam um dos marcadores específicos de tipos celulares. Dessa forma, podem-se comparar valores percentuais obtidos em experimentos diferentes, os quais não são influenciados pela área medida, e apenas assumem que a influência do tratamento analisado seja homogênea para a estrutura de interesse. A esses parâmetros pode se chamar de Taxa de neurogênese (Taxa de gliogênese, astrogênese, etc) Esse tipo de medida permite verificar se tratamentos distintos promovem alterações diferentes no padrão de diferenciação celular das novas células produzidas nas regiões proliferativas do cérebro.

Como vimos nesse trabalho, resultados diferentes para o mesmo tratamento foram obtidos quando observados os parâmetros Taxa de neurogênese e Neurogênese por área (Figura 14). Assim, as comparações a seguir levarão em consideração o tipo de medida e a forma como ela foi expressa no trabalho original para que conclusões sejam feitas a partir delas, em relação aos resultados obtidos no atual trabalho.

Isolamento social

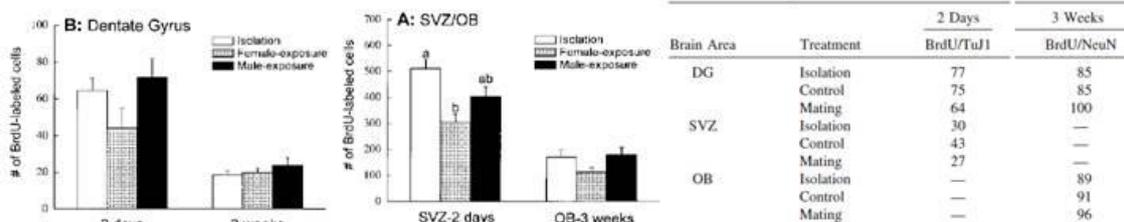
Em um dos primeiros relatos sobre o efeito do isolamento social na neurogênese, proliferação e sobrevivência no cérebro de roedores, Fowler et al., 2002 (Figura 20a), mostraram que fêmeas de ratazanas das pradarias (*Microtus ochrogaster*) mantidas em isolamento social por 2 dias apresentam maior proliferação celular na Zona Subventricular (local de origem das novas células do BO) do que fêmeas grupadas com outras fêmeas, mas não com machos, durante esse período. A mesma diferença não foi

observada no Giro Denteado. Após 3 semanas de isolamento, a diferença observada com 2 dias no SVZ não pôde ser observada na sobrevivência de células novas no BO. Novamente, não foram observadas diferenças no Hipocampo. Em nenhum dos tempos de isolamento testados foi observada diferença na Taxa de neurogênese entre animais isolados e agrupados, medida pela proporção de células BrdU e NeuN ou BrdU e TuJ1 positivas (TuJ1 é, assim como NeuN, um marcador específico de neurônio). O mesmo grupo responsável por esse estudo publicou recentemente um novo trabalho (Figura 20b), também com a ratazana da pradaria, em que demonstrou que o isolamento social de 6 semanas promove uma diminuição significativa no número de células BrdU⁺ que sobrevivem ao período de isolamento. Também foi observada uma diminuição no número de células Ki-67⁺ após o período (Ki-67 é um marcador de divisão celular intrínseco. Por isso, sua marcação permite quantificar a proliferação que estava ocorrendo no momento da fixação do tecido processado). Também foi observada nesse trabalho uma diminuição da diferenciação das células novas em neurônios (Taxa de neurogênese) após 6 semanas de isolamento social. Esses resultados foram obtidos no Giro Denteado e na Amígdala de ratazanas da pradaria, tratadas com BrdU por 14 dias previamente ao início do isolamento de 6 semanas (LIEBERWIRTH et al., 2012).

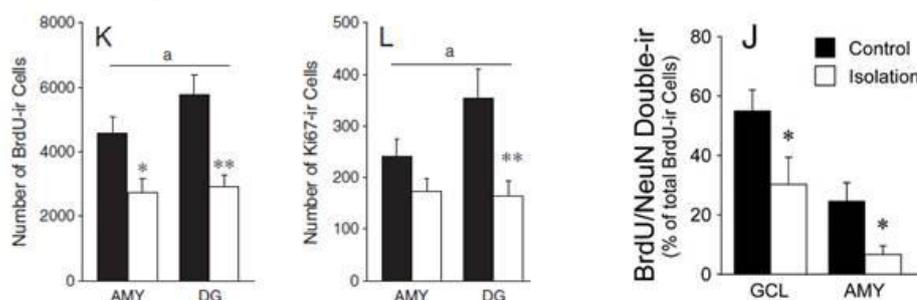
Ibi et al., 2008 (Figura 20c), demonstraram que camundongos isolados a partir do desmame apresentam menos células BrdU⁺ no Giro Denteado após 4 semanas do início do isolamento (sobrevivência). Além disso, nessas células, a Taxa de neurogênese foi menor nos animais isolados. No entanto, camundongos tratados com BrdU no último dia das 4 semanas de isolamento e que tiveram a proliferação quantificada 24h depois não apresentaram diferenças em relação animais agrupados, resultado diferente daquele visto por Lieberwirth et al., 2012 na ratazana da pradaria com o marcador Ki-67 após isolamento de 3 semanas.

Em ratos, Lu et al., 2003 (Figura 20d), obtiveram resultados muito similares aos observados por Ibi et al., 2008, e Lieberwirth et al., 2012b: menor número de células BrdU⁺ (sobrevivência) e menor proporção de neurônios novos (BrdU⁺/TOAD-64⁺) (Taxa de neurogênese) no Giro Denteado do Hipocampo de animais submetidos a 4 semanas de isolamento após o desmame.

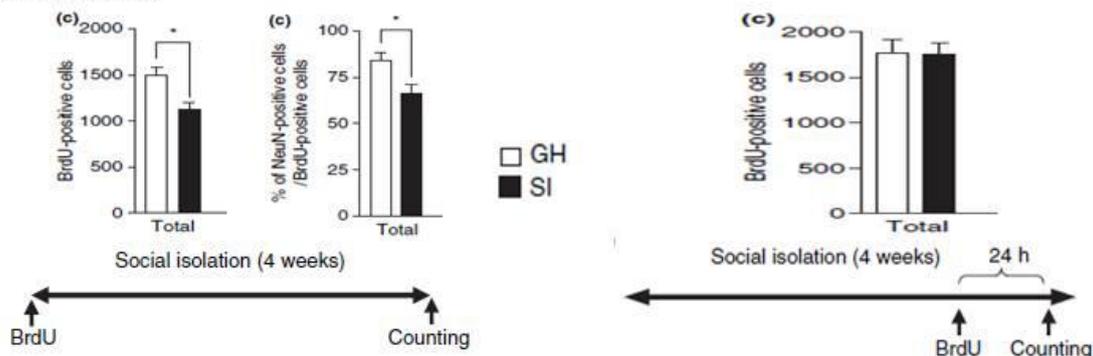
a. Fowler et al, 2002:



b. Lieberwirth et al, 2012b:



c. Ibi et al, 2008:



d. Lu et al, 2003:

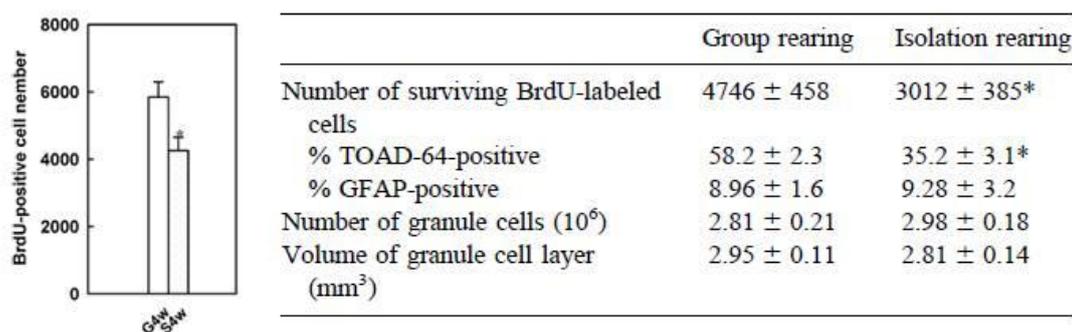


Figura 20: Reprodução dos gráficos e tabelas contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão do efeito do isolamento social na proliferação, sobrevivência e neurogênese em roedores.

Em comparação com os resultados obtidos no presente trabalho, nota-se que os resultados acima citados dizem respeito a períodos maiores de isolamento social do que o período aqui utilizado (7 dias). Ainda assim, os animais isolados no presente trabalho

também apresentaram menor Taxa de neurogênese no Giro Denteado, como reportado na maioria dos trabalhos (IBI et al., 2008; LIEBERWIRTH et al., 2012; LU, 2003). A ausência de efeito do isolamento no Bulbo Olfatório vista pelo presente trabalho foi também reportada por um dos estudos citados (FOWLER et al., 2002). No entanto, percebe-se que o aumento da proliferação observado no Hipocampo de camundongos isolados por 7 dias visto aqui somente possui correlato com o que foi observado na Zona Subventricular de fêmeas de ratazanas da pradaria isoladas por 2 dias, em relação a fêmeas agrupadas com outras fêmeas pelo mesmo período. Uma vez que o presente trabalho avaliou o efeito do isolamento social em células cuja incorporação de BrdU se deu durante todo o período de isolamento, pode-se dizer que os resultados observados aqui são uma mistura de proliferação (células nascidas 1-2 dias antes do sacrifício dos animais) e sobrevivência (células nascidas entre o 1º e 5º dias de isolamento). Não se pode dizer, portanto, que os resultados observados no presente trabalho sejam contraditórios ao que já foi observado na literatura. É possível que diferenças entre espécies e linhagens e, especialmente, entre os tempos de isolamento avaliados tenham influenciado diretamente nas discrepâncias observadas.

Um trabalho cujos resultados podem ampliar a compreensão do resultado da contagem de células BrdU⁺ obtido no presente trabalho é o de Dranovsky et al., 2011. Esses autores realizaram acompanhamento do processo de diferenciação de células novas do Giro Denteado durante diferentes períodos de tempo e condições ambientais. Foram utilizados camundongos transgênicos, nos quais o tratamento com tamoxifeno promove a expressão de proteína amarela fluorescente (EYFP) apenas em células tronco neurais (NSC – *neural stem cells*), a qual permanece constante em todas as células da progênie dessa linhagem. Dessa forma, foi possível identificar células diferenciadas a partir daquelas que sofreram divisão durante o tratamento com tamoxifeno, mesmo após

longos períodos de tempos, algo que não é possível com o BrdU, devido à diluição desse marcador após vários ciclos de divisão celular ou eventuais mortes das células marcadas.

Nesse trabalho, os autores verificaram que 1 mês de isolamento social levou a uma maior proporção de NSCs (células co-expressando EYFP e GFAP, com morfologia radial) nos animais isolados em relação aos agrupados em ambiente padrão ou enriquecido. O mesmo, no entanto, não foi observado após 3 meses de isolamento, quando apenas animais mantidos agrupados em ambiente enriquecido apresentaram menor proporção de NSCs em relação aos demais grupos (Figura 21 – G e H). Quando analisados números absolutos, animais isolados apresentaram um número de NCSs maior que o observado nos demais grupos (Figura 21 - I). Ainda, o número proporcional de neurônios novos (células EYFP⁺/NeuN⁺) não foi significativamente menor em animais isolados, seja por 1 ou por 3 meses, diferente do que observaram os trabalhos ilustrados na Figura 20. Essa diferença, no entanto, foi perceptível entre animais isolados e agrupados e aqueles expostos a ambiente enriquecido (maior proporção no ambiente enriquecido), independente do tempo de exposição à condição ambiental (1 ou 3 meses) (Figura 21 – G e H). Os autores sugerem que os resultados observados refletem um acúmulo de NSCs nos animais isolados, o que não ocorre nos animais agrupados ou mantidos em ambiente enriquecido, nos quais essas células se diferenciam rapidamente em neurônios (processo chamado de amplificação transiente rápida). Talvez, o que se observou nos resultados de proliferação celular no presente trabalho reflita esse aumento de NSCs, antes que um aumento na morte celular (diminuição da sobrevivência) pudesse ter acontecido.

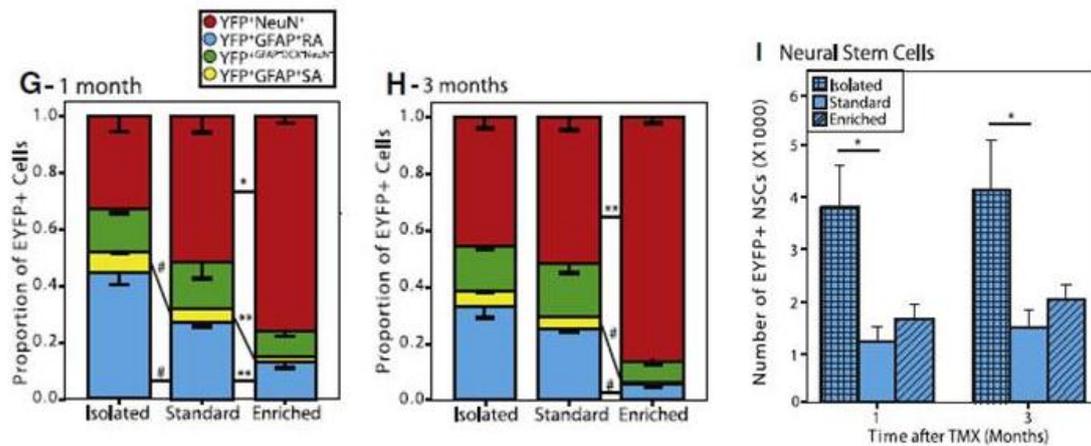


Figura 21: Reprodução de gráficos retirados de Dranovsky et al., 2011 (Figura 7.G,H,I). G. e H.: proporção de células novas (EYFP⁺) que expressam marcadores (e morfologia) de neurônio (NeuN), Astrócito (GFAP e SA: morfologia estrelada), Célula Tronco Neural (GFAP e RA: morfologia radial) ou nenhum marcador específico em animais isolados, agrupados ou agrupados em ambiente enriquecido por 1 mês (G) ou 3 meses (H). I.: Número absoluto de NCSs em animais isolados, agrupados ou agrupados em ambiente enriquecido por 1 mês (esq.) ou 3 meses (dir).

Dranovsky et al., 2011, também observaram que animais isolados (1 ou 3 meses) apresentam uma correlação linear positiva baixa ($R^2=0,42$) entre o número de NCSs e o número de neurônios após o período de isolamento, algo também observado na lâmina inferior do Giro Denteado de animais agrupados sem enriquecimento. Essa correlação indicaria que há uma taxa constante e baixa de diferenciação de NSCs em neurônios, ao mesmo tempo em que há um processo de autorrenovação das NSCs. Já em animais mantidos em ambiente enriquecido, não há uma correlação entre o número de NSCs e neurônios, fenômeno semelhante ao que se observa na lâmina superior do Giro Denteado de camundongos agrupados. Nesse caso, a maioria dos animais analisados apresentou um alto número de neurônios e uma baixa quantidade de NSCs (Figura 22). Por isso, pôde se supor que, em animais mantidos em ambiente enriquecido, há uma taxa alta de diferenciação de NSCs em neurônios (amplificação transiente rápida), mas sem renovação da população de NSCs (Figura 23). Sabe-se, ainda, que a lâmina inferior do Giro Denteado é menos ativa, em geral, do que a lâmina superior. Vale lembrar que a explicação da hipótese proposta por nós para o efeito deletério do isolamento social na memória previa que o fator inicial causador do déficit seria a privação de estimulação

sensorial com consequente diminuição global da atividade neuronal e possíveis alterações advindas dessa diminuição na neurogênese adulta do animal isolado. Assim, é coerente com essa hipótese que o processo de diferenciação celular no Giro Denteado de um animal submetido a baixos níveis de atividade neuronal seja semelhante ao que é observado em uma área intrinsecamente menos ativa do Giro Denteado de um animal controle (lâmina inferior).

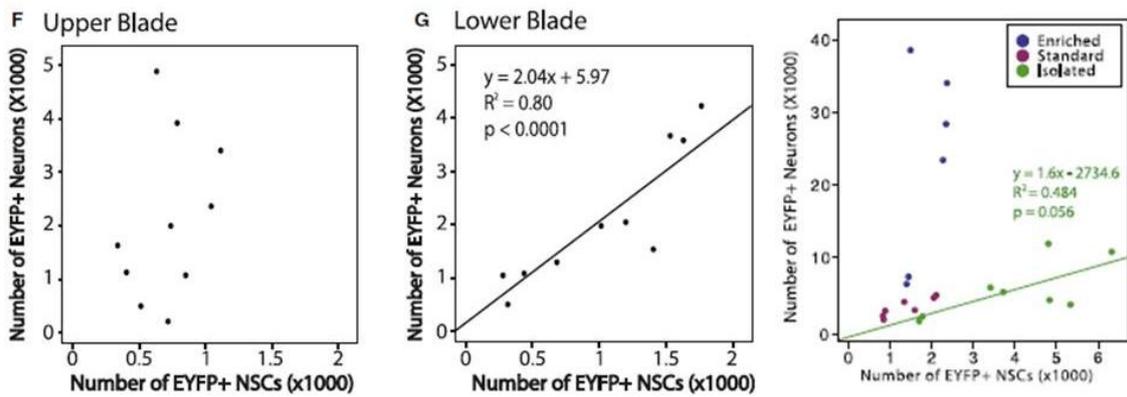


Figura 22: Reprodução de gráficos retirados de Dranovsky et al., 2011 (Figura 05F,G e Figura 07K). Gráficos de correlação entre o número de NCSs e o número de Neurônios na lâminas superior (esq.) e inferior (centro) do Giro Denteado do Hipocampo de animais agrupado em ambiente não enriquecido e no Giro Denteado inteiro do Hipocampo de animais isolados, agrupados ou agrupados em ambiente enriquecido. (dir.).

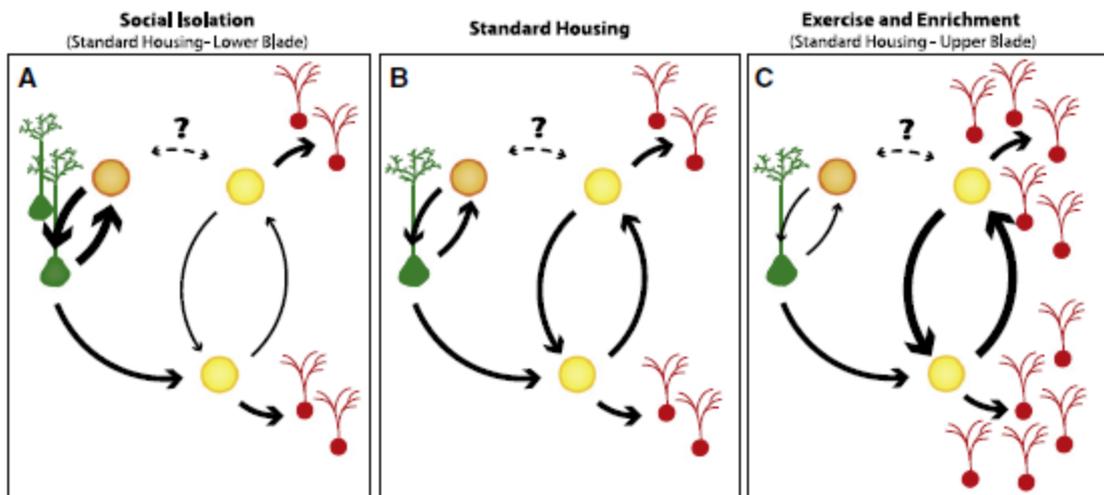


Figura 23: Reprodução da Figura 8 de Dranovsky et al., 2011. Esquema ilustrativo do processo de diferenciação celular a partir de NCSs em camundongos isolados ou na lâmina inferior do Giro Denteado do Hipocampo de animais agrupados (A), Giro Denteado inteiro do Hipocampo de animais agrupados (B) ou em camundongos agrupados em ambiente enriquecido ou na lâmina superior do Giro Denteado do Hipocampo de animais agrupados.

Enriquecimento ambiental

Stranahan et al., 2006, avaliaram os efeitos da interação entre isolamento social ou agrupamento com a realização ou não de exercícios físicos (corrida) na proliferação, sobrevivência e neurogênese no Giro Denteado (Figura 24a). Os resultados desse trabalho indicaram que, assim como o que foi visto por Ibi et al., 2008, para camundongos, após um longo período de isolamento social (48 dias), não houve diferença na proliferação celular (BrdU injetado na véspera do sacrifício) entre animais isolados e agrupados (Figura 24a – esquerda). No entanto, a corrida teve efeitos diferentes nos animais isolados, dependendo do tempo de exposição a esse tipo de enriquecimento ambiental. Com injeções diárias de BrdU por 12 dias, animais isolados submetidos a corrida apresentaram menos células novas do que animais isolados, agrupados ou agrupados e submetidos a corrida (Figura 24a – meio). Nos mesmos 12 dias, mas com apenas uma injeção de BrdU na véspera do sacrifício, não foi vista diferença na proliferação nos animais isolados e isolados submetidos a corrida. Já com 48 dias, animais isolados submetidos à corrida tiveram maior proliferação do que animais isolados apenas (Figura 24a – direita).

Esses resultados indicam que a corrida teve efeitos diferentes na proliferação e sobrevivência de células novas. O experimento em que foram feitas injeções diárias, assim como o experimento do presente trabalho, mistura os efeitos de proliferação (visto apenas nas células nascidas poucos dias antes do sacrifício) e sobrevivência (efeito observável nas células nascidas nos primeiros dias do experimento). No entanto, o experimento em que apenas uma injeção foi feita no 12º dia mostra que a diminuição do número de células visto nos animais isolados submetidos à corrida no experimento de múltiplas injeções se deve a uma menor sobrevivência, e não a proliferação, já que esta foi demonstrada como não estando alterada entre os grupos com 12 dias. Ainda, o

experimento de uma única injeção mostra que, após 48 dias de corrida, o efeito do enriquecimento na proliferação passa a ser positivo. Não é possível, no entanto, concluir se há também alteração no efeito sobre a sobrevivência após 48 dias, pois não foi feito nenhum experimento que testasse essa hipótese.

Nesse trabalho, ainda foram quantificadas proporções de neurônios nas populações de células novas no experimento em que os animais foram tratados com BrdU por 12 dias consecutivos. Diferentemente do que foi observado no presente trabalho, não foram observadas diferenças entre animais agrupados e isolados. Também não foram vistas diferenças entre animais mantidos isolados ou agrupados com acesso a corrida. Os autores concluíram que as variações observadas na proliferação entre os grupos refletem-se proporcionalmente na neurogênese, sem que haja alteração, no entanto, na tendência a essas novas células darem origem a mais ou menos neurônios. Essa conclusão é conflitosa com aquela proposta por Dranovsky et al., 2011, e ilustrada na Figura 23.

Comparados aos resultados do presente trabalho, os resultados de Stranahan et al., 2006, permitem concluir que o efeito agudo da corrida e do enriquecimento ambiental por odores sociais no número de células novas no Giro Denteado do Hipocampo de ratos e camundongos é diferente.

Monteiro et al., 2014, demonstraram que o enriquecimento ambiental por objetos foi capaz de aumentar o número de neurônios novos no Giro Denteado do Hipocampo de camundongos isolados ou agrupados. No entanto, esses autores não observaram diferenças entre animais agrupados e isolados em ambientes não enriquecidos (Figura 24b – esquerda). O parâmetro utilizado nesse trabalho foi o número de células positivas para BrdU e NeuN pela área do Giro Denteado (Neurogênese por área) após uma

semana de injeções diárias de BrdU, idêntico ao realizado no presente trabalho. Ao analisarem o mesmo parâmetro no Bulbo Olfatório, observaram que animais isolados ou agrupados em ambiente enriquecido por objetos apresentaram maior neurogênese na Camada Glomerular (Figura 24b – meio), ao passo que apenas animais agrupados em ambientes enriquecidos por objetos apresentaram maior neurogênese na Camada Granular (Figura 24b – direita). Novamente, nenhuma diferença foi observada entre animais isolados e agrupados em ambiente não enriquecido.

Em comparação aos resultados obtidos no presente trabalho, os resultados de Monteiro et al., 2014, foram semelhantes. Apesar da diferença de linhagens (Swiss x C57BL6/J), em nenhum dos trabalhos foi observada diferença na Neurogênese por área entre animais isolados e agrupados em ambiente não enriquecido, seja no Giro Denteado ou no Bulbo Olfatório. No entanto, Monteiro et al., 2014, não utilizaram a Taxa de neurogênese, parâmetro com o qual foi possível observar diferenças entre a animais isolados e agrupados no presente trabalho.

Quanto ao efeito do enriquecimento por objetos testado nesse trabalho, os autores observaram um efeito significativo nos animais isolados em relação aos animais agrupados, o que não foi visto no presente trabalho, onde o enriquecimento por odores apenas igualou a Taxa de neurogênese dos animais isolados à dos animais agrupados. É possível que o enriquecimento por odores sociais tenha um efeito mais sutil que o enriquecimento por objetos e, assim, promova menor alteração nos fenômenos neurogênicos observados. No entanto, tanto o enriquecimento por objetos testado por Monteiro et al., 2014, e o enriquecimento por odores sociais testado no presente trabalho foram capazes de promover alterações na Neurogênese por área ou na Taxa de neurogênese dos animais isolados no ambiente enriquecido, em relação ao que se observa em animais isolados em ambiente não enriquecido.

Em um experimento em que foi testado o efeito de odores não sociais na proliferação na Zona Subventricular e sobrevivência e neurogênese na camada Granular do Bulbo Olfatório, Rochefort et al., 2002, observaram efeitos diferentes do enriquecimento. Em camundongos agrupados expostos por 20 dias a um ambiente enriquecido com odores não sociais (essências como lavanda, alho, chocolate ou laranja, por exemplo) um maior número de células BrdU⁺ foi detectado na camada Granular (Figura 24c – esquerda), mas a proporção de neurônios nessas células não foi diferente entre os grupos (Figura 24c – meio). Quando observado o efeito de 20 dias de enriquecimento na proliferação celular na Zona Subventricular, não foi observado nenhum efeito em nenhuma das 4 regiões da SVZ analisadas (Figura 24c – direita).

Esses resultados diferem daqueles obtidos no presente trabalho, onde não foram vistas diferenças nos fenômenos neurogênicos no Bulbo Olfatório após enriquecimento por odores sociais durante uma semana. No entanto, se aproximam do que foi observado por Monteiro et al., 2014, para enriquecimento por objetos. Pode-se supor, a partir dessas observações, que uma exposição mais prolongada ao enriquecimento por odores sociais em animais isolados possa causar um aumento do número de células novas que sobrevivem na camada Granular do Bulbo Olfatório.

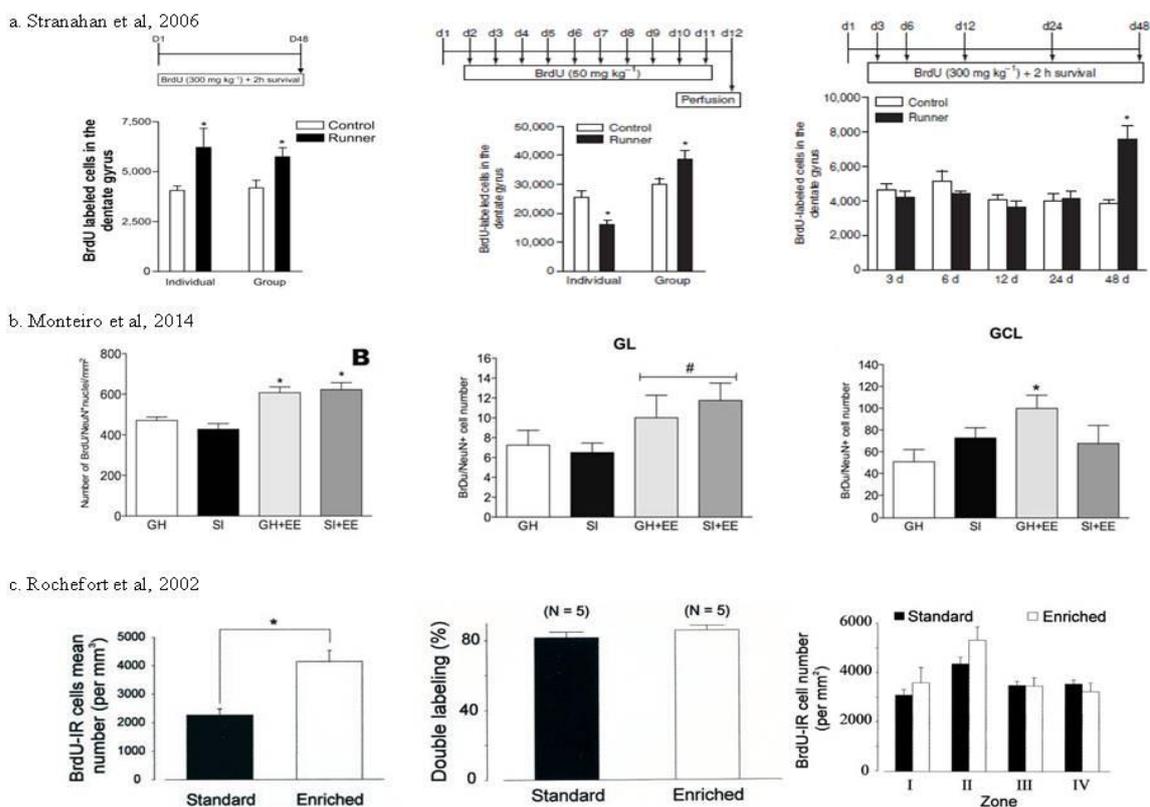


Figura 24: Reprodução dos gráficos contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão do efeito do enriquecimento ambiental na proliferação, sobrevivência e neurogênese em roedores.

Hipocampo Dorsal x Ventral

Classicamente, uma divisão anatômica baseada na conectividade das diferentes porções do Hipocampo foi proposta (MOSER; MOSER, 1998). Em sua revisão, Fanselow e Dong, 2010, relatam que evidências atuais apontam para uma divisão do Hipocampo em Dorsal, Intermediário e Ventral, de acordo com padrões de expressão de diferentes genes, além da conectividade e evidências de experimentos comportamentais. Nessa revisão, os autores argumentam que o Hipocampo Dorsal está mais relacionado com comportamentos de locomoção, orientação do movimento, navegação e exploração, devido à sua conectividade com estruturas como o córtex cingulado, tálamo anterior e corpos mamilares. Por sua vez, o Hipocampo Ventral estaria mais relacionado a comportamentos emocionais, uma vez que sua conectividade se dá, diferentemente da porção dorsal, com o Bulbo Olfatório, Amígdala e Hipotálamo.

Tanti et al., 2012 e 2013, verificaram o efeito do ambiente enriquecido por objetos e presença de rodinha de corrida nos fenômenos neurogênicos no Hipocampo Dorsal e Ventral de camundongos. Em ambos os trabalhos, os animais foram mantidos agrupados em ambiente enriquecido ou não enriquecido por 28 dias. BrdU injetado anteriormente ao período de exposição às condições ambientais permitiu quantificar neurogênese e sobrevivência e injeções na véspera do sacrifício permitiram a quantificação da proliferação após o período experimental. No trabalho de 2012, os autores observaram que a proliferação celular encontra-se aumentada nas duas porções do Hipocampo de animais expostos a enriquecimento ambiental (Figura 25a – esquerda), mas que não há diferença significativa na quantidade de proliferação entre as áreas. A quantificação de neurogênese revelou que apenas na região dorsal do Hipocampo houve efeito significativo do enriquecimento ambiental, o qual promoveu uma maior diferenciação das células novas em neurônios (Figura 25a – direita).

Os resultados de 2013 repetiram algumas das observações que haviam sido feitas em 2012, mas também encontraram resultados discrepantes. Os autores decidiram dividir o Hipocampo em 5 regiões, Septal (dorsal) 1 e 2, Intermediária e Temporal (ventral) 1 e 2. A utilização da nomenclatura dorsal/ventral ou septal/temporal é variada na literatura, e os termos referem-se às mesmas porções do Hipocampo. O aumento na proliferação medida no 28º dia de experimento observado no trabalho de 2012 foi encontrado novamente apenas nas duas porções septais (dorsais) do Hipocampo. Nas porções temporais (ventrais) e intermediária não foram observadas diferenças (Figura 25b – esquerda). Quando avaliadas as proporções das células novas no 28º dia em relação aos marcadores que estavam expressos, observa-se que há uma maior quantidade relativa de células com comprometimento neuronal (DCX^+ e $Prox1^+$) na porção septal 1 do que na temporal 2 nos animais não submetidos a enriquecimento e

que o enriquecimento foi capaz de aumentar a proporção de células com fenótipo neuronal apenas na área septal (dorsal), algo que já havia sido verificado no trabalho de 2012. Ainda, a proporção de células com fenótipo neuronal imaturo tardio (DCX⁻ Prox1⁺) é muito maior na região temporal (ventral).

Monteiro et al., 2014, também dividiram o Hipocampo em 4 regiões distintas ao longo do seu eixo anteroposterior (divisão similar à realizada por Tanti et al., 2013). Os resultados obtidos por esses autores mostram que animais agrupados ou isolados em ambiente não enriquecido apresentam menores quantidades de neurônios novos (BrdU e NeuN positivos) do que animais isolados ou agrupados em ambiente enriquecido ao longo de todo o eixo anteroposterior, exceto na porção 3 da divisão feita pelos autores. É possível também observar uma tendência ao aumento no número de neurônios novos à medida que se avança em direção à porção posterior (ventral) do Hipocampo, apesar de não ter havido diferença significativa entre as porções analisadas (Figura 25c).

Em comparação com os resultados do presente trabalho, os resultados de Tanti et al., 2012 e 2013, são de certa forma contraditórios, apesar de os desenhos experimentais utilizados nos dois trabalhos terem sido diferentes. O presente trabalho demonstrou que a proliferação (associada à sobrevivência, como já discutido anteriormente) é maior na porção dorsal do Hipocampo, ao passo que a Taxa de neurogênese é maior na porção ventral, independente do tratamento ambiental. Tanti et al., 2012 e 2013, mostram, em ambos, que a proliferação não difere entre as porções do Hipocampo analisadas (duas ou cinco divisões). Em relação à proporção de células novas que adquirem fenótipo neuronal, Talani et al., 2012, não observam diferenças entre as porções ventral e dorsal, apesar de a média da porção ventral ser maior, mas não estatisticamente.

Em relação aos resultados de Monteiro et al., 2014, uma vez que o desenho experimental é similar ao realizado no presente trabalho (1 semana de tratamento ambiental com injeções diárias de BrdU em animais isolados ou agrupados), as comparações podem ser feitas de forma mais sistemática. Se consideradas as divisões AP1 e AP2 do trabalho de Monteiro et al., 2014, como sendo a porção dorsal do presente trabalho e AP3 e AP4 como a ventral, observa-se que é possível que haja diferenças entre os valores das duas porções. O presente trabalho, no entanto, não encontrou nenhuma diferença no número de neurônios novos expresso pela área do Giro Denteado entre as duas porções do Hipocampo, em nenhum dos grupos analisados.

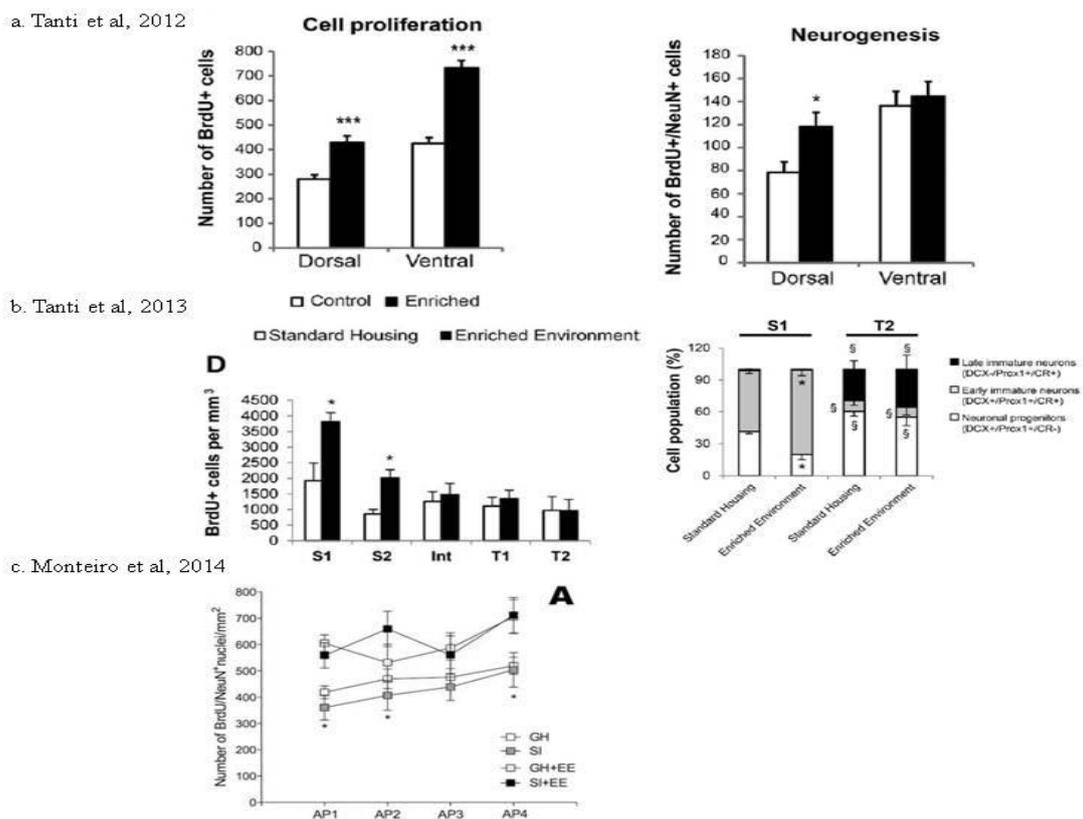


Figura 25: Reprodução dos gráficos contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão das diferenças entre as porções Dorsal e Ventral do Hipocampo durante enriquecimento ambiental.

Padronização experimental e de nomenclatura

Após a análise sistemática de resultados previamente publicados e comparação destes com os do presente trabalho, percebe-se que poucas comparações de fato

puderam ser feitas, principalmente devido às discrepâncias entre os desenhos experimentais e parâmetros quantitativos analisados em cada um deles. Apesar de o termo neurogênese ser amplamente utilizado na literatura dessa área, ainda há necessidade de padronização de termos e como cada parâmetro pode ser medido e comparado. Há, no entanto, uma tendência à padronização, observada em trabalhos de autores diferentes onde os termos sobrevivência, neurogênese ou proliferação têm sido utilizados pra descrever os mesmos tipos de observações feitas em experimentos semelhantes. Mesmo assim, desenhos experimentais diferentes podem causar o maior problema na interpretação comparativa de dados semelhantes. Um exemplo interessante é o fato de nenhum outro trabalho utilizar o tempo de isolamento de 1 semana como o utilizado no presente trabalho. Tempos diferentes não só de isolamento social e/ou exposição a ambientes enriquecidos são uma constante na literatura, bem como variações no tempo esperado entre a administração de BrdU e o sacrifício dos animais para verificação da expressão dos diferentes marcadores de diferenciação celular. Nesse ultimo caso, há uma tendência à utilização de 28 dias – 4 semanas – como padrão, uma vez que esse tempo é descrito como sendo o necessário para a maturação e incorporação funcional de neurônios novos no Hipocampo (DUAN et al., 2008).

Atividade neuronal após encontro social

Durante a execução do presente trabalho, após a execução dos experimentos de neurogênese e proliferação, um trabalho publicado por Kee e colaboradores em 2007 motivou a elaboração de uma hipótese que terminou por não ser testada. No referido trabalho, os autores observaram que os novos neurônios produzidos no Giro Denteado do Hipocampo de camundongos são preferencialmente incorporados em traços de memória espacial recém-adquiridos. Essa conclusão foi tirada a partir da observação de que a maioria dos neurônios ativos (positivo para c-Fos) durante a execução de uma

tarefa de memória espacial era de células marcadas também por BrdU, que fora injetado algumas semanas ou dias antes do treino e teste da tarefa. Também foi observado nesse trabalho que o tempo ótimo entre a injeção de BrdU e sua colocalização aumentada com c-Fos é de 4 semanas, o que coincide com outros relatos de que os novos neurônios do Hipocampo amadurecem e se integram nas redes preexistentes nesse tempo (ESPOSITO et al., 2005; JESSBERGER; KEMPERMANN, 2003; PIATTI; ESPOSITO; SCHINDER, 2006). Com esses resultados, os autores conseguiram demonstrar que neurônios novos não apenas são recrutados durante uma tarefa de memória espacial e passam a fazer parte do traço de memória, como a maioria dos neurônios ativados durante a tarefa são os neurônios novos.

Com base nesses resultados, foi proposto que o mesmo paradigma experimental fosse utilizado para se verificar se os novos neurônios seriam preferencialmente recrutados no traço de memória social utilizando-se a metodologia de Kogan et al., 2000. BrdU seria injetado em camundongos 4 semanas antes da execução da tarefa de memória social e os animais seriam sacrificados uma hora e meia após o teste de memória social. Com isso, os novos neurônios marcados pela droga poderiam ser detectados em concomitância com a proteína c-Fos em fatias de Hipocampo. O que se esperaria, caso a memória social recrutasse diferencialmente neurônios novos do Hipocampo durante sua aquisição e reativação, seria que a maioria dos neurônios c-Fos⁺ fossem também BrdU⁺. Demonstrar que os neurônios novos do Hipocampo são preferencialmente incorporados no traço de memória social seria um primeiro passo na direção de se demonstrar que o déficit de memória social causado pelo isolamento social se deve à diminuição na proporção de novos neurônios produzidos no Giro Denteado de animais isolados, observada no presente trabalho.

No entanto, entrou em questão a incerteza sobre a participação do Hipocampo em memórias sociais. Apesar de os efeitos do isolamento social e do enriquecimento ambiental por objetos poderem ser observados no Hipocampo e de a memória social ser influenciada em camundongos submetidos a essas condições, há ainda na literatura evidências que apontam para a não participação dessa estrutura nesse tipo de memória.

Um dos estudos mais conhecidos das neurociências, o do paciente HM (SCOVILLE; MILNER, 1957), revelou que o Hipocampo pode estar envolvido em mais aspectos da memória do que apenas a formação de mapas espaciais. O paciente HM tinha epilepsia de lobo temporal resistente a tratamento por drogas e, por isso, teve que remover cirurgicamente ambos os seus lobos temporais, local onde se encontra o Hipocampo. Após a cirurgia, HM não se lembrava de nada do que havia se passado no período de algumas semanas previamente à cirurgia, e não foi mais capaz de formar novas memórias declarativas, como memórias sociais. Assim, apesar de se encontrar todos os dias com Brenda Milner, pesquisadora que acompanhou seu caso durante toda sua vida, ele precisava ser apresentado a ela novamente a cada encontro, o que fez até sua morte em 2008. Por outro lado, HM ainda se manteve capaz de aprender tarefas motoras e era capaz de se lembrar de séries de números por algum tempo, conquanto permanesse repetindo mentalmente os números durante esse tempo. Essas evidências revelaram que nem todos os tipos de memória dependem de um Hipocampo intacto. O caso do paciente HM foi uma das primeiras evidências sólidas de que uma função cerebral tão complexa como a formação e manutenção de memórias poderia estar subordinada a estruturas discretas no cérebro, e não difusamente distribuída por toda a extensão cerebral (SQUIRE, 2009). No entanto, Squire, 2009, também ressalta que, no trabalho original de Scoville e Milner, 1957, esses autores chamam a atenção para a impossibilidade de se associar diretamente o dano funcional observado no paciente HM

a uma única estrutura, uma vez que não apenas os Hipocampos, mas também os Giros Parahipocampais e as Amígdalas haviam sido removidos. Portanto, ainda que o caso do paciente HM tenha jogado uma primeira luz sobre a função do Hipocampo na memória, ainda muito precisava ser feito para a elucidação e discriminação de funções mais específicas de cada uma das estruturas removidas em HM.

Diversos trabalhos recentes têm tentado compreender o funcionamento das memórias sociais e se o Hipocampo tem papel fundamental ou não nessa função. O trabalho de Kogan et al., 2000, demonstrou que lesões bilaterais no Hipocampo promovem déficit de memória social. No entanto, nesse trabalho, apenas a memória de curto prazo (intervalo de 30 minutos entre treino e teste) foi testada para animais que tiveram o Hipocampo lesionado. Esse resultado é muito similar ao que se observou no paciente HM, que não conseguia reconhecer alguém após ter permanecido apenas alguns minutos sem ver a pessoa ou se sua atenção fosse desviada, mesmo que momentaneamente (SCOVILLE; MILNER, 1957).

Burton et al., 2000, por sua vez, mostraram que lesões no Hipocampo e Subículo (região que recebe inervação imediatamente da área CA1 do Hipocampo) de ratos não causaram déficit em uma tarefa de aprendizado social de preferência alimentar. Nessa tarefa, observa-se que ratos preferem alimentos que outros ratos tenham ingerido anteriormente e cujo odor tenha sido transmitido entre eles pela boca do animal que já se alimentara. Apesar de diferente da tarefa de reconhecimento social, essa tarefa envolve o aprendizado e reconhecimento de odores provenientes do alimento e a associação desses odores àqueles do coespecífico de quem se aprendeu a preferência alimentar. As diferenças observadas no efeito de lesões hipocampais nas duas tarefas (reconhecimento social e aprendizado social de preferência alimentar) podem ser explicadas pelas incongruências intrínsecas entre as tarefas, mas revelam também que o

hipocampo participa de formas diferentes em tarefas onde a habilidade de reconhecimento de odores sociais é importante.

Ainda em ratos, Squires et al., 2006, demonstraram, em estudo metodologicamente muito similar ao de Kogan et al., 2000, que lesões hipocâmpais não causavam déficit de memória social em animais mantidos agrupados. Em um estudo com multieletrodos registrando a atividade individual de neurônios no Giro Denteado do Hipocampo de ratos, von Heimendahl et al., 2012, não foram capazes de encontrar um número significativo de neurônios exclusivamente responsivos a coespecíficos (3 em 319 neurônios registrados).

Recentemente, dois trabalhos praticamente idênticos na sua concepção teórica, mas com abordagens diferentes, demonstraram que a região CA2 do Hipocampo é necessária para a formação de memórias sociais, mas não de memórias espaciais ou de medo (HITTI; SIEGELBAUM, 2014; STEVENSON; CALDWELL, 2014). Stevenson et al., 2014, realizaram lesões citotóxicas direcionadas à região CA2 do Hipocampo, enquanto Hitti e Siegelbaum, 2014, utilizaram optogenética para eliminar apenas a população de células piramidais de CA2. Em ambos os casos, o resultado foi que animais tratados não foram capazes de reconhecer coespecíficos previamente conhecidos. Não foi feito, no entanto, o desligamento temporário dos neurônios de CA2, em nenhum dos trabalhos, assim como aquele realizado por Gu et al., 2012, para a memória espacial. Portanto, não é possível saber em qual momento – aquisição, consolidação ou reativação – CA2 é mais relevante para a memória social.

Destaca-se do trabalho de Hitti e Siegelbaum, 2014, onde também foi observada conectividade de CA2 com núcleos aferentes e eferentes, que não há conexão direta dessa área com o Giro Denteado, e que ela recebe inervação diretamente do Córtex

Entorrinal Lateral, área dedicada ao processamento de informações não espaciais nesse córtex. Assim, é possível que quaisquer efeitos das manipulações ambientais da neurogênese adulta possam não ter seus efeitos sobre a memória social relacionados ao Hipocampo, uma vez que esse fenômeno se restringe, nessa estrutura, ao Giro Denteado. Vale ressaltar que neurogênese adulta ocorre também na Amígdala, e que os novos neurônios dessa área têm sido pouco investigados em relação à sua possível participação em memórias sociais.

Dessa forma, antes que se pudesse verificar se os novos neurônios do Hipocampo participariam preferencialmente na formação de uma memória social, foi necessário testar se o Hipocampo de fato seria recrutado diferencialmente durante o encontro social entre camundongos desconhecidos. O mapeamento das várias áreas observadas foi proposto de modo que, se o Hipocampo não se mostrasse diferencialmente ativado, outras áreas poderiam ser identificadas como tendo participação diferencial no encontro social.

Como já discutido anteriormente, a divisão da literatura acerca de memória social em dois conjuntos isolados de publicações teve consequências negativas na elaboração do presente trabalho. Devido a um inadvertido viés originalmente adotado por nós na busca por referências bibliográficas, a maioria dos trabalhos inicialmente utilizados fazia parte do grupo de artigos indexados sob o termo “memória social”, e praticamente toda a literatura sob o termo “reconhecimento social” foi ignorada em um primeiro momento. No entanto, após o início dos experimentos de ativação neuronal após encontro social, percebemos a existência do viés mencionado. Com isso, encontramos alguns trabalhos que já haviam se ocupado de analisar o padrão de expressão de c-Fos em camundongos e ratos expostos ou não a encontro social.

O primeiro trabalho encontrado foi o de Borelli et al., 2009, no qual os autores compararam o padrão de expressão de c-Fos em diversas áreas do cérebro de camundongos CD1 expostos a um juvenil ou a uma gaiola vazia por 20 minutos. Os autores observaram, assim como no presente trabalho, aumento significativo de células positivas para c-Fos nos núcleos Basolateral e Medial posterodorsal da Amígdala. Foram vistos aumentos também nos núcleos Pré-mamilar Dorsal e Ventral do Hipotálamo, os quais não foram analisados no presente trabalho (Figura 26a - esquerda). Nesse trabalho, também foi comparado o padrão de expressão de c-Fos de camundongos expostos a um juvenil conhecido ou a um juvenil desconhecido. Para essa comparação, os autores observaram diferenças em muito mais áreas cerebrais do que quando foi feita exposição a um juvenil desconhecido e uma gaiola vazia. As regiões onde houve diferença significativa foram as seguintes: Córtex Infra- e Pré-límbico, Córtex Piriforme, Núcleos Paraventricular e Pré-Mamilar Dorsal do Hipotálamo, Hipotálamo Lateral, Substância cinzenta periaquedutal porção ventrolateral, além dos dois núcleos da Amígdala onde já havia sido vista diferença no primeiro experimento (BLA e MeApd) (Figura 26a – direita). Em nenhum dos dois experimentos, vale ressaltar, foram vistas diferenças nas áreas do Hipocampo analisadas.

Os autores argumentam que o maior número de estruturas diferencialmente ativadas na tarefa que envolveu o reconhecimento de um camundongo conhecido contra a apresentação a um camundongo desconhecido pode significar que o reconhecimento, diferentemente da apreciação inicial de um estímulo social, recruta estruturas de processamento de mais alta ordem, como as áreas corticais diferencialmente ativadas. Ainda, os autores sugerem que possa ser necessária uma integração entre funções cognitivas e emocionais para que o reconhecimento seja feito de forma correta, ao passo

que apenas áreas de processamento primário e secundário sejam ativadas diferencialmente nos primeiros momentos após a apresentação de um estímulo social.

Em mais um experimento similar, Richter et al., 2005, viram que a exposição de um camundongo macho adulto da linhagem C57BL/6JOlaHsd a um juvenil desconhecido por 4 minutos ativou diferencialmente ainda mais áreas do que aquelas vistas no presente trabalho ou por Borelli et al., 2009. Esses autores verificaram também que a exposição a um odorante não social, a Carvona, promoveu algumas ativações diferenciais em áreas comuns àquelas ativadas pela exposição ao estímulo social, em relação à exposição a uma gaiola vazia, sem o odor. As áreas onde houve aumento de células positivas para c-Fos nos animais expostos a um juvenil foram: Camadas Granular e Mitral do AOB e do MOB, Amígdala Medial, Área Pré-Óptica Média e Córtex Piriforme. A exposição à Carvona induziu aumento na ativação neuronal apenas nas regiões amostradas do MOB, mas não do AOB nem na Amígdala. Ainda, houve redução na ativação do Córtex Piriforme, contrário ao que foi observado para a apresentação de estímulo social. Novamente, o Hipocampo não apresentou diferenças de ativação em nenhuma de suas áreas para nenhum dos estímulos olfativos (Figura 26b – acima).

Esses autores utilizaram um esquema semelhante àquele ilustrado na Figura 02 para tentar explicar como os diferentes estímulos olfativos, social e não social, ativam diferencialmente as regiões amostradas (Figura 26b - abaixo).

a. Borelli et al, 2009

Brain areas	EC/EC	EC/CD-1	Brain areas	CD-1/Same CD-1	CD-1/Novel CD-1
Telencephalic structures			Telencephalic structures		
PIL	16.04 ± 1.79	16.04 ± 4.06	PIL	13.48 ± 3.67	36.65 ± 7.47*
IL	8.14 ± 1.78	6.05 ± 1.53	IL	8.07 ± 1.89	21.01 ± 3.54*
AOM	21.04 ± 3.47	31.95 ± 4.11	AOM	22.20 ± 7.71	32.32 ± 5.96
AOP	19.95 ± 5.39	19.61 ± 5.20	AOP	31.72 ± 12.11	30.78 ± 9.01
Cg2	16.65 ± 3.24	17.27 ± 6.71	Cg2	11.91 ± 3.34	20.82 ± 4.68
LSL	5.05 ± 1.33	3.08 ± 0.65	LSL	1.78 ± 0.36	12.44 ± 2.74*
LSV	11.15 ± 2.41	12.08 ± 2.97	LSV	10.90 ± 3.80	24.85 ± 4.32*
MS	3.50 ± 0.87	4.72 ± 1.59	MS	6.41 ± 2.40	6.51 ± 2.11
Pir	27.12 ± 4.96	26.42 ± 5.01	Pir	18.28 ± 2.78	44.73 ± 11.20*
LEnt	11.16 ± 2.52	12.82 ± 3.85	LEnt	11.90 ± 1.62	18.22 ± 2.97
BLA	7.90 ± 1.46	15.67 ± 2.73*	BLA	10.82 ± 2.56	22.65 ± 4.09*
Ce	3.00 ± 0.98	1.87 ± 0.42	Ce	2.84 ± 0.67	4.88 ± 2.17
MeApd	8.36 ± 1.40	20.27 ± 3.83*	MeApd	10.96 ± 1.17	27.72 ± 5.13*
MeApv	10.83 ± 2.24	15.78 ± 2.91	MeApv	17.78 ± 1.27	21.16 ± 3.49
PMCo	10.25 ± 1.72	17.16 ± 5.38	PMCo	12.53 ± 1.88	18.42 ± 5.40
DG	6.75 ± 1.68	7.60 ± 0.84	DG	4.17 ± 1.28	7.50 ± 3.33
CA1	4.88 ± 1.23	5.53 ± 1.30	CA1	5.32 ± 1.41	5.50 ± 2.40
CA2	7.82 ± 1.95	7.71 ± 2.97	CA2	5.37 ± 2.31	8.96 ± 3.94
CA3	12.81 ± 2.81	10.73 ± 2.15	CA3	5.55 ± 1.99	12.86 ± 4.21
Diencephalic structures			Diencephalic structures		
PvN	27.88 ± 4.95	28.32 ± 5.22	PvN	28.29 ± 3.40	59.21 ± 4.17*
AHC	21.53 ± 4.16	25.79 ± 5.72	AHC	24.59 ± 4.96	25.10 ± 4.21
LH	14.32 ± 2.82	12.05 ± 3.00	LH	10.71 ± 2.21	19.82 ± 2.78*
DMH	24.56 ± 4.20	28.10 ± 3.92	DMH	21.54 ± 4.09	32.33 ± 6.92
VMHdm	8.22 ± 4.72	9.98 ± 4.12	VMHdm	4.83 ± 0.49	16.08 ± 2.13*
PH	17.76 ± 4.65	15.58 ± 3.70	PH	18.02 ± 5.63	29.53 ± 3.84
PMD	16.16 ± 2.31	28.17 ± 2.46*	PMD	17.09 ± 2.51	37.81 ± 8.03*
PMV	2.52 ± 0.96	14.40 ± 3.30*	PMV	31.94 ± 8.15	38.90 ± 5.59
Mesencephalic structures			Mesencephalic structures		
MnR	2.38 ± 0.52	4.01 ± 1.09	MnR	3.47 ± 1.76	5.60 ± 3.58
DRN	2.89 ± 1.00	3.12 ± 1.31	DRN	4.34 ± 1.35	3.97 ± 2.18
DMPAG	6.58 ± 1.35	6.13 ± 1.49	DMPAG	6.10 ± 1.01	9.53 ± 1.88
DLPAG	6.55 ± 1.43	7.89 ± 1.80	DLPAG	6.95 ± 2.70	11.29 ± 2.08
LPAG	13.32 ± 2.82	15.06 ± 2.87	LPAG	11.61 ± 3.37	21.28 ± 2.29
VLPAG	11.34 ± 2.04	11.93 ± 2.77	VLPAG	11.28 ± 2.25	26.12 ± 6.02*
SC	24.46 ± 3.86	28.96 ± 5.68	SC	26.01 ± 4.65	36.65 ± 4.99
CIC	17.44 ± 3.21	20.26 ± 5.77	CIC	14.40 ± 3.03	27.42 ± 5.37

* P < 0.05 compared to EC/EC group (Hest).

b. Richter et al, 2005

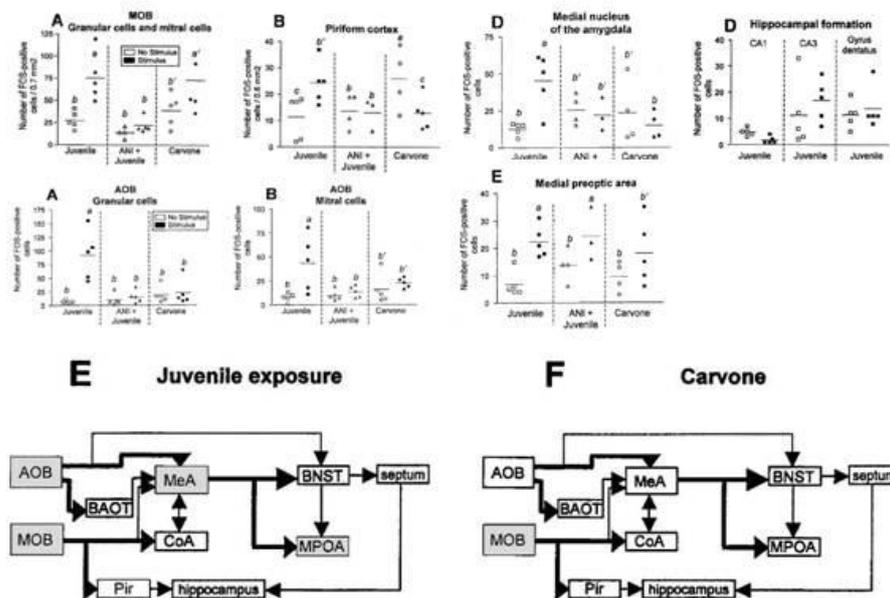


Figura 26: Reprodução dos gráficos e esquemas contendo os resultados dos trabalhos citados na discussão do efeito do encontro social na ativação cerebral em camundongos.

Um terceiro trabalho, de 2001, já havia demonstrado muito do que foi visto por Borelli et al., 2009, e Richter et al., 2005. Ferguson et al., 2001, observaram que a exposição de camundongos C57BL/6J a juvenis por 90 segundos ativa diferencialmente

os núcleos Cortical e Medial da Amígdala, o Córtex Piriforme, o Núcleo Basal da Estria Terminal e a Área Pré-Óptica Média. Os autores ainda testaram os dois Bulbos Olfatórios e o Hipocampo, mas não viram diferenças nessas áreas (Figura 27).

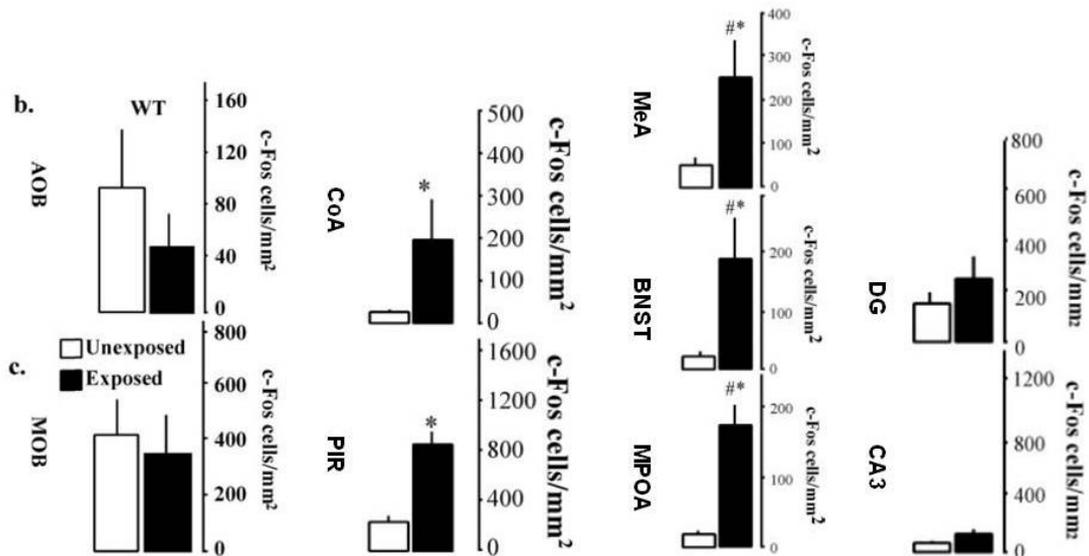


Figura 27: reprodução dos gráficos do trabalho de Ferguson et al., 2001.

É interessante notar que, apesar de alguns resultados contraditórios, em todos esses trabalhos a Amígdala Medial foi diferencialmente ativada após o encontro social, independente da linhagem ou tempo de exposição ao juvenil. Tendo isso em vista, os trabalhos de Richter et al., 2005, e Ferguson et al., 2001, e outros (GUR; TENDLER; WAGNER, 2014; SAMUELSEN; MEREDITH, 2011) demonstraram que interferir no funcionamento da Amígdala Medial afeta o desempenho em tarefas de memória social. Ferguson et al., 2001, verificaram que camundongos nocaute para oxitocina não são capazes de reconhecer coespecíficos, e que a injeção desse neurotransmissor na Amígdala Medial faz com que essa habilidade seja recuperada. Esses autores também observaram que a injeção de antagonistas oxitocinérgicos nessa porção da Amígdala promove os mesmos efeitos observados nos animais nocaute. No entanto, não foi observada diferença no comportamento se a injeção da droga antagonista fosse feita no Bulbo Olfatório, revelando que o efeito da oxitocina no reconhecimento social se dá

apenas na Amígdala Medial quando analisado o circuito inicial de transdução da informação olfativa social.

Richter et al., 2005, por sua vez, verificaram que a injeção sistêmica de Anisomicina, droga que bloqueia a síntese proteica, afeta negativamente a aquisição de novas memórias de reconhecimento social de uma maneira dependente do tempo em que a injeção é feita. Quando injetada 20 minutos antes, imediatamente após ou 6 horas após o treino, a Anisomicina foi capaz de impedir que o animal tratado reconhecesse um juvenil desconhecido 24 horas depois do treino. Quando a injeção foi feita 3 horas ou 18 horas após o treino, o mesmo efeito não foi observado. Apesar de não terem sido feitas injeções diretamente na Amígdala Medial, observou-se que a Anisomicina bloqueou o aumento da ativação neuronal visto nesse núcleo após o encontro social com juvenil desconhecido. O mesmo foi observado para os aumentos vistos nas áreas do MOB e AOB e no Córtex Piriforme, mas não na Área Pré-Óptica Medial (Figura 26b – acima). Em estudo recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, Pena et al., 2014, observaram que injeções de Anisomicina diretamente no Hipocampo de camundongos 3 horas após o treino, mas não imediatamente ou 6 horas depois, foi capaz de impedir a formação de memória social de longa duração. Já injeções diretas no Bulbo Olfatório promoveram déficit de memória social nos mesmos tempos que foram vistos por Richter et al., 2005. Os autores argumentam que o Hipocampo possa ter uma participação tardia no processo de consolidação de memórias sociais, o que aconteceria apenas 3 horas depois do encontro social. Essa hipótese pode ser também defendida com base nas evidências de que o Hipocampo não foi diferencialmente ativado em nenhum dos experimentos já citados em que o número de células c-Fos positivas foi quantificado imediatamente após o treino ou teste da memória social, mas que sua lesão

completa (KOGAN et al., 2000) ou parcial (STEVENSON; CALDWELL, 2014) prejudica a capacidade de reconhecimento social em roedores.

O conjunto de evidências expostos traçam um cenário onde o AOB, o MOB e a MeA possuem participação imediata no processamento de estímulos olfativos sociais e que sua lesão, inativação ou modificação neuroquímica levam a déficit de memória social de longo prazo. O Hipocampo, por sua vez, parece ter participação no processo de consolidação de memórias sociais, mas não participa nem da aquisição, nem da reativação dessas memórias.

Correlação de áreas ativadas

O presente trabalho destaca-se dos demais que também quantificaram a ativação neuronal após encontro social entre camundongos desconhecidos, pois foi o único em que foi feita uma análise da correlação da ativação das diferentes áreas analisadas nos animais de cada grupo e também com o tempo de exploração de cada animal exposto a um juvenil.

Os resultados da análise de correlação aqui obtidos (Tabelas 01-04 e Figura 20) revelam uma estruturação das ativações correlacionadas bastante diferente nos dois grupos analisados (JuA e GV). No grupo JuA, observa-se que houve uma estruturação das correlações em dois módulos, e que muitas das estruturas analisadas não se correlacionaram com nenhuma outra estrutura. Em um dos módulos, destaca-se a presença de várias áreas do Hipocampo (CA1v, CA2v, CA3d e CA3v) com correlações entre si e com áreas do Bulbo Olfatório (AOB, GR e GL). Nenhuma estrutura do Hipocampo apresentou correlação com as estruturas da Amígdala cuja atividade se encontrou aumentada após o encontro social, nem com a camada Mítral do Bulbo

Olfatório, as quais são a principal saída de informação do Bulbo Olfatório para o restante do cérebro.

No outro módulo visto para o grupo JuA e conectado ao primeiro pela Camada Mitral do MOB, o Hipotálamo Lateral apresentou correlação de sua atividade com 5 outras estruturas (BLA, IL, PL, PVN e DGt), as quais também tiveram sua atividade correlacionada entre si de diferentes maneiras. Destacam-se as correlações entre BLA e PL e MeApd e IL. Os córtices Infra- e Pré-Límbico participam de comportamentos motivacionais dependentes de atenção e relacionados com o contexto emocional da tarefa. O PL, particularmente, possui conexão direta com a Amígdala Basolateral (ao que provavelmente se deve a correlação positiva entre essas estruturas vista nos resultados aqui apresentados) e possui conectividade ideal com outras estruturas para que sua função seja de integração de informação passada e futura, incluindo a qualidade emocional das informações (Revisado por VERTES, 2006).

As estruturas hipotalâmicas analisadas e que apresentaram correlação com outras estruturas também possuem função importante na modulação periférica de comportamentos emocionais. O PVN é responsável pela liberação do fator de liberação de corticotropina no eixo hipofisário-adrenal, o qual modula a produção e liberação de hormônios relacionados com estados emocionais variados, comportamentos sexuais, dentre outros (BOSCH et al., 2009; HEINRICH, 2003). O Hipotálamo Lateral, por sua vez, está envolvido em comportamentos agressivos entre coespecíficos (FERRIS; DELVILLE, 1994). A correlação negativa observada entre a Camada Mitral do MOB e o PVN pode indicar que o processamento dos estímulos sociais no MOB promoveu, ao longo dos 5 minutos de interação entre os animais desconhecidos, uma diminuição da ativação do PVN. Assim, essa área, potencialmente envolvida em respostas agonísticas, foi modulada negativamente pela área sensorial primária, de modo que não houve

agressividade entre os animais e sim comportamentos exploratórios de reconhecimento. O mesmo pode ser estendido para o IL e para o LH, visto que as correlações entre a Camada Mitral do MOB e essas áreas foram direta ou indiretamente negativas.

Também é interessante a forte correlação negativa observada entre a atividade da MeApd e da Camada Mitral do Bulbo Olfatório ($R^2 = -0,95$). Esse resultado está de acordo com o que foi observado por Gur et al., 2014. Esses autores verificaram que a estimulação teta (100Hz) do AOB promove Depressão de Longo Prazo (LTD – *long-term depression*) na MeA, de forma dependente de Ocitocina, neurotransmissor presente em grande parte dos neurônios desse núcleo. Se realizada previamente à exposição de um indivíduo a um juvenil em uma tarefa de reconhecimento social, a estimulação teta abole a capacidade de o adulto de se lembrar do juvenil após 30 minutos. De acordo com os autores, a estimulação olfativa proveniente do juvenil teria resultado similar à estimulação teta no AOB, e a informação seria codificada na MeA por meio do LTD. Assim, o estabelecimento artificial prévio de LTD na MeA impediria a codificação correta do estímulo olfativo relevante para formação da memória. Os nossos resultados também apontam para um acoplamento entre BO e MeA em que o aumento da atividade das células Mitrals do BO reflita-se em uma diminuição da atividade da MeA exclusivamente quando se trata de um estímulo social. A mesma correlação negativa não foi observada nos animais expostos apenas a uma gaiola vazia, o que corrobora essa hipótese.

Nos animais expostos apenas à gaiola vazia não há uma estruturação dos pares de correlação tão evidente quanto se vê nos animais do grupo JuA. Observa-se, nesses animais, a formação de pequenos módulos de correlações comuns entre estruturas, e um módulo maior, mas relativamente difuso, envolvendo algumas estruturas do Hipocampo, Bulbo Olfatório, LH e BLA. Nota-se que poucas estruturas não

apresentaram correlação com nenhuma outra, diferente do que foi observado para o grupo JuA.

O estabelecimento dos módulos de correlação vistos no grupo JuA, baseado no que foi discutido acima sobre as estruturas envolvidas, e em comparação com o que se observou para o grupo GV, evidencia que o encontro social foi capaz de promover uma mobilização de estruturas específicas que, pode-se imaginar, passaram a responder de forma semelhante e coordenada. Não é possível afirmar com esses resultados que tenha havido alterações em parâmetros eletrofisiológicos das estruturas analisadas, como coerência de fase ou de amplitude. No entanto, as observações feitas no presente trabalho fomentam a elaboração de novos paradigmas experimentais, utilizando ferramentas mais precisas de avaliação da atividade neuronal durante o encontro social, de modo que as hipóteses aqui levantadas possam ser testadas.

6. CONCLUSÕES

- O isolamento social de uma semana é capaz de afetar a neurogênese adulta e a proliferação no Giro Denteado de camundongos, mas não no Bulbo Olfatório;
- O enriquecimento ambiental por odores sociais é capaz de evitar os efeitos causados pelo isolamento ambiental de uma semana;
- Existem diferenças de proliferação e neurogênese entre as áreas ventral e dorsal do Hipocampo;
- O encontro social recruta diferencialmente dois núcleos da Amígdala: Lateral posterodorsal e Basolateral;
- O encontro social promove correlação da ativação neuronal estruturada entre diversas áreas de processamento primário e secundário do cérebro de camundongos.

7. REFERÊNCIAS

ALTMAN, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? **Science**, 1962.

ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. **The Anatomical record**, v. 145, p. 573–591, abr. 1963.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **The Journal of comparative neurology**, v. 137, n. 4, p. 433–457, dez. 1969.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 124, n. 3, p. 319–335, jun. 1965.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Postnatal Neurogenesis in the Guinea-pig. **Nature**, v. 214, n. 5093, p. 1098–1101, jun. 1967.

ARAKAWA, H. et al. A new test paradigm for social recognition evidenced by urinary scent marking behavior in C57BL/6J mice. **Behavioural brain research**, v. 190, n. 1, p. 97–104, jun. 2008.

ARRUDA-CARVALHO, M. et al. Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 42, p. 15113–27, out. 2011.

BAYER, S. A. Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: A correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. **Experimental Brain Research**, v. 46, n. 3, p. 315–323, 1982.

BAYER, S. A.; YACKEL, J. W.; PURI, P. S. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. **Science**, v. 216, n. 4548, p. 890–892, maio 1982.

BELLUSCIO, L. et al. A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. **Cell**, v. 97, n. 2, p. 209–220, 1999.

BENGOETXEA, H. et al. Enriched and deprived sensory experience induces structural changes and rewires connectivity during the postnatal development of the brain. **Neural plasticity**, v. 2012, p. 305693, jan. 2012.

BLUTHÉ, R. M.; DANTZER, R. Role of the vomeronasal system in vasopressinergic modulation of social recognition in rats. **Brain research**, v. 604, n. 1-2, p. 205–10, fev. 1993.

BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Expression of c-Fos in response to stressogenic stimuli in the amygdala of old vs . young rats – a preliminary study. p. 191–194, 2005.

- BORELLI, K. G. et al. Neural correlates of scent marking behavior in C57BL/6J mice: detection and recognition of a social stimulus. **Neuroscience**, v. 162, n. 4, p. 914–23, set. 2009.
- BOSCH, O. J. et al. The CRF system mediates increased passive stress-coping behavior following the loss of a bonded partner in a monogamous rodent. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 6, p. 1406–1415, maio 2009.
- BOYSE, E.; BEAUCHAMP, G.; YAMAZAKI, K. The genetics of body scent. **Trends in Genetics**, v. 3, n. 4, 1987.
- BRENNAN, P. A; KENDRICK, K. M. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1476, p. 2061–78, dez. 2006.
- BRENNAN, P. A; ZUFALL, F. Pheromonal communication in vertebrates. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 308–15, nov. 2006.
- BURTON, S. et al. Combined lesions of hippocampus and subiculum Do not produce deficits in a nonspatial social olfactory memory task. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 14, p. 5468–75, jul. 2000.
- CHEETHAM, S. A et al. The genetic basis of individual-recognition signals in the mouse. **Current biology : CB**, v. 17, n. 20, p. 1771–7, out. 2007.
- DRAGUNOW, M.; BAG, P. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. v. 29, p. 261–265, 1989.
- DRANOVSKY, A. et al. Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 908–23, jun. 2011.
- DREW, M. R.; DENNY, C. A.; HEN, R. Arrest of adult hippocampal neurogenesis in mice impairs single- but not multiple-trial contextual fear conditioning. **Behavioral neuroscience**, v. 124, n. 4, p. 446–454, ago. 2010.
- DUAN, X. et al. Development of neural stem cell in the adult brain. **Current opinion in neurobiology**, v. 18, n. 1, p. 108–15, fev. 2008.
- ERIKSSON, P.; PERFILIEVA, E. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, 1998.
- ERIKSSON, P. S.; WALLIN, L. Functional consequences of stress-related suppression of adult hippocampal neurogenesis – a novel hypothesis on the neurobiology of burnout. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 110, n. 5, p. 275–280, nov. 2004.
- ESPOSITO, M. S. et al. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 44, p. 10074–10086, nov. 2005.

- FANSELOW, M. S.; DONG, H.-W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7–19, jan. 2010.
- FEIERSTEIN, C. E. et al. Disruption of Adult Neurogenesis in the Olfactory Bulb Affects Social Interaction but not Maternal Behavior. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 4, n. December, p. 176, jan. 2010.
- FERRIS, C. F.; DELVILLE, Y. Vasopressin and serotonin interactions in the control of agonistic behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, n. 5-7, p. 593–601, 1994.
- FOWLER, C. D. et al. The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. **Journal of neurobiology**, v. 51, n. 2, p. 115–28, maio 2002.
- GOULD, E. et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 260–5, mar. 1999.
- GRÉGOIRE, C.-A. et al. Untangling the influences of voluntary running, environmental complexity, social housing and stress on adult hippocampal neurogenesis. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e86237, jan. 2014.
- GU, Y. et al. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. **Nature neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 1700–1706, dez. 2012.
- GUR, R.; TENDLER, A.; WAGNER, S. Long-term social recognition memory is mediated by oxytocin-dependent synaptic plasticity in the medial amygdala. **Biological psychiatry**, v. 76, n. 5, p. 377–86, set. 2014.
- GUSMÃO, I. D. et al. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 2, p. 440–6, mar. 2012.
- HEINRICHS, S. C. Modulation of social learning in rats by brain corticotropin-releasing factor. **Brain research**, v. 994, n. 1, p. 107–114, dez. 2003.
- HITTI, F. L.; SIEGELBAUM, S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 88–92, abr. 2014.
- HURST, J. L. et al. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. **Nature**, v. 414, n. 6864, p. 631–634, 2001.
- IBI, D. et al. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. **Journal of neurochemistry**, v. 105, n. 3, p. 921–32, maio 2008.
- ISHIKAWA, R. et al. Time-dependent enhancement of hippocampus-dependent memory after treatment with memantine: Implications for enhanced hippocampal adult neurogenesis. **Hippocampus**, v. 24, n. 7, p. 784–93, jul. 2014.

JESSBERGER, S.; KEMPERMANN, G. Adult-born hippocampal neurons mature into activity-dependent responsiveness. **The European journal of neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 2707–2712, nov. 2003.

JULIUS, D.; NATHANS, J. Signaling by sensory receptors. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 1, p. a005991, jan. 2012.

KITAMURA, T. et al. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 814–27, nov. 2009.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. **Hippocampus**, v. 10, n. 1, p. 47–56, jan. 2000.

KRECH, D. et al. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 55, p. 429–437, dez. 1960.

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

LEIN, E. S. et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. **Nature**, v. 445, n. 7124, p. 168–76, jan. 2007.

LIEBERWIRTH, C. et al. Social isolation impairs adult neurogenesis in the limbic system and alters behaviors in female prairie voles. **Hormones and behavior**, v. 62, n. 4, p. 357–66, set. 2012.

LIN, S. D. Y.; BLOCK, E.; KATZ, L. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. **Nature**, v. 434, n. March, 2005.

LISMAN, J. Formation of the non-functional and functional pools of granule cells in the dentate gyrus: role of neurogenesis, LTP and LTD. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 8, p. 1905–9, abr. 2011.

LU, L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 2, p. 600–609, out. 2003.

MA, D. et al. Selective ablation of olfactory receptor neurons without functional impairment of vomeronasal receptor neurons in OMP-ntr transgenic mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 12, p. 2317–2323, dez. 2002.

MING, G.-L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687–702, maio 2011.

MONTEIRO, B. M. M. et al. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. **Hippocampus**, v. 24, n. 2, p. 239–48, fev. 2014.

- MOSER, M. B.; MOSER, E. I. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 8, n. 6, p. 608–619, 1998.
- MUCIGNAT-CARETTA, C.; REDAELLI, M.; CARETTA, A. One nose, one brain: contribution of the main and accessory olfactory system to chemosensation. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 6, n. November, p. 46, jan. 2012.
- NAGAYAMA, S.; HOMMA, R.; IMAMURA, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. September, p. 1–19, set. 2014.
- NAKASHIBA, T. et al. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. **Cell**, v. 149, n. 1, p. 188–201, mar. 2012.
- PENA, R. R. et al. Anisomycin administered in the olfactory bulb and dorsal hippocampus impaired social recognition memory consolidation in different time-points. **Brain research bulletin**, v. 109C, p. 151–157, out. 2014.
- PEREDA-PÉREZ, I. et al. Long-term social isolation in the adulthood results in CA1 shrinkage and cognitive impairment. **Neurobiology of learning and memory**, v. 106, p. 31–9, nov. 2013.
- PIATTI, V. C.; ESPOSITO, M. S.; SCHINDER, A. F. The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 463–468, dez. 2006.
- REIF, A. et al. Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 885–895, ago. 2004.
- RICHTER, K.; WOLF, G.; ENGELMANN, M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 12, n. 4, p. 407–13, 2005.
- ROBERTS, L. Post-weaning social isolation of rats leads to a diminution of LTP in the CA1 to subiculum pathway. **Brain Research**, v. 991, n. 1-2, p. 271–273, nov. 2003.
- ROCHEFORT, C. et al. Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory. v. 22, n. 7, p. 2679–2689, 2002.
- ROSENZWEIG, M.; KRECH, D. Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. **Journal of comparative ...**, 1962.
- SAMUELSEN, C. L.; MEREDITH, M. Oxytocin antagonist disrupts male mouse medial amygdala response to chemical-communication signals. **Neuroscience**, v. 180, p. 96–104, abr. 2011.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nat Meth**, v. 9, n. 7, p. 676–682, jul. 2012.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11–21, fev. 1957.

SEKIGUCHI, R.; WOLTERINK, G.; VAN REE, J. M. Analysis of the influence of vasopressin neuropeptides on social recognition of rats. **European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 1, n. 2, p. 123–6, maio 1991.

SILVOTTI, L. et al. A recent class of chemosensory neurons developed in mouse and rat. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24462, jan. 2011.

SNYDER, J. S.; KEE, N.; WOJTOWICZ, J. M. Effects of Adult Neurogenesis on Synaptic Plasticity in the Rat Dentate Gyrus Effects of Adult Neurogenesis on Synaptic Plasticity in the Rat Dentate Gyrus. **Journal of neurophysiology**, v. 85, n. February, p. 2423–2431, 2001.

SQUIRE, L. The legacy of patient HM for neuroscience. **Neuron**, v. 61, n. 1, p. 6–9, 2009.

SQUIRES, A. S. et al. Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. **Neurobiology of learning and memory**, v. 85, n. 1, p. 95–101, jan. 2006.

STEVENSON, E. L.; CALDWELL, H. K. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. **The European journal of neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 3294–301, nov. 2014.

STRANAHAN, A. M.; KHALIL, D.; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 4, p. 526–33, abr. 2006.

TALANI, G.; BIGGIO, G.; SANNA, E. Enhanced Sensitivity to Ethanol-Induced Inhibition of LTP in CA1 Pyramidal Neurons of Socially Isolated C57BL/6J Mice: Role of Neurosteroids. **Frontiers in endocrinology**, v. 2, n. October, p. 56, jan. 2011.

THOR, D.; HOLLOWAY, W. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of Comparative and Physiological ...**, v. 96, n. 6, p. 1000–1006, 1982.

TONG, M. T.; PEACE, S. T.; CLELAND, T. A. Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. July, p. 238, jan. 2014.

VALLEY, M. T. et al. Ablation of mouse adult neurogenesis alters olfactory bulb structure and olfactory fear conditioning. **Frontiers in neuroscience**, v. 3, p. 51, 2009.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427–31, nov. 1999.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030–1034, fev. 2002.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1–20, set. 2006.

VÕIKAR, V. et al. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. **Genes, brain, and behavior**, v. 4, n. 4, p. 240–52, jun. 2005.

VON HEIMENDAHL, M.; RAO, R. P.; BRECHT, M. Weak and nondiscriminative responses to conspecifics in the rat hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 32, n. 6, p. 2129–41, fev. 2012.

WICHER, D. Functional and evolutionary aspects of chemoreceptors. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 6, n. October, p. 48, jan. 2012.

WOJTOWICZ, J. M.; KEE, N. BrdU assay for neurogenesis in rodents. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1399–405, jan. 2006.

WYATT, T. D. Pheromones and animal behaviour. In: **Pheromones and animal behaviour**. [s.l.] Cambridge University Press, 2003. p. 1–22.

YAMAZAKI, K.; BEAUCHAMP, G.; WYSOCKI, C. Recognition of H-2 types in relation to the blocking of pregnancy in mice. **Science**, v. 221, n. 10, p. 10–12, 1983.