

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

BRISA MARINA DE MEIRELES MONTEIRO

**PAPEL DA NEUROGÊNESE NOS EFEITOS
PROMNÉSICOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO
SOBRE A MEMÓRIA SOCIAL**

Belo Horizonte
2012

BRISA MARINA DE MEIRELES MONTEIRO

**PAPEL DA NEUROGÊNESE NOS EFEITOS
PROMNÉSICOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO
SOBRE A MEMÓRIA SOCIAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Fabrício Araújo Moreira

Belo Horizonte
2012

Dedico este trabalho a
Deus e as pessoas que mais
amo neste mundo: Mãe, Pai,
Cris, tia Shirlei, Maria Fernanda
e Athos.

“Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin

Agradeço primeiramente a **Deus** por me conceder a vida, por me dar sabedoria para que eu pudesse alcançar aquilo que almejei, por me abençoar em tudo o que eu me propus até hoje a fazer, e especialmente por me conceder uma família maravilhosa e me permitir conhecer pessoas incríveis.

Agradeço a todos da minha família por me apoiarem em todas as minhas decisões, por serem meus maiores incentivadores e por estarem comigo sempre. Em especial minha **mãezinha**, minha melhor amiga e a minha fã número 1, que vibra com minhas vitórias, que chora junto comigo durante as dificuldades, que me coloca para cima quando me faltam forças e que sempre me faz sentir a melhor pessoa do mundo! Meu **pai**, que do seu jeito tímido e discreto sempre ressalta as minhas virtudes, se orgulha de minhas conquistas e me acompanha em todas as etapas da minha vida. Agradeço também ao meu irmão **Lucas Cristal**: uma vez o agradei “simplesmente por existir” e muitas pessoas vieram me questionar esta frase, entretanto, ela resume todo o meu agradecimento ao irmão mais lindo que eu pude ter. Eu o amo e sou eternamente grata, pelo simples fato de ele existir em minha vida e torná-la mais completa e feliz.

Agradeço também a minha **tia Shirlei** por ser minha segunda mãe, me apoiando quando foi preciso, incentivando-me se necessário e educando-me com seu jeito inibido, porém bem marcante. Agradeço-a também por me presentear com a aFILHAda mais especial que eu poderia ter. Todos os dias quando chegava em casa, as vezes cansada ou mesmo chateada pelos percalços da vida eu renovava minhas forças no sorriso, no encanto, em cada gesto sincero da **Maria Fernanda**. Ela me olhava de forma ingênua e me amava independente se eu tinha conseguido ou não um “asterisco”, isso me fazia sentir a pessoa mais especial deste mundo e me fazia também esquecer todos os meus problemas. Obrigada meu bebê por fazer a minha vida melhor!

Quero também agradecer imensamente ao meu amor, amigo, irmão, companheiro e namorado **Athos**. Esse sim vivenciou cada passo desta e de outras caminhadas, foram longas ligações, desabafos sem fim, momentos de ausência, mas em meio a tudo isso ele sempre esteve comigo, sempre me apoio, sempre foi paciente e sempre tinha uma palavra de consolo e esperança para me ajudar. Te amo muito! Quero também agradecer aos meus **sogros** e meus **cunhados** por me acolherem e por me fazerem sentir como se fosse realmente da família. Em especial minha sogra, que me alimentou tantas vezes com aquelas marmitas deliciosas, que sempre torceu por mim e acreditou que eu conseguiria. Agradeço a todos os outros membros da minha família em especial a **Vá, Serjão, Vanessita, Tia Leninha, Amarelão e Juliana**, obrigado pelo apoio, carinho e pela presença de sempre.

Agradeço a minha eterna professora e grande amiga **Raquel Vasconcelos** por ter sido a maior incentivadora para que eu fizesse o mestrado, pelas palavras de apoio e ânimo, por acreditar sempre em mim, pela

amizade a mim despendida e por toda ajuda concedida. Agradeço também a professora **Janice Henriques da Silva** pela confiança, pela ajuda e por me permitir conhecer a professora **Grace Schenatto Pereira Moraes**, minha orientadora, que abriu as portas do NNC para mim, mesmo sem me conhecer, que apostou em mim, que confiou que eu daria conta e acima de tudo que sempre me ajudou com tudo o que eu precisei. Serei eternamente grata a ela pela chance concedida e por todo incentivo e apoio. Agradeço ao meu co-orientador, **Fabício Araújo Moreira** pelas contribuições valiosas e por toda ajuda prestadas ao longo deste trabalho.

Agradeço também aos professores do NNC pelas colaborações e por estarem sempre dispostos a me ajudar: **Márcio Flávio Dutra Moraes, André Ricardo Massensini e Juliana Carvalho Tavares**. Agradeço aos amigos do NNC pelas ajudas, pelas distrações, pelo acolhimento e pelas amizades: **Isabela, Cristiane, Aila, Marina, Luciana (bomba), Thiago Lazaroni, Felipe, Daniela Fontes, Talita, Brunão, Mauro, Onésia, Natália, Marcelo, Thiago Vitareli, Daniel, Gabriel, Leandro, João, Flávio, Gustavo Rezende e Lopes, Márcio Rabelo, Patrícia, André Lockman** e professor **Antônio**. Em especial: **Guilherme Cornélio, Cristina Fonseca, Hércules, Danielle Bernardes e Luciana** (né Lu!) por me fazerem rir muito, pela confiança em mim depositada, por todos os momentos compartilhados, por toda ajuda, e principalmente pela amizade. E mais especialmente ainda a **Aninha**, minha amiga SWISS, que me ajudou em tudo o que eu precisei, que me alimentou com tantas marmitas gostosas e que até aprendeu a tolerar a comida do bandex só para me fazer companhia, que foi minha confidente, que me divertiu inúmeras vezes com seu jeito “loucaaaa” de ser e que sempre esteve ao meu lado – no sentido literal e

figurado! Agradeço também aos demais amigos do ICB: **Maria Cecília, Rosária, Vânia, Lucas, Cibele, Aline, Nathália** e em especial a **Juliana Amaral**, outra “loucaaa” que eu gosto muito, obrigada por todos os momentos, pela amizade, pelas distrações, por me fazer rir tantas vezes e obrigada também pelos empréstimos de produtos e reagentes.

Agradeço aos amigos “**filhos da PUC**” pelo companheirismo de sempre, aos **professores da PUC**: mestres que levarei por toda a minha vida, que me moldaram uma profissional e que me impulsionaram a alcançar este objetivo. Em especial ao professor **Antônio Mourthe**, que abriu as portas do laboratório de Anatomia para mim, e que dessa maneira me ajudou a descobrir a magia do ensinar e a paixão pelo corpo humano. Agradeço ao **Marquinho** e ao **Selminho** por todo incentivo e apoio. Agradeço a minha amiga do coração **Érica Carolina** por estar sempre presente em minha vida. Agradeço a professora **Fabiane Ribeiro Ferreira** pela credibilidade, pela ajuda com a escrita da dissertação, por me ouvir, me aconselhar e por estar sempre disposta a me ajudar. Também agradeço a Fabiane por ter me permitido conhecer o senhor **Gehard** e a dona **Franziska**, os quais eu agradeço por todo carinho a mim dedicado nestes pouco mais de 2 anos, por serem meus ouvintes incansáveis, pelas palavras de ânimo, pela amizade a mim presenteada e pela ajuda com a correção da dissertação!

No mais obrigado a tantos outros que de uma forma ou de outra me ajudaram a ser quem eu sou, e a chegar aonde eu cheguei. A caminhada pode ser longa e árdua, mas quando se tem amigos tudo fica mais fácil! Amo cada um de vocês!!!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT.....	XIX
1- INTRODUÇÃO	
1.1- MEMÓRIA.....	20
1.1.1- Formação das memórias.....	21
1.2- CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS.....	22
1.2.1- Quanto à duração.....	23
1.2.2- Quanto ao conteúdo.....	24
1.3- MEMÓRIA SOCIAL: INTERAÇÃO E REDE.....	25
1.3.1- Estímulos olfatórios e memória social.....	28
1.3.2- Condições ambientais e memória - isolamento social.....	30
1.3.3- Ambiente enriquecido e memória.....	33
1.4- NEUROGÊNESE.....	36
2- JUSTIFICATIVA.....	42
3- OBJETIVOS	
3.1- OBJETIVO GERAL.....	44
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4- MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1- ANIMAIS.....	46
4.1.1- Grupos experimentais e condições de habitação.....	46
4.2- TAREFA DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....	48
4.3- LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	50
4.4- TESTE DO CHOCOLATE.....	51

SUMÁRIO

4.5-	ADMINISTRAÇÃO DE BrdU.....	52
4.6-	ADMINISTRAÇÃO DE Ara-C.....	52
4.7-	PERFUSÃO E PREPARO DAS FATIAS.....	54
4.8-	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	56
	4.8.1- Técnica de fluorescência para a marcação BrdU ou dupla marcação NeuN/BrdU.....	56
4.9-	MICROSCOPIA E ANÁLISE DE IMAGENS.....	57
5.0-	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	
	Protocolo 1- Avaliação da Memória social de curta duração.....	60
	Protocolo 2- Avaliação da Memória social de longa duração.....	61
	Protocolo 3- Avaliação do comportamento tipo ansiedade em animais isolados e agrupados.....	62
	Protocolo 4- Avaliação da taxa de neurogênese no giro denteado do hipocampo	63
	Protocolo 5- Avaliação da Memória social de longa duração 10 dias após o treino	64
	Protocolo 6- Avaliação da Memória social de longa duração após interferência no processo de consolidação da memória.....	65
	Protocolo 7- Avaliação da taxa de neurogênese no bulbo olfatório.....	66
	Protocolo 8- Avaliação da capacidade olfatória.....	67
	Protocolo 9- Avaliação da Memória social de longa duração após infusão de AraC ou salina.....	68
	Protocolo 10- Avaliação da capacidade olfatória dos animais após a infusão de salina ou AraC.....	69
	Protocolo 11- Avaliação da proliferação celular no giro denteado e no bulbo olfatório dos animais após a infusão de salina ou AraC.....	70
5.1-	ANÁLISE ESTATÍSTICA	71

5.1-	MEMÓRIA SOCIAL.....	72
5.2-	AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE.....	75
5.3-	NEUROGÊNESE NO GIRO DENTEADO (GD) DO HIPOCAMPO.....	77
5.4-	MEMÓRIA SOCIAL DE LONGA DURAÇÃO: AP x AE.....	81
	5.4.1- Avaliação da memória social de longa duração 24 horas após a primeira exposição ao juvenil.....	82
	5.4.2- Persistência da memória social de longa duração.....	84
	5.4.3- Estabilidade da memória social de longa duração.....	86
5.5-	NEUROGÊNESE NO BULBO OLFATÓRIO (BO).....	89
5.6-	TESTE DO CHOCOLATE.....	93
5.7-	BLOQUEIO DA NEUROGÊNESE.....	95
	5.7.1- Memória social de longa duração.....	96
	5.7.2- Teste do chocolate.....	97
	5.7.3- Proliferação celular.....	98
	5.7.3.1- Proliferação celular no Giro Denteado (GD) do hipocampo.....	98
	5.7.3.2- Proliferação celular no Bulbo Olfatório (BO).....	99
	5.7.3.3- Confirmação do posicionamento da cânula.....	102
6-	DISCUSSÃO.....	104
7-	CONCLUSÕES.....	112
8-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
9-	ANEXO I	128

LISTA DE ABREVIATURA

- AE** - Animais agrupados em gaiolas enriquecidas
- AMPc** – Adenosina Monofosfato Cíclico
- AOB** - Bulbo Olfatório Acessório
- AP**- Animais agrupados em gaiolas padrão
- Ara-c** - Citosina-beta-D-arabinofuranosideo
- BDNF**- Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
- BO** – Bulbo Olfatório
- BrdU** – Bromodesoxiuridina
- CEBIO**- Centro de Bioterismo
- CETEA**- Comitê de Ética em Experimentação Animal
- CREB** – Elemento de Resposta à Ligação do AMPc
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EPM** – Labirinto em cruz elevado
- GL**- Glomerular
- GP** – Gaiola padrão
- GrE**- Granular Externa
- GrI**- Granular Interna
- GTM**- Giro Temporal Medial
- ICB**- Instituto de Ciências Biológicas
- I.P.**- Intra-peritonal
- IE** - Animais isolados em gaiolas enriquecidos
- IP**- Animais isolados em gaiolas padrão
- LTD** - Depressão de Longa Duração
- LTP**- Potenciação de Longa Duração
- M**- Mitral

MOS – Sistema Olfatório Principal

NCAM – Molécula de Adesão de Células Neurais

NMDA - N-metil D-Aspartato

NR1A – Subunidade do receptor do NMDA

PI- Plexiforme

PSA – Ácido Poli-siálico

PSANCAM – Molécula de Adesão de Células Neurais Poli-sialitada

RNA- Ácido Ribonucléico

RNAm- Ácido Ribonucléico Mensageiro

SGZ- Zona Subgranular do giro denteado

STS-P- Sulco Temporal supero-posterior (STS-P)

SVZ - Zona Subventricular dos ventrículos laterais

MCD- Memória de Curta Duração

MLD- Memória de Longa Duração

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

VLD- Ventrículo Lateral Direito

VLE- Ventrículo Lateral Esquerdo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema das interligações entre diversas áreas cerebrais com o sistema olfatório.....pag.39
- Figura 2.** Foto representativa dos grupos experimentais.....pag.47
- Figura 3.** Foto representativa do aparato utilizado na tarefa de reconhecimento social.....pag.49
- Figura 4.** Figura ilustrativa de uma mini bomba acoplada ao cateter de polipropileno e este acoplado a cânula de infusão.....pag.53
- Figura 5.** Figura ilustrativa do posicionamento da cânula dos mini-pumps osmóticos no ventrículo lateral.....pag.54
- Figura 6.** Foto de um animal com o mini-pump osmótico. Repare na bomba localizada abaixo da pele e no capacete de acrílico responsável por fixar a cânula.....pag.54
- Figura 7.** Figuras representativas das regiões selecionadas para a escolha das fatias utilizadas na imunofluorescência.....pag.55
- Figura 8.** Ilustração da série Z utilizada para a análise das imagens de imunofluorescência.....pag.57
- Figura 9-** Figura representativa do Bulbo Olfatório.....pag.58
- Figura 10-** Demonstração da contagem de células uma a uma pelo programa Image J.....pag.58
- Figura 11-** Representação dos passos para análise da camada granular interna do BO.....pag.59
- Figura 12-** Representação da forma de análise da camada granular interna do

BO.....pag.59

Figura 13- Desenho experimental: avaliação da memória social de curta duração em animais agrupados e isolados em gaiola padrão.....pag.60

Figura 14- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração em animais agrupados e isolados (gaiola padrão e ambiente enriquecido).....pag.61

Figura 15- Desenho experimental: avaliação do padrão tipo ansiedade em animais agrupados e isolados em gaiola padrão.....pag.62

Figura 16- Desenho experimental: avaliação da neurogênese do Giro Denteado do hipocampo nos animais agrupados e isolados (em gaiola padrão e enriquecidas).....pag.63

Figura 17- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração 10 dias após o treino em animais agrupados (gaiola padrão ou ambiente enriquecido).....pag.64

Figura 18 - Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração após interferência no processo de consolidação em animais agrupados (gaiola padrão ou ambiente enriquecido).....pag.65

Figura 19- Desenho experimental: avaliação da neurogênese no Bulbo Olfatório nos animais agrupados e isolados (em gaiola padrão e enriquecidas).....pag.66

Figura 20- Desenho experimental: avaliação da capacidade olfatória dos animais agrupados e isolados em gaiola padrão e ambiente enriquecido..pag.67

Figura 21- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração em animais isolados em ambiente enriquecido após infusão de AraC ou salina.....	pag.68
Figura 22- Desenho experimental: avaliação da capacidade olfatória dos animais isolados em ambiente enriquecido após infusão de salina ou AraC.....	pag.69
Figura 23- Desenho experimental: avaliação da neurogênese no giro denteado e no bulbo olfatório dos animais isolados em ambiente enriquecido após infusão de salina ou AraC.....	pag.70
Figura 24- Memória Social de curta duração não é afetada por 7 dias de isolamento social.....	pag.73
Figura 25- O isolamento social em gaiolas-padrão leva a déficit de memória social de longa duração, entretanto o ambiente enriquecido previni este déficit.....	pag.74-75
Figura 26 - O isolamento de 1 semana não aumenta a ansiedade dos animais.....	pag.76
Figura 27- Número de células BrdU/NeuN+/mm ² ao longo do eixo antero-posterior do Giro Denteado.....	pag.78-80
Figura 28- Número de células BrdU/NeuN+/mm ² na somatório dos valores dos eixos ântero-posteriores dos Giros Denteados analisados.....	pag.81
Figura 29- Os animais agrupados em ambiente enriquecido apresentam uma memória social de longa duração (24 horas após o treino) semelhante a dos	

animais agrupados em gaiola padrão.....	pag.83
Figura 30- O ambiente enriquecido aumenta a persistência da memória social de longa duração.....	pag.86
Figura 31- O ambiente enriquecido aumenta a resistência da memória social de longa duração.....	pag.88
Figura 32- Neurogênese no Bulbo Olfatório (BO).....	pag.91-93
Figura 33- O isolamento social prejudica o olfato e parece ser mais prejudicial para os animais em gaiolas padrão.....	pag.94
Figura 34- O bloqueador de neurogênese (AraC) levou a déficit de memória social de longa duração.....	pag.96-97
Figura 35- A droga inibidora de neurogênese (AraC) não afeta o olfato dos animais.....	pag.98
Figura 36- Número de células BrdU+/mm ² no Giro Denteado (GD).....	pag.99
Figura 37- Proliferação celular no Bulbo Olfatório (BO).....	pag.100-101
Figura 38- Figuras representativas do local de colocação da cânula para infusão da Salina ou do Arac.....	pag.103

RESUMO

A memória social pode ser definida como o conjunto de informações utilizadas para o reconhecimento de indivíduos da mesma espécie. Esta memória é essencial em muitas formas de interação social e pode ser modulada por fatores ambientais. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que o isolamento social prejudica a persistência da memória social e o enriquecimento do ambiente previne esse déficit. Nossa hipótese é de que o efeito promnésico do ambiente enriquecido sobre a memória social dos animais isolados deve-se ao aumento da neurogênese. Para testarmos esta hipótese, realizamos testes comportamentais para a avaliação da memória social, da ansiedade e do olfato; imunofluorescência para co-marcação BrdU/NeuN; e bloqueio farmacológico da neurogênese através da administração do agente anti-mitótico AraC. Nossos resultados demonstraram que o isolamento social de 1 semana prejudicou a memória social de longa duração (MLD), mas não alterou a memória social de curta duração ou a ansiedade de camundongos SWISS. O ambiente enriquecido preveniu o déficit de MLD e aumentou a taxa de neurogênese na região do giro denteado (GD) do hipocampo dos animais isolados, comprovando parcialmente nossa hipótese. Interessantemente, o ambiente enriquecido também aumentou a neurogênese no GD dos animais mantidos em agrupamento social, o que provavelmente refletiu na maior persistência e estabilidade da MLD destes animais. Também analisamos a funcionalidade e a neurogênese no bulbo olfatório (BO). No teste de olfato, os animais isolados tiveram um pior desempenho que foi parcialmente recuperado pelo ambiente enriquecido, porém não observamos diferença entre estes grupos quanto à neurogênese. Interessantemente, observamos um aumento de neurônios novos na camada granular externa do BO de animais agrupados em ambiente enriquecido. No entanto, o ambiente enriquecido não alterou a performance dos animais agrupados na tarefa de olfato. O inibidor de neurogênese, AraC, diminuiu a proliferação celular nas camadas granulares do BO e no GD. Além disso, o AraC prejudicou a memória dos animais isolados em ambiente enriquecido e não alterou o olfato. Nossos resultados comprovam nossa hipótese inicial de que o ambiente enriquecido previne o déficit de MLD em animais isolados através da modulação da neurogênese. Além disso, demonstramos que o ambiente enriquecido com estímulos sociais e não sociais é capaz de aumentar a neurogênese no GD e no BO, além de aumentar a estabilidade e a persistência da memória social. Por fim, demonstramos que não existe uma relação direta entre o olfato, pelo menos medido pelo teste do chocolate, e a taxa de neurogênese no BO o que estimula a reavaliação do papel da neurogênese no olfato.

Palavras-chave: memória social, isolamento social, ambiente enriquecido, neurogênese.

ABSTRACT

Social memory comprehends the information necessary to identify and recognize co-specifics. This kind of memory is essential in many forms of social interaction and is modulated by the environmental conditions. Previous studies from our laboratory showed that social isolation impairs the social memory persistence and that enriched environment (EE) prevents that deficit. Our working hypothesis is that the neurogenesis is the mechanism by which EE exerts promnesic effects on social memory. To address this hypothesis we used behavioral tests to evaluate social memory, anxiety and olfaction; immunofluorescence to label BrdU/NeuN positive neurons and pharmacological blockade of neurogenesis through the administration of the anti-mitotic agent AraC. Our results showed that one week of social isolation impaired long-term social memory (S-LTM), but not social short-term memory or anxiety in SWISS mice. The EE prevented the S-LTM deficit and increased the neurogenesis in the dentate gyros (DG) of the hippocampus of social isolated mice, which partially confirm our hypothesis. Interestingly, the EE also increased the neurogenesis in the DG of group-housed mice, which probably allowed S-LTM to be more persistent and stable in those mice. We also analyzed the functionality and the neurogenesis in the olfactory bulb (OB). In the olfactory behavioral test, named buried-food finding test, the social isolated mice have a worse performance that was partially recover by the EE, though we did not find difference between groups in the neurogenesis. Interestingly, we observed more new neurons in the external granular layer of the OB in the grouped-house mice maintained in the EE. However, the EE did not change the performance of these mice in the olfactory behavioral test. The AraC decreased the cellular proliferation in both granular layers of the OB and also in the DG. Furthermore, AraC impaired S-LTM, but not the olfaction. Taken together, our results confirm our hypothesis that the EE prevents the S-LTM deficit of social isolated mice by increasing neurogenesis. In addition, we showed that the somatory of the EE and social stimulus increases neurogenesis in the DG and OB, and also improves the social memory persistence and stability. Finally, our results indicate that there are no direct relation between olfaction, at least measured in the buried food-finding test, and the neurogenesis in the OB, which arouses the reassessment of the neurogenesis role on olfaction.

Key-words: social memory, social isolation, enriched environment, neurogenesis.

1- INTRODUÇÃO

1.1- MEMÓRIA

“O cérebro humano guarda bilhões de impressões, algumas fugazes, outras durante a vida inteira. Nós as chamamos memórias. Assim como as informações sensoriais que chegam são decompostas e então reconstruídas para formar percepções, também as percepções são novamente decompostas à medida que passam para dentro da memória. Cada fragmento é despachado para uma parte diferente de nossa vasta biblioteca interna. Mas, à noite quando o corpo descansa, esses fragmentos são tirados para fora do armazém, remontados e reprisados. Cada repassagem as grava mais fundo na estrutura neural, até chegar um momento em que às memórias e a pessoa que as guarda são efetivamente a mesma coisa (Carter R.,2007).”

O passado, as memórias, os esquecimentos voluntários não só dizem quem o indivíduo é, mas também quem ele pode ser. Ninguém é capaz de fazer algo que desconhece ou mesmo de projetar futuros possíveis com base em situações que nunca foram aprendidas. Por isso, as memórias são tão importantes, elas conferem a cada um a sua forma de ser e torna desta maneira cada ser humano ou animal como único, individual (Izquierdo I.,2002).

Embora as vivências de cada um sejam únicas. O indivíduo, como um ser social, também partilha de hábitos, costumes e tradições que são necessárias para o bem-estar e para a sobrevivência. Ou seja, em seu sentido mais amplo, memória abrange desde informações intrínsecas do indivíduo até histórias de cada cidade, país, povo ou civilização no qual ele está inserido (Izquierdo

I.,2002).

Em síntese a palavra “memória” pode ser definida como a capacidade dos animais, incluindo o homem, de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (Lent R.,2008).

1.1.1- Formação das memórias

A formação da memória envolve algumas etapas: a) aquisição, b) consolidação e c) evocação.

A *aquisição*, também conhecida como aprendizagem refere-se ao processo no qual as informações presentes no ambiente são detectadas pelos sistemas sensoriais. Durante os primeiros minutos ou horas após o contato com o estímulo a ser memorizado, as informações recém adquiridas tornam-se estáveis por meio de uma série de processos que envolvem síntese protéica e modificações sinápticas resultando na *consolidação* (Izquierdo I.,2002).

O termo *consolidação* foi apresentado há mais de 100 anos atrás por Muller e Pilzecker (1900) para indicar que após a aprendizagem, a memória está inicialmente em um estado lábil, mas que ao longo do tempo ela torna-se estável e resistente (McGaugh J.L.,2000; Izquierdo I.,2002; Dubai Y. 2004; Alberini C.M., 2011).

Entretanto, os mecanismos que envolvem a consolidação da memória só começaram a ser desvendados 70 anos depois. Em 1973, Timothy Bliss e Terje Lomo demonstraram em neurônios hipocampais de coelhos anestesiados, que a estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos produz um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. Tal aumento pode durar horas, dias ou meses. Esse padrão de respostas

neurais reforçadas e persistentes ficou conhecido como potenciação de longa duração ou *long-term potentiation* (LTP).

Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação do sistema nervoso, cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo. Numa analogia com a memória esses estímulos repetitivos são desencadeados pelo processo de aprendizagem (Izquierdo I.,2002; Blundon J. & Zakharenko S.,2008).

Após consolidadas, as informações recém aprendidas podem ser recuperadas num processo denominado de *evocação*, e desta maneira serem utilizadas na cognição e emoção.

Estudos feitos na última década demonstraram que as memórias ao serem evocadas podem tornar-se novamente instáveis por um tempo limitado. Durante esse tempo elas podem ser estabilizadas mais uma vez, num processo conhecido como *reconsolidação* da memória (Sara S.J., 2000; Monfils M. et al.,2009). Além disso, os circuitos neurais também podem ser desfeitos e refeitos gerando novas formas de aprendizado como a conhecida extinção da memória (Herry et al, 2010).

1.2- CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS

Há muitas classificações das memórias, mas basicamente elas podem ser classificadas quanto a sua duração e quanto ao seu conteúdo:

1.2.1- Quanto à duração

Durante a etapa de aquisição, se as informações a serem memorizadas não apresentam uma relevância emocional ou se serão utilizadas por pouco

tempo, o processo de retenção destas informações é curto, definindo esta memória como sendo uma memória de trabalho ou mesmo de curta duração.

As memórias de trabalho servem para manter durante alguns segundos, no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento. São importantes na aquisição e evocação de toda e qualquer outra memória por utilizarem de informações já armazenadas integrando-as às novas informações que estão sendo adquiridas e processadas continuamente. A memória de trabalho é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal, e este por sua vez se conecta a regiões como o córtex entorrinal, parietal superior e cíngulo anterior e hipocampo (Ericsson KA & Kintsch W,1995; Izquierdo I.,2002;Lent R.,2008).

As memórias de curta duração independem de síntese de RNA mensageiro (RNAm) e proteínas, permanecem por mais tempo, entre 30 minutos e 6 horas e são importantes em eventos um pouco mais duradouros. O hipocampo, o córtex entorrinal e o córtex parietal são estruturas importantes no processamento desta memória (Izquierdo I. et al.,1999; Izquierdo L.A. et al.,2002; Izquierdo I.,2002, Lent R.,2008).

Em algumas situações quando é necessário que as informações aprendidas sejam retidas por mais tempo, o processo de consolidação torna-se essencial para “arquivar” a nova informação, guardando-a por um tempo mais prolongado. Esta retenção mais duradoura pode durar horas, dias ou mesmo anos, caracterizando assim as chamadas memórias de longa duração. As áreas envolvidas no processamento destas memórias são as mesmas áreas que processam as memórias de curta duração (Izquierdo I.,2002, Lent R.,2008).

É importante elucidar que as memórias de curta duração não se referem

à fase inicial das memórias de longa duração. Ambas são fenômenos fisiológicos paralelos, diferentes e independentes. Essa separação entre os dois tipos de memória pode ser confirmada por experimentos que suprimem a de curta sem afetar a de longa (Izquierdo I. et al.,1999; Izquierdo L.A. et al.,2002; Richter et al.,2005;).

1.2.2- Quanto ao conteúdo

As memórias podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo basicamente em: operacionais, não-declarativas e declarativas. As memórias operacionais são utilizadas para armazenamento temporário das informações e estão intimamente envolvidas com as memórias de trabalho e de curta duração (Izquierdo I. & Medina J.H. 1997; Izquierdo I. et al.,1999; Izquierdo I.,2002; Lent R.,2008).

Já as memórias não-declarativas, de procedimento ou implícitas são aquelas que contêm informações das quais não se pode ter acesso consciente, referem-se a capacidades e habilidades motoras ou sensoriais, comumente chamadas de "hábito". Os circuitos responsáveis por estas memórias envolvem o núcleo caudado e o cerebelo, algumas ainda utilizam circuitos do lobo temporal (Izquierdo I. et al.,1999; Izquierdo L.A. et al.,2002; Izquierdo I.,2002; Lent R.,2008).

As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos são chamadas declarativas ou explícitas. São memórias adquiridas com plena intervenção da consciência. As principais estruturas nervosas responsáveis por estas memórias são o hipocampo e o córtex entorrinal, essas regiões se comunicam com o córtex cingulado e o córtex parietal. A área basolateral do núcleo amigdalóide e a amígdala são regiões moduladoras da formação de

memórias declarativas (Izquierdo I. et al.,1999; Izquierdo L.A. et al.,2002; Izquierdo I.,2002; Lent R.,2008).

As memórias declarativas podem ser semânticas quando contem informações a respeito do ambiente no qual o indivíduo está inserido ou podem ser episódicas quando contem informações acerca da própria vida do indivíduo e de eventos relacionados com ela. As memórias episódicas por sua vez podem ser subdivididas em mais duas categorias, *lembrança* e *familiaridade*. A primeira refere-se à recordação de eventos passados que incluem associações específicas e detalhes contextuais, enquanto a segunda refere-se à sensação de se já ter vivido um determinado evento no passado sem associações específicas e detalhes contextuais. Para melhor entendimento da *familiaridade* pode-se exemplificar com situações nas quais a face de uma pessoa não é estranha (sensação de já tê-la visto), entretanto, não há recordação sobre um lugar ou mesmo um dia em que se encontrou anteriormente com tal pessoa (Izquierdo I. et al.,1999; Izquierdo L.A. et al.,2002; Rugg M.D. & Yonelinas A.P., 2003; Wolk D.A. et al.,2008; Binder J.R. e Desai R.H.,2011).

1.3- MEMÓRIA SOCIAL: INTERAÇÃO E REDE

Dentre as informações que podem ser acessadas nas memórias declarativas está a habilidade de reconhecer indivíduos familiares e membros da mesma espécie. O tipo de memória utilizada nesta situação é denominada de Memória Social, que é por sua vez fundamental para o reconhecimento social. O reconhecimento social em qualquer espécie de animal é importante para muitas formas de interação social, incluindo a reprodução, a criação de domínio e de hierarquias dentro de uma sociedade e a formação de pares

sexuais em espécies monogâmicas (Markham J.A. & Juraska J.M., 2007; Moura, P.J. et al., 2010; Engelmann M. et al., 2011).

A Memória social se refere à capacidade dos animais modificarem seus comportamentos sociais diante de um indivíduo da mesma espécie como consequência de um encontro social anterior com ele. A capacidade de reconhecimento social dentro de uma sociedade é vantajosa porque os seus membros podem desprender mais tempo em atividades relacionadas a organização e proteção do grupo, ao invés de vigorosa investigação de um indivíduo não perigoso já conhecido (Markham J.A. & Juraska J.M., 2007; Moura, P.J. et al., 2010)

O ser humano apresenta boa capacidade de estabelecer e manter relações sociais, para tanto também utiliza informações sociais prévias, recuperadas pelas memórias episódicas. Durante as interações sociais não existe dissociação entre as memórias auto-geradas (*episódicas*) com as memórias associadas a um contexto social (*semânticas*). Vários estudos mostram que a participação ativa de um indivíduo sobre uma informação memorizada torna-a mais facilmente lembrada do que se essa mesma informação for apenas lida pelos indivíduos (Jacoby L.L., 1978; Slamecka N.J. e Graf P., 1978, Mano Y. et al., 2011).

Distintas representações corticais foram observados durante interações sociais em humanos. Através da imagem por Ressonância Magnética Funcional foi verificado a ativação do Córtex pré-frontal direito associado as memórias semânticas e do Córtex pré-frontal esquerdo, bem como do Córtex cingulado medial associado as memórias episódicas (Mano Y. et al., 2011).

A memória episódica é também importante na comunicação. A

comunicação faz parte da interação social e carrega consigo características sociais adquiridas num contexto social onde os indivíduos estão inseridos como: as gírias e piadas, as histórias de vida e as conversas em geral com as outras pessoas (Schank R. & Abelson P., 1977; Nelson K. & Gruendel J., 1981; Mano Y. et al.,2011).

No mundo moderno é bastante comum a utilização da internet como forma de comunicação e conseqüentemente, de interação social.

A maioria dos usuários de internet integram-se aos serviços sociais online para manter e reforçar as relações sociais pré-existentes. A variação no número de amigos de uma determinada rede social (Facebook) foi correlacionada com o volume da massa cinzenta encefálica dos indivíduos. A densidade da substância cinzenta do Giro Temporal Medial (GTM), do Sulco Temporal supero-posterior (STS-P) e da amígdala parece estar relacionada com o tamanho da rede social online e/ou do mundo real (Kanai R. et al.,2011).

A capacidade de memória, para associações nome-face constituiria uma importante função para a manutenção de uma grande rede social. Com isso, além das regiões do cérebro envolvidas em vários aspectos da cognição social, o volume do Córtex Entorrinal direito, relacionado à formação da memória associativa para pares, incluindo pares de nomes e de rostos, também correlacionou-se com o tamanho da rede social online (Kanai R. et al.,2011)..

Desta forma, sugere-se que o GTM e o STS-P, implicados em percepção social e o córtex entorrinal implicado em memórias associativas, fornecem a capacidade cognitiva para construir e manter grandes redes sociais online na sociedade humana (Kanai R. et al.,2011).

1.3.1- Estímulos olfatórios e memória social

Nos humanos e em outros primatas, o reconhecimento social depende principalmente dos sistemas visuais e auditivos. Pacientes com lesões no Giro fusiforme direito (área associativa visual) perdem a habilidade em reconhecer faces, embora não apresentem déficits visuais ou de memória (Ferguson J.N.et al.,2002).

Já na maioria dos outros mamíferos, as informações sociais são codificadas principalmente através da via olfativa por “pistas quimiosensoriais” presentes na área anogenital, que determina uma "assinatura olfativa" (Ferguson J.N.et al.,2002; MarkhamJ.A. & Juraska J.M.,2007). Os odores provenientes da urina são utilizados para discriminar entre indivíduos da mesma espécie, para comunicar informação: como dominância e saúde; e também são usados pelos machos para anunciar a sua qualidade de potenciais companheiros e de dominância territorial (Kogan et al., 2000 ; Arakawa et al, 2008).

O sistema olfatório participa da modulação da memória social por manter íntimas conexões neuronais com o hipocampo e outras estruturas importantes no processo de memória (Kogan et al., 2000; Okuda et al.,2009).

A memória social pode ser medida, em laboratórios, através de vários testes como: habituação e desabituação, discriminação social e paradigma de residente intruso. Esse último consta basicamente da mensuração do tempo de investigação de um animal juvenil por um animal adulto, através de exposições repetitivas. É esperada redução no tempo de investigação nas exposições seguintes a do primeiro contato, se o animal adulto apresenta a memória intacta (Thor D.H., Holloway W.R., 1982; Kogan et al., 2000; MarkhamJ.A. & Juraska J.M.,2007; Moura, P.J. et al.,2010; van der Kooij M.A. & Sandi C., 2011). Em

camundongos do sexo masculino a capacidade de armazenamento da "assinatura olfativa" de um determinado co-específico vai de 30 minutos até pelo menos 7 dias. Isto implica que esta espécie é capaz de estabelecer uma memória social olfatória de curta e de longa duração. Para tanto é necessário integridade dos mecanismos envolvidos com esta memória, como por exemplo, a integridade do hipocampo (Kogan et al., 2000).

Assim como em outras memórias de longa duração, a consolidação da memória social requer dois estágios de síntese de proteína: uma com início imediato e outra 6 a 7 horas depois do animal ter entrado em contato com o juvenil. Além disso, esse processo parece ativar áreas como o núcleo medial da amígdala, a área pré-óptica medial e o bulbo olfatório acessório (Richter et al., 2005).

É importante pontuar que os estímulos olfatórios são processados por dois sistemas diferentes. As informações sobre os estímulos voláteis são preferencialmente tratadas no sistema olfatório principal (MOS) e as informações sobre os estímulos não-voláteis no sistema olfatório acessório (AOS) (Sanchez-Andrade G. et al., 2005). O primeiro é composto pelo bulbo olfatório e as estruturas límbicas, como o núcleo cortical da amígdala e o córtex piriforme (Cooke et al. 1998). O segundo é formado pelo bulbo olfatório acessório, núcleo medial da amígdala, os núcleos do trato olfatório lateral e da estria terminal, a área pré-óptica medial e septo (Cooke et al. 1998).

Durante os testes de memória social os feromônios - substâncias químicas que desencadeiam comportamentos inatos e respostas fisiológicas - secretados por animais da mesma espécie, são processados pelos dois sistemas olfatórios (Ferrero & Liberles, 2010). Tanto as células do epitélio

olfativo principal quanto às do sistema olfatório acessório expressam c-fos (marcador de atividade neural) em resposta a apresentação de urina (Muroi Y. et al., 2006; Martel K.L. & Baum M.J., 2007; Martel K.L. et al., 2007).

O desempenho dos animais na tarefa de reconhecimento social pode variar entre os sexos, com a idade, entre espécies e com o *status* emocional do animal no momento do teste (Markham J.A. & Juraska J.M., 2007; van der Kooij M.A. & Sandi C., 2011). Além do mais a memória social, assim como as outras, pode ser alterada positivamente ou negativamente em animais knockdown para o transportador de acetilcolina ou em resposta a estímulos farmacológicos, fatores estressantes, crises epiléticas, lesões do hipocampo e alterações no bulbo olfatório, bem como mudanças nas condições de habitação e no ambiente dos indivíduos (Matochik, 1988; Bluthé & Dantzer, 1993; Burton S. et al., 2000; Prado et al., 2006; Lim C.E. et al., 2007; van der Kooij M.A. & Sandi C., 2011).

1.3.2- Condições ambientais e memória - isolamento social

As condições de habitação são importantes para a saúde dos animais e podem influenciar o comportamento em várias espécies. O isolamento social, como condição ambiental, pode ser induzido em roedores através da permanência do animal em sua gaiola na ausência de co-específicos. Esse isolamento pode ser agudo, quando ocorre dentro de 24 horas ou crônico quando ocorre por períodos mais prolongados (Kogan et al., 2000; Võikar V. et al., 2005; Silva C.F. et al., 2011; Kwak C. et al., 2009; Leasure J.L & Decker L., 2009).

O isolamento social pode afetar desde respostas fisiológicas como pressão arterial, frequência cardíaca e os ritmos circadianos, até estruturas do

encéfalo. Conseqüências como a redução da densidade cortical de neurônios piramidais, a diminuição da expressão de BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro) no hipocampo e a redução da LTP (Potenciação de Longa Duração) foram observadas após o isolamento (Woodworth C.H. & Johnson A.K., 1988; Greco A.M. et al., 1989; Roberts L. & Greene J.R., 2003; Scaccianoce S. et al., 2006).

Sabe-se que assim como a redução dos fatores de transcrição gênica (CREB), a redução da síntese de proteínas *de novo* e as lesões do hipocampo; *isolamento social* também pode afetar negativamente a memória social de longa duração (Kogan et al., 2000; Gusmão & Monteiro et al., 2012).

A memória social, em animais isolados não dura mais do que 1 hora (Thor D.H., Holloway W.R., 1982; Sekiguchi R. et al.,1991; Bluthe R.M. et al.,1993). Kogan e col. 2000, observaram que camundongos criados sob condições de isolamento social, durante 3 semanas apresentaram déficit de memória social de longa duração. Dados de nosso laboratório demonstraram que camundongos isolados por 1 semana não reconhecem um juvenil intruso 24 horas após a primeira exposição ao mesmo. Entretanto, esse déficit não foi observado em relação a memória social de curta duração, ou seja, quando a segunda exposição ao juvenil aconteceu 30 minutos após a primeira (Gusmão & Monteiro et al., 2012).

O isolamento social, além de afetar a memória social também pode induzir comportamentos agressivos, aumentar a ansiedade, levar a hiperatividade e diminuir o desempenho dos animais em tarefas de memória e aprendizado espacial (Wongwitdecha N. & Marsden C.A., 1996; Nilsson M. et al.,1999; Lu et al. 2003; Ibi et al. 2008 ; Kwak C. et al.,2009; Silva C.F. et

al.,2011). Outro efeito observado em condições de isolamento crônico foi a diminuição no número de células novas, principalmente neurônios, bem como uma redução da sobrevivência e da diferenciação destes novos neurônios (Lu et al. 2003; Ibi et al. 2008 ; Leasure J.L & Decker L.,2009; Silva C.F. et al.,2011).

Alguns estudos buscam compreender as alterações bioquímicas e fisiológicas que estão por detrás de alguns destes efeitos deletérios do isolamento social, incluindo a diminuição no número de células novas e os déficits de memória. Até o presente momento pouco ainda se sabe. Entretanto, acredita-se que o isolamento leve a diminuição no número de células novas no hipocampo por aumentar o estresse do animal e desta maneira aumentar a liberação de corticosterona. A corticosterona em excesso eleva a quantidade de glutamato na fenda sináptica. Este por sua vez, aumenta a expressão da subunidade NR1A do receptor NMDA, induzindo a morte de células-tronco *in vitro* (Tashiro et al.,2006).

Além deste efeito parece que o isolamento ainda reduz a expressão excitatória GABAérgica que é importante na ativação do fator de transcrição neural, reduz a produção de dopamina, de fatores tróficos e de serotonina que são importantes na proliferação celular e nas tarefas de aprendizado e memória (Lu et al.,2003; Tozuka et al.,2005; Ibi et al.,2008).

Foi visto que o isolamento social provoca déficits celulares e comportamentais como elucidados anteriormente. Entretanto, estes déficits parecem não serem permanentes. Evidências recentes sugerem que estímulos como o reagrupamento social, a administração de fármaco, por exemplo, a fluoxetina, a atividade física e o **ambiente enriquecido** podem reaver os

prejuízos desencadeados pelo isolamento (Lu et al.,2003; Ibi et al.,2008; Leasure J.L & Decker L.,2009; Gusmão, 2010). Esses estímulos são tão fortes que mesmo após uma lesão hipotalâmica, o fato de reagrupar os animais já foi suficiente para aumentar a variabilidade de respostas comportamentais em camundongos comparado com ao grupo isolado (Williams et al.,2001).

A explicação de como o reagrupamento social, os antidepressivos, a atividade física e o **ambiente enriquecido** atuam prevenindo ou mesmo revertendo os efeitos deletérios do isolamento social é ainda questionado. Alguns pesquisadores encontraram o aumento da neurogênese junto das melhoras no desempenho em tarefas de aprendizado e memória espaciais (Brown J. et al.,2003; Lu et al.,2003; Ibi et al.,2008). Demonstrando haver uma correlação entre o aumento da taxa de neurogênese e a melhora no desempenho das tarefas espaciais.

1.3.3- Ambiente enriquecido e memória

No final de 1940, baseado em relatos informais de que ratos levados para a casa, como animais de estimação mostraram melhorias comportamentais se comparados aos ratos de laboratório, Donald Hebb propôs pela primeira vez o conceito experimental de "ambiente enriquecido". (Hebb D.O.,1947; van Praag et al.,2000). No início dos anos 1960, abordagens experimentais foram iniciadas para investigar os efeitos do ambiente enriquecido sobre o cérebro (Wiesel T.N. & Hubel D.N.,1965; van Praag et al.,2000).

O conceito de Ambiente Enriquecido pode ser definido como uma *“combinação de estímulos complexos: inanimados (brinquedos, rodas de corrida voluntária e túneis) e sociais (indivíduos co-específicos) capazes de*

promoverem uma série de benefícios principalmente sobre o aprendizado e a memória” (van Praag et al., 2000). Como pôde ser observado pela definição de ambiente enriquecido, ele envolve estímulos *sociais*, então vale salientar que em todos os estudos citados a seguir os animais encontravam-se agrupados.

Vários estudos evidenciaram que o ambiente enriquecido é capaz de aumentar a taxa de neurogênese no giro denteado do hipocampo e conseqüentemente melhorar o desempenho dos animais em tarefas de memória e aprendizado espaciais (Kempermann, G., et al., 1997; Nilsson M. et al., 1999; Williams et al., 2001; Lazic et al., 2006; Catlow et al., 2009; Okuda et al., 2009).

O efeito do ambiente enriquecido sobre a neurogênese é mais expressivo na sobrevivência dos novos neurônios do que na taxa de proliferação das células granulares do hipocampo. Parece ainda que este efeito depende de um chamado período crítico, que acontece entre a segunda e a terceira semana após a administração de BrdU- agente que avalia proliferação celular (Tashiro et al., 2007; Okuda et al., 2009)

Embora vários estudos indiquem que o ambiente enriquecido atua sobre os animais agrupados melhorando seu desempenho em tarefas de aprendizado e memória espacial através do aumento da taxa de neurogênese hipocampal, existem algumas controvérsias (Kempermann, G., et al., 1997; Nilsson M. et al., 1999; Williams et al., 2001; Lazic et al., 2006; Catlow et al., 2009; Okuda et al., 2009). A neurogênese não parece ser a única responsável pelas melhoras observadas nos comportamentos dos roedores em resposta ao enriquecimento ambiental. Após irradiação de raio X sobre a região do

hipocampo, camundongos colocados em ambiente enriquecido, tiveram desempenho análogo no labirinto aquático ao de camundongos em ambiente enriquecido que não tiveram a interrupção da neurogênese pela irradiação. Ambos os grupos enriquecidos (com e sem bloqueio da neurogênese) foram superiores aos grupos mantidos em gaiolas padrão. Em conclusão, os camundongos expostos ao ambiente enriquecido tiveram melhor desempenho no teste de aprendizado espacial e apresentaram menos ansiosos do que os que não estavam em ambientes enriquecidos, mas isso não pôde ser atribuído ao aumento da neurogênese, já que houve semelhanças entre os grupos enriquecidos irradiados e não irradiados (Meshi D. et al.,2006).

Nesse caso, o ambiente enriquecido parece ter atuado por outras vias independentes da neurogênese, por exemplo, ter levado a um *upregulation* de Fatores Neurotróficos Derivados do Cérebro (BDNF), ao aumento da LTP (Potenciação de Longa Duração), a alterações morfológicas nas ramificações dendríticas, ao aumento na sinaptogênese, na gliogênese e na angiogênese (Volkmar, F.R. & Greenough, W.T., 1972; Greenough W.T., 1976; Isaacs, K. R. et al.,1992; van Praag et al., 2000; Williams et al.,2001; Meshi et al.,2006; Cao X.et al.,2007).

Os estímulos provenientes do ambiente enriquecido podem ainda aumentar a síntese de proteínas cinases e da proteína reguladora da expressão gênica (CREB) (Williams et al.,2001), inibir as taxas de apoptoses espontâneas de células hipocâmpais e da amígdala, e induzir a expressão de moléculas de adesão de células neurais (Williams et al.,2001; Okuda et al.,2009).

É importante ressaltar que os estudos mencionados anteriormente, quando avaliam a participação da neurogênese o fazem em associação com

tarefas de memória e aprendizado espaciais. No nosso laboratório, dados não publicados, demonstraram que os animais isolados por 1 semana em ambiente enriquecido apresentaram uma prevenção do déficit de memória social de longa duração propiciado pelo isolamento em gaiolas padrão (Gusmão, 2010). Entretanto, este estudo não investigou a participação da neurogênese e nem de outras vias bioquímicas ou celulares, envolvidas nesse processo de prevenção.

1.4– NEUROGÊNESE

Em 1962 Joseph Altman descobriu a existência de neurônios novos no cérebro de ratos adultos jovens. A intenção do estudo na verdade era de investigar a cinética da proliferação glial ao se fazerem lesões eletrolíticas na região do corpo geniculado lateral. Entretanto, ao administrarem a timidina marcada radioativamente (que se liga ao DNA de células novas) eles conseguiram encontrar células gliais marcadas não só no corpo geniculado lateral, mas também em várias regiões ligadas ao corpo geniculado lateral como, por exemplo: a camada inferior do córtex visual, a região pré-tectal, o trato óptico e outros. Além disso, como as fatias utilizadas na histologia, eram cortadas em 5 μ M (micrômetros), eles puderam estudar a morfologia das células, encontrando marcação de alguns neuroblastos e núcleos de alguns neurônios, não necessariamente na área de lesão. A quantidade de neuroblastos e neurônios marcados variavam de acordo com o tempo de sacrifício dos animais e a maioria dos neurônios marcados eram do tipo estrelado. Com isso eles puderam pela primeira vez, mesmo que ao acaso, encontrar no DNA de neurônios e neuroblastos um marcador de proliferação celular, sugerindo que aquelas células marcadas eram novos neurônios. Nesta

época eles também inferiram que esses novos neurônios viessem de células indiferenciadas.

Em 1969, Altman encontrou que a proliferação das células no cérebro continuava após o nascimento e por toda a vida adulta na Zona Subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais de mamíferos. Em 1994 Lois e Alvarez-Buylla mostraram que existem um número grande de células marcadas com timidina radioativa na região SVZ, quando comparado a outras regiões como córtex e estriado. Esses autores fizeram estudos de cultura *in vitro* e viram que as células da SVZ são capazes de migrarem para fora da região de cultura e são também capazes de diferenciarem em neurônios e glia.

Atualmente, acredita-se que as células tronco neurais vem não de células indiferenciadas, mas sim de uma subpopulação de astrócitos. Ao utilizarem um inibidor de proliferação celular (Ara-c) na região da SVZ viram que após um tempo, células com características astrocitárias eram capazes de repovoar a SVZ. Sugerindo desta maneira, que as células com alta capacidade proliferativa presentes na SVZ seriam um tipo de “astrócitos” diferenciado com potencial para gerar os novos neurônios (Alonso et al.,2008).

Trabalhos anteriores mostraram que os neurônios gerados, continuamente na zona subventricular dos ventrículos laterais podem migrar para o bulbo olfatório, onde amadurecem e adquirem característica de neurônios maduros. Essa migração parece ser importante para substituir as células mortas do bulbo olfatório (Frankland & Miller, 2008). Vários trabalhos demonstram que a neurogênese hipocampal é essencial para um bom desempenho em tarefas de memória e aprendizado espacial (tarefas dependentes do hipocampo), entretanto, pouco se sabe a respeito da

importância funcional da neurogênese no bulbo olfatório sobre a atividade olfatória (Kempermann, G., et al., 1997; Nilsson M. et al., 1999; Williams et al., 2001; Lazic et al., 2006; Catlow et al., 2009; Okuda et al., 2009; Sakamoto et al., 2011).

Os “astrócitos” importantes para a formação de novos neurônios também seriam importantes na migração rostral das células novas para o bulbo olfatório na medida que secretam substâncias que acentuam essa migração. As células gliais também podem apoiar a sobrevivência e / ou proporcionar informação direcional para os neuroblastos. Os astrócitos (precursores de neuroblastos) expressam moléculas de adesão neural (PSANCAM) ao longo da migração rostral e essa migração é interrompida em animais com ausência de NCAM ou PSA (Doetsch et al. 1999).

Além da SVZ existe uma outra região da qual se originam as células novas que é a região subgranular do giro denteado (SGZ). Acredita-se que as células provenientes desta região são essenciais não para substituir as células mortas, como ocorre no bulbo olfatório, mas sim para adicionar mais células e conseqüentemente levar ao crescimento do tecido, como visualizado pela seguinte figura:

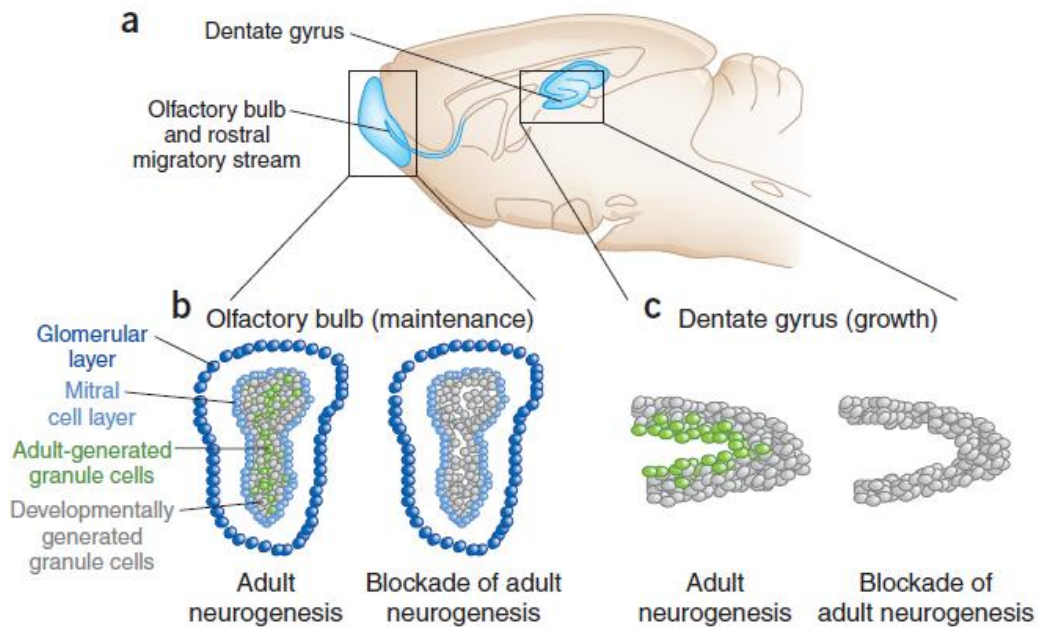


Figura 1. Diferença estrutural da neurogênese no bulbo olfatório e no giro denteado do hipocampo. Extraída do trabalho de Frankland & Miller, 2008.

Evidências recentes demonstram a existência de neurônios novos em outras áreas cerebrais como o neocórtex e o hipotálamo. (Lu et al.,2003; Williams et al.,2001; Lazic et al.,2006). Mais recente ainda, são experimentos que demonstram a formação de células novas na amígdala.

A amígdala é uma das estruturas mais importante do sistema límbico, desempenha papéis essenciais nos processos sociais, emocionais e motivacionais, bem como na aprendizagem e memória (Okuda et al.,2009). Em macacos e esquilos a amígdala parece participar da neurogênese adulta, mas em roedores é ainda questionado (Okuda et al.,2009).

Além da descoberta da neurogênese, estudos vêm demonstrando que a taxa de neurogênese não é fixa, ela pode sofrer influências positivas ou negativas através de estímulos externos ou biológicos. O tratamento com

antidepressivos, o reagrupamento social, o ambiente enriquecido e a atividade física podem elevar o número e a sobrevivência dos neurônios neo-formados (Gould et al.,1999, van Praag et al.,2000, Malberg et al.,2000). Enquanto, o envelhecimento, o estresse e o isolamento podem reduzir os níveis de produção de células neurais (Catlow et al.,2009; Lu et al.,2003; Williams et al.,2001; Lazic et al.,2006).

Além disso, ciclos hormonais, níveis de neurotransmissores, expressão de fatores de transcrição e crescimento e estado nutricional também podem influenciar a neurogênese (Barnea, 2009).

Embora ainda controversos, acredita-se que as alterações neurogênicas possam determinar mudanças comportamentais, tanto no que tange o aprendizado e memória espaciais, quanto em relação a memória social.

Mudanças permanentes na expressão dos genes codificam memórias de longo prazo, de tal forma que a aquisição destas memórias é como uma etapa final e irreversível da diferenciação celular. Se assim for, então o neurônio inteiro, não só a sinapse, é a unidade de aprendizagem e o número de neurônios disponível para o armazenamento de novas memórias de longo prazo seria inversamente relacionado com o número de memórias previamente adquiridas. Esse mecanismo remete a uma função importante da neurogênese sobre a capacidade de aprendizado e armazenamento de novas informações (Barnea, 2009).

Pode-se então perceber, que existe um consenso de que a neurogênese ocorre no cérebro de animais adultos, inclusive roedores. Também é unânime a crença de que existam fatores intrínsecos e extrínsecos que possam interferir na taxa de neurogênese, como o ambiente enriquecido e o isolamento social. O

primeiro levando a um aumento e o segundo a uma diminuição.

Vários estudos demonstram o efeito do ambiente enriquecido, aumentando o número e a sobrevivência de neurônios no hipocampo, repercutindo em melhoras no desempenho dos animais no Labirinto Aquático de Morris. Entretanto, nestes estudos os animais encontravam-se agrupados. Em relação o efeito do ambiente enriquecido sobre animais isolados foi evidenciado em um estudo do nosso laboratório, sendo que melhoras foram vistas através de teste que envolve a memória social de longa duração. Mas, essa mesma dissertação não investigou a participação da neurogênese nesse efeito do ambiente enriquecido sobre os animais isolados.

Diante disso o presente estudo se faz necessário, para investigar a participação da neurogênese no efeito que o ambiente enriquecido exerce sobre a memória social, em animais isolados. A nossa hipótese é de que a neurogênese no hipocampo e no bulbo olfatório seja importante para que o ambiente enriquecido previne o déficit de memória social de longa duração em camundongos isolados socialmente.

2- JUSTIFICATIVA

“Somos aquilo que recordamos e também somos o que resolvemos esquecer (Izquierdo I.,2002).”

As memórias dizem quem o indivíduo é, e quem ele pode ser, embora as vivências de cada um sejam únicas. O indivíduo está inserido numa sociedade e com esta ele partilha hábitos, costumes e tradições que são necessárias para o seu bem-estar e para a sua sobrevivência (Izquierdo I.,2002). A interação entre indivíduos da mesma espécie, portanto, é importante tanto na sociedade humana quanto nas demais sociedades animais, para estruturar as redes de relações, estabelecer hierarquias e escolher parceiros. Para ser possível tal reconhecimento e discriminação, é necessário evocar um processo mnemônico, conhecido como *memória social* (Markham J.A. & Juraska J.M.,2007; Moura, P.J. et al.,2010; Engelmann M. et al.,2011).

Existem fatores genéticos, ambientais e comportamentais que podem prejudicar todo e qualquer tipo de memória. Patologias relacionadas ao déficit de memória são denominadas de demências e são frequentes nos dias atuais. O aumento à predisposição de demências é multifatorial e relaciona-se ao estresse mental desencadeado pelo bombardeio de estímulos ambientais deletérios sobre o ser humano, como por exemplo, a poluição visual e sonora, o trânsito congestionado, a violência urbana e o aumento da cobrança sobre o reconhecimento profissional e a melhora financeira. Somado a tudo isso está também a alimentação pouco saudável, o tabagismo, o sedentarismo, o **isolamento social** e o envelhecimento (Silva M.,2011).

Em roedores, o isolamento social, leva a déficits celulares, histoquímicos e comportamentais (Lu et al.,2003; Ibi et al.,2008; Kogan et al., 2000). Em

humanos, o afastamento social favorece o desenvolvimento de disfunções cardiovasculares e problemas cognitivos e de memória (Couzin J.,2009).

Embora a atenção para a saúde esteja aumentando nos últimos tempos, ainda não se conhecem medidas preventivas ou curativas realmente eficientes para as demências (Matioli M.N. et al.,2011). Acredita-se que mudanças no estilo de vida associadas ao aumento de estímulos ambientais podem ajudar na prevenção ou mesmo no tratamento de demências. Alguns estudos demonstraram que pessoas que lêem muito, como por exemplo, pessoas que gostam de cartilhas de palavras cruzadas ou mesmo estudar línguas estrangeiras apresentam mais tardiamente os sintomas ligados a doença de Alzheimer (DA). O ambiente enriquecido, no caso sonoro, pode ser utilizado em terapias musicais para pacientes portadores de DA (Silva M., 2011).

Nos roedores, o reagrupamento social, bem como gaiolas enriquecidas e o uso de antidepressivos revertem os prejuízos cognitivos gerados pelo isolamento social. Entretanto os mecanismos através dos quais estes estímulos agem para melhorar os prejuízos cognitivos ainda não são completamente conhecidos (Catlow et al.,2009; Lu et al.,2003; Williams et al.,2001; Lazic et al.,2006; Ibi et al.,2008; Gusmão, 2010; Meshi et al.,2006). A neurogênese tem sido apontada como o provável mecanismo pelo qual o ambiente enriquecido beneficia a memória apesar de ainda não haver um consenso (Silva M.,2011). Portanto, nosso trabalho se propõe a contribuir no entendimento de um dos grandes desafios da neurociência que é o de desvendar a função da neurogênese na memória, em especial na memória social.

3- OBJETIVOS

3.1- OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da neurogênese nos efeitos promnésicos do ambiente enriquecido sobre a memória social.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do isolamento social sobre a memória social de curta e de longa duração em camundongos da linhagem SWISS;
- Verificar o efeito do ambiente enriquecido concomitante ao isolamento social sobre a memória social de longa duração em camundongos da linhagem SWISS;
- Avaliar o efeito do isolamento social sobre o comportamento do tipo ansiedade;
- Quantificar o número de novos neurônios na região do giro denteado do hipocampo de animais agrupados em gaiola padrão, agrupados em ambiente enriquecido, isolados e isolados socialmente em ambiente enriquecido;
- Verificar a estabilidade e a persistência da memória social de animais agrupados em ambiente enriquecido;
- Quantificar o número de novos neurônios no bulbo olfatório de animais agrupados em gaiola padrão, agrupados em ambiente enriquecido, isolados e isolados socialmente em ambiente enriquecido;
- Avaliar a capacidade olfatória dos animais agrupados em gaiola padrão,

agrupados em ambiente enriquecido, isolados e isolados socialmente em ambiente enriquecido;

- Avaliar o efeito da administração crônica, intra-ventricular, do inibidor de neurogênese, AraC, sobre a memória social de animais isolados em ambiente enriquecido;
- Avaliar o efeito da administração crônica, intra-ventricular, do inibidor de neurogênese, AraC, sobre a capacidade olfatória de animais isolados em ambiente enriquecido;
- Quantificar o número de células BrdU positivas na região do giro denteado do hipocampo e bulbo olfatório após a administração crônica, intra-ventricular, do inibidor de neurogênese, AraC.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem swiss (8 a 12 semanas de idade). Como intrusos na tarefa de reconhecimento social foram utilizados camundongos machos juvenis da linhagem SWISS (25- 30 dias de idade). Todos os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro controlado de 12/12 horas, com temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade 40-70%. Os animais tiveram livre acesso à ração e água, exceto quando mencionado.

Todos os protocolos foram realizados observando-se as normas do “Guide for the care and use of laboratory animals” (1996) e do CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG). Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – 145/2010.

4.1.1- Grupos experimentais e condições de habitação

Os animais foram divididos em 4 grupos:

- Agrupado Padrão (AP): os animais (5 por gaiola) foram mantidos durante sete dias em caixa padrão (28X17X12cm). (Figura 2A).
- Isolado Padrão (IP): cada animal foi mantido individualmente durante sete dias, em caixa padrão (28X17X12cm). (Figura 2B).
- Agrupado em Ambiente Enriquecido (AE): os animais (5 por gaiola) foram mantidos durante sete dias em caixa maior (40X33X16cm), contendo uma espécie de abrigo de plástico feito com garrafa *pet*, rolos de papelão, fitas e

objetos coloridos (Figura 2C).

- Isolado em Ambiente Enriquecido (IE): cada animal foi mantido individualmente, durante sete dias, em caixa padrão (28x17x12cm) contendo rolos de papelão, fitas e objetos coloridos (Figura 2D).

É importante salientar que todos os animais foram mantidos no mesmo local, ou seja, dentro de uma estante ventilada (ALESCO, Brasil). Logo, os animais isolados provavelmente estiveram expostos às imagens, odores e sons de camundongos de outras caixas. Portanto, os animais isolados (IP e IE) foram privados apenas do contato físico com co-específico (Gusmão & Monteiro, 2012).

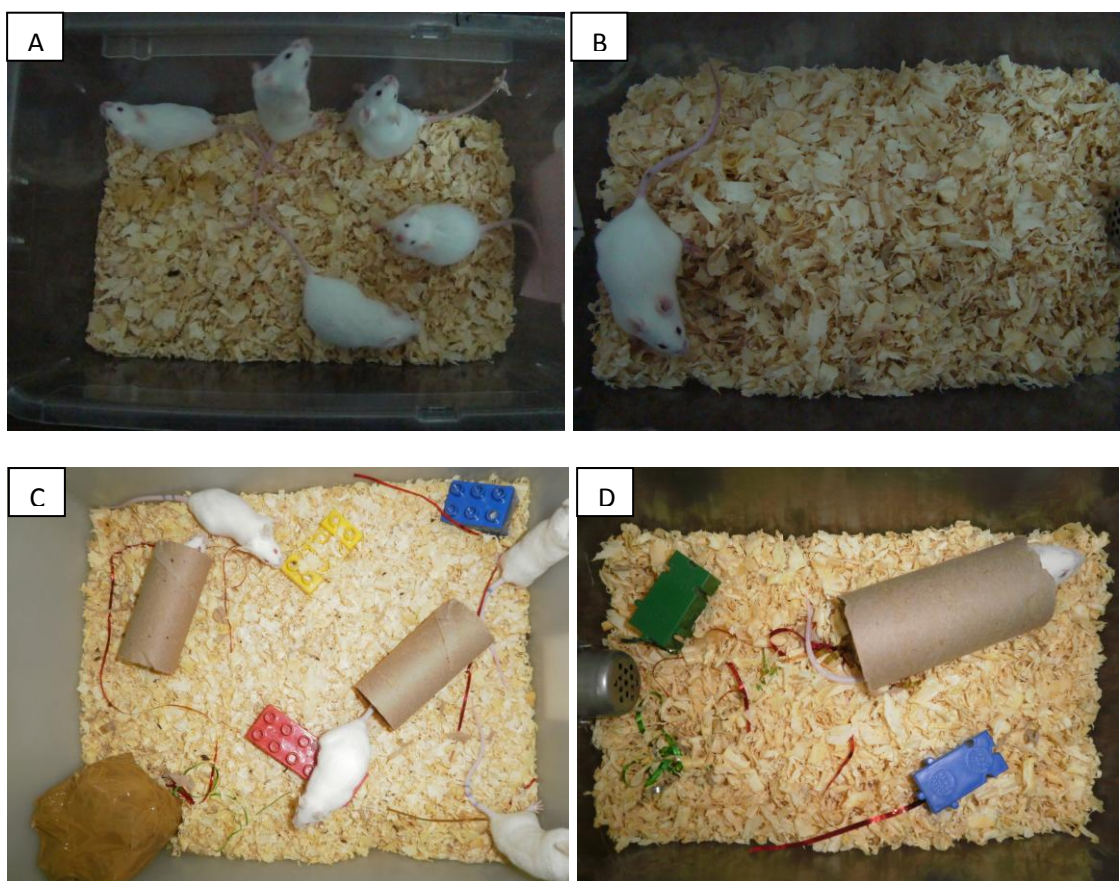


Figura 2- Foto representativa dos grupos experimentais: **(A)** Agrupado Padrão; **(B)** Isolado Padrão; **(C)** Agrupado em ambiente Enriquecido e **(D)** Isolado em ambiente Enriquecido.

4.2-TAREFA DE RECONHECIMENTO SOCIAL

A memória social foi avaliada através da tarefa de reconhecimento social (paradigma de residente intruso), onde um animal juvenil é inserido na caixa de um animal adulto e mede-se o tempo de investigação social. É esperado, em situações normais, que o tempo de exploração do animal juvenil pelo animal adulto diminua no segundo encontro quando comparado ao tempo de exploração durante o primeiro encontro (Prado et al.,2006; Gusmão & Monteiro El al.,2012).

Primeiramente, o animal adulto foi habituado durante 30 minutos à uma caixa semelhante à que é mantido. A sessão de treino teve início com a inserção do camundongo juvenil na caixa. O tempo de exploração foi quantificado durante 5 minutos. Para evitar que comportamentos agressivos fossem exacerbados e que apenas a exploração iniciada pelo animal adulto fosse quantificada, o animal juvenil foi apresentado ao animal adulto no interior de um cilindro de acrílico transparente (10 cm de diâmetro) contendo cerca de 60 orifícios igualmente distribuídos (Figura 3A e 3B). Além disso, para que o interesse do animal adulto não fosse pelo cilindro e sim pelo animal juvenil, durante o período de habituação um cilindro idêntico, mas vazio, foi mantido na caixa. Para evitar que o animal juvenil ficasse agitado no interior do cilindro, o mesmo também foi habituado, porém durante 5 minutos, num outro cilindro idêntico (Choleris et al.,2003, Prado et al.,2006 e Gusmão & Monteiro et al.,2012).



Figura 3- Foto representativa do aparato utilizado na tarefa de reconhecimento social: **(A)** e em detalhe o cilindro onde o animal juvenil foi apresentado **(B)**.

A memória social de curta duração (MCD) foi avaliada 30 minutos após o treino. Já a memória social de longa duração (MLD) 24 horas ou 10 dias pós-treino. Todas as sessões de teste tiveram duração de 5 minutos. Entre a sessão de treino e teste, o cilindro vazio foi mantido na caixa do animal adulto durante os 30 minutos que antecederam o início da sessão de teste.

Foi quantificado como exploração social o tempo que o animal adulto manteve seu “focinho” e/ou vibrissas (bigode) nos orifícios do cilindro.

Os dados referentes a essa tarefa podem ser expressos graficamente em função do tempo bruto de exploração do juvenil pelo animal adulto ou em função do Índice de Reconhecimento Social. Esse índice é calculado pela razão do tempo de exploração do juvenil no teste sobre a soma do tempo de exploração no treino e teste. Se o Índice de Reconhecimento for significativamente menor que 0.5 com o p menor que 0.05 no *One Sample t test* significa que o animal adulto lembrou-se do juvenil no segundo contato com ele.

4.3- LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*, EPM) é um dos testes mais utilizados para medir o comportamento do tipo ansiedade. Ele se baseia no comportamento natural de exploração espontânea, dos roedores, mediante a ambientes novos e na aversão natural dos roedores para áreas abertas e elevadas (Komada et al.,2008).

O aparelho é constituído de 4 braços, 2 abertos (30 cm x 6 cm) e 2 fechados (30 cm x 6 cm x 16 cm), elevados a 30 cm do chão e dispostos perpendicularmente uns aos outros, se cruzando ao centro (6 cm x 6 cm). Os animais têm acesso a todos os braços e são autorizados a circular livremente entre eles. O número de entradas nos braços abertos e fechado, e o tempo gasto nos braços abertos e fechados são usados como indicativos de ansiedade. Animais que apresentam um comportamento do tipo ansioso (tratados com drogas ansiogênicas), tendem a permanecer menos tempo nos braços abertos, diferentemente dos animais tratados com drogas ansiolíticas. Evitar os braços abertos é considerado como uma consequencia da indução de níveis mais elevados de medo, a aversão em explorar os braços abertos do labirinto é causada pelo medo de espaços abertos e elevados (Komada et al.,2008).

No nosso protocolo, os animais (isolados e agrupados) foram colocados no centro do labirinto e durante 5 minutos foi contabilizado o número de entradas em cada braço e o tempo de permanência nos braços abertos e nos braços fechados (Gusmão & Monteiro, 2012).

4.4- TESTE DO CHOCOLATE

A informação olfativa é essencial para uma variedade de comportamentos nos roedores, incluindo o reconhecimento de predadores e animais familiares; a escolha de parceiros e a busca por alimentos (Doty R.L., 1986; Schellink H.M. et al.,1993; Brennan P.A. & Keverne E.B., 2004; Keverne E.B., 2004; Restrepo D. et al.,2004; Kavaliers M. et al.,2006; Yang M. et al.,2009). Muitas tarefas comportamentais projetadas para os roedores dependem de estímulos olfativos, incluindo a preferência social e testes de aprendizado e memória. Para tanto, a avaliação do olfato é fundamental (Yang M. et al.,2009).

O teste do chocolate conta com a tendência natural dos animais em usar pistas olfativas para encontrar alimentos, neste caso enterrado sob a maravalha. Desta maneira este teste é capaz de confirmar a capacidade dos animais em cheirar (Yang M. et al.,2009).

Durante 3 dias, antes da realização do teste de chocolate, os animais (isolados e agrupados) tiveram contato com pedaços de chocolate (7 gramas) para a habituação dos mesmos ao cheiro e ao gosto. Nestes 3 dias também, a quantidade de ração foi reduzida para aproximadamente 20 gramas por dia, para cada animal. Na noite anterior ao teste, toda a ração e os pedaços de chocolates restantes foram removidos a fim de privar os animais de quaisquer alimentos por 12 horas.

O teste do olfato consistiu na introdução do animal numa gaiola limpa (28 cm x 17 cm x 12 cm) contendo um pedaço de chocolate escondido sob a maravalha limpa (3 cm), e na posterior mensuração da latência para encontrar o pedaço de chocolate (Lin Li et al.,2010; Gusmão e Monteiro, 2012).

4.5- ADMINISTRAÇÃO DE BrdU

A bromodesoxiuridina, ou BrdU, foi utilizado como marcador da proliferação de células precursoras neurais endógenas. O BrdU é um análogo da timidina e ele incorpora ao DNA das células durante a fase-S da mitose, fase esta que ocorre a autoduplicação do DNA. Logo, o BrdU é amplamente utilizado como um marcador de proliferação celular (Breunig J.J. et al.,2008).

O BrdU (Sigma) foi dissolvido em uma solução de NaCl a 0,9% e administrado intra-peritonalmente (i.p.) na dose de 75 mg / kg de peso corporal. Cada animal recebeu 1 injeção de BrdU diária (entre 8 e 10 horas da manhã) durante 7 dias. No oitavo dia, os animais foram sacrificados 24 horas após a última injeção de BrdU (adaptado de Bruel-Jungerman et al.,2005 e Lazic et al.,2006).

4.6 – ADMINISTRAÇÃO DE Ara-C

A Citosina-beta-D-arabinofuranosideo, ou Ara-C é uma substância que se incorpora ao DNA da célula e inibe a sua replicação. A Ara-C forma complexos de clivagem com a topoisomerase I, resultando em fragmentação do DNA. Essa droga é utilizada como um inibidor de proliferação celular, também conhecido como agente anti-mitogênico. Logo, Ara-C é considerado um inibidor de neurogênese. (Azuma A. et al.,2001; Alonso et al.,2008).

O Ara-C (Sigma) foi diluído em solução salina estéril a 0.9% para que sua concentração final ficasse a 2%. A droga foi colocada dentro de mini bombas osmóticas (Alzet, modelo 1007D, fluxo de 0.5µl/hora, durante 7 dias), em campo estéril, com o auxílio de uma seringa de 1 ml e agulha de 27 G x

0.45". Posteriormente, as mini bombas foram conectadas a um cateter de polipropileno e este por sua vez conectado as cânulas de infusão (Figura 4).

A colocação das mini bombas foi realizada através de cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com solução de cetamina (1,5%) e xilazina (0,375%) na dose de 0,2ml para cada 30 gramas de animal, e posteriormente colocados no estereotáxico adaptado para camundongos. A cânula foi implantada no ventrículo lateral direito (escolha aleatória) (Figura 5), seguindo as coordenadas: AP (Ântero-posterior)= -0,5 mm, LL (Latero-lateral)= -1,0 mm e DV (Dorso-ventral)= -2,0 mm. O cateter de polipropileno e a respectiva mini bomba foram colocados no dorso dos animais (Figura 6) e a pele foi devidamente divulsionada e posteriormente suturada de modo que não houvesse risco de remoção destas bombas.

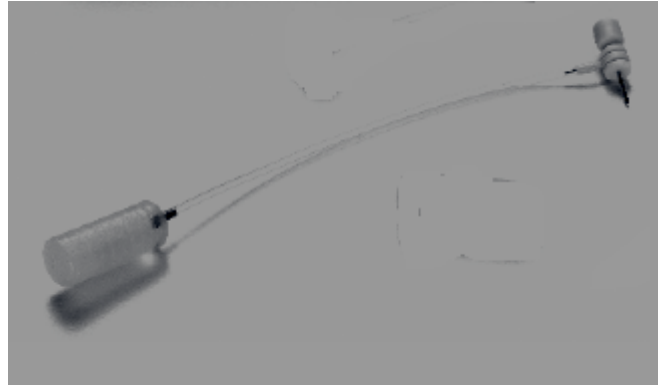


Figura 4- Figura ilustrativa de uma mini bomba acoplada ao cateter de polipropileno e este acoplado a cânula de infusão.

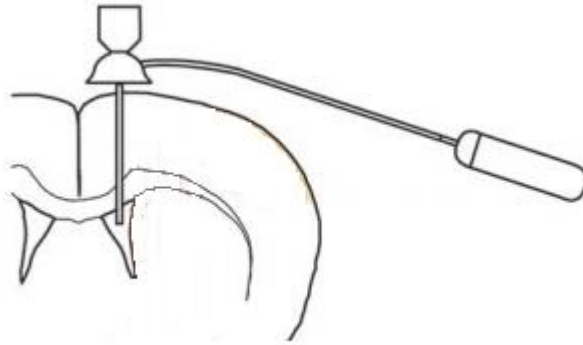


Figura 5- Figura ilustrativa do posicionamento da cânula dos mini-pumps osmóticos no ventrículo lateral (adaptado de Kimura et al.,2008).



Figura 6- Foto de um animal com o mini-pump osmótico. Repare na bomba localizada abaixo da pele e no capacete de acrílico responsável por fixar a cânula.

4.7- PERFUSÃO E PREPARO DAS FATIAS

Os camundongos foram profundamente anestesiados com solução de cetamina (1,5%) e xilazina (0,375%) na dose de 0,2 ml para cada 30 gramas de animal, e posteriormente perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo, com tampão fosfato PBS (0,01M) por 3 minutos (400ml/Kg) e paraformaldeído (PFA) a 4% por 7 minutos (800ml/Kg).

Posteriormente o cérebro foi removido e colocado em frascos contendo PFA a 4%, para fixação por 12 horas. Após, os cérebros foram colocados em

solução de sacarose a 30% em PBS 0,01M por 2 a 3 dias (até que os cérebros tivessem no fundo da solução). Através de um criostato os cérebros foram fatiados em cortes coronais ântero-posteriores de 40 μm (Tashiro et al.,2007; Lu et al.,2003). Foram selecionados o máximo de fatias de bulbo olfatório (porque se perdem muitas durante a realização da imunohistoquímica e da imunofluorescência) e 4 fatias de hipocampo espaçadas por 360 μm ,denominadas para as análises de AP's 1 a 4 (cortes ântero-posteriores selecionados com a ajuda do atlas de camundongo: Paxinos, G. & Franklin, K.B.J., 2004, 2º edição). Figura 7.

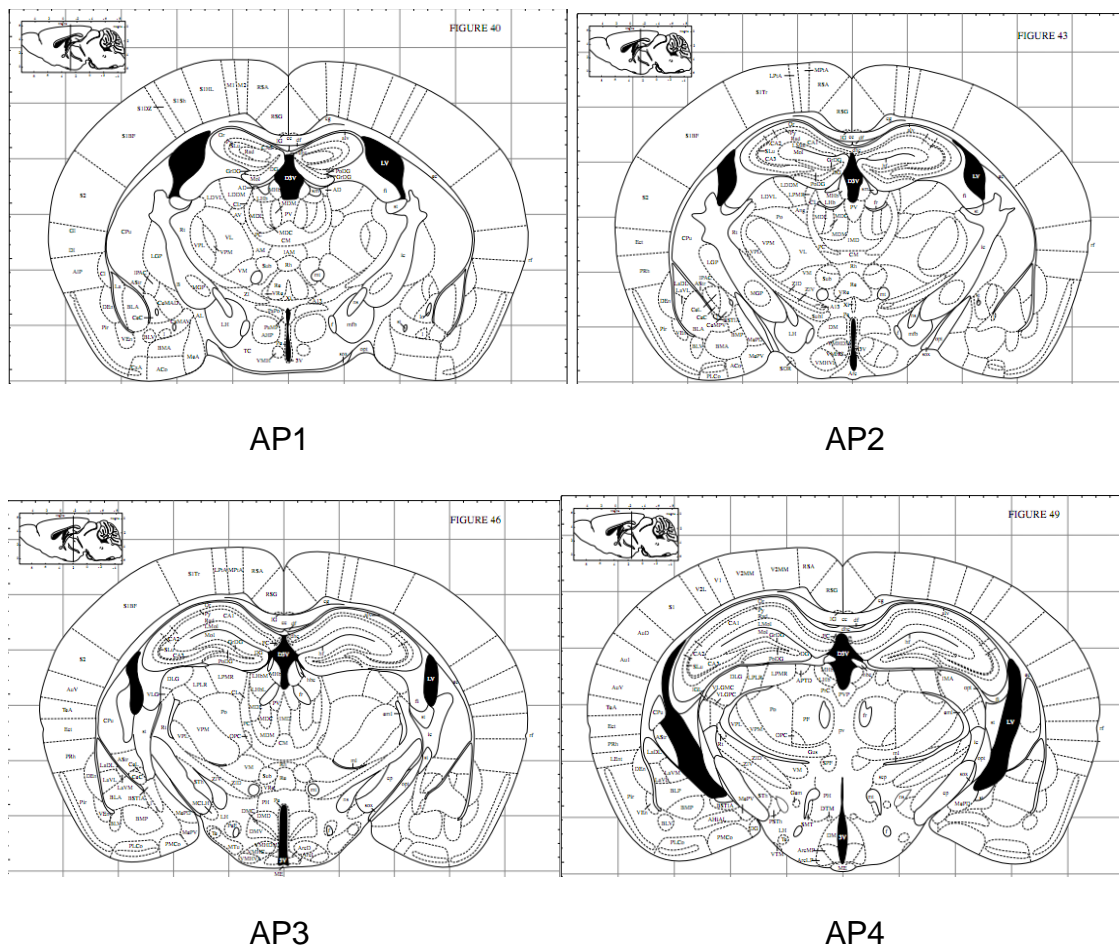


Figura 7- Figuras representativas das regiões selecionadas para a escolha das fatias utilizadas na imunofluorescência.

4.8- IMUNOFLUORESCÊNCIA

4.8.1- Técnica de fluorescência para a marcação BrdU ou dupla marcação NeuN/BrdU

O método utilizado foi o *free-floating*. O protocolo a seguir foi o mesmo para a marcação apenas para o BrdU (usado para confirmar se o AraC afetou a proliferação celular) ou para dupla marcação BrdU/NeuN (usado para avaliar a neurogênese).

As fatias foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em PBS 0,01M. Após, foram procedidas 3 lavagens de 5 minutos em PBS-t (PBS 0,01M com 0,3% TX 100v/v) e 3 lavagens de 5 minutos em NaCl 0,9%. Em seguida, as fatias foram incubadas por 10 minutos em 2M de HCL e por 30 minutos em 3M de HCL, ambas as incubações a 37°C. Posteriormente, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em 0.1 M de Tampão Borato e 3 vezes de 5 minutos em PBS-t. O bloqueio das fatias foi feito com 5% de NGS (Normal Goat Serum) em PBS-t por 1 hora. Após, foram adicionados os anticorpos anti-BrdU (1:800, rat monoclonal-Abcam) e o anti-NeuN (1:500, mouse monoclonal- Millipore). A incubação foi realizada a 4° C por 72 horas. Após os 3 dias de incubação com os anticorpos primários, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em PBS 0,01M, e incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (1:400 anti-mouse Alexa Fluor 568 e 1:400 anti-rat Alexa Fluor 488- Invitrogen) por 90 minutos em temperatura ambiente. Ao final, as fatias foram lavadas 4 vezes por 10 minutos em PBS 0,01M (Tashiro et al.,2007; Lu et al.,2003). É importante salientar que ao longo de todo o processo de imunofluorescência descrito anteriormente foram realizados dois controles essenciais: em um pocinho algumas fatias de hipocampo e bulbo olfatório foram incubadas apenas com

anticorpo primário (controle sem anticorpo secundário) e em outro pocinho fatias também de hipocampo e bulbo olfatório foram incubadas apenas com anticorpo secundário (controle sem anticorpo primário). Esses controles são importantes para identificar se os anticorpos utilizados estão ou não, se ligando de forma inespecífica ao tecido.

As lâminas foram montadas e fixadas em Vectashield (Vector Laboratories), cobertas com lamínulas e mantidas em recipiente protegido de luz e refrigeradas até o dia seguinte, quando foram fotografadas.

4.9- MICROSCOPIA E ANALISE DE IMAGENS

As células BrdU positivas (BrdU+) ou BrdU/NeuN positivas (BrdU/NeuN+) nas regiões de hipocampo e bulbo olfatório foram fotografadas utilizando um microscópio de epifluorescência convencional (Zeiss, Imager.) e adquiridas através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*, com objetiva de 5x, 10x e de 20x. Ao realizar a captura das imagens utilizamos a série-Z que nos possibilitou identificar e quantificar as células co-localizadas. A análise das imagens foi feita utilizando a imagem da série-Z (figura 8) e concomitantemente o software Image J.

Nas imagens de neurogênese, as células BrdU+ são as células de cor verde, já as NeuN+ são as de cor vermelha, e as células co-localizadas BrdU/NeuN+ são as de cor amarela. Entretanto, nas imagens de proliferação celular, nas quais tem-se apenas células BrdU+, estas se encontram na cor cinza fluorescente, como visualizado, por exemplo, na Figura 10.

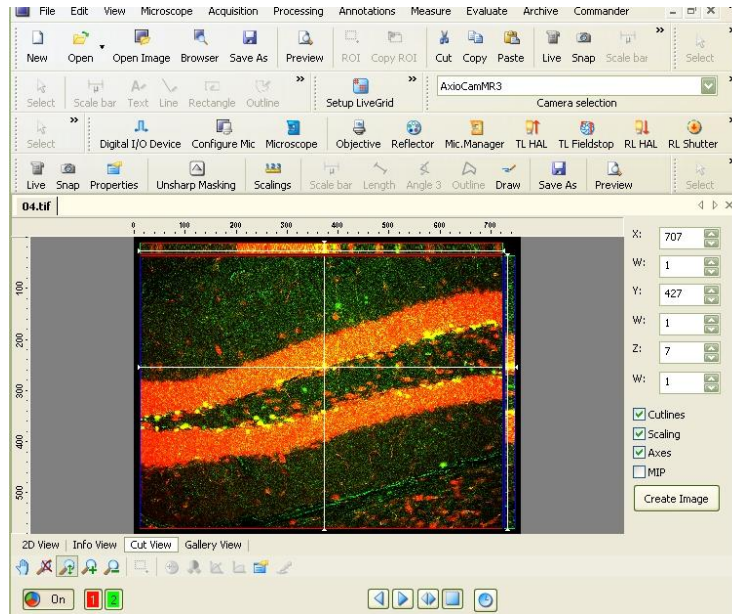


Figura 8- Ilustração da série Z utilizada para a análise das imagens de imunofluorescência.

Em todas as análises, com exceção da camada granular interna do bulbo olfatório (figura 9), a contagem das células foi realizada uma a uma (figura 10). Sendo que na região do hipocampo, os dados foram normalizados pela razão entre o número de células marcadas (BrdU+ ou BrdU/NeuN+) divididas pela área do giro denteado. Essa área por sua vez foi calculada pela demarcação manual da mesma, com o auxílio do programa Image J.

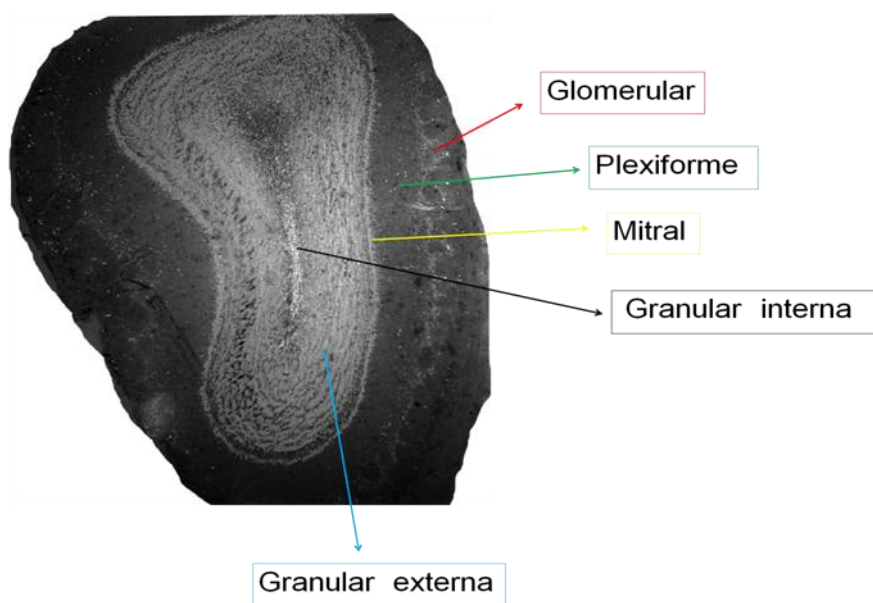


Figura 9- Figura representativa do Bulbo Olfatório.

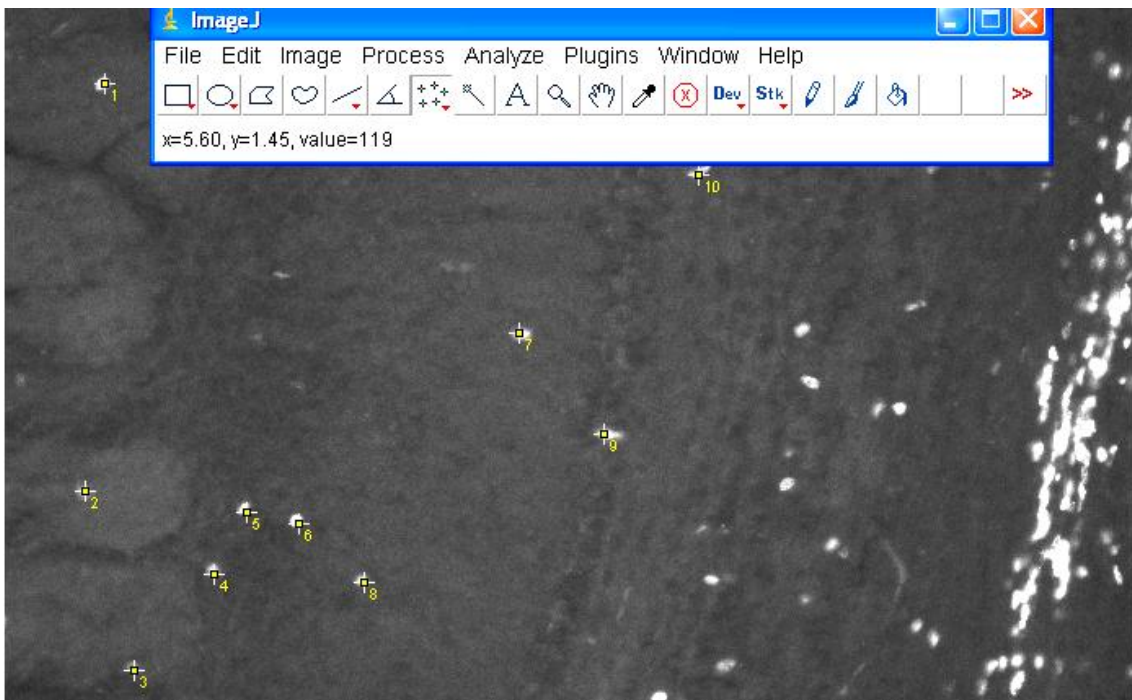


Figura 10- Demonstração da contagem de células BrdU+ uma a uma pelo programa Image J

Na camada granular interna do bulbo olfatório (BO), as fotos foram passadas para 32 bits, foi posteriormente aplicado um threshold entre 95 e 170 (BrdU/NeuN) ou 50 e 200 (BrdU+) - padronizado para todas as fatias (como pode ser visualizado na figura abaixo):

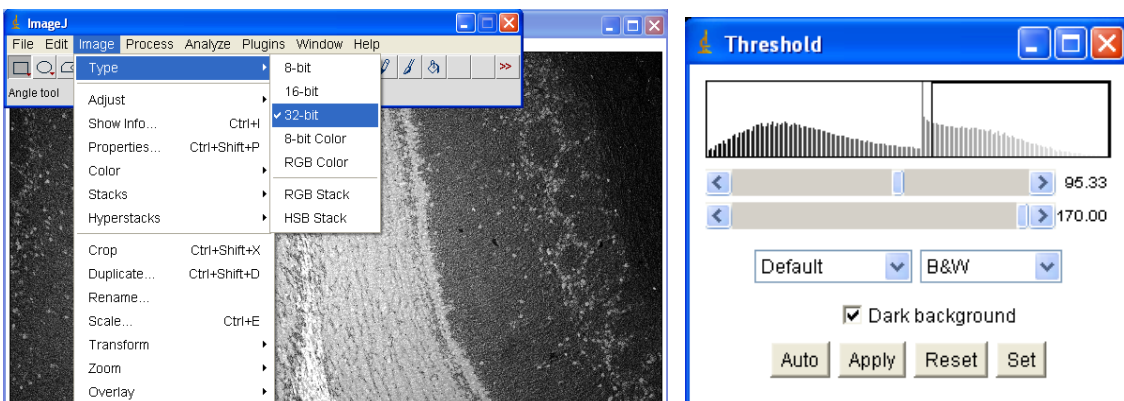


Figura 11- Representação dos passos para análise da camada granular interna do BO.

Lembrando que para estas fatias foi demarcada uma área (a mão livre)

que circundava a região da camada granular interna para saber qual a porcentagem de células dentro do threshold aplicado que se encontrava nesta área (Figura 12). Neste caso a representação gráfica foi dada por porcentagem da área marcada.

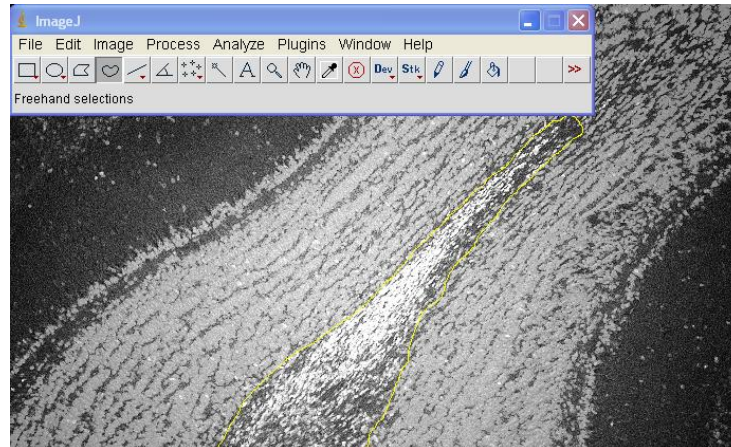


Figura 12- Representação da forma de análise da camada granular interna do BO. Reparem na linha amarela.

5.0- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Protocolo 1- Avaliação da Memória social de curta duração

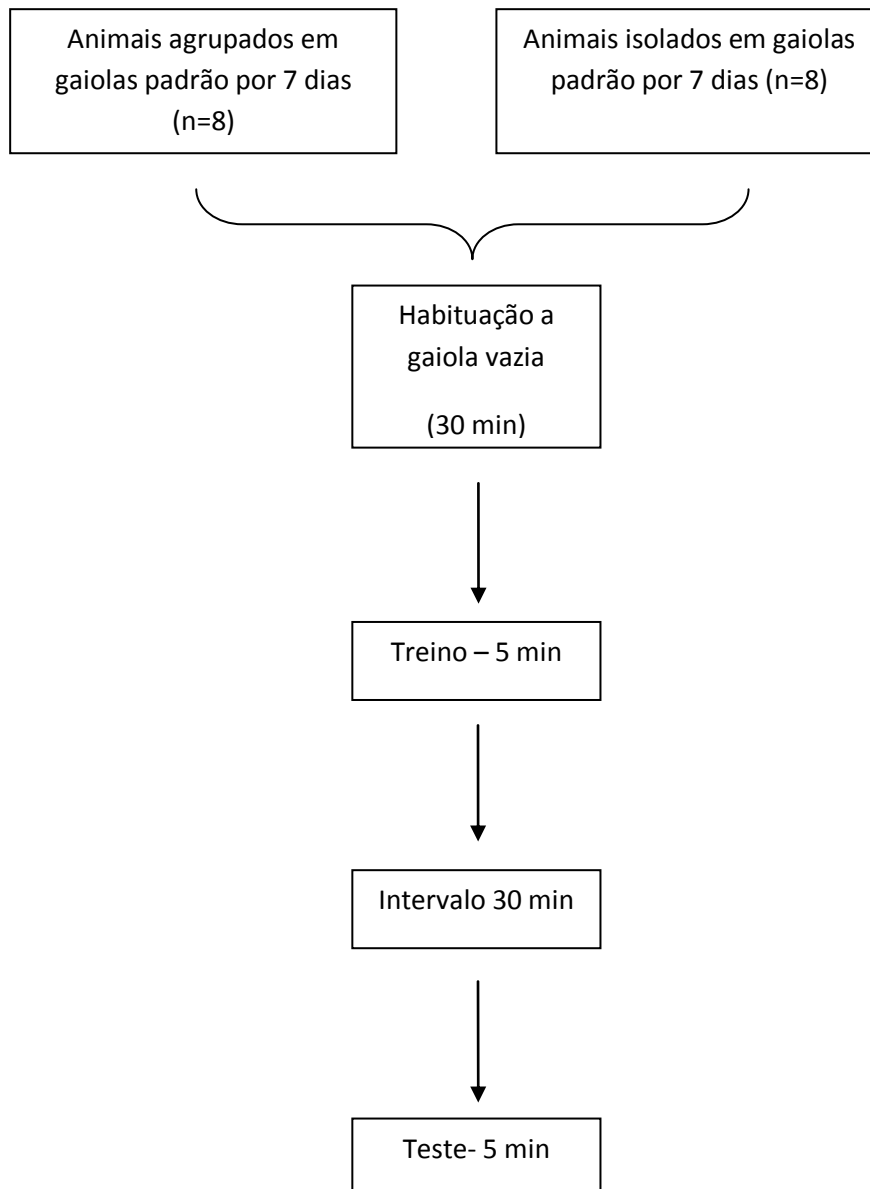


Figura 13- Desenho experimental: avaliação da memória social de curta duração em animais agrupados e isolados em gaiola padrão.

Protocolo 2- Avaliação da Memória social de longa duração

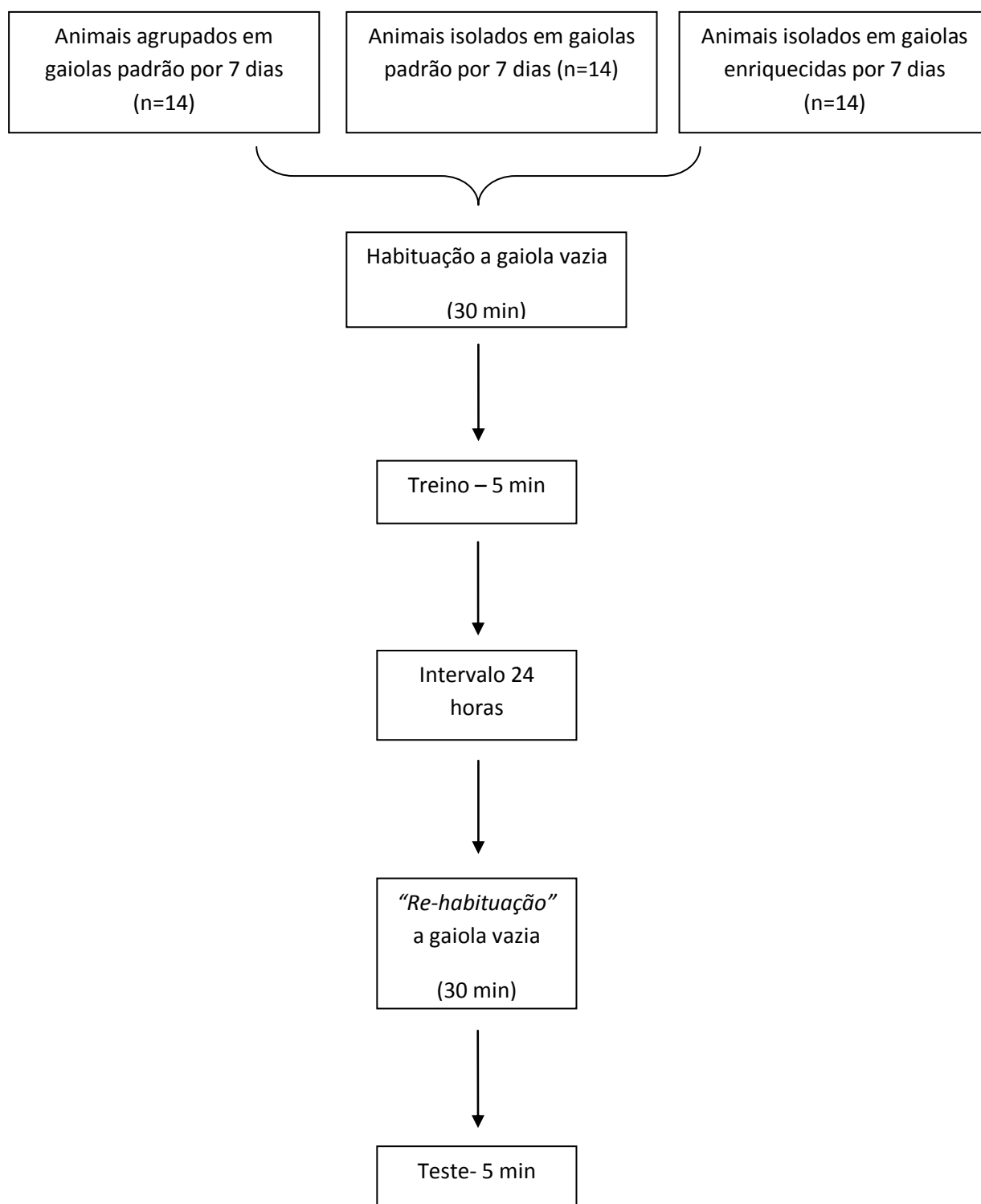


Figura 14- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração em animais agrupados e isolados (gaiola padrão e ambiente enriquecido).

Protocolo 3- Avaliação do comportamento tipo ansiedade em animais isolados e agrupados

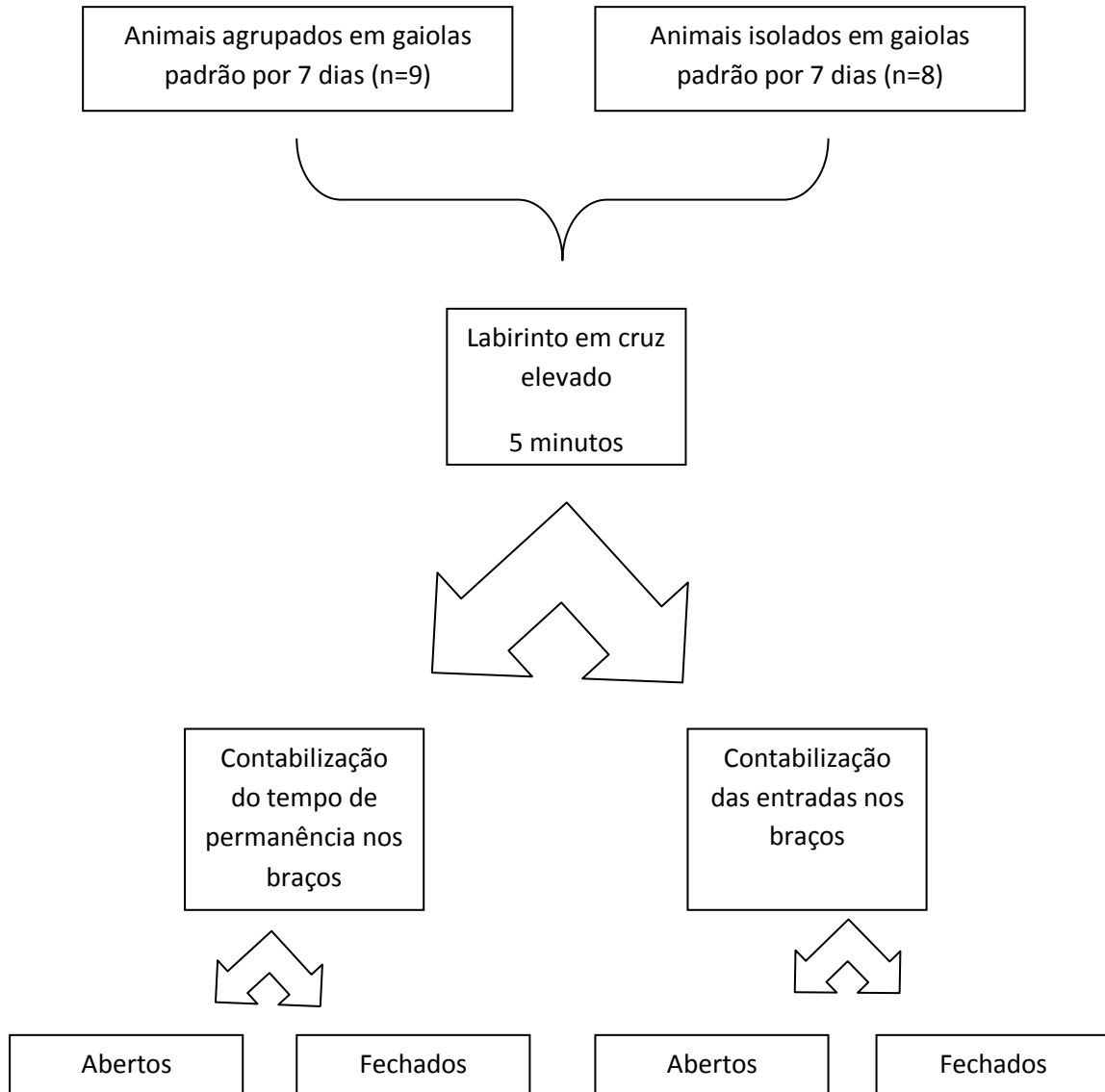


Figura 15- Desenho experimental: avaliação do padrão tipo ansiedade em animais agrupados e isolados em gaiola padrão.

Protocolo 4- Avaliação da taxa de neurogênese no giro denteado do hipocampo.

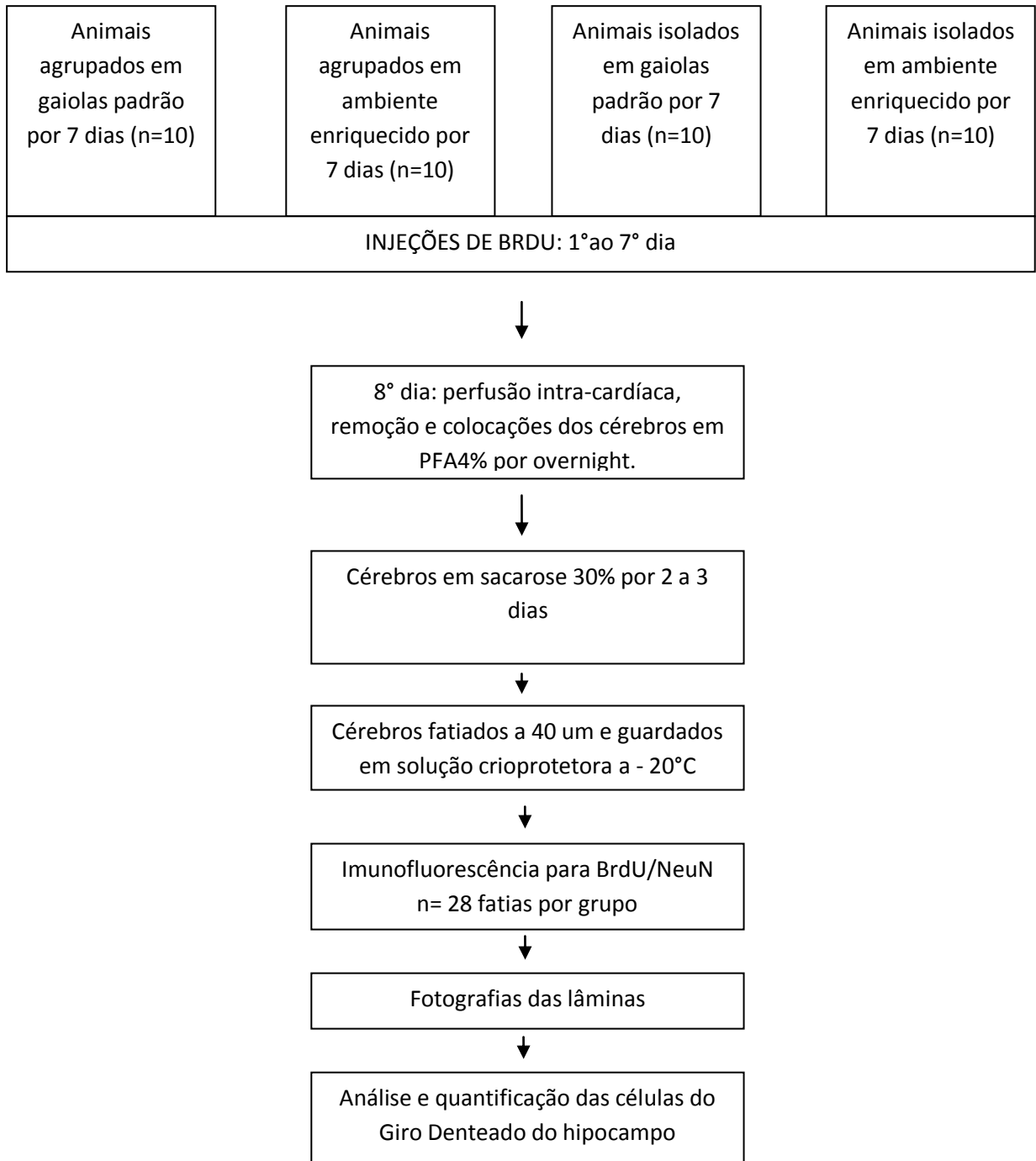


Figura 16- Desenho experimental: avaliação da neurogênese do Giro Denteado do hipocampo nos animais agrupados e isolados (em gaiola padrão e enriquecidas).

Protocolo 5- Avaliação da Memória social de longa duração 10 dias

após o treino.

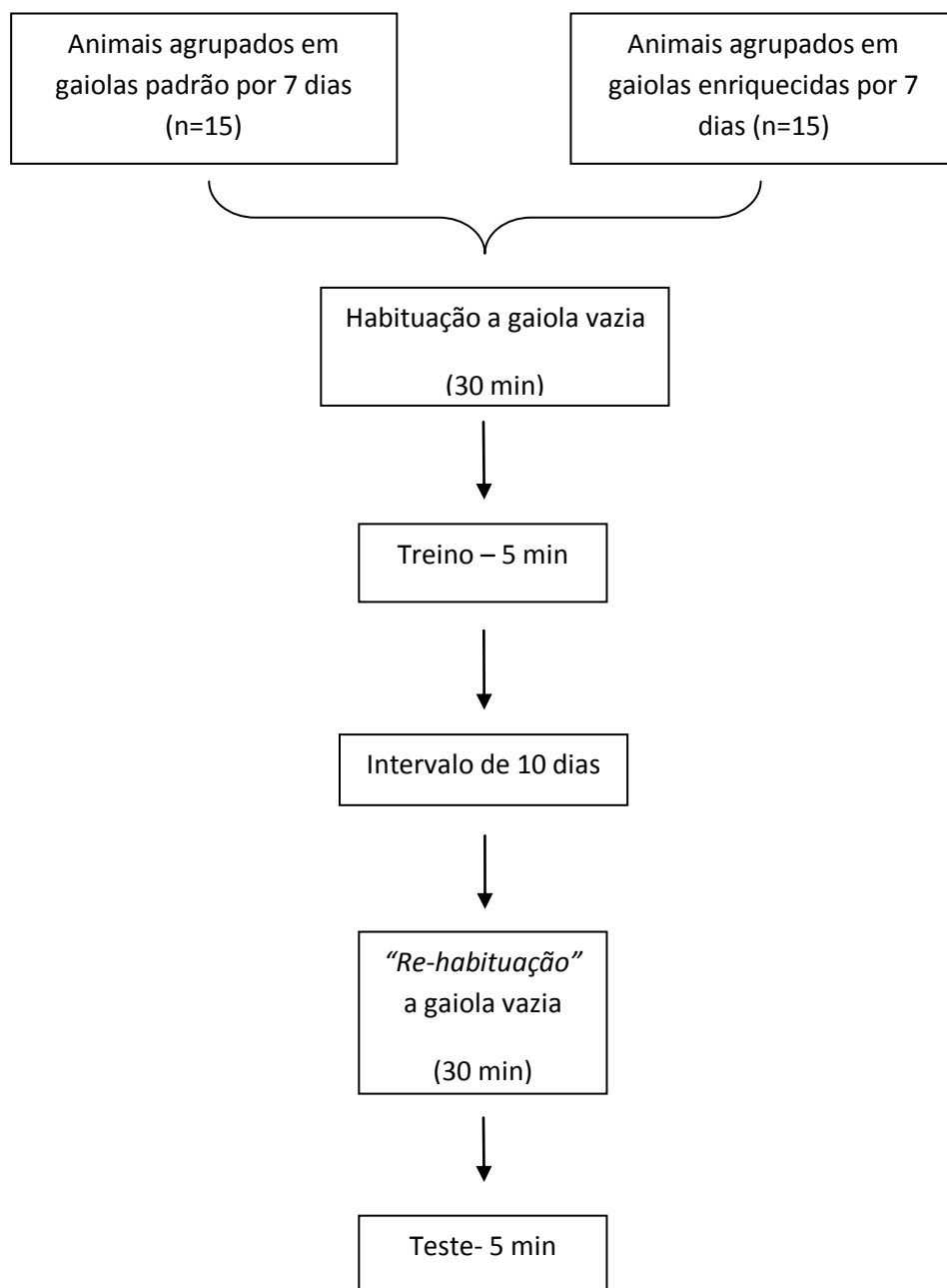


Figura 17- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração 10 dias após o treino em animais agrupados (gaiola padrão ou ambiente enriquecido).

Protocolo 6- Avaliação da Memória social de longa duração após interferência no processo de consolidação da memória.

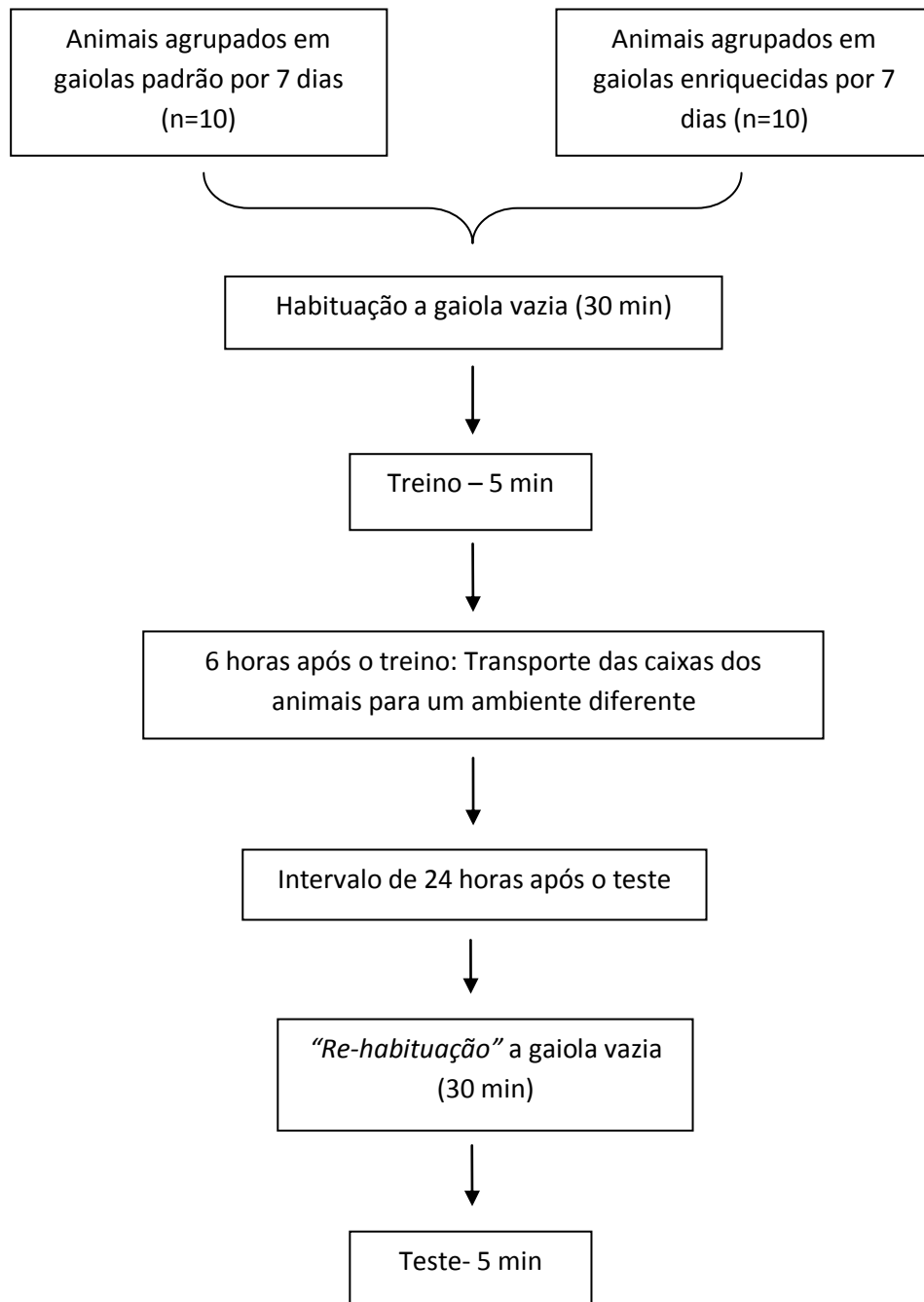


Figura 18- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração após interferência no processo de consolidação em animais agrupados (gaiola padrão ou ambiente enriquecido).

Protocolo 7- Avaliação da taxa de neurogênese no bulbo olfatório.

Obs: mesmos animais utilizados na avaliação da neurogênese do Giro denteado.

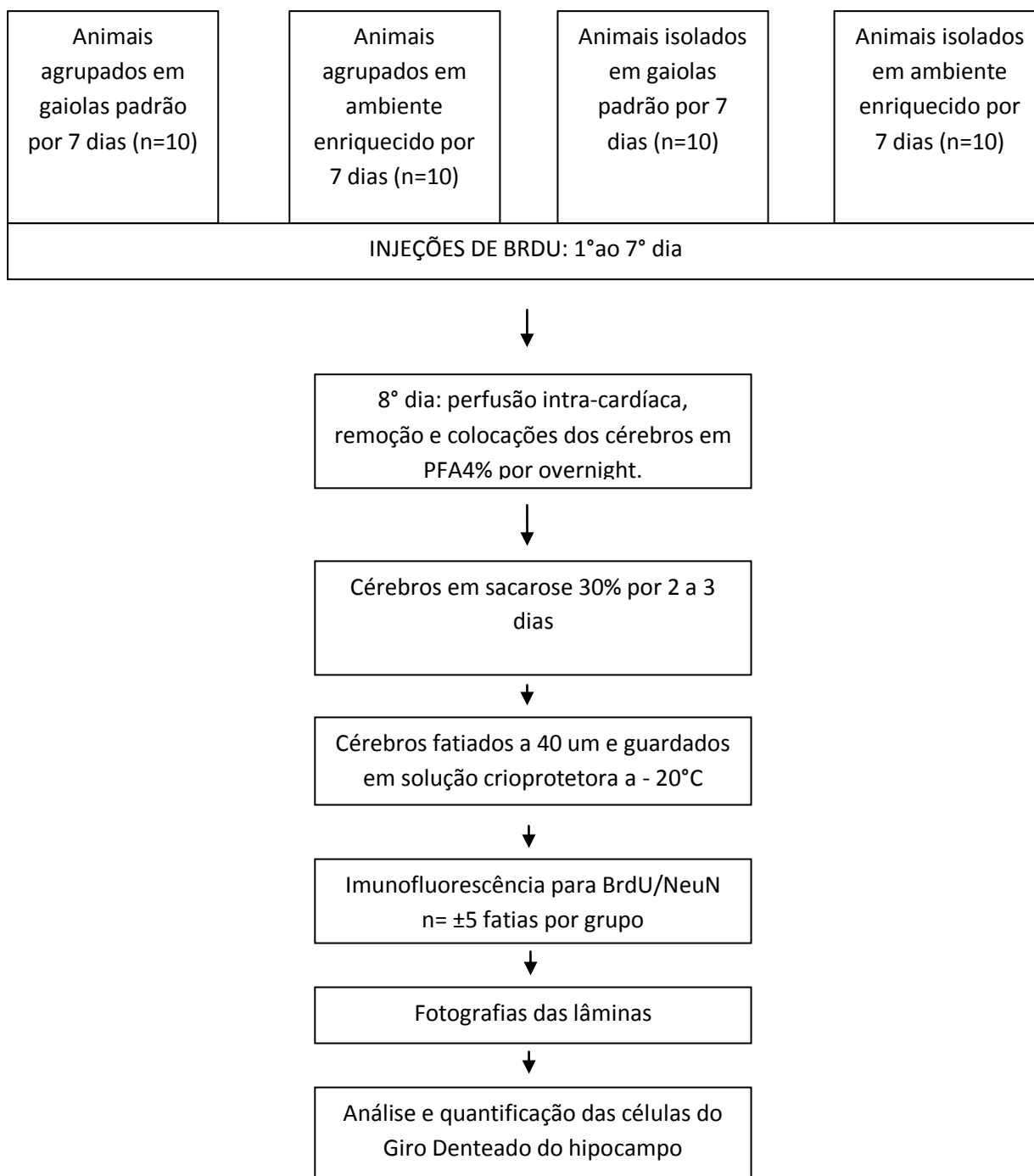


Figura 19- Desenho experimental: avaliação da neurogênese no Bulbo Olfatório nos animais agrupados e isolados (em gaiola padrão e enriquecidas).

Protocolo 8- Avaliação da capacidade olfatória.

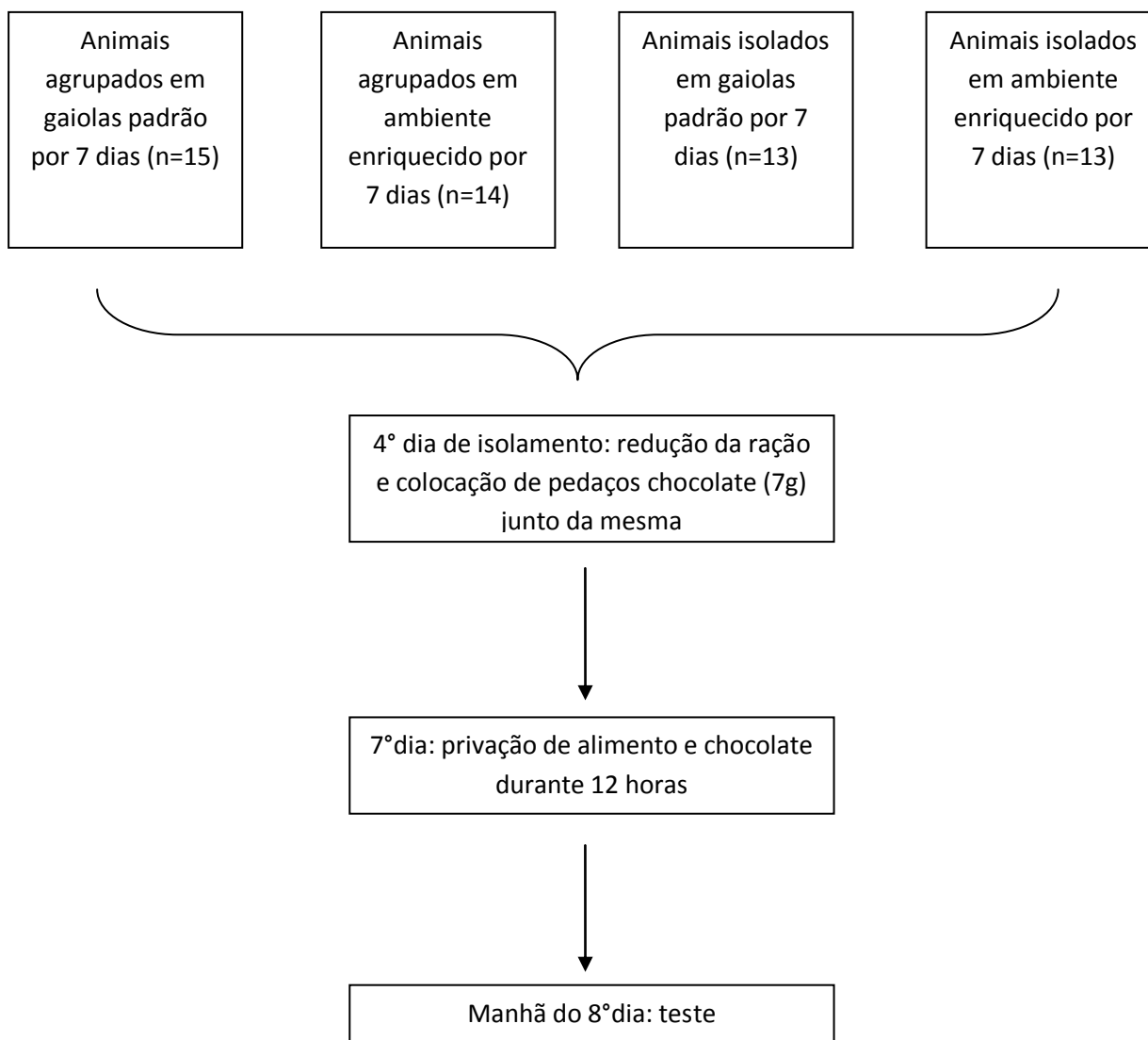
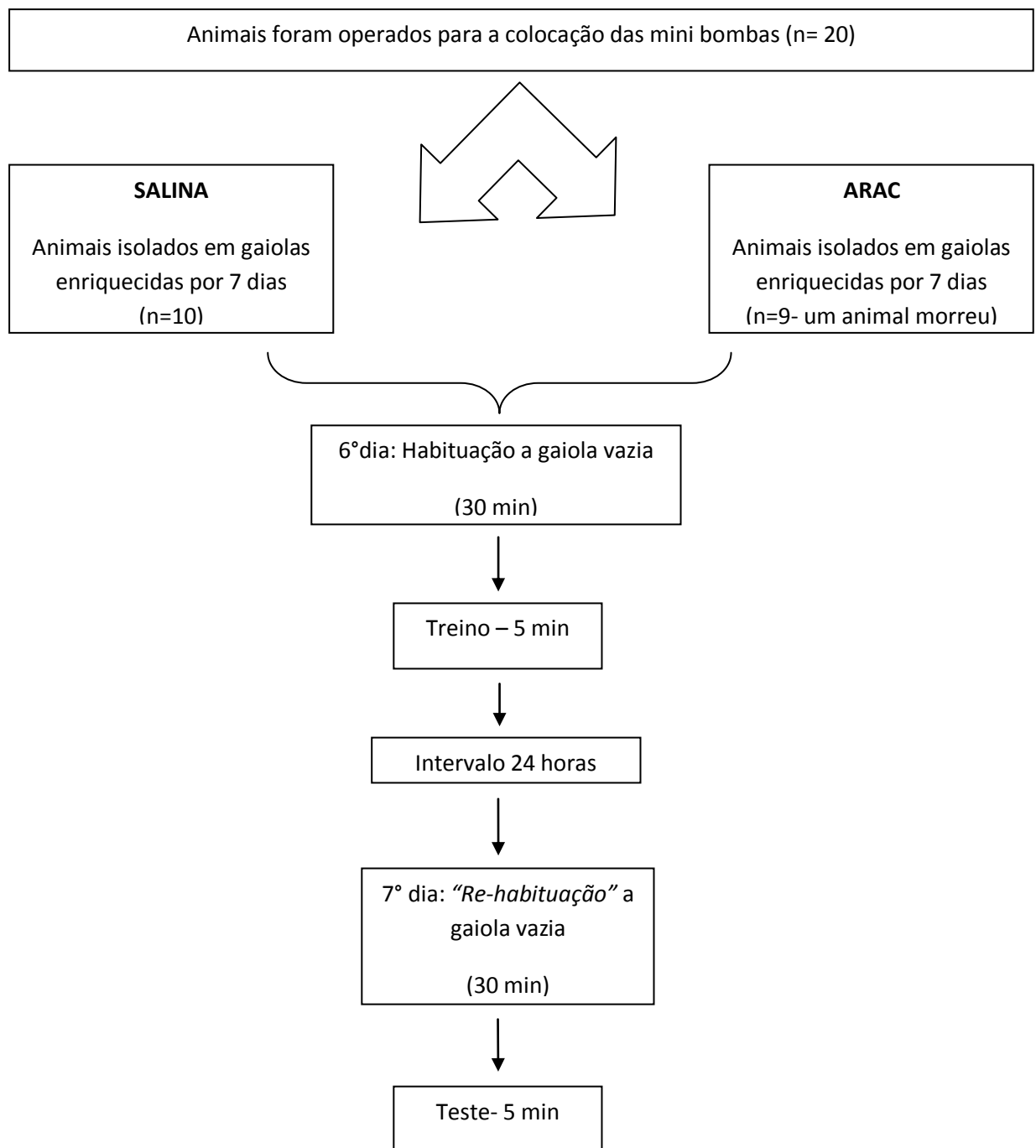


Figura 20- Desenho experimental: avaliação da capacidade olfatória dos animais agrupados e isolados em gaiola padrão e ambiente enriquecido.

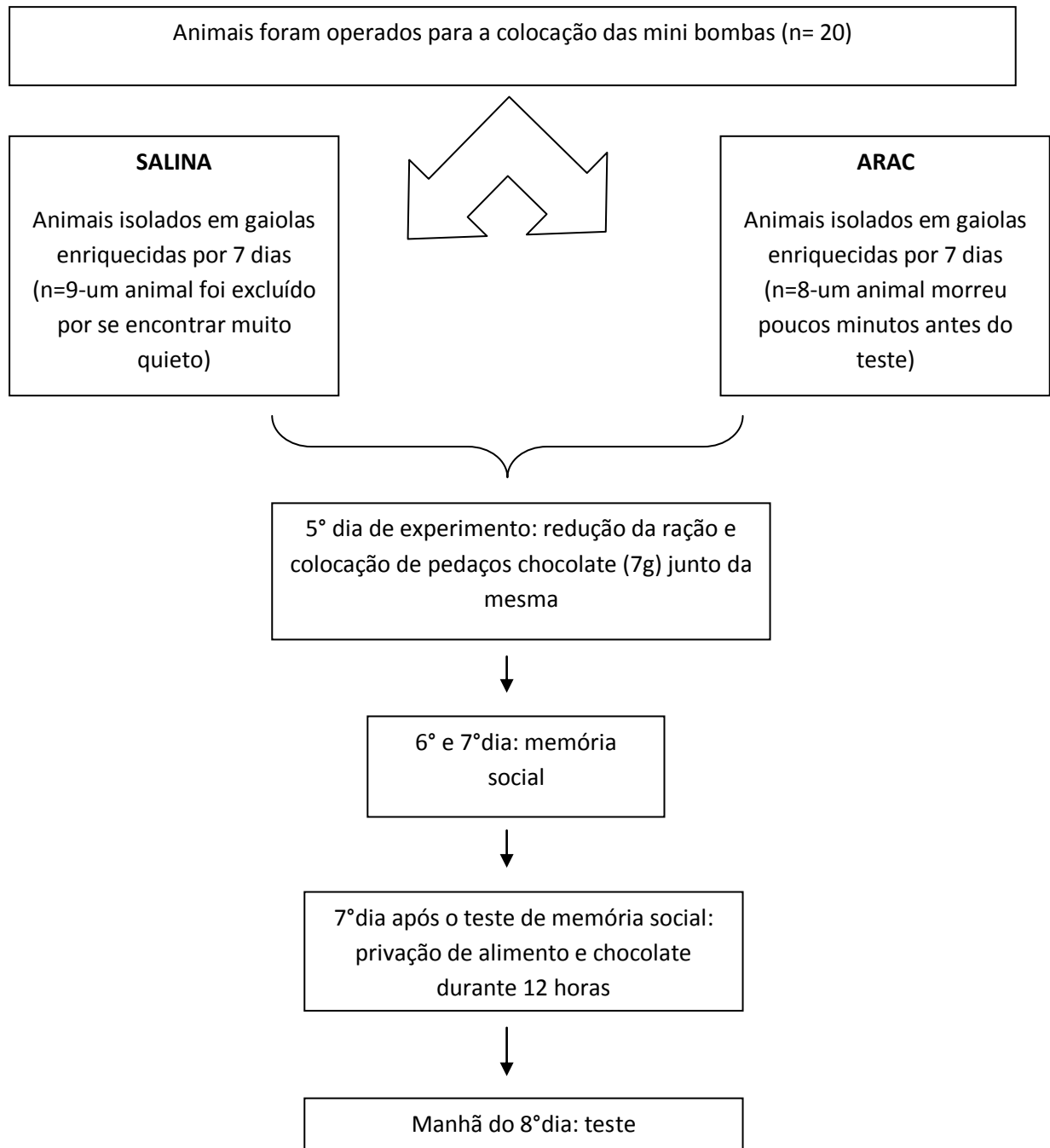
Protocolo 9- Avaliação da Memória social de longa duração após infusão de AraC ou salina



Obs: nas análises estatísticas foram utilizados apenas os animais cujas cânulas estavam no Ventrículo Lateral Direito (VDL), portanto, ao final tivemos 6 animais por grupo.

Figura 21- Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração em animais isolados em ambiente enriquecido após infusão de AraC ou salina.

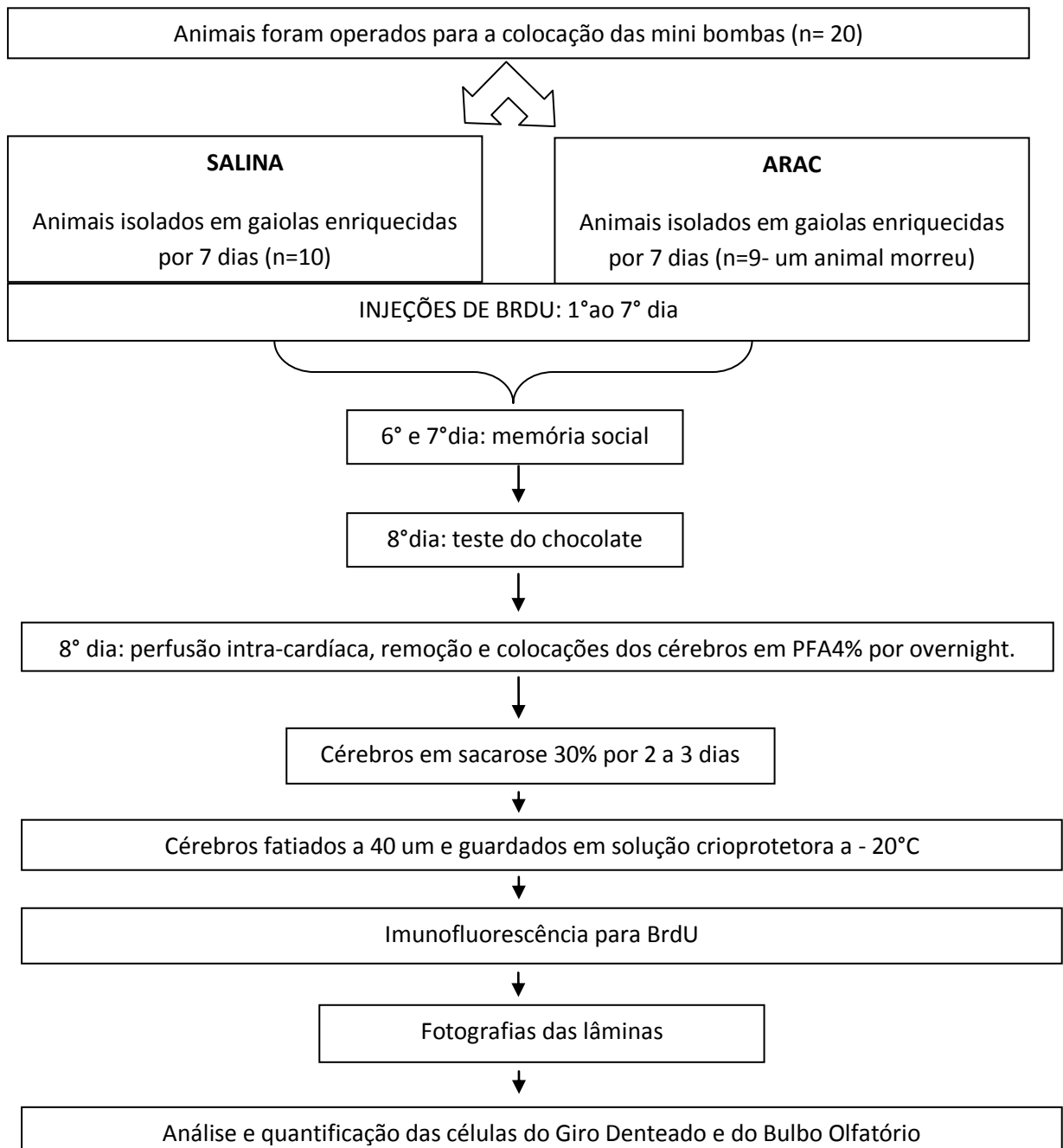
Protocolo 10- Avaliação da capacidade olfatória dos animais após a infusão de salina ou AraC



Obs: nas análises estatísticas foram utilizados apenas os animais cujas cânulas estavam no VDL, portanto, ao final tivemos 6 animais por grupo.

Figura 22- Desenho experimental: avaliação da capacidade olfatória dos animais isolados em ambiente enriquecido após infusão de salina ou AraC.

Protocolo 11- Avaliação da proliferação celular no giro denteado e no bulbo olfatório dos animais após a infusão de salina ou AraC



Obs: nas análises estatísticas foram utilizados apenas os animais cujas cânulas estavam no VDL, portanto, ao final tivemos a média aritmética de 4 fatias por região para os 6 animais utilizados.

Figura 23- Desenho experimental: avaliação da neurogênese no giro denteado e no bulbo olfatório dos animais isolados em ambiente enriquecido após infusão de salina ou AraC.

5.1- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram inicialmente comparados à curva normal de Gauss utilizando o teste de distância K-S (Kolmogorov-Smirnov), através do programa GraphPad Prism 4.

Os dados referentes aos experimentos de memória social foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de 2 vias de medida repetida, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Para verificar se o valor dos Índices de Reconhecimento foi estatisticamente diferente de 0.5 foi usado o *One Sample t test*.

Já os dados de neurogênese foram avaliados utilizando também a análise de variância (ANOVA) de 2 vias, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni, mas esta ANOVA não foi de medida repetida.

Na existência de apenas 2 grupos, por exemplo no caso do labirinto em cruz elevado ou dos protocolos com os animais salina X AraC, as análises foram feitas com o teste t não pareado e na presença de 3 grupos (por exemplo, como no caso da análise do Índice de Reconhecimento Social para a memória social de longa duração nos grupos isolados em gaiolas padrão ou enriquecida e agrupados em gaiolas padrão) com ANOVA de 1 via e pós teste (*pos hoc*) de Bonferroni.

Todos os dados estão expressos por média +/- erro padrão.

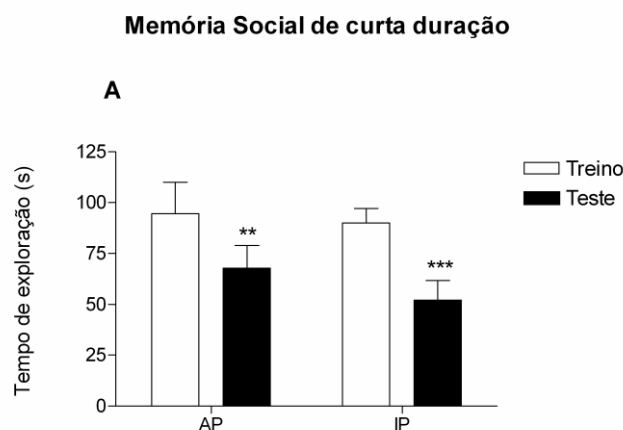
5- RESULTADOS

5.1- MEMÓRIA SOCIAL

Primeiramente, avaliamos a memória social em camundongos SWISS para confirmar que esta linhagem se comportaria como a linhagem C57BL/6J, utilizada por Gusmão & Monteiro et al., 2012.

Corroborando Gusmão & Monteiro et al., 2012 e outros (Thor e Holloway, 1982; Kogan et al., 2000) encontramos que o isolamento social de 7 dias não prejudica a memória social de curta duração na linhagem SWISS (Figura 24 A). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [condição ambiental X sessão: $F(1,14)=1.4$, $p=0.26$] ou efeito principal da condição ambiental [$F(1,14)=0.44$, $p=0.52$]. Entretanto, observamos um efeito principal da sessão [$F(1,14)=46.2$, $p<0.0001$] em ambos os grupos ($p<0.01$).

A análise do índice de reconhecimento social mostrou que tanto o grupo AP ($p=0.0045$), quanto o IP ($p=0.0012$) tiveram o índice de reconhecimento menor que 0.5 (Figura 24 B), o que indica que os animais de ambos os grupos lembraram do juvenil no segundo encontro. Além disso, não houve diferença entre os grupos no desempenho da tarefa ($p= 0.0638$).



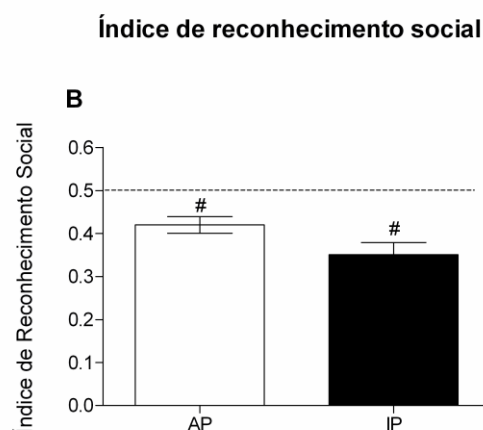


Figura 24- Memória Social de curta duração não é afetada por 7 dias de isolamento social. **A-** Tempo de exploração do juvenil no treino e no teste: os asteriscos (*) indicam diferença entre o treino e o teste no mesmo grupo. **B-** Índice de Reconhecimento Social: os sustentados (#) indicam que os índices foram estatisticamente inferiores a 0.5. AP= Agrupado em gaiola padrão, IP= Isolado em gaiola padrão.

Também corroborando trabalhos anteriores (Thor e Holloway, 1982; Kogan et al., 2000; Gusmão & Monteiro et al., 2012), encontramos que os animais SWISS isolados não foram capazes de lembrar do intruso juvenil 24 horas após o primeiro encontro. Sendo assim, o isolamento social em gaiola padrão, durante 7 dias, prejudicou a memória social de longa duração.

Com objetivo de reproduzir resultados prévios de nosso laboratório que mostraram que animais C57BL/6J isolados em ambiente enriquecido são capazes de reter a memória social por 24h, isolamos animais SWISS em ambiente enriquecido, durante o mesmo período de 7 dias. Nossos resultados mostram que o enriquecimento do ambiente foi capaz de prevenir o déficit de memória social de longa duração causado pelo isolamento (Figura 25 A). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [condição ambiental X sessão: $F(2,39)=2.12$, $p=0.13$] ou efeito principal da condição

ambiental [F(2,39)=0.79, p=0.46]. Entretanto, observamos um efeito principal da sessão [F(2,39)=10.97, p=0.002] nos grupos AP e IE (p<0.05).

A análise do índice de reconhecimento social mostrou que apenas os grupos AP (p= 0.0013) e IE (p= 0.0060) tiveram o índice de reconhecimento menor que 0.5 (Figura 25 B), o que não foi observado no grupo IP (p= 0.7407). Esses resultados indicam que somente os animais dos grupos AP e IE lembraram do juvenil no segundo encontro. A ANOVA de 1 via mostrou que não há diferença entre os grupos quanto ao desempenho na tarefa [F(2,41)= 2.94, p= 0.06].

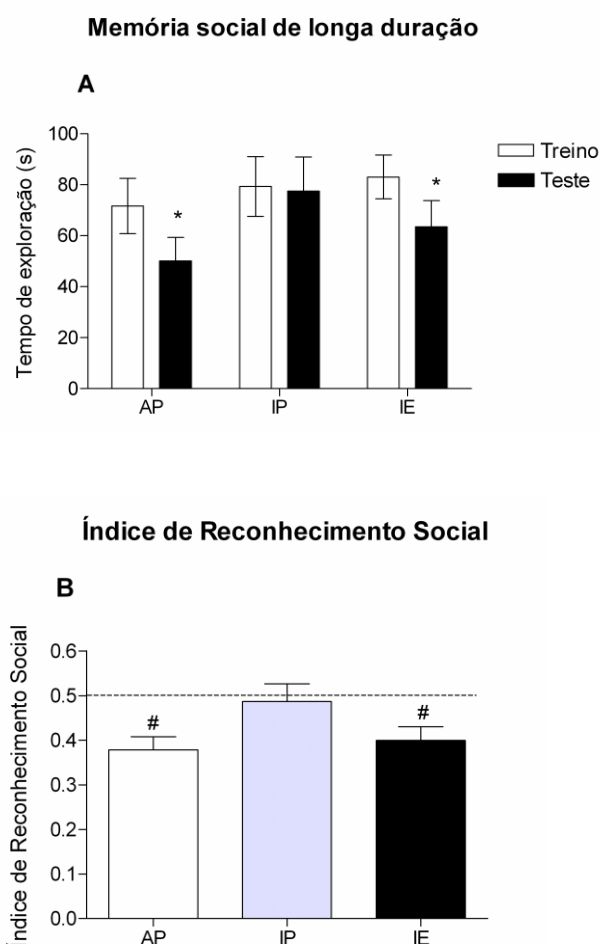


Figura 25- O isolamento social em gaiolas-padrão leva a déficit de memória social de longa duração, entretanto o ambiente enriquecido previne este déficit. A- Tempo de exploração do

juvenil no treino e no teste: os asteriscos indicam diferença entre o treino e o teste em cada grupo. **B-** Índice de Reconhecimento Social: os sustentados indicam que os índices foram estatisticamente inferiores a 0.5. AP= Agrupado em gaiola padrão, IP= Isolado em gaiola padrão e IE= Isolado em ambiente enriquecido.

5.2- AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE

Como trabalhamos com isolamento social e é sabido que este pode levar ao stress e aumentar a ansiedade, o que por sua vez pode afetar o aprendizado e a memória, decidimos realizar a tarefa do labirinto em cruz elevado com o objetivo de avaliar a ansiedade dos animais isolados.

Observamos que uma semana de isolamento social não aumenta comportamentos relacionados à ansiedade. O teste t não pareado demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos em relação a porcentagem de entrada [AP x IP: $t(15) = 0.4527$, $p = 0,6573$] ou tempo de permanência [AP x IP: $t(15) = 0.4390$, $p = 0.6669$] nos braços abertos (Figuras 26A e 26B). Também não observamos diferenças entre os grupos quanto ao tempo de permanência nos braços fechados [AP x IP: $t(15) = 0.5887$, $p = 0,5648$] (Figura 26C).

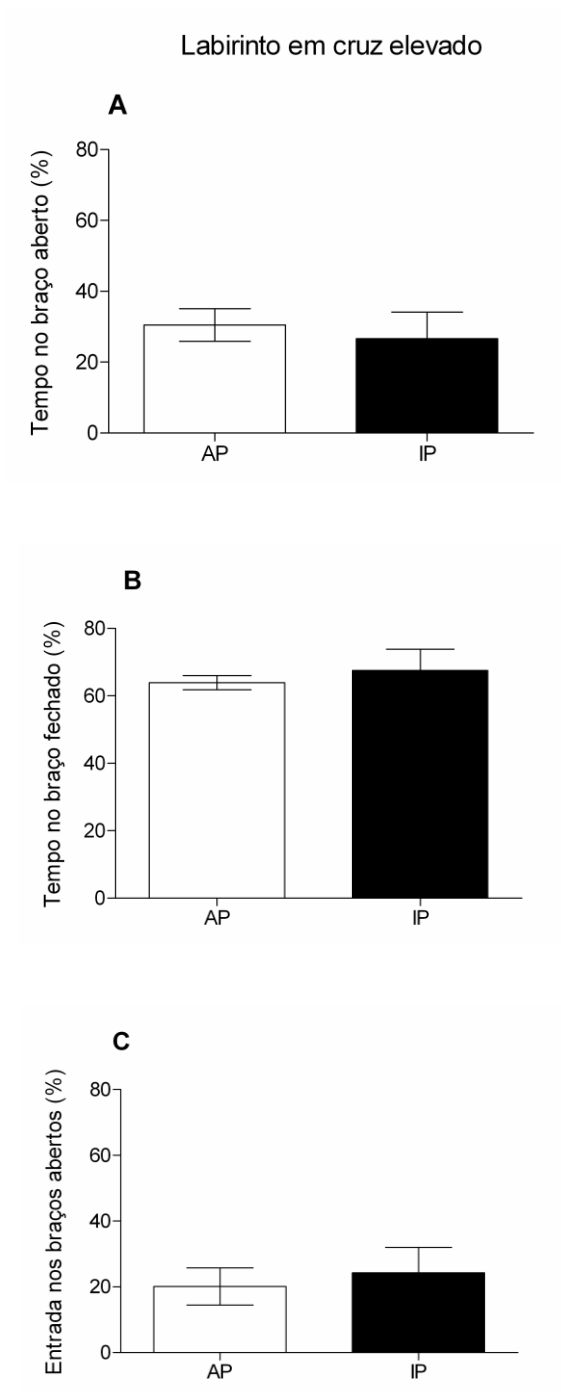


Figura 26 - O isolamento de 1 semana não aumenta a ansiedade dos animais. A- Porcentagem de tempo semelhantes nos braços abertos. **B-** Porcentagem de permanência nos braços fechados também não foi diferente. **C-** Nem foi observado diferença entre os grupos em relação a porcentagem de entradas nos braços abertos.

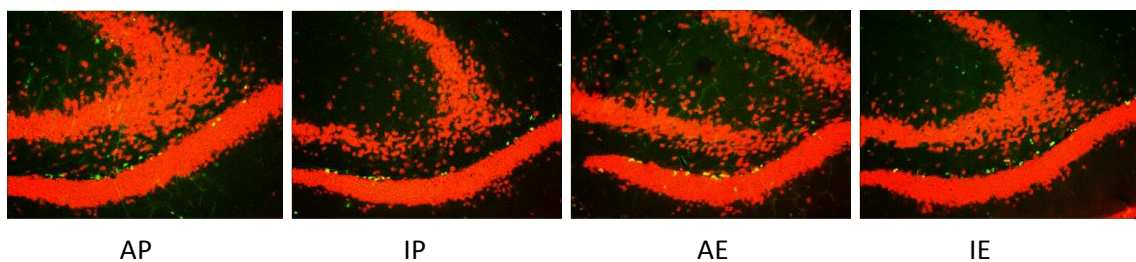
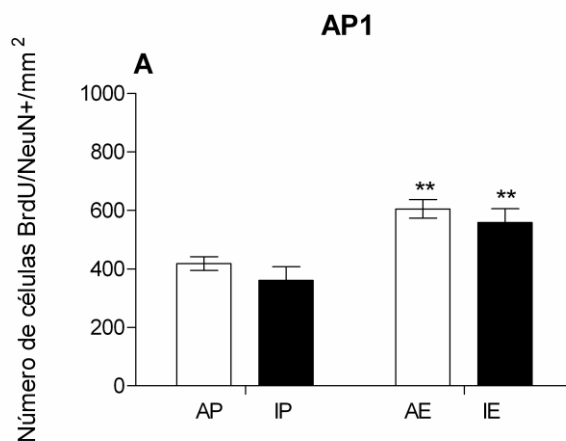
5.3- NEUROGÊNESE NO GIRO DENTEADO (GD) DO HIPOCAMPO

Observamos que o ambiente enriquecido preveniu o déficit de memória social em animais socialmente isolados. Apesar de não ser um consenso, vários estudos mostram que um dos efeitos do ambiente enriquecido é o de aumentar a neurogênese no hipocampo e que isto pode estar relacionado com a melhora da memória (Kempermann, G., et al., 1997; Nilsson M. et al., 1999; Williams et al., 2001; Lazic et al., 2006; Catlow et al., 2009; Okuda et al., 2009). Logo, decidimos verificar se o ambiente enriquecido utilizado em nosso trabalho seria capaz de aumentar a neurogênese no hipocampo. Já que na literatura o efeito do ambiente enriquecido sobre o aumento da taxa de neurogênese foi demonstrado em animais agrupados, decidimos utilizar como controle positivo no nosso estudo, animais agrupados em ambiente enriquecido.

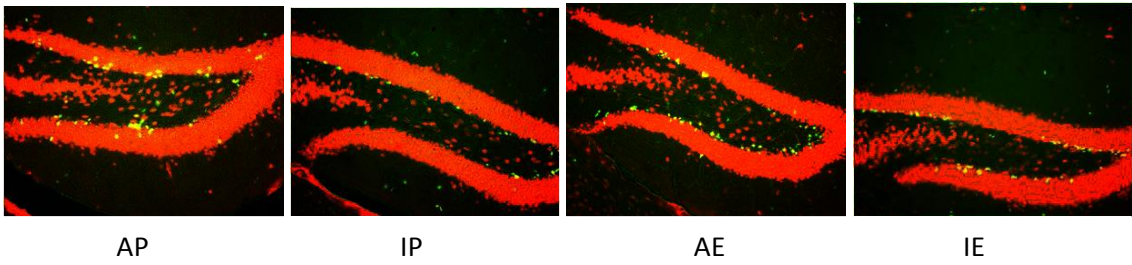
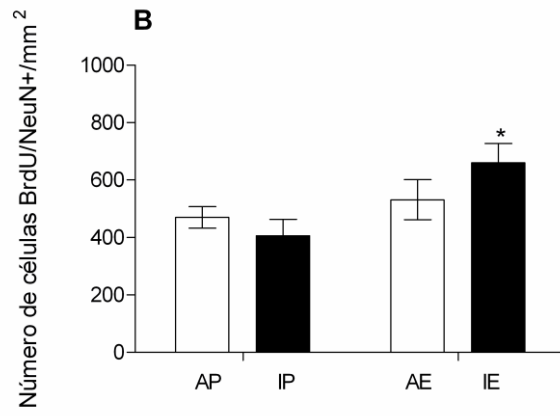
O hipocampo é uma estrutura com papel altamente integrativo, logo, multifuncional. Acredita-se que a parte dorsal do hipocampo associa-se mais à função cognitiva e a parte ventral à função emocional (Czerniawski J. et al., 2011). Diante disso, decidimos analisar mais minuciosamente o hipocampo dorsal. Para tanto, as fatias de hipocampo foram selecionadas em cortes ântero-posteriores (AP's) crescentes e espaçadas a 360 μ m uma da outra. Encontramos diferença significativa entre os grupos no AP1, no qual os animais AE e IE tiveram número superior de neurônios novos em relação aos animais AP e IP (Figura 27A). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,24)=0.02$, $p=0.885$] ou efeito principal do agrupamento [$F(1,24)=1.78$, $p=0.195$]. Entretanto, observamos um

efeito principal do enriquecimento [$F(1,24)=24.17$, $p<0.0001$] nos grupos AE e IE em relação aos grupos AP e IP ($p<0.01$).

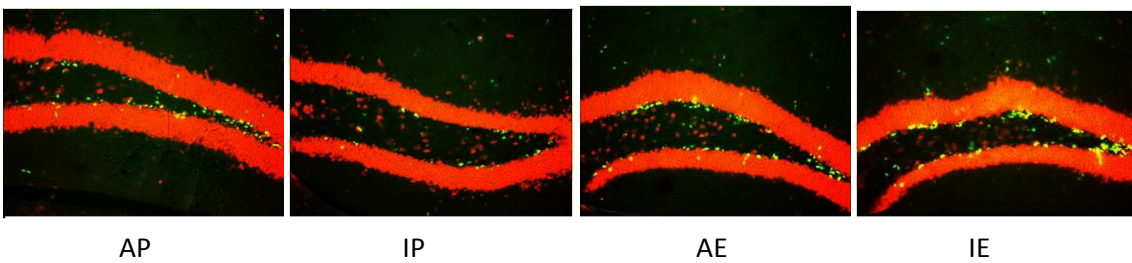
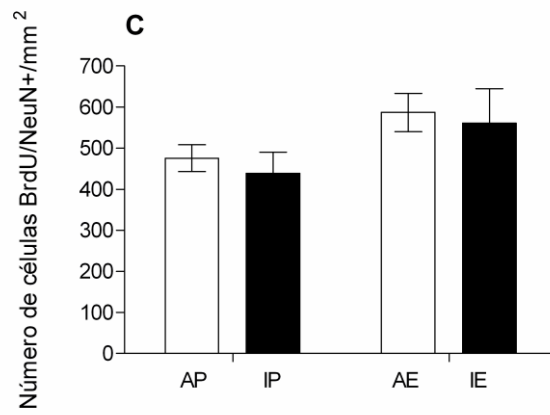
No AP2, somente os animais IE comparados aos IP tiveram maior taxa de neurogênese (Figura 27B). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,24)=2.62$, $p=0.12$] ou efeito principal do agrupamento [$F(1,24)=0.3029$, $p=0.5872$]. Entretanto, observamos um efeito principal do enriquecimento [$F(1,24)=7.113$, $p=0.0135$] sobre os grupos isolados, IP x IE ($p<0.05$). Nas demais sessões (AP3 e AP4) não houve diferença entre os grupos (Figuras 27C e D).



AP2



AP3



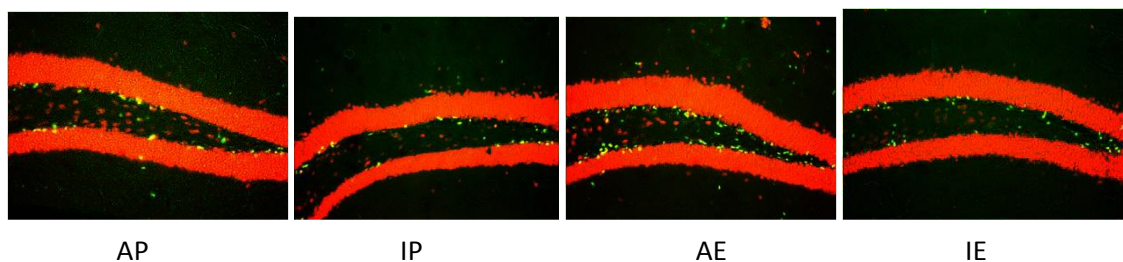
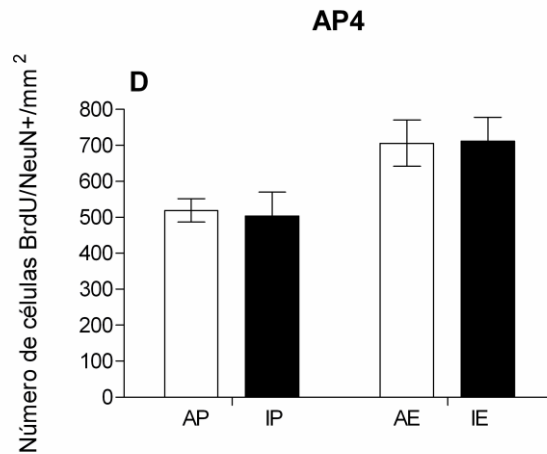


Figura 27- Número de células BrdU/NeuN+/mm² ao longo do eixo antero-posterior do Giro Denteado **A-** AP1 = primeiro nível dentro do eixo analisado. **B-** AP2 = segundo nível dentro do eixo analisado. **C-** AP3= terceiro nível dentro do eixo analisado. **D-** AP4= quarto nível dentro do eixo analisado. As figuras abaixo de cada gráfico são figuras representativas de cada grupo. AP = Agrupados em gaiolas padrão, AE = Agrupados em Ambiente Enriquecido, IP = Isolados em gaiolas padrão, IE = Isolados em Ambiente Enriquecido.

Quando somamos os valores dos quatro AP's observamos diferença significativa na taxa de neurogênese, entre os grupos AP x AE e IP x IE (Figura 28). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,108)=1.125$, $p=0.2912$] ou efeito principal do agrupamento [$F(1,108)=0.2578$, $p=0.6127$]. Entretanto, observamos um efeito principal do enriquecimento [$F(1, 108)=35.96$, $p<0.0001$] sobre os grupos isolados, IP x IE e agrupados, AP x AE ($p<0.01$).

Diante disso, verificamos que a nossa hipótese foi parcialmente comprovada, pois o ambiente enriquecido utilizado em nosso trabalho foi efetivo em prevenir o déficit de memória social e aumentou a taxa de neurogênese no hipocampo dos animais isolados. No entanto, ainda não podemos correlacionar o aumento da neurogênese com a prevenção do déficit de memória social.

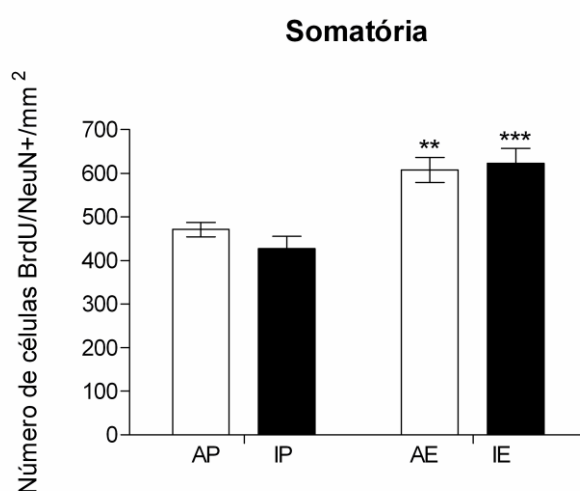


Figura 28- Número de células BrdU/NeuN+/mm² na somatória dos valores dos eixos ântero-posteriores dos Giros Denteados analisados. AP = Agrupados em gaiolas padrão, AE = Agrupados em Ambiente Enriquecido, IP = Isolados em gaiolas padrão, IE = Isolados em Ambiente Enriquecido. Os asteriscos (*) representam a diferença entre os grupos submetidos a condições ambientais diferentes (padrão x enriquecido).

5.4- MEMÓRIA SOCIAL DE LONGA DURAÇÃO: AP x AE

Nossos resultados de imunofluorescência revelaram que o ambiente enriquecido também aumentou a neurogênese na região do GD do hipocampo de animais socialmente agrupados. Diante disto, podemos levantar duas possibilidades: (1) ou o efeito do ambiente enriquecido em aumentar a

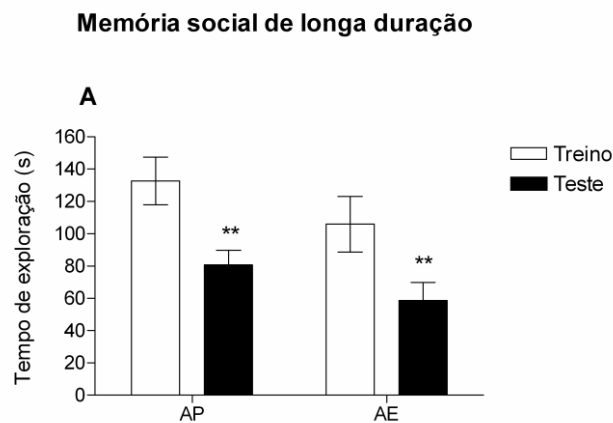
neurogênese no GD de animais agrupados é um fenômeno que não está relacionado com a memória social e nesse caso não deveríamos observar nenhuma melhora na memória social dos animais agrupados em ambiente enriquecido; ou (2) o enriquecimento mais intenso do ambiente, ou seja, com estímulos não-sociais e sociais, pode ter "melhorado" a memória social destes animais. Para testar essas possibilidades, que são excludentes, decidimos verificar se a memória social dos animais agrupados em ambiente enriquecido seria mais persistente ou mais estável ou ainda se estes animais apresentariam um melhor desempenho na tarefa de reconhecimento social.

5.4.1- Avaliação da memória social de longa duração 24 horas após a primeira exposição ao juvenil

Foi observado em alguns estudos, que o ambiente enriquecido pode diminuir o tempo gasto por roedores para encontrar uma plataforma submersa num labirinto aquático, refletindo assim uma melhora no desempenho em tarefas de memória espacial (Kempermann, G., et al., 1997; Nilsson M. et al., 1999; Williams et al., 2001; Lazic et al., 2006; Catlow et al., 2009; Okuda et al., 2009). Quanto à memória social, podemos inferir sobre o desempenho dos animais pela análise do tempo de exploração no treino e através da comparação entre os índices de reconhecimento. Investigamos, então, se haveria diferença no tempo de exploração do juvenil no treino e/ou no índice de reconhecimento social, entre os animais agrupados em ambiente enriquecido e agrupados em gaiola padrão. Para tanto, realizamos a tarefa de reconhecimento social com um intervalo de 24 horas entre o treino e o teste.

Como esperado, os animais de ambos os grupos lembraram-se do juvenil intruso, porém não houve diferença no desempenho da tarefa (Figura 29 A). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [condição ambiental X sessão: $F(1,18)=0.054$, $p=0.8182$] ou efeito principal da condição ambiental [$F(1,18)=2.336$, $p=0.1438$]. Entretanto, observamos um efeito principal da sessão [$F(1,18)=23.23$, $p=0.0001$] em ambos os grupos ($p<0.01$).

A análise do índice de reconhecimento social mostrou que tanto o grupo AP ($p=0.0017$), quanto o AE ($p=0.0092$) tiveram o índice de reconhecimento menor que 0.5 (Figura 29 B), o que indica que os animais de ambos os grupos lembraram do juvenil no segundo encontro. Não houve diferença entre os índices de reconhecimento ($p= 0.7084$).



Índice de reconhecimento social

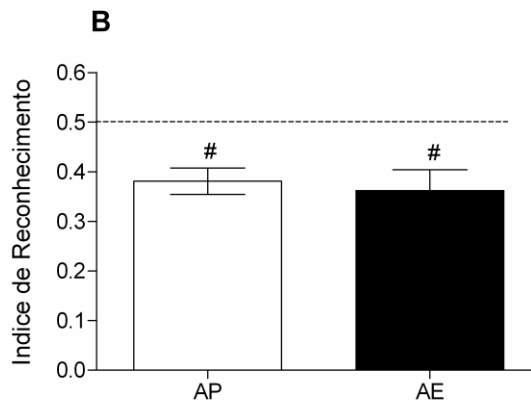


Figura 29- Os animais agrupados em ambiente enriquecido apresentam uma memória social de longa duração (24 horas após o treino) semelhante a dos animais agrupados em gaiola padrão. A- Gráfico representativo do tempo de exploração no treino (TR) e no teste (TT), os asteriscos expressam a diferença entre treino e teste. **B-** Índice de Reconhecimento Social: a linha pontilhada representa o índice de 0,5 e os sustentados representam que o valor do índice foi estatisticamente menor que 0.5.

A tarefa de reconhecimento social, diferentemente do labirinto aquático, reflete mais especificamente se o animal é ou não capaz de lembrar do juvenil, do que se sua memória é melhor ou pior do que a de outro animal adulto. Isso se deve ao fato de que, o animal adulto, embora já conheça o juvenil, exibe mesmo assim uma certa interação social com ele. Desta maneira, o tempo desta interação num segundo contato não é tão drasticamente reduzida a ponto de remeter a um melhor ou pior desempenho na tarefa.

5.4.2- Persistência da memória social de longa duração

Como foi observado, comparar o desempenho dos animais agrupados em relação à memória social pode não ser tão sensível para detectar possível melhora desta memória desencadeada pelo enriquecimento físico do ambiente.

Kogan e colaboradores 2000, encontraram que os roedores são capazes de reter a memória social por até 7 dias. Diante disso, pensamos se seria possível os animais agrupados em ambiente enriquecido reterem essa memória por um período maior do que 7 dias, o que demonstraria uma melhora na persistência da memória.

Realizamos o treino no sétimo dia de enriquecimento do ambiente e retornamos os animais para a condição de habitação padrão. Somente 10 dias após o treino, realizamos o teste. Esse desenho experimental foi importante para garantir que o resultado obtido fosse decorrente da codificação do traço de memória no momento em que os efeitos plásticos do ambiente enriquecido estavam presentes e não de um efeito prolongado do ambiente enriquecido.

Verificamos que apenas os animais agrupados em ambiente enriquecido foram capazes de reter a memória social por 10 dias (Figura 30 A). A ANOVA de 2 vias mostrou haver interação entre os fatores [condição ambiental X sessão: $F(1,28)=6.84$, $p=0.0142$], logo analisamos os resultados pelo teste t. O teste t pareado mostrou que houve diferença entre treino e teste no grupo AE ($p=0.0001$), mas não no grupo AP ($p=0.1171$).

A análise do índice de reconhecimento social mostrou que apenas o grupo AE ($p=0.0005$) teve o índice de reconhecimento menor que 0.5, diferentemente do grupo AP ($p=0.0527$, Figura 30 B), o que indica que somente os animais AE lembraram do juvenil no segundo encontro. Além disso, não houve diferença entre os grupos no desempenho da tarefa ($p= 0.0834$).

Diante destes resultados é possível inferir que o enriquecimento ambiental somado aos estímulos sociais é capaz de aumentar a persistência

da memória social, que na ausência de enriquecimento do ambiente é de 7 dias, por pelo menos 10 dias.

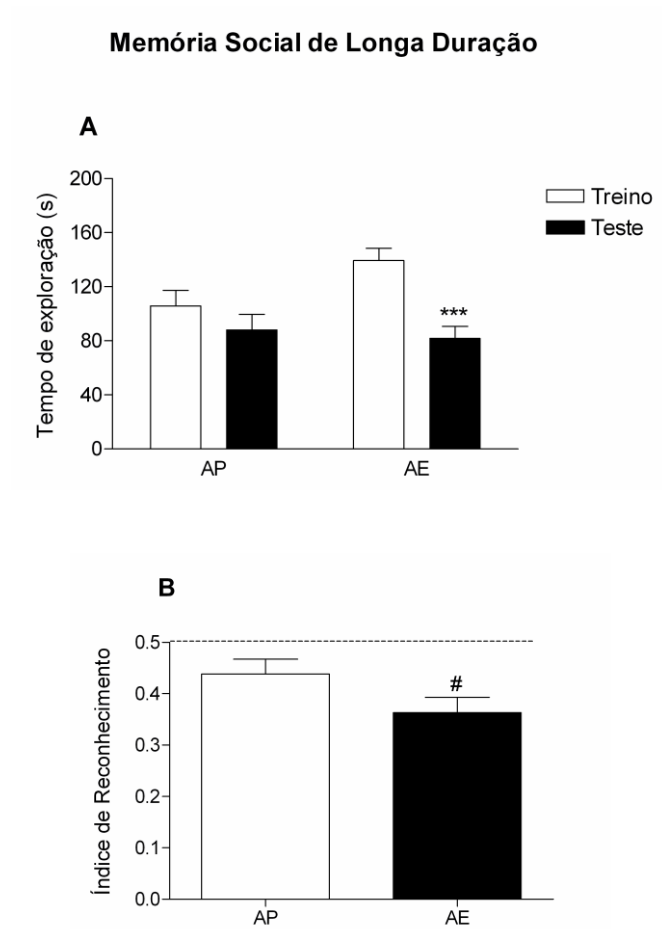


Figura 30- O ambiente enriquecido aumenta a persistência da memória social de longa duração. A- Gráfico representativo do tempo de exploração no treino (TR) e no teste (TT), os asteriscos expressam a diferença entre treino e teste nos animais agrupados em ambiente enriquecidos. **B-** Índice de Reconhecimento Social: a linha pontilhada representa o índice de 0.5 e o sustenido representa que o valor do índice do grupo AE foi estatisticamente menor que 0.5.

5.4.3- Estabilidade da memória social de longa duração

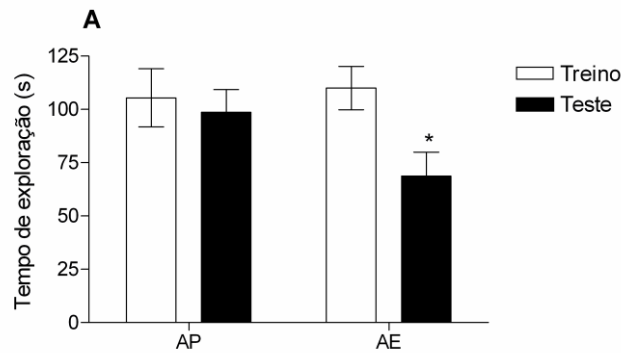
Após a aquisição, memórias são estabilizadas ao longo do processo chamado de consolidação. Foi demonstrado que a consolidação da memória

social de longa duração é estabilizada em dois tempos específicos, imediatamente e 6 horas após o contato com o animal intruso (Ricther et al., 2005). Os autores utilizaram como ferramenta para testar a estabilidade da memória social a administração do inibidor de síntese protéica, a anisomicina, cujo efeito é bastante consistente. Logo, se utilizássemos a anisomicina, provavelmente ambos os grupos não lembrariam do juvenil no teste. Como o nosso objetivo era testar a estabilidade da memória social após o ambiente enriquecido em animais agrupados, da maneira mais sutil possível, optamos por uma ferramenta menos invasiva, e simplesmente modificamos os animais de sala, 6h após o treino e realizamos o teste 24 horas após o treino.

Apenas os animais agrupados em ambiente enriquecido apresentaram memória social de longa duração intacta (Figura 31 A). A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [condição ambiental X sessão: $F(1,36)=2.25$, $p=0.1425$] ou efeito principal da condição ambiental [$F(1,36)=1.206$, $p=0.2794$]. Entretanto, observamos um efeito principal da sessão [$F(1,36)=4.376$, $p=0.0436$] nos animais AE ($p<0.05$).

A análise do índice de reconhecimento social mostrou que o grupo AE ($p= 0.0129$), mas não o AP ($p= 0.2042$), teve o índice de reconhecimento menor que 0.5 (Figura 31 B), o que indica que somente os animais AE lembraram do juvenil no segundo encontro. Além disso, não houve diferença entre os grupos no desempenho da tarefa ($p= 0.0880$).

Memória Social de Longa Duração



Índice de Reconhecimento

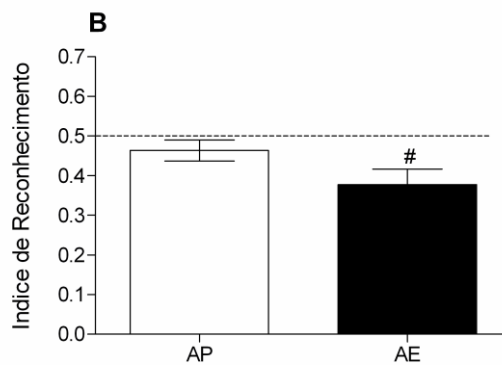


Figura 31- O ambiente enriquecido aumenta a estabilidade da memória social de longa duração. **A-** Gráfico representativo do tempo de exploração no treino (TR) e no teste (TT), os asteriscos (*) expressam a diferença entre treino e teste nos animais agrupados em ambiente enriquecidos. **B-** Índice de Reconhecimento Social: a linha pontilhada representa o índice de 0.5 e o sustenido (#) representa que o valor do índice do grupo AE foi estatisticamente menor que 0.5.

Assim, o ambiente enriquecido parece ter fortificado de alguma maneira a rede mnemônica a ponto de impedir que a consolidação da memória social de longa duração fosse afetada 6 horas após a apresentação do juvenil.

5.5- NEUROGÊNESE NO BULBO OLFATÓRIO (BO)

As principais regiões do encéfalo onde a neurogênese está bem descrita são o hipocampo e o bulbo olfatório. Além disso, o BO é uma região onde a informação olfativa é inicialmente codificada, o que reflete no processamento de memórias dependentes de olfato, como é o caso da memória social. Logo, decidimos avaliar a neurogênese no BO.

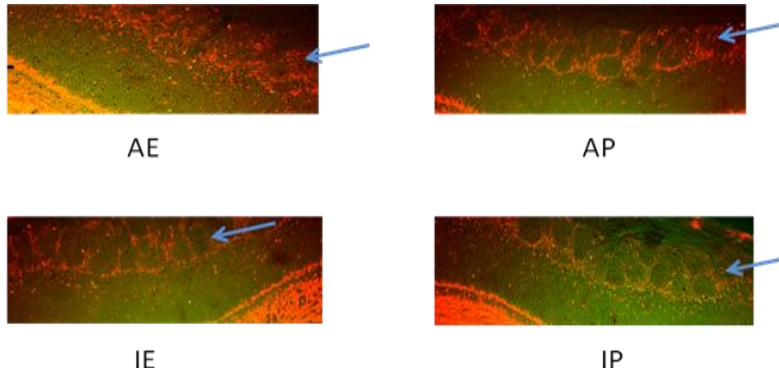
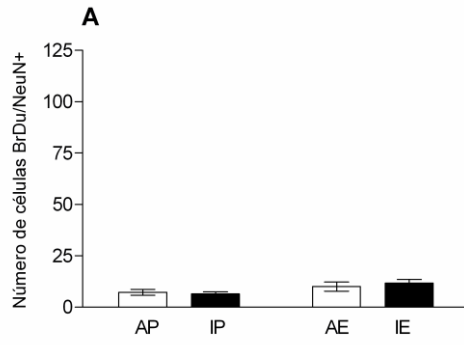
A informação sensorial entra no sistema olfativo através da ligação do odorante aos receptores expressos em Neurônios Sensoriais Olfativos (NSO). Essa ligação gera potenciais de ação que evocam a liberação sináptica de glutamato para as células periglomerulares (presentes nas **camadas glomerular e plexiforme**) e para as **células mitrais**. Os padrões de disparo das células mitrais são moldados pelos interneurônios inibitórios das camadas periglomerular e **granular**. Acredita-se que as células mitrais ativem as células granulares neo-formadas (numa interação dendrodendríticas) e estas por sua vez estimulam a liberação de GABA, modulando inibitoriamente os estímulos conduzidos pelas células mitrais. Depois de refinada, a informação olfativa é retransmitidas para células-alvo presentes no córtex piriforme, onde é processada, influenciando o comportamento. A renovação contínua dos interneurônios recém-nascidos é necessária para o refinamento inibitório das células mitrais e essa inibição por sua vez, é crucial para o adequado funcionamento do olfato (Price J.L. & Powell T.P. 1970; Lledo P.M. & Saghatelian A.,2005; Lagier S. et al. 2007; Arenkiel B.R., 2010).

Considerando a diferença funcional de cada camada do BO, decidimos quantificamos os neurônios novos nas varias camadas do BO. Seguindo da camada mais externa para a mais interna temos: **Camada Gromerular,**

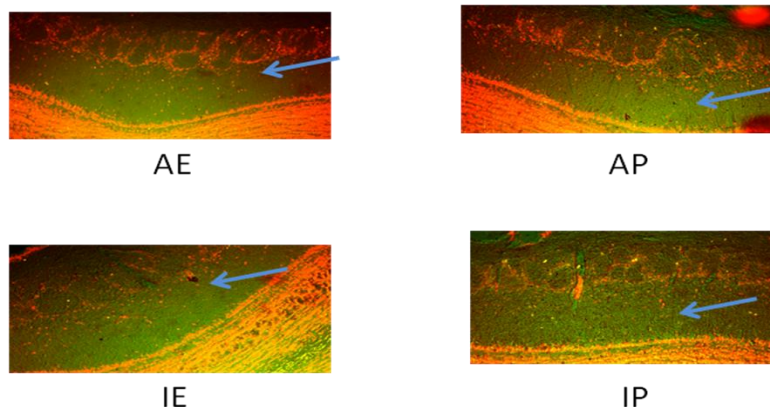
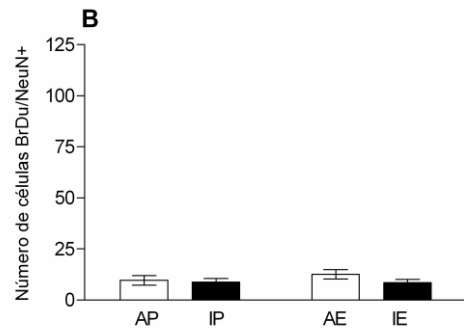
Camada Plexiforme, Camada Mitral, Camada Granular externa e Camada Granular interna (Figura 9).

Foi verificada diferença estatística apenas entre os animais agrupados em gaiolas padrão com os animais agrupados em ambiente enriquecido e essa diferença ocorreu apenas na camada granular externa do bulbo olfatório. A ANOVA de 2 vias mostrou que na Camada Glomerular não houve interação significativa entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,12)= 0.5495$, $p=0.4728$] e nem diferença entre os grupos ($p > 0.05$); na Camada plexiforme não houve interação significativa entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,16)= 0.6556$, $p=0.43$] e nem diferença entre os grupos ($p > 0.05$); na Camada Mitral não houve interação significativa entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,16)= 0.0101$, $p=0.9212$] e nem diferença entre os grupos ($p > 0.05$), e na Camada Granular interna não houve interação significativa entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,16)= 1.541$, $p=0.2323$] e nem diferença entre os grupos ($p > 0.05$). Entretanto, na Camada Granular externa a ANOVA de 2 vias mostrou haver interação entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,16)=4.611$, $p=0.0474$], então analisamos os resultados pelo teste t. O teste t pareado mostrou que houve diferença entre os grupos AP x AE ($p=0.0180$), mas não entre os grupos IP x IE ($p=0.7987$), AP x IP ($p=0.1732$) ou AE x IE ($p=0.1548$).

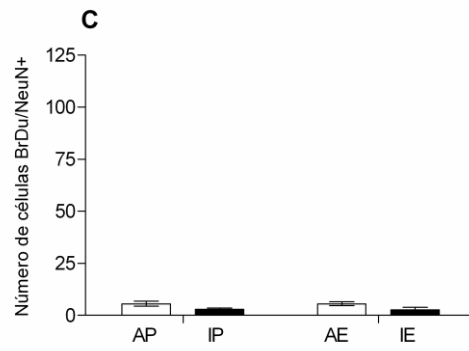
Camada Glomerular



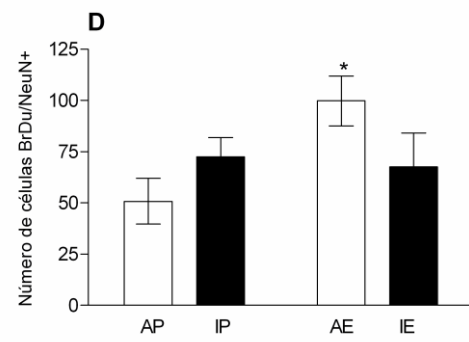
Camada Plexiforme



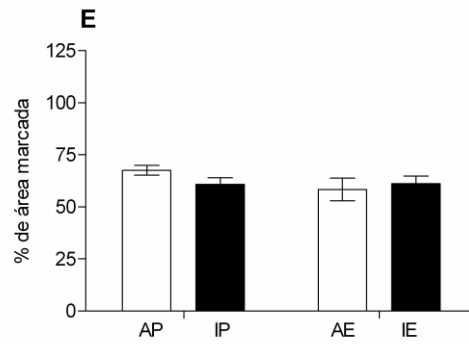
Camada Mitral



Camada Granular Externa



Camada Granular Interna



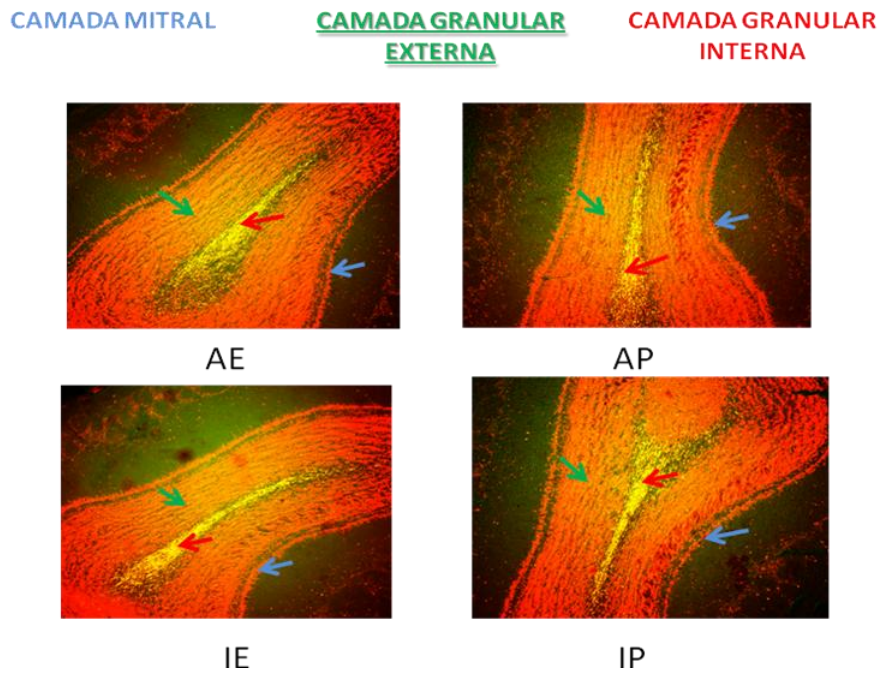


Figura 32- Neurogênese no Bulbo Olfatório (BO). Quantificação das células BrdU/NeuN+ nas camadas do BO: **A-** Camada Glomerular. **B-** Camada plexiforme. **C-** Camada Mitral. **D-** Camada Granular externa. **E-** Camada Granular interna. As figuras abaixo dos gráficos são representativas de cada camada e de cada grupo. As setas em cada figura apontam para a camada em questão. AP = Agrupados em gaiolas padrão, AE = Agrupados em Ambiente Enriquecido, IP = Isolados em gaiolas padrão, IE = Isolados em Ambiente Enriquecido. Os asteriscos (*) representam a diferença entre os grupos submetidos a condições ambientais diferentes (padrão x enriquecido).

5.6- TESTE DO CHOCOLATE

Os animais IP exploraram mais os juvenis durante o teste na tarefa de reconhecimento social quando comparados aos animais AP e IE (Figura 25 A e B), isso pode refletir um prejuízo no olfato mais do que um déficit de memória. Logo, realizamos o teste do chocolate para verificar a função olfativa dos animais isolados e agrupados em ambiente enriquecido e em gaiolas padrão.

A ANOVA de 2 vias mostrou não haver interação entre os fatores [agrupamento X enriquecimento: $F(1,51)= 0.1863$, $p= 0.6678$]. Entretanto, observamos um efeito principal do agrupamento [$F(1,51)= 16.20$, $p=0.0002$] nos animais AP x IP ($p<0.01$) e AE x IE ($p<0.05$), e um efeito principal do enriquecimento [$F(1,51)= 9.912$, $p=0.0027$] nos animais IP x IE ($p<0.05$) (Figura 33). Estes resultados demonstram que o isolamento social, independente de ser acompanhado ou não do enriquecimento do ambiente, aumenta a latência dos animais para encontrar o chocolate quando comparado à condição de agrupamento social, refletindo assim um comprometimento da função olfativa dos animais isolados. Entretanto, o isolamento social associado ao enriquecimento do ambiente foi capaz de diminuir a latência para encontrar o chocolate, quando comparado ao isolamento em gaiolas padrão, o que indica que o ambiente enriquecido pode melhorar tanto a memória social quanto a função olfativa nos animais isolados.

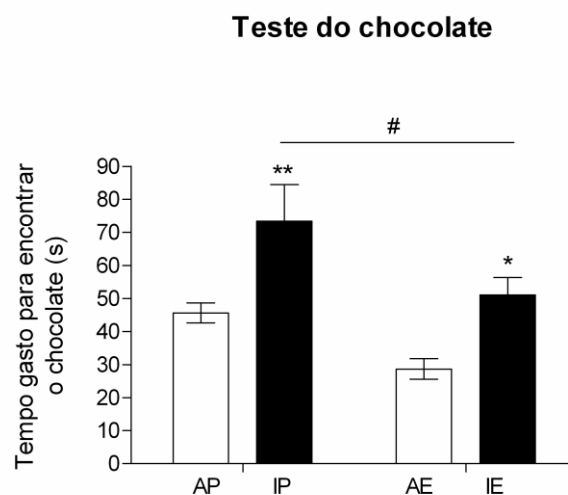


Figura 33- O isolamento social prejudica o olfato e parece ser mais prejudicial para os animais em gaiolas padrão. Os asteriscos refletem a análise entre animais expostos as mesmas condições ambientais (gaiola padrão ou ambiente enriquecido). O sustenido reflete a

análise entre animais expostos as mesmas condições de habitação (isolamento ou agrupamento).

5.7- BLOQUEIO DA NEUROGÊNESE

Até aqui, nossos resultados mostram que o ambiente enriquecido previne o déficit de memória social induzido pelo isolamento social e aumenta a neurogênese no GD de animais socialmente isolados. No entanto, estes resultados são complementares, não havendo, necessariamente, relação causal entre eles. Logo, decidimos bloquear farmacologicamente a neurogênese, ao longo de uma semana de isolamento social em ambiente enriquecido, para verificar se de fato a neurogênese é o mecanismo pelo qual o ambiente enriquecido está exercendo seus efeitos promnésicos.

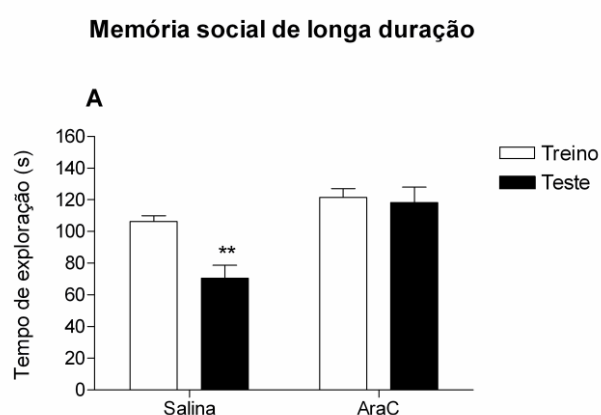
Administramos diariamente, através de mini bombas osmóticas e sob um fluxo constante, uma droga antimitótica (AraC) no ventrículo lateral direito dos animais isolados em ambiente enriquecido (IE) e conduzimos posteriormente análises comportamentais e imunohistoquímicas. Sabe-se que drogas administradas icv difundem por estruturas adjacentes aos ventrículos, como o hipocampo. Além disso, a Zona Subventricular dos ventrículos laterais contém células progenitoras capazes de repovoar o BO. Logo, a via de administração do AraC utilizado em nosso trabalho foi escolhida com o objetivo de inibir a neurogênese no hipocampo e no bulbo olfatório.

5.7.1- Memória social de longa duração

Como era esperado os animais que receberam o AraC não lembraram do intruso 24 horas após a sua primeira exposição, diferentemente dos animais que receberam salina (Figura 34 A). A ANOVA de 2 vias mostrou haver interação entre os fatores [condição ambiental X sessão: $F(1,10)= 6.531$, $p= 0.0286$], logo analisamos os resultados pelo teste t. O teste t pareado mostrou que houve diferença entre treino e teste no grupo salina ($p= 0.0099$), mas não no grupo AraC ($p= 0.7438$).

A análise do índice de reconhecimento social mostrou que apenas os animais que receberam salina ($p= 0.0184$) tiveram o índice de reconhecimento menor que 0.5 (Figura 34 B), o que não foi observado no grupo AraC ($p= 0.6623$). Esses resultados indicam que somente os animais salina lembraram do juvenil no segundo encontro com o mesmo. Houve diferença no desempenho da tarefa entre os grupos ($p= 0.0259$).

Esses resultados parecem comprovar a nossa hipótese de que o mecanismo pelo qual o ambiente enriquecido previne o déficit de memória social em animais socialmente isolados é dependente da neurogênese.



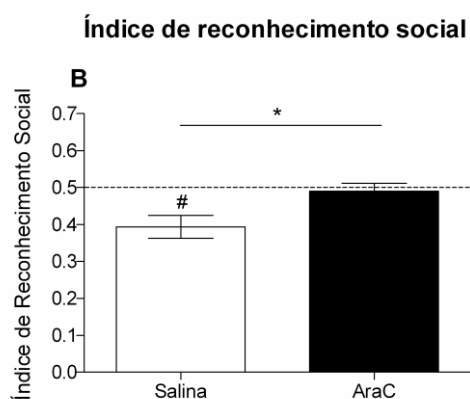


Figura 34- O bloqueador de neurogênese (AraC) provoca déficit de memória social de longa duração. **A-** Gráfico representativo do tempo de exploração no treino e no teste, os asteriscos expressam a diferença entre treino e teste nos animais agrupados em ambiente enriquecidos. **B-** Índice de Reconhecimento Social: a linha pontilhada representa o índice de 0,5 e o sustenido representa que o valor do índice do grupo salina foi estatisticamente menor que 0,5 e os asteriscos representam que houve diferença entre os grupos (Salina x AraC) em relação aos seus índices de reconhecimento social.

5.7.2- Teste do chocolate

Verificamos que o ambiente enriquecido foi capaz de diminuir a latência para encontrar o chocolate em animais isolados, o que indica que de alguma maneira o ambiente enriquecido está melhorando o desempenho olfativo de animais socialmente isolados. Além disso, o AraC foi administrado icv e é sabido que as células proliferativas proveniente da zona subventricular migram preferencialmente para o Bulbo Olfatório (BO). Logo, decidimos avaliar os animais com bloqueio de neurogênese no teste do chocolate.

Não houve diferença entre os grupos salina x AraC em relação ao tempo gasto para encontrar o chocolate ($p= 0.3168$, figura 35). Este achado de certa

forma é interessante visto que a amnésia provocada pela droga não pode ser atribuída a uma possível anosmia, ou seja, os animais são capazes de sentir o cheiro exalado pelo intruso, entretanto, não são capazes de lembrar do mesmo.

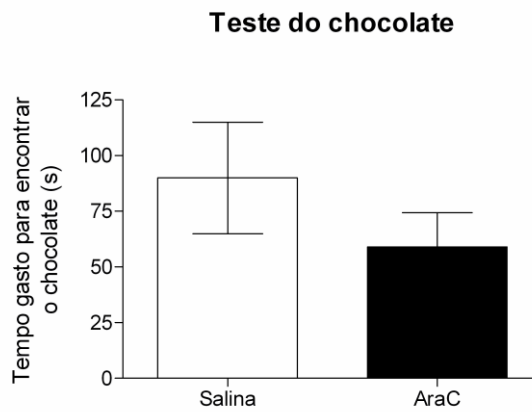


Figura 35- A droga inibidora de neurogênese (AraC) não afeta o olfato dos animais.

5.7.3- Proliferação celular

5.7.3.1- Proliferação celular no Giro Denteado (GD) do hipocampo

Realizamos a imunofluorescência para BrdU afim de verificar se a droga AraC administrada no ventrículo lateral direito foi capaz de diminuir a proliferação de células no hipocampo e bulbo olfatório.

Verificamos que a AraC diminuiu a taxa de proliferação celular no GD do hipocampo, visto que houve diferença entre os grupos (salina x AraC) em relação ao número de células BrdU+ por milímetro quadrado ($p= 0,0182$; figura 36).

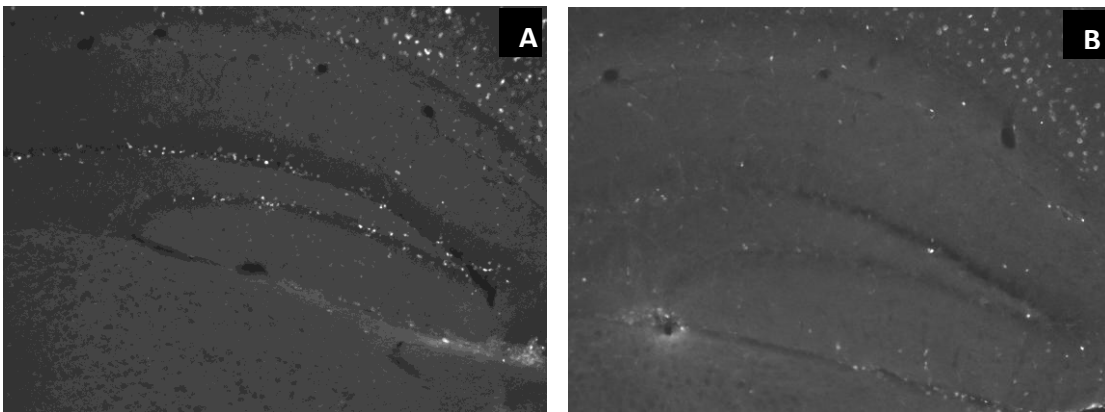
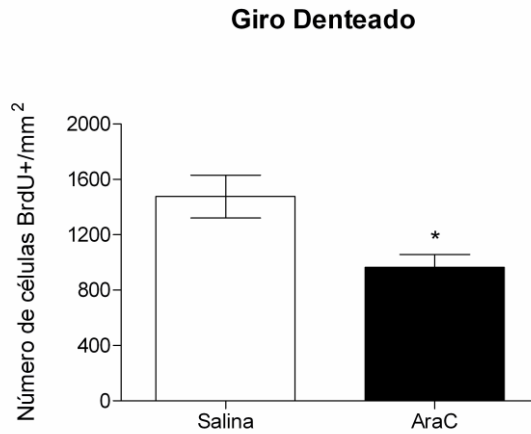
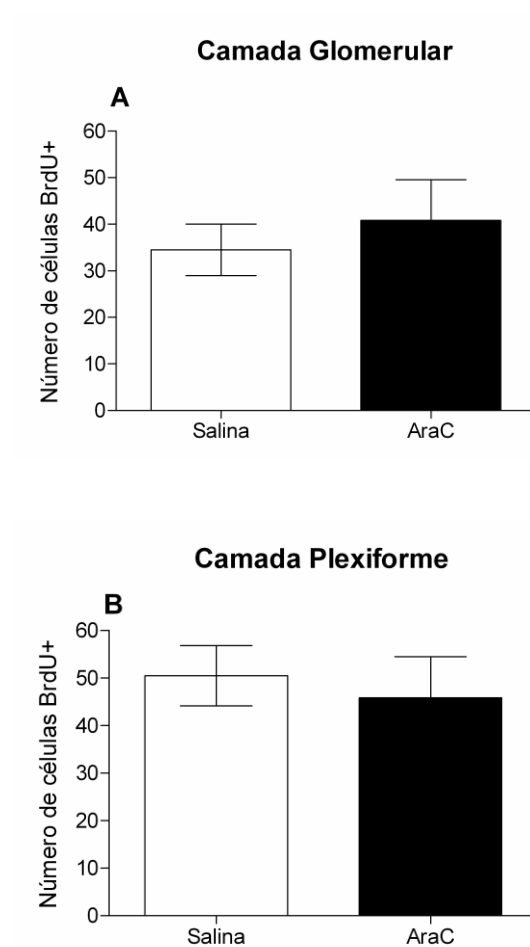


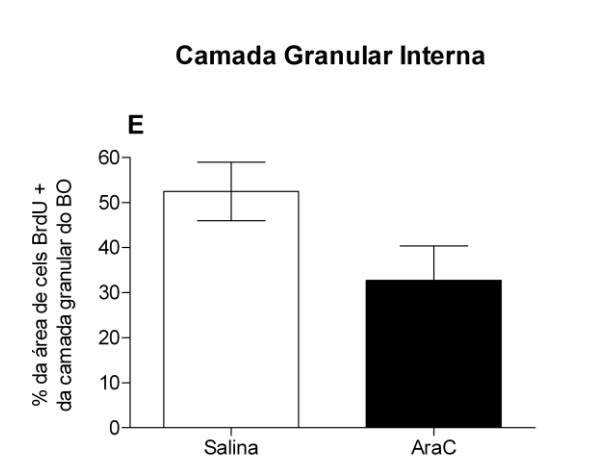
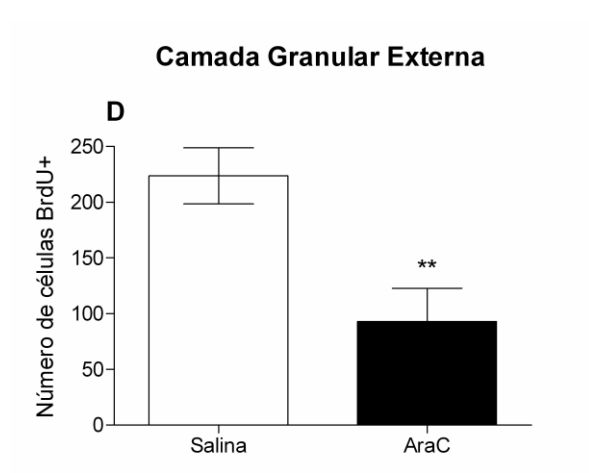
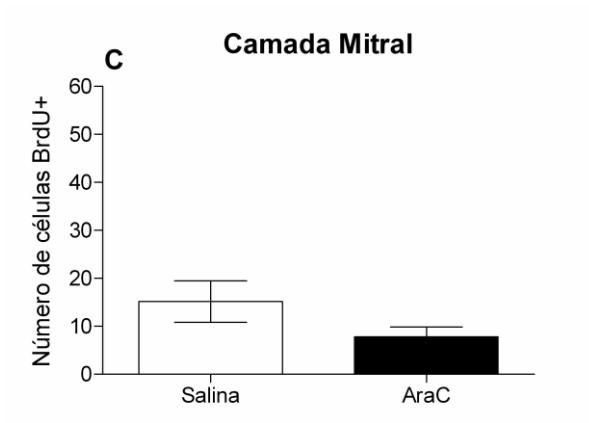
Figura 36- Número de células BrdU+/mm² no Giro Denteado (GD). Em cima gráfico com o número de células BrdU+/milímetro quadrado em ambos os grupos. Em baixo, fotos representativas do Giro Denteado do hipocampo nos animais que receberam Salina (A) e nos animais que receberam AraC (B).

5.7.3.2- Proliferação celular no Bulbo Olfatório (BO)

A literatura demonstra que células progenitoras presentes na Zona Subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais são capazes de gerar células novas que por sua vez migram num fluxo rostral em direção ao BO, onde algumas morrem e outras diferenciam em neurônios e integram a rede (Lois e Alvarez-Buylla, 1994; Alonso et al., 2008; Frankland & Miller, 2008).

Diante disso, avaliamos se a droga inibidora de neurogênese (AraC) afetou a taxa de células proliferativas no BO. Foi verificado que na camada do BO que contem maior número de células novas - camadas granular externa- houve diferença entre os grupos salina x AraC ($p=0.0074$). Nas demais camadas tal diferença não foi encontrada. Mesmo assim é possível afirmar que a droga alcançou o BO e afetou a taxa de células novas nessa região. Figura 37 (A,B,C,D e E).





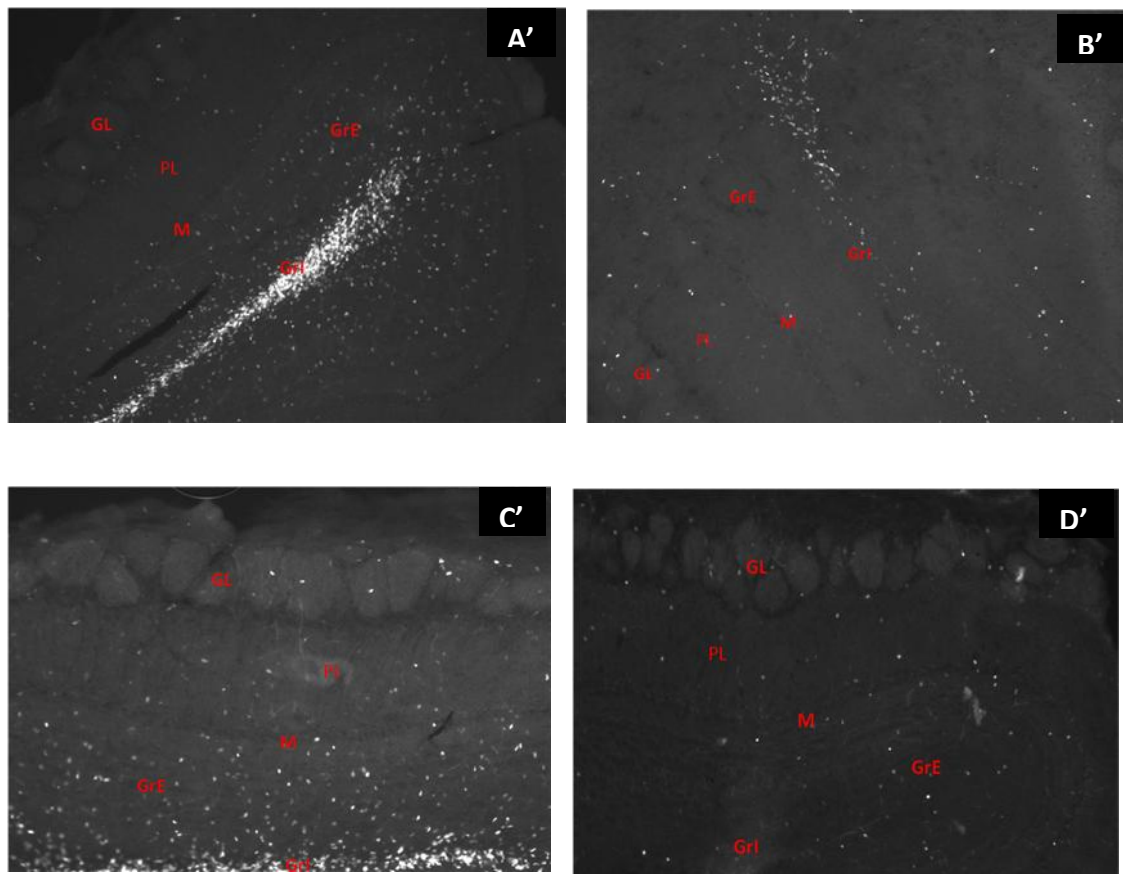


Figura 37- Proliferação celular no Bulbo Olfatório (BO). **A-** Quantificação das células BrdU+ na camada mais externa do BO: Camada Glomerular ($p= 0.5531$). **B-** Camada plexiforme ($p= 0.6737$). **C-** Camada Mitral ($p= 0.1522$). **D-** Camada Granular externa ($p= 0.0074$). **E-** Camada Granular interna ($p= 0.0772$). As fotos abaixo do gráfico são representativas dos grupos Salina (**A'** e **C'**) e AraC (**B'** e **D'**). GL: Glomerular, PL: Plexiforme, M:Mitral, GrE: Granular Externa e Grl: Granular Interna.

5.7.3.3- Confirmação do posicionamento da cânula

Os animais cujas cânulas estavam fora do ventrículo foram excluídos de todas as análises: tanto comportamental quanto da imunofluorescência, restando desta maneira 6 animais por grupo. Abaixo segue uma figura representativa do posicionamento da cânula no VLD.

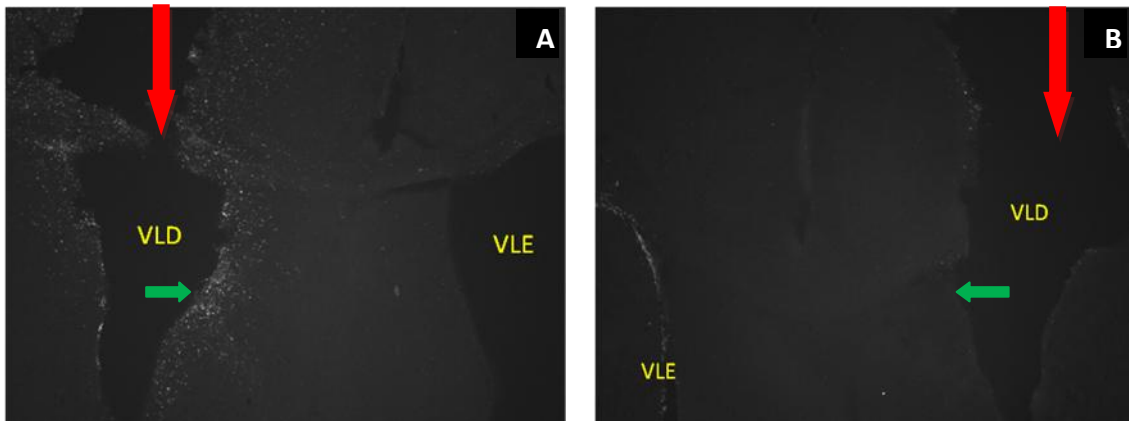


Figura 38- Figuras representativas do local de colocação da cânula para infusão da Salina ou do Arac. A- Animais infundidos com salina. **B-** Animais infundidos com a droga (AraC). As setas vermelhas indicam o local do VLD no qual se encontravam as cânulas. Obs: reparem nas setas verdes, elas apontam para a parede dos VLD, onde se encontra a SVZ, mesmo sem ter quantificado é possível observar menos células BrdU+ nos animais AraC (B) quando comparados aos salinas (A). VLD: Ventriculo Lateral Direito, VLE: Ventriculo Lateral Esquerdo.

6- DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam dados anteriores da literatura nos quais a memória social pode ser afetada por diversos fatores, incluindo o isolamento social (Thor D.H. & Holloway W.R.,1982; Sekiguchi R. et al.,1991; Bluthe R.M. et al., 1993; Kogan J.H. et al.,2000; Gusmão & Monteiro et al.,2012). No nosso estudo, o isolamento social durante uma semana, iniciado na vida adulta, não afetou a memória social de curta duração, mas prejudicou a memória social de longa duração. Este efeito deletério do isolamento sobre a memória social não pode ser atribuído à ansiedade, já que animais isolados comportaram-se como os animais agrupados na tarefa de labirinto em cruz elevado.

O fato de o isolamento social afetar apenas a memória social de longa e não interferir na memória social de curta duração sugere que essas memórias são diferentemente moduladas por alterações ambientais. De fato, os mecanismos moleculares adjacentes à consolidação destas memórias parecem ser distintos. Por exemplo, a consolidação da memória social de longa, mas não a de curta, depende de síntese protéica (Richter et al.,2005;).

Quando o enriquecimento ambiental foi adicionado ao isolamento social, os animais apresentaram memória social de longa duração, o que não ocorreu na ausência de ambiente enriquecido.

A definição de ambiente enriquecido, proposta pela primeira vez por Hebb em 1940, leva em conta a contribuição conjunta de diversos fatores como estímulos sensoriais, modificações diárias do local dos alimentos, além de oportunidade de contato social e atividade física voluntária (Rosenzweig M.R.

et al.,1978; van Praag et al.,2000). Aqui, utilizamos um ambiente enriquecido mais restrito, com apenas estímulos sensoriais. Além disso, não há trabalhos que utilizam o ambiente enriquecido na ausência de estímulo social. Alguns estudos comparam a memória espacial de animais isolados em gaiola padrão com a de animais agrupados em ambiente enriquecido (Bernstein L.A.,1973; Silva C.F. et al.,2011). Porém, desta forma, os fatores isolamento e enriquecimento são tomados paralelamente e não concomitantemente. Logo, demonstramos pela primeira vez que animais SWISS adultos, isolados socialmente, porém na presença de um ambiente enriquecido, mesmo que restrito, tiveram a memória social preservada.

Além dos efeitos promnésicos do ambiente enriquecido sobre a memória social de animais isolados socialmente, também observamos que se adicionarmos ao ambiente enriquecido o contato com co-específicos, a memória social fica mais persistente e estável. Animais agrupados em ambiente enriquecido lembraram do juvenil 10 dias após o primeiro encontro, e perturbações ambientais 6 horas pós-treino, não foram suficientes para prejudicar a memória social destes animais. Estes resultados são bastante promissores pois a literatura é vasta em relação ao benefício do ambiente enriquecido sobre a memória e o aprendizado espacial (Nilsson M. et al.,1999; van Praag et al.,2000; Williams B.M. et al.,2001; Meshi D. et al.,2006; Cao X et al.,2007), mas pouco se sabe a respeito do efeito do ambiente enriquecido sobre a memória social de longa duração.

Na busca do mecanismo pelo qual o ambiente enriquecido está exercendo seus efeitos benéficos sobre a memória social de longa duração, apostamos na neurogênese. Sabe-se que estímulos ambientais promovem

efeitos plásticos no sistema nervoso central como o aumento da arborização dendrítica, da gliogênese e neurogênese (Cummins R.A. et al.,1973; Holloway R.L.,1966; Diamond M.C. et al. 1966; Altman J. & Das G.D.,1964; van Praag et al.,2000). Primeiramente, então, demonstramos que o ambiente enriquecido, associado ou não aos estímulos sociais, aumentou a neurogênese na região do giro denteado do hipocampo. Porém, a associação deste efeito com a memória ainda precisava ser investigado.

Tem sido demonstrado que o ambiente enriquecido aumenta a neurogênese no hipocampo, o que parece beneficiar memórias hipocampo-dependentes (Lazic et al.,2006, Nilsson M. et al.,1999; Kempermann G. et al.,1997, van Praag et al.,2000, Brown J. et al.,2003; Bruel-Jungerman et al.,2005). Entretanto, deve ser salientado que a afirmativa: *o ambiente enriquecido melhora a memória por aumentar a neurogênese* - nem sempre é verdadeira. O bloqueio da neurogênese no hipocampo não impediu que o ambiente enriquecido melhorasse o desempenho dos animais na tarefa do labirinto aquático de Morris (Meshi D. et al.,2006). Desta forma, mudanças funcionais e comportamentais associadas ao enriquecimento ambiental podem não ser devido apenas ao aumento da neurogênese, mas sim por meio de outros mecanismos como o aumento da gliogênese, sinaptogênese e angiogênese; o aumento da Potenciação de Longa Duração (LTP); bem como a um *upregulation* de Fatores Neurotróficos Derivados do Cérebro (BDNF) (Volkmar F.R. & Greenough W.T.,1972; Greenough W.T. & Volkmar F.R., 1973; Greenough W.T., 1976; Isaacs K.R. et al., 1992; van Praag et al.,2000; Meshi D. et al.,2006; Sahay et al., 2011).

Para confirmar a importância funcional da neurogênese no efeito do ambiente enriquecido sobre a MLD dos animais isolados, infundimos o AraC no Ventrículo Lateral Direito (VLD) dos animais, durante 7 dias (Alonso M. et al.,2008). Nosso protocolo de infusão foi suficiente para diminuir o número de células novas (BrdU+) no GD do hipocampo e na camada granular do BO. Além disso, verificamos que os efeitos promnésicos do ambiente enriquecido foram abolidos pelo AraC. Em conjunto, estes resultados confirmam a nossa hipótese de que o ambiente enriquecido associado ao isolamento social previne o déficit de memória social através do aumento da neurogênese, pelo menos em se tratando de GD.

Considerando que (1) a Zona Subventricular dos ventrículos laterais possuem células capazes de proliferarem e migrarem para o Bulbo Olfatório (BO), onde podem diferenciar-se em interneurônios (Alvarez-Buylla A. & García-Verdugo J.M.,2002) e que (2) a memória social parece ser fortemente modulada pela função do BO (Ferguson J.N. et al.,2002; Ritcher K. et al.,2005; Engelmann M.,2009) avaliamos também a neurogênese no BO.

Nossos resultados mostraram que animais agrupados em ambiente enriquecido comparados aos animais agrupados em gaiola padrão possuem mais novos neurônios na Camada Granular Externa. Nessa camada estão localizadas as células novas, ainda granulares, que se caso sobreviverem vão integrar ao circuito, refinando os estímulos para as células mitrais. Nas outras camadas do BO, esperávamos encontrar poucos neurônios novos, já que a maioria dos interneurônios neo-formados são importantes para substituir os interneurônios que morrem frequentemente na camada granular (Price J.L. &

Powell T.P. 1970; Lledo P.M. & Saghatelian A.,2005; Lagier S. et al. 2007; Imayoshi I et al, 2008; Arenkiel B.R., 2010).

Sabe-se pouco, ainda, a respeito do que determina a morte, a sobrevivência e a incorporação dos novos interneurônios à rede bulbar. Entretanto, parece que a morte dos interneurônios não depende de estímulos e/ou fatores liberados pelas células novas, visto que o bloqueio da neurogênese não impede a morte das células já existentes (Imayoshi I et al, 2008) e parece que a incorporação e a sobrevivência dos novos interneurônios à rede depende de estímulos eletrofisiológicos. Foi recentemente demonstrado que as sinapses excitatórias - recebidas pelas células granulares recém-nascidas logo após a sua chegada no BO (diferentemente das recebidas pelas células granulares pré-existentes) - sofrem potenciação de longa duração (Nissant A. et al., 2009). E essa potenciação parece ser importante para manter as células vivas e para que elas possam ser incorporadas à rede.

Demonstramos que o ambiente enriquecido associado aos estímulos sociais aumentou a neurogênese no BO, aumentou a persistência da memória social e a tornou mais robusta. Logo, imaginamos que animais agrupados em ambiente enriquecido teriam uma melhor capacidade olfativa. Entretanto, não foi o que observamos. O ambiente enriquecido não melhorou a capacidade olfativa, pelo menos a avaliada pelo teste do chocolate, de animais socialmente agrupados.

Interessantemente, os animais isolados em ambiente enriquecido não tiveram a neurogênese aumentada no BO, porém tiveram melhor desempenho na tarefa do chocolate em comparação aos animais isolados em gaiola padrão. Além disso, o isolamento social por si só piorou a capacidade olfativa, porém

não diminuiu a neurogênese no BO. Ainda, animais isolados em ambiente enriquecido, mas com inibição da neurogênese no BO tiveram desempenho semelhante aos controles no teste do chocolate. Em conjunto, estes resultados apontam para a complexa relação entre neurogênese no BO e o olfato.

De fato, a descoberta da neurogênese é relativamente recente e vários estudos vem sendo conduzidos para preencher diversas lacunas ainda existentes, como por exemplo, o papel da neurogênese adulta no sistema olfativo. A neurogênese no BO parece ser dinamicamente modulada por diversos fatores externos. Enquanto a gravidez, o enriquecimento olfativo e o treinamento dependente do contexto aumentam o número dos neurônios recém-nascido; o envelhecimento e doenças de Parkinson e Alzheimer resultam em uma diminuição (Ma D.K. et al. 2009).

É sabido que a substituição contínua dos neurônios no bulbo olfatório ocorre de acordo com mudanças de odores e relevância do ambiente (Alvarez-Buylla A. & García-Verdugo J.M.,2002). O estímulo olfatório é tão importante para o recrutamento de novos neurônios no bulbo olfatório, que a oclusão nasal diminui esse recrutamento (Frazier-Cierpial L.& Brunjes P.C., 1989;. Corotto F.S. et al, 1994; Alvarez-Buylla A. & García-Verdugo J.M.,2002).

A investigação dos fatores que modulam positiva ou negativamente a taxa de neurogênese no bulbo olfatório ou mesmo no hipocampo é importante, entretanto, a compreensão da importância funcional dos novos neurônios é ainda mais essencial.

Os estudos que associam o bloqueio da neurogênese adulta no BO e funções olfativas são bastante controversos, já que as metodologias variam bastante. A diminuição da neurogênese no BO pode não afetar a discriminação

olfatória espontânea e a memória olfatória associativa (Breton-Provencher et al, 2009;. Lazarini F. et al, 2009). Por outro lado, animais knockout para NCAM (molécula de adesão celular importante na migração rostral) apresentam diminuição de neurogênese no bulbo acompanhado de prejuízo na discriminação olfativa entre odores, entretanto, a capacidade olfativa bem como a memória olfativa estão intactas (Gheusi G. et al., 2000). Alguns trabalhos demonstraram que a discriminação entre odores semelhantes pode ser comprometida após a ablação neurogênica (Enwere E. et al., 2004; Moreno M.M. et al., 2009). Breton-Provencher V. e colaboradores (2009), mostraram que animais tratados com AraC possuem um limiar elevado para detecção de odores, bem como uma redução no tempo de retenção da memória olfativa de curta duração. Entretanto, a memória olfativa de longa duração associada a recompensa foi persistente por até 1 semana. Tais resultados demonstram que, curiosamente, apesar de camundongos com neurogênese bulbar prejudicada poderem executar bem alguns testes de aprendizagem olfativa, a quantidade de tempo em que a informação aprendida fica armazenada em sua memória parece depender da neurogênese adulta (Bardy C.& Pallotto M.,2010). De certa forma, parece concebível que a importância funcional dos interneurônios bulbares recém-nascidos esteja relacionada a um ajuste na discriminação olfatória fina, mais do que a capacidade olfativa geral. Logo, nossos resultados, tanto de aumento, quanto de diminuição da neurogênese no BO, precisam ser complementados por testes comportamentais que meçam capacidade olfativa e memória olfativa de maneira mais sensível.

Em suma, nosso trabalho comprovou a hipótese de que o ambiente enriquecido previne a expressão do déficit de memória social de longa duração

em animais isolados devido ao aumento da neurogênese na região do GD do hipocampo. No entanto, ainda é necessário verificar se o efeito do ambiente enriquecido em aumentar a persistência e a estabilidade da memória social deve-se ao aumento da neurogênese encontrado em animais agrupados em ambiente enriquecido. E finalmente, nosso trabalho suscita a importância de estudos que investiguem a relevância funcional do BO como substrato neural da memória social, bem como da função olfativa.

7- CONCLUSÕES

- O isolamento social, durante 7 dias, não prejudica a memória social de curta duração, mas prejudica a memória social de longa duração;
- O isolamento social, durante 7 dias, não induz um comportamento do tipo ansiedade;
- O ambiente enriquecido, aplicado concomitantemente ao isolamento é capaz de prevenir o déficit sobre a memória social de longa duração;
- O ambiente enriquecido nos animais agrupados é capaz de aumentar a persistência e a estabilidade da memória social de longa duração;
- O ambiente enriquecido, aplicado durante 7 dias, em animais isolados ou agrupados, aumenta a neurogênese no Giro Denteado (GD) do hipocampo;
- O ambiente enriquecido em associação aos estímulos sociais aumenta a neurogênese na camada granular externa do Bulbo Olfatório (BO);
- O ambiente enriquecido não melhora o olfato dos animais agrupados, mas impede o déficit produzido pelo isolamento sobre a capacidade olfatória nos animais isolados em gaiola padrão;
- A infusão de AraC no ventrículo lateral, durante 7 dias, diminui a proliferação celular no GD e na camada externa granular do BO;
- A diminuição das células granulares novas no GD e no BO prejudica a memória social de longa duração, sem afetar o olfato.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberini C.M.. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2011, Vol. 5, No. 12.

Alonso et al. Turning Astrocytes from the Rostral Migratory Stream into Neurons: A Role for the Olfactory Sensory Organ. *The Journal of Neuroscience*. 2008, 28(43):11089–11102.

Altman, J. & Das, G. D. Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature*. 1964, 204: 1161–1163.

Alvarez-Buylla A. & García-Verdugo J.M.,2002. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. *The Journal of Neuroscience*. 2002, 22(3):629–634.

Azuma A. et al. *Mol. Pharmacol.*2001, 59: 725-731.

Arakawa et al. A new test paradigm for social recognition evidenced by urinary scent marking behavior in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*. 2008, 97–104.

Arenkiel B.R. Adult Neurogenesis Supports Short-Term Olfactory Memory. *J Neurophysiol*. 2010, 103: 2935–2937.

Bardy C. & Pallotto M. What happens to olfaction without adult neurogenesis? *Frontiers in Neuroscience*. 2010, Vol. 4, No. 24.

Barnea A. Interactions between environmental changes and brain plasticity in birds. *General and Comparative Endocrinology*. 2009, 163: 128–134.

Bernstein L.A., study of some enriching variables in a freeenvironment for rats. *J. Psychosomatic Res.* 1973, 17:85–88.

Binder J.R. e Desai R.H. The neurobiology of semantic memory. *Trends in Cognitive Sciences.* 2011, Vol. 15, No. 11

Bluthe R.M.et al. Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. *Psychoneuroendocrinology.* 1993, 18:323–335.

Brennan PA & Keverne EB. Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol.* 2004, 14:81–89.

Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M. R. III, and Saghatelian, A. Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *J. Neurosci.* 2009, 29:15245–15257.

Breunig J.J. et al. Evolving methods for the labeling and mutation of postnatal neuronal precursor cells: a critical review. *Adult neurogenesis.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp.49-80.

Brown J. et al. Enriched Environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *European Journal of Neuroscience.*2003, 17: 2042-2046.

Bruel-Jungerman et al. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience.* 2005, 21 : 513–521.

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.* 2000, 20(14):5468–5475.

Cao X. et al. Enriched Environment Restores Impaired Hippocampal Long-Term Potentiation and Water Maze Performance Induced by Developmental Lead Exposure in Rats. Wiley InterScience, 2007.

Carter R. Estados da mente, cap 7: O livro de ouro da mente. Edit: Rio de Janeiro, 2007.

Catlow B.J. et al. Effects of environmental enrichment and physical activity on neurogenesis in transgenic PS1/APP mice. *Brain Research*. 2009, pp. 173 – 179.

Cecchi GA, Petreanu LT, Alvarez-Buylla A, Magnasco MO. Unsupervised learning and adaptation in a model of adult neurogenesis. *J Comp Neurosci*. 2001, 11:175–182.

Choleris et al. An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003, 6192–6197.

Cooke et al. Sexual Differentiation of the Vertebrate Brain: Principles and Mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1998, 19:323–362.

Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience*. 1994, 61:739–744.

Couzin J. With isolation comes ill health. *Science*. 2009, vol.323.

Cummins, R. A., Walsh, R., Budtz-Olsen, O. E., Konstantinos, T. & Horsfall, C. R. Environmentally-induced changes in the brains of elderly rats. *Nature*. 1973, 243: 516–518.

Czerniawski J. et al. Dorsal versus ventral hippocampal contributions to trace and contextual conditioning: Differential effects of regionally selective nmda receptor antagonism on acquisition and expression. *Hippocampus*, 2011.

Diamond, M. C. et al. Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J. Comp. Neurol.* 1966, 128: 117–126.

Doetsch et al. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999, 96: 11619–11624.

Doty R.L. Odor-guided behavior in mammals. *Experientia.* 1986, 42:257–271.

Dubai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?. *Annu. Rev. Psychol.* 2004, 55:51–86.

Engelmann, M. Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2009, 91 : 58–65.

Engelmann M. et al., Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nature Protocols.* 2011, 6: 1152–1162.

Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *J Neurosci.* 2004, 24:8354–8365.

Ericsson KA e Kintsch W. Long-term working memory. *Psychol Rev.* 1995, 102(2):211-45.

Ferdman N. et al. Weaning age, social isolation, and gender, Interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav Brain Res.* 2007, 18:180 (2):174-82.

Ferrero & Liberles. The secret codes of mammalian scents. John Wiley & Sons, Inc. 2010, Vol. 2.

Ferguson J.N. et al. The Neuroendocrine Basis of Social Recognition. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2002, 23: 200–224.

Frankland & Miller. Regenerating your senses: multiple roles for neurogenesis in the adult brain. *Nature Neuroscience*. 2008, Vol. 11, No. 10.

Frazier-Cierpial L, Brunjes PC. Early postnatal cellular proliferation and survival in the olfactory bulb and rostral migratory stream of normal and unilaterally odor-deprived rats. *J Comp Neurol*. 1989, 289:481–492.

Gheusi G, Cremer H, McLean H, Chazal G, Vincent JD, Lledo PM. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97:1823–1828.

Gould et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neurosci*. 1999, 2: 260–265.

Greco A.M. et al. Effects of individual housing on circadian rhythms of adult rats. *Physiol Behav*, 1989, 45:363–366.

Greenough, W. T. & Volkmar, F. R. Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments. *Exp. Neurol*. 1973, 40: 491–504.

Greenough, W. T. *Neural Mechanisms of Learning and Memory*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts. 1976, 255–278 .

Guide for the care and use of laboratory animals (NIH publication n°85 –23 revised 1996).

Disponível em: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140&page=R2.

Gusmão.I.D.G. Memória Social de Longa Duração em camundongos expostos a diferentes estímulos ambientais. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em

Fisiologia e Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais

Gusmão & Monteiro et al. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behavioural Brain Research*, 2012.

Hebb D. O. The effects of early experience on problemsolving at maturity. *Am. Psychol.* 1947, 2: 306–307.

Herry et al. Neuronal circuits of fear extinction. *European Journal of Neuroscience*. 2010, Vol. 31, pp. 599–612.

Holloway, R. L. Dendritic branching: some preliminary results of training and complexity in rat visual cortex. *Brain Res.* 1966, 2: 393–396.

Ibi 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*. 2008, 105: 921–932.

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neurosci.* 2008, 11: 1153–1161.

Isaacs, K. R. et al. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1992, 12: 110–119.

Izquierdo I. e Medina J.H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 1997, 68: 285–316.

Izquierdo I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*. 1999, 103: 1–11.

Izquierdo I.. *Memória*. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2002.

Izquierdo L.A. et al. Molecular Pharmacological Dissection of Short- and Long-Term Memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2002, Vol. 22, No. 3.

Jacoby, L.L., On interpreting the effects of repetition: solving a problem versus remembering a solution. *J. Verbal Learn. Verbal Behav*. 1978, 17: 649–667.

Jay A. Blundon e Stanislav S. Zakharenko. Dissecting the Components of Long-Term Potentiation. *Neuroscientist*. 2008, 14(6): 598–608.

Joseph Altman. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science*. 1962, Vol. 135.

Joseph Altman. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 1969, 137(4):433-57.

Kanai R. et al. Online social network size is reflected in human brain structure. *Proc. R. Soc. B* published online 19 October 2011.

Kandel, E.R. et al. *Principles of neural science*. McGraw-Hill. New York. 2000.

Kavaliers M. et al. Inadvertent social information and the avoidance of parasitized male mice: a role for oxytocin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006, 103:4293–4298.

Keverne EB. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology & behavior*. 2004, 83:177–187.

Kimura et al. Antagonism of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-2 Enhances Migration of Neural Progenitor Cells Toward an Area of Brain Infarction. *Stroke*. 2008, 39: 3411-3417.

Kogan, J.H. et al. Long-Term Memory Underlying Hippocampus-Dependent Social Recognition in Mice. *Hippocampus*. 2000, 10:47–56.

Kwak C. et al. Social Isolation Selectively Increases Anxiety in Mice without Affecting Depression-like Behavior. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2009, Vol 13: 357–360.

Kempermann G., et al. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997, 386: 493–495.

Komada et al. Elevated Plus Maze for Mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2008.

Lagier S, Panzanelli P, Russo RE, Nissant A, Bathellier B, Sassoe-Pognetto M, Fritschy JM, Lledo PM. GABAergic inhibition at dendrodendritic synapses tunes gamma oscillations in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104: 7259–7264.

Lazarini, F., Mouthon, M.-A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., Lamarque, S., Abrous, D. N., Boussin, F. D., and Lledo, P.-M. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS One* 4. 2009.

Lazic et al. Neurogenesis in the R6/1 transgenic mouse model of Huntington's disease: effects of environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*. 2006, Vol. 23, pp. 1829–1838.

Leasure J.L. e Decker L. Social Isolation Prevents Exercise-Induced Proliferation of Hippocampal Progenitor Cells in Female Rats. *Hippocampus*. 2009, 19:907–912.

Lledo P.M. & Saghatelian A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci*. 2005, 28: 248–254.

Lim C.E. et al. Short-term social recognition memory deficit and atypical social and physiological stressor reactivity in seizure-susceptible EI mice. *Seizure*. 2007, 16: 59–68.

Lin Li et al. Olfactory bulb proteins linked to olfactory memory in C57BL/6J mice. *Amino Acids*. 2010, 39:871–886.

Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994, 264:1145–1148.

Lu et al. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Experimental Neurology*. 2003, 183: 600–609.

Ma DK, Kim WR, Ming GL, Song H. Activity-dependent extrinsic regulation of adult olfactory bulb and hippocampal neurogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 2009, 1170: 664–673.

Malberg et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci*. 2000, 20: 9104–9110.

Mano Y. et al. The representation of social interaction in episodic memory: A functional MRI study. *NeuroImage*. 2011, 57: 1234–1242.

Markham J.A. e Juraska J.M. Social Recognition Memory: Influence of Age, Sex, and Ovarian Hormonal Status. *Physiol Behav*. 2007, 92(5): 881–888.

Martel KL e Baum MJ. Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *Eur J Neurosci*. 2007, 26(2):463-75.

Martel KL et al. Comparison of urinary odor-induced glomerular activation in the main olfactory bulb of aromatase knock-out and wild type female mice. *Neurosci Lett*. 2007, 421(2):101-5.

Matioli M.N. et al. Worries about memory loss and knowledge on Alzheimer's disease in community-dwelling elderly from Brazil. *Dement Neuropsychol*. 2011, 5(2): 108-113.

Matochik J.A. Role of the main olfactory system in recognition between individual spiny mice. *Physiol Behav*. 1988, 42:217–222.

McGaugh J.L. Memory - a Century of Consolidation. *Science* 2000, 287.

Meshi D. et al. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nature Neuroscience*. 2006, Vol. 9 , No. 6.

Monfils M. et al. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. *Science*. 2009, 324.

Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., and Mandairon, N. Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2009, 106: 17980–17985.

Moura P.J., Meirelles S.T. and Xavier G.F. Long-term social recognition memory in adult male rats: factor analysis of the social and non-social behaviors. *Braz J Med Biol Res*. 2010, 43(7): 663-676.

Muroi Y et al. Volatile female odors activate the accessory olfactory system of male mice without physical contact. *Neuroscience*. 2006, 141(2):551-8.

Nelson, K. e Gruendel, J. Generalized event representations: basic building blocks of cognitive development. In: Lamb, M.E., Brown, A.L. (Eds.), *Advances in Developmental Psychology*. Erlbaum, 1981., pp. 131–158.

Nissant A, Bardy C, Katagiri H, Murray K, Lledo PM. Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci*. 2009, 12:728 – 730.

Nilsson M. et al. Enriched Environment Increases Neurogenesis in the Adult Rat Dentate Gyrus and Improves. *J. Neurobiol*. 1999, 39: 569–578. Spatial Memory

Okuda et al. Environmental Enrichment Stimulates Progenitor Cell Proliferation in the Amygdala. *Journal of Neuroscience Research*. 2009, 87:3546–3553.

Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2^o edition. (2004), Academic Press Limited, London, UK.

Prado et al. Mice Deficient for the Vesicular Acetylcholine Transporter Are Myasthenic and Have Deficits in Object and Social Recognition. *Neuron*. 2006, 51: 601–612.

Price J.L. & Powell T.P. The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci*. 1970, 7: 125–155.

Restrepo D. et al. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and behavior*. 2004, 46:247–256.

Richter et al. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learning & Memory*. 2005, 12:407–413.

Roberto Lent. *Neurociência da mente e do comportamento*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2008.

Roberts L. e Greene J.R. Post-weaning social isolation of rats leads to a diminution of LTP in the CA1 to subiculum pathway. *Brain Res.* 2003, 991:271–273.

Rosenzweig, M. R., Bennett, E. L., Hebert, M. & Morimoto, H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res.* 1978, 153, 563–576.

Rugg M.D. e Yonelinas A.P. Human recognition memory: a cognitive neuroscience perspective. *TRENDS in Cognitive Sciences.* 2003, Vol.7, No.7.

Sakamoto et al. Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *PNAS.* 2011, Vol. 108, No. 20.

Sahay A. et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature, letter research,*2011.

Sanchez-Andrade G. et al. Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev.* 2005, Vol.51, No.5, pp.547-58.

Sara S.J. Remembering Retrieval and Reconsolidation: Toward a Neurobiology of Remembering. *Learnin & Memory.* 2011, 7:73–84

Scaccianoce S. et al. Social isolation selectively reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor without altering plasma corticosterone. *Behavioural Brain Research.* 2006, 168:323–325.

Schank, R. e Abelson, P. *Scripts, Plans, Goals and Understanding.* Erlbaum, 1977.

Schellink H.M. et al. Odor-induced sexual maturation and expression of c-fos in the olfactory system of juvenile female mice. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993, 74:138–141.

Sekiguchi R. et al. Short duration of retroactive facilitation of social recognition in rats. *Physiol Behav*, 1991, 50:1253–1256.

Slamecka, N.J. e Graf, P. The generation effect: delineation of a phenomenon. *J. Exp. Psychol. Hum. Learn.* 1978, 4: 592–604.

Silva C.F. et al. Effects of social isolation and enriched environment on behavior of adult Swiss mice do not require hippocampal neurogenesis. *Behavioural Brain Research*. 2011, 225: 85– 90.

Silva M. Cérebro.com. 2011. Disponível em: <http://cerebro-online.blogspot.com/search/label/Alzheimer> .

Tashiro et al. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*. 2006, Vol 442-24.

Tashiro et al. Experience-Specific Functional Modification of the Dentate Gyrus through Adult Neurogenesis: A Critical Period during an Immature Stage. *The Journal of Neuroscience*. 2007, 27(12):3252–3259.

Thor DH, Holloway WR. Social memory of the male laboratory rat. *Journal of Comparative Psychology*. 1982, 96: 1000–1006.

Tozuka et al. GABAergic Excitation Promotes Neuronal Differentiation in Adult Hippocampal Progenitor Cells. *Neuron*. 2005, 47: 803–815.

van der Kooij M.A. & Sandi C. Social memories in rodents: Methods, mechanisms and modulation by stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2011.

van Praag et al. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews, Neuroscience*. 2000, Vol. 1.

Võikar V. et al. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes, Brain and Behavior*. 2005, 4: 240–252.

Volkmar, F.R. E Greenough, W.T. Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science*. 1972, 176: 1445–1447.

Wang XJ, Buzsáki G. Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci*. 1996, 16:6402– 6413.

Whittington MA, Traub RD, Kopell N, Ermentrout B, Buhl EH. Inhibition-based rhythms: experimental and mathematical observations on network dynamics. *Int J Psychophysiol*. 2000, 38:315–336.

Wiesel T.N. & Hubel D.N. Extent of recovery from the effects of visual deprivation in kittens. *J. Neurophysiol*. 1965, 28, 1060–1072.

Williams B.M. et al. Environmental enrichment: Effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiology & Behavior*. 2001, 73: 649-658.

Wolk D.A. et al. Recollection and familiarity in amnesic mild cognitive impairment: A global decline in recognition memory. *Neuropsychologia*. 2008, 46: 1965–1978.

Wongwitdecha N. e Marsden C.A. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav. Brain Res*. 1996, 75: 27–32.

Woodworth C.H. e Johnson A.K. Isolation, tactile startle and resting blood pressure in Long-Evans rats. *Physiol Behav*. 1988, 43: 609–616.

Yang M. et al. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. Curr Protoc Neurosci. 2009, Chapter: Unit–8.24.

9- ANEXO I