

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

DANIEL GONÇALVES RÊGO

ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE IDADE, PARÂMETROS
COGNITIVOS ESPACIAIS E ATIVIDADE DO SISTEMA
SEROTONÉRGICO NO HIPOCAMPO DE RATOS

BELO HORIZONTE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Estudo das relações entre idade, parâmetros cognitivos espaciais e
atividade do sistema serotoninérgico no hipocampo de ratos**

Daniel Gonçalves Rêgo

Orientadora: Prof(a). Angela Maria Ribeiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (Programa de Pós Graduação em Neurociências) como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Neurociências.

BELO HORIZONTE

2014

043

Rêgo, Daniel Gonçalves.

Estudo das relações entre idade, parâmetros cognitivos espaciais e atividade do sistema serotoninérgico no hipocampo de ratos. [manuscrito] / Daniel Gonçalves Rêgo - 2014.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Ângela Maria Ribeiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Envelhecimento - Teses. 2. Serotonina - Teses. 3. Ácido hidroxindolacético. 4. Memória espacial. 5. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 6. Labirinto de Barnes. 7. Ratos Wistar. 8. Neurociências - Teses. I. Ribeiro, Ângela Maria. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8

DANIEL GONÇALVES RÊGO

ESTUDO DAS RELAÇÕES ENTRE IDADE, PARÂMETROS COGNITIVOS ESPACIAIS
E ATIVIDADE DO SISTEMA SEROTONÉRGICO NO HIPOCAMPO DE RATOS

Orientadora: Professora Doutora Angela Maria Ribeiro

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Data da defesa: 13 de março de 2014.

Resultado: _____ .

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Doutor Antônio Jaeger – UFMG

Prof. Doutor Marco Aurélio Romano-Silva – UFMG

Profa. Doutora Maria Aparecida Camargos Bicalho – UFMG

AGRADECIMENTOS

Minha especial gratidão à Professora Angela Maria Ribeiro, que desde a graduação deixou marca indelével em minha formação profissional e científica.

Aos amigos do LANEK (Laboratório de Neurociências Molecular e Comportamental) pelo grande ajuda em muitos momentos do trabalho que hoje se conclui. Especialmente às doutoras Andrea Frozino Ribeiro e Patrícia da Silva Oliveira, que além do auxílio nos procedimentos experimentais, compartilharam pacientemente seus conhecimentos em discussões de significativo proveito. Também meu especial agradecimento ao doutorando Fábio Antônio Borges Vigil, responsável pela minha introdução em várias das técnicas utilizadas neste trabalho, e à técnica Aparecida Guerra de Jesus pelo grande apoio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos e parceiros de trabalho, integrantes do Grupo de Estudos em Geriatria e Gerontologia.

Aos meus pais, Roberto e Maria, minha origem e referência, ponto de apoio incondicional

À minha segunda mãe, Irene, pelo amparo e entusiasmo durante todo este trabalho

Ao meu irmão, Prof. Cássio, pelas sugestões e encorajamento no início deste trabalho.

À minha irmã Ana Cláudia, com sua sabedoria e generosidade.

À minha esposa, Karina, meu amor, minha luz e minha companheira nesta trajetória

Ao meu filho Tomás, meu amor e meu Campeão, que deu boas sugestões

À “vó” Benedita, que deu a partida para este sonho.

EPÍGRAFE

“Creio que uma folha de relva não é menos que a jornada das estrelas,
E a formiga é tão perfeita, e um grão de areia, e o ovo da galinha,
E a rã é uma obra-prima para o altíssimo,
E a trepadeira de amoras-pretas podia enfeitar os salões do céu,
E a mínima junta de minha mão humilha qualquer máquina,
E a vaca pastando de cabeça baixa supera qualquer estátua,
E um camundongo um milagre suficiente pra confundir sestilhões de infiéis,
E a cada tarde de minha vida eu voltaria a ver a filha do fazendeiro fervendo sua
Chaleira e fazendo bolo.”

Walt Whitman, “Canção de mim mesmo”

RESUMO:

Três grupos de ratos Wistar (idosos, adultos e jovens) foram usados para verificar os efeitos da idade sobre: (i) o desempenho em tarefa cognitiva espacial no Labirinto de Barnes (LB) e; (ii) parâmetros serotoninérgicos hipocampais. *Treino*: para aprender a tarefa os animais precisam criar um mapa cognitivo do ambiente utilizando coordenadas espaciais, baseadas em dicas extra-labirinto. Os estímulos aversivos são a altura da plataforma do LB (campo aberto) e a luminosidade do ambiente. O reforço é uma caixa-escape (CE), que representa a única saída possível entre doze possibilidades no LB. A CE está sempre na mesma posição (QA=quadrante alvo) em relação às dicas espaciais. O desempenho do animal foi expresso em latência (s) e distância percorrida (cm) para encontrar a CE. Animais idosos apresentaram pior desempenho que os jovens ($p=0.007$) e adultos ($p=0.002$) no treino. No entanto, com o treino sucessivo, os idosos foram capazes de aprender. O efeito significativo da idade persiste mesmo considerando a velocidade como ajuste dos dados (o efeito é sobre aspectos cognitivos, não sobre aspectos motores). *Teste Comprobatório*: após 24 h do treino os ratos foram recolocados no LB, por 2 min, sem a CE e com o orifício correspondente ocluído. A idade não exerceu efeito sobre a memória do local onde se encontrava a CE, expressa como preferência pelo quadrante alvo no 1º min. No entanto, os idosos apresentam uma mediana do tempo de permanência no QA abaixo de 50% (deslocamento no LB igualmente distribuída entre o QA e demais), enquanto os adultos e jovens apresentam mediana acima de 60%, ou seja, uma recuperação parcial da informação aprendida. A flexibilidade comportamental foi avaliada através do Índice de Extinção (IE=tempo no QA 1min/tempo no QA 2min). Não houve efeito da idade sobre o IE. Entretanto, os jovens permaneceram menos tempo ($p=0,025$) no QA no 2ºmin, quando comparado com o 1ºmin, indicando extinção do comportamento aprendido, fato não observado para os idosos e adultos. No dia seguinte ao teste os ratos foram mortos e os hipocampus separados para determinação, por cromatografia (HPLC), das concentrações de serotonina (5-HT) e de seu metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA). Houve efeito da idade sobre a [5-HIAA] no meio extracelular nas condições estimulada (despolarizante) ou não e também na [5-HIAA] total (conteúdo no tecido). Não houve relação entre os parâmetros neuroquímicos e comportamentais, exceto uma correlação significativa positiva entre distância percorrida (cm) na 3ª sessão e a [5-HIAA] total no hipocampo dos idosos. A idade afetou a cinética do processo de aprendizagem espacial e variações nos níveis de 5-HIAA parecem fazer parte do mecanismo neurobiológico responsável por essa alteração.

PALAVRAS-CHAVES: envelhecimento; serotonina; ácido 5-hidroxi-indolacético; memória espacial; hipocampo; labirinto de Barnes, extinção, ratos Wistar

ABSTRACT:

Three groups of Wistar male rats were used to study the effects of age on: (i) performance in a spatial cognitive task: Barnes Maze (BM) and (ii) serotonergic parameters in the hippocampus. *Training:* for learning the task, the rats have to use extra-spatial cues— cognitive map. The aversive stimuli were the height and luminosity on the platform of BM. The reinforcement was an escape-chamber (EC), which was the only escape among twelve possibilities (eleven of them were false escapes) in the BM. The EC was placed in the same position (target quadrant=TQ) in relation to the spatial cues placed on the room walls. Animal performances were expressed as latency (s) and path length (cm) to find the EC. There was a significant effect of age on animal performance during training. However, in the last session, after consecutive trials, aged rat's performance was similar to the adult and young rats. Statistical analyzes of path length data adjusted for rat's ambulation speed showed that the observed aged effect was on cognitive aspect and not on rat's motility. *Probe trial:* twenty-four hours after training, all rats were given a 120-s probe trial, in which the EC was removed and its entrance closed. There was no group effect on memory, expressed as the preference for the TQ (TQP=target quadrant preference) measured during the 1st min (considered as 100%) of the probe. However, aged rats showed a median of TQP below 50%, while adult and young rats spend more than 60% of the 1st min in the TQ. It indicates they were able to remember, at least partly, the place where the EC was during the training. For assessing behavioural flexibility (BF), an Index of Extinction (IE) was worked out by dividing the TQP in the 1st min by TQP in the 2nd min of the trial. There was no age effect on IE, though the young, but not aged and adult rats, spent shorter time ($p=0,025$) in TQ during the 2nd min, indicating BF. On the first day after probe trial, all rats were killed and their hippocampus separated for biochemical assays (5-HT and 5-HIAA) using the High Performance Liquid Chromatography method. There was significant effect of group on the extracellular 5-HIAA levels in both normal and depolarized (high potassium) conditions. There were no significant correlations between behavioural and neurochemical parameters, except between path length (cm) measured during the 3th session of training and total [5-HIAA] for aged rats. The present data show that age affects both the kinetic of spatial learning process and the hippocampal 5-HIAA levels. In addition, they indicate that 5-HIAA seems to play a role in the neurobiological mechanism of the observed cognitive change.

KEYWORDS: aging; 5-HT; 5-HIAA; spatial memory; hippocampus; Barnes maze, extinction, Wistar rats

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Tabela 1 – Solução Tyrode. Composição dos tipos de solução Tyrode utilizados nos experimentos de liberação de 5-HT e medida de 5-HIAA. pH=7.4	19
Tabela 2 – Dados do desempenho dos animais durante as sessões do “Treino” no labirinto de Barnes (LB): número de tentativas sem sucesso, por sessão e grupo	26
Tabela 3 – Efeito do tempo (sessões) sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA (DPer, em cm): dados da análise estatística das médias da DPer por meio das Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre as sessões, por grupos.	28
Tabela 4 - Efeito do tempo (sessões) sobre o desempenho no treino, expresso em LATÊNCIA (Lat, em s.): dados da análise estatística das médias da Lat por meio das Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre as sessões, por grupos.	28
Tabela 5 – Efeito da idade sobre o desempenho no treino, expresso em LATÊNCIA (Lat): dados da análise estatística das médias da Lat por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos, por sessão	29
Tabela 6 – Efeito da idade sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA (DPer): dados da análise estatística das médias da DPer por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos, por sessão	30
Tabela 7 – Dados da análise do desempenho motor (VELOCIDADE de deslocamento dos animais sobre a plataforma=LB): parâmetros estatísticos obtidos por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos	31
Tabela 8 – Efeito do tempo (sessões) sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA ($DPer_{vel}$, em cm), ajustada considerando o fator velocidade: dados da análise estatística das médias da $DPer_{vel}$ da por meio das Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre as sessões, por grupos, calculadas considerando o fator velocidade.	33
Tabela 9 – Efeito da idade sobre o desempenho dos animais, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA, AJUSTADA PELO FATOR VELOCIDADE ($DPer_{vel}$, em cm): dados da análise estatística das médias da $DPer_{vel}$ por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos, por sessão	34

Tabela 10 - Medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para os deltas D_1 , D_2 , e D_3 obtidos com as medidas da DISTÂNCIA PERCORRIDA pelos animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem), durante o treino, com e sem ajuste usando função modular*.	37
Tabela 11 - Medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para as razões R_1 , R_2 e R_3 obtidas das medidas em DISTÂNCIA PERCORRIDA. Comparações entre os grupos.	39
Tabela 12 – [5-HIAA] no meio extracelular dos hipocampos incubados em condições normal ou despolarizante: medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para comparações dos grupos.	42
Tabela 13 - Medidas descritivas para a [5-HT] e para a [5-HIAA] teciduais (conteúdo total), e para a taxa de renovação [5-HIAA]/[5-HT] no hipocampo de ratos Wistar. Dados do teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos.	44
Tabela 14 - Dados da análise de Regressão Marginal Log-Linear Univariada: [5-HIAA] no extrato extracelular hipocampal versus DISTÂNCIA PERCORRIDA, LATÊNCIA e VELOCIDADE (medidas durante o treino).	45
Tabela 15 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no extrato extracelular do hipocampo incubado em solução normal ou despolarizante versus DISTÂNCIA PERCORRIDA ou VELOCIDADE ou LATÊNCIA (medidas durante o treino).	46
Tabela 16 – Dados da análise de Regressão Marginal Log-Linear Univariada: [5-HIAA] no meio extracelular do hipocampo incubado em meio normal ou despolarizante versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO, PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no 1 ^a min e no 2 ^a min (medidas realizadas durante o teste comprobatório).	47
Tabela 17 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no extrato extracelular do hipocampo incubado em solução normal ou despolarizante versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO ou PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no 1 ^a min (PQA 1 ^o min) – medidas durante o teste comprobatório.	48

<p>Tabela 18 – Dados da análise de Regressão Marginal Log-Linear Univariada: [5-HIAA], [5-HT] e a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus DISTÂNCIA PERCORRIDA, LATÊNCIA e VELOCIDADE (medidas durante o treino).</p>	49
<p>Tabela 19 - Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] ou [5-HT] ou a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus DISTÂNCIA PERCORRIDA ou LATÊNCIA ou VELOCIDADE (medidas durante o treino).</p>	50
<p>Tabela 20 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no hipocampo (conteúdo total) versus DISTÂNCIA PERCORRIDA por sessão (durante o treino).</p>	51
<p>Tabela 21 - Dados da análise de Regressão Log-Linear pelo método de Quase verossimilhança: [5-HIAA], [5-HT] e a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO e PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE-ALVO no 1^amin e no 2^amin (medidas realizadas durante o teste comprobatório).</p>	52
<p>Tabela 22 - Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA], [5-HT] e a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO, PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no 1^amin (PQA 1^o min) - medidas no teste comprobatório.</p>	53

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Classificação dos sistemas de memória	05
Figura 2. Visão esquemática em corte sagital do cérebro humano mostrando a distribuição do sistema serotoninérgico	09
Figura 3. Esquema do delineamento experimental em linha cronológica	14
Figura 4. Fotos do Labirinto de Barnes e acessórios	15
Figura 5. Foto do Labirinto de Barnes ilustrando as trajetórias de um animal na primeira (painel A) e quinta (painel B) tentativas do primeiro dia (primeira sessão) do treino de um rato idoso (rato #1)	17
Figura 6. Esquema do aparato utilizado nos experimentos de liberação de serotonina.	19
Figura 7. Estrutura química da serotonina e do ácido 5-hidroxiindolacético	21
Figura 8. Cromatogramas.	22
Figura 9. Curvas de calibração dos padrões de 5-HT e 5-HIAA.	23
Figura 10. Curvas de aprendizado espacial dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem. Desempenho expresso em latência (s, painel A) e distância percorrida (cm, painel B) para encontrar a caixa-escape	27
Figura 11. Curvas de velocidade de deslocamento dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem (cm/s) sobre a plataforma=LB.	30
Figura 12. Curvas de aprendizado espacial dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem, considerado o fator velocidade. Desempenho expresso em latência (s, painel A,) e distância percorrida (cm, painel B), considerando o fator velocidade, para encontrar a caixa-escape.	32
Figura 13. Curvas de aprendizado espacial dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem (mostrando todas as tentativas de todas as sessões). Desempenho expresso em latência (s, painel A) e distância percorrida (cm, painel B) para encontrar a caixa-escape.	36
Figura 14. Medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos bootstrap de 95%) dos deltas D_1 , D_2 , e D_3 obtidos das medidas expressas em DISTÂNCIA PERCORRIDA (painéis A e B) dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem, sem e com função modular.	38
Figura 15. Medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) das razões R_1 , R_2 , e R_3 obtidas das medidas do desempenho dos ratos expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem.	39

Figura 16. Desempenho dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem no teste comprobatório: avaliação da flexibilidade comportamental, por meio das medianas do índice de extinção (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%).	40
Figura 17. Desempenho dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem no teste comprobatório: medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) da preferência pelo quadrante alvo (PQA, em % de tempo) no primeiro e no segundo minuto do teste comprobatório.	41
Figura 18. Medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) da concentração de 5-HIAA no meio extracelular dos hipocampos (incubado em Tyrode normal ou despolarizante) de ratos dos três grupos experimentais, submetidos a tarefa espacial no Labirinto de Barnes	43
Figura 19. Mediana (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT (Painel A) e de 5-HIAA (Painel B) no hipocampo de ratos submetidos a tarefa espacial no Labirinto de Barnes	44
Figura 20. Diagrama de dispersão entre as concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HIAA no hipocampo dos animais do grupo idoso e seu desempenho na 3ª sessão do treino (aquisição da informação na tarefa espacial).	51

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A - adulto

β - letra grega utilizada para se referenciar aos coeficientes de uma regressão.

CE – Caixa escape

Cm/s – centímetro por segundo

DPer – distância percorrida

DPer_{vel} - distância percorrida ajustada pelo fator velocidade

D.P. – Desvio Padrão. É uma das principais medidas de dispersão dos dados. Pode ser definida como a raiz quadrada da variância. Sua medida representa o quanto os dados se afastam da média.

E.P. - Erro Padrão: O erro padrão é uma medida da precisão da média amostral. O erro padrão é obtido dividindo o desvio padrão pela raiz quadrada do tamanho da amostra.

Exp() – Função Exponencial (e^x).

G.L. - Graus de Liberdade.

Grupo A - grupo adulto

Grupo I - grupo idoso

Grupo J - grupo jovem

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

I – idoso

IE - índice de extinção

J – jovem

LAM – labirinto aquático de Morris

Lat – latência

Lat_{vel} - latência ajustada pelo fator velocidade

LB – Labirinto de Barnes

MDF (*medium density fiberboard*) – placa de fibra de madeira, muito utilizada em marcenaria

P-valor: É uma estatística utilizada para sintetizar o resultado de um teste de hipóteses. Formalmente, o p-valor é definido como a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma amostra, assumindo como verdadeira a hipótese nula. Como geralmente define-se o nível de significância em 5%, um p-valor menor que 0,05, gera evidências para rejeição da hipótese nula do teste.

PQA – Preferência pelo Quadrante-Alvo

PQA_{10 min} – Preferência pelo Quadrante-Alvo no 1º min do teste comprobatório

PQA_{20 min} – Preferência pelo Quadrante-Alvo no 2º min do teste comprobatório

QA – Quadrante-Alvo

1ª Q – 1ª Quartil: O primeiro quartil é uma medida de posição que representa que pelo menos 25% das respostas são menores que ele.

2ª Q – 2ª Quartil: O segundo quartil, também conhecido como mediana é uma medida de posição que representa que pelo menos 50% das respostas são menores que ele.

3ª Q – 3ª Quartil: O terceiro quartil é uma medida de posição que representa que pelo menos 75% das respostas são menores que ele.

s. - Segundo

S.E.(β) – Erro padrão do Beta.

SEM – erro padrão da média

Vel – velocidade

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
EPÍGRAFE	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
SUMÁRIO	xii
1. JUSTIFICATIVA	p.01
2. INTRODUÇÃO	p.02
2.1. ENVELHECIMENTO E DISFUNÇÕES COGNITIVAS: HUMANOS E RATOS.....	p.02
2.2. APRENDIZAGEM E MEMÓRIA	p.03
2.2.1. Memória espacial e hipocampo	p.05
2.2.2. Memória espacial, hipocampo e Labirinto de Barnes	p.07
2.2.3. Bases neurobiológicas do aprendizado e memória espacial: hipocampo, sistema serotoninérgico e disfunção cognitiva presente no envelhecimento	p.08
3. OBJETIVOS	p.11
3.1. GERAL	p.11
3.2. ESPECÍFICOS	p.11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	p.12
4.1. ANIMAIS: OBTENÇÃO E CUIDADOS RELACIONADOS	p.12
4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	p.13
4.3. ESTUDO COMPORTAMENTAL	p.14
4.3.1. Tarefa no Labirinto de Barnes (LB)	p.14
4.3.1.1. Equipamento	p.14
4.3.1.2. Treino (aquisição de informações – aprendizagem espacial)	p.16
4.3.1.3. Teste comprobatório (memória de referência; extinção do comportamento=flexibilidade)	p.18
4.4. ESTUDOS NEUROQUÍMICOS	p.18
4.4.1. Sacrifício dos ratos, dissecação do cérebro para obtenção dos hipocampus e processamento das amostras para: (a) experimento de liberação de 5-HT e (b) determinação do conteúdo	

total de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo	p.18
4.4.2. Experimento de liberação de 5-HT - Incubação das amostras biológicas	p.20
4.4.3. Processamento das amostras de hipocampo para determinação das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA	p.20
4.4.4. Determinação das concentrações de 5-HT e 5-HIAA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	p.21
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	p.24
5. RESULTADOS	p.26
5.1. PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	p.26
5.1.1. Treino –introdução	p.26
5.1.2. Treino – latência, distância percorrida e velocidade	p.26
5.1.3. Treino – latência e distância percorrida, valores ajustados pelo fator velocidade	p.31
5.1.4. Treino - análise do aprendizado e da memória ao longo das sessões, com foco no intervalo entre as últimas e as primeiras tentativas de sessões consecutivas	p.35
5.1.5. Teste comprobatório – análise da memória e extinção do comportamento, após o treino	p.40
5.2. PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS	p.42
5.2.1. Dados da liberação de 5-HT e nível de 5-HIAA no meio extracelular	p.42
5.2.2. Determinações das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo	p.43
5.3. RELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS (MEDIDOS NO TREINO E NO TESTE COMPROBATÓRIO) E OS SEGUINTE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS: NÍVEIS DE 5-HIAA NO MEIO EXTRACELULAR DO HIPOCAMPO INCUBADO EM MEIO NORMAL OU DESPOLARIZANTE	p.45
5.3.1. Distância percorrida, latência e velocidade medidas no treino versus concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo incubado em meio normal ou despolarizante	p.45
5.3.2. Índice de extinção e preferência pelo quadrante alvo no teste comprobatório versus concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo incubado em meio normal ou despolarizante	p.46
5.4. RELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS (MEDIDOS NO TREINO E NO TESTE COMPROBATÓRIO) E OS SEGUINTE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS: CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS (CONTEÚDO TOTAL) DE 5-HT E 5-HIAA NO HIPOCAMPO, E A TAXA DE RENOVAÇÃO DA 5-HT ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$).	p.48
5.4.1. Distância percorrida, latência e velocidade, (desempenho cognitivo no treino) versus concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA, e da taxa de renovação da 5-HT ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$)no hipocampo.	p.48
5.4.2. Índice de extinção e preferência pelo quadrante alvo durante o teste comprobatório versus concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e de 5-HIAA no hipocampo, e da taxa de renovação da 5-HT ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$)	p.52
6. DISCUSSÃO	p.54

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS – CONCLUSÕES	p.69
8. PERSPECTIVAS	p.71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p.73
10. ANEXOS	p.80

1. JUSTIFICATIVA

As alterações celulares e neuroquímicas ocorridas durante o envelhecimento cerebral têm sido alvo de estudo intensivo nas últimas duas décadas. Algumas destas alterações, como as placas senis e os emaranhados neurofibrilares, apresentam associação com doenças neurodegenerativas, em especial com a doença de Alzheimer. As drogas atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Alzheimer foram desenvolvidas com base no conhecimento de aspectos desses processos moleculares. Elas atuam sobre os sistemas colinérgico (rivastigmina, galantamina, e donepezil) e glutamatérgico (memantina). Até o momento não há medicamento para esta doença cujo alvo seja o sistema serotoninérgico. Dos estudos em fase clínica com drogas que atuam sobre receptores de 5-HT para o tratamento da doença de Alzheimer alguns foram interrompidos por ausência de eficácia clínica (King *et al*, 2009). Apesar disto, as pesquisas em área básica continuam a sugerir um papel relevante do sistema serotoninérgico na fisiopatologia da doença de Alzheimer. Em 2011 Cirrito *et al* sugeriram um efeito neuroprotetor de antidepressivos inibidores da recaptação de 5-HT, contra a deposição anormal de beta-amilóide e a formação de placas senis. O papel da 5-HT na fisiopatologia de distúrbios emocionais, como depressão, pânico e ansiedade é bastante conhecido (Cools R *et al*, 2008), assim como a significativa incidência de transtornos emocionais na senescência (van'tVeer-Tazelaar PJ *et al*, 2011), e o impacto de aspectos emocionais sobre o desempenho em tarefas cognitivas (Kuçuk, *et al*, 2008). O sistema serotoninérgico parece desempenhar um papel importante nos mecanismos de interface entre cognição e emoção (King *et al*, 2008). Muito ainda precisa ser elucidado quanto ao envolvimento do sistema serotoninérgico nas disfunções cognitivas que evoluem gradativamente durante o envelhecimento e que representam um fator de risco para a doença de Alzheimer. As relações entre as atividades de circuitos serotoninérgicos específicos e o desempenho de animais idosos em testes cognitivos não são conhecidas. Esse estudo pode contribuir para a compreensão do estado funcional serotoninérgico durante a realização de uma tarefa cognitiva e o efeito da idade nesses processos.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Envelhecimento e disfunções cognitivas: humanos e ratos

O envelhecimento é um processo inexorável pelo qual todos os seres vivos passarão desde que vivam o suficiente. Dentro do *continuum* que a vida é, não existe por enquanto marcador biológico que identifique quando este processo tem início. Sabe-se que ele é caracterizado pela redução das reservas orgânicas do indivíduo, com conseqüente alteração da homeostase, a qual o torna mais frágil e predisposto às doenças (Papaléo Netto, 2011). Na Medicina, especificamente na Geriatria, as alterações fisiológicas cerebrais decorrentes do envelhecimento promovem um novo estado funcional que costuma ser percebido quando o indivíduo é exposto a situações de maior demanda. Esquecimento leve e discreta desorientação temporo-espacial são possíveis manifestações clínicas deste novo estado, o qual reflete o declínio da reserva cognitiva, que não é em si um estado patológico. A condição *disfuncional* da cognição tem merecido grande interesse da comunidade científica, pois coloca em risco a autonomia do indivíduo idoso, representante cada vez maior das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento (Chaimowicz, 1998; Papaléo Netto, 2011).

A utilização de roedores para o estudo do substrato biológico do processo de envelhecimento fisiológico cerebral, com o intuito de contribuir para se compreender o que ocorre em humanos, se sustenta na hipótese de que alguns aspectos deste processo são comuns aos mamíferos. Os neurocientistas partem do princípio que todo aspecto do comportamento, incluindo a cognição, possui uma base biológica e o uso de modelos experimentais seria mais uma forma, entre várias, para se estudar o fenômeno do envelhecimento e tentar colaborar para com o entendimento das relações entre aspectos específicos do comportamento e os componentes moleculares envolvidos. Certamente, por se tratar de um fenômeno complexo e multifatorial, as estratégias para estudá-lo também necessitam de um caráter interdisciplinar, com desenhos em diferentes níveis e utilização dos mais diversos instrumentos. Entretanto, o estudo de doenças humanas por meio dos chamados modelos animais, em roedores ou outros animais não-primatas, é passível de maiores críticas visto que a probabilidade de os mesmos processos patológicos em doenças humanas ocorrerem e se manifestarem de formas idênticas através das espécies é considerada muito baixa (Gallagher *et al.*, 1997). No entanto, isto não descarta a possibilidade da obtenção de valiosas contribuições geradas de experimentos utilizando modelos animais, que mesmo não sendo totalmente representativos de

uma doença podem reproduzir aspectos relacionados com as mesmas e representar uma vantagem, no sentido de abrir novas perspectivas de estudos muitas vezes inviáveis de serem realizados em seres humanos.

Ratos Wistar são animais com expectativa de vida relativamente curta, entre 2 a 3,5 anos (Pass e Freeth, 1993), de fácil manuseio e cujo comportamento em tarefas espaciais permite a análise de aspectos cognitivos que podem ser reproduzidos. Eles envelhecem bem em biotérios experimentais, sob condições controladas, que reduzem em alguma extensão a variabilidade dos dados mensurados (sejam parâmetros comportamentais ou bioquímicos), característica típica dos indivíduos idosos, que são um desafio adicional para o entendimento do processo de envelhecimento.

O estudo do envelhecimento *per si* em ratos representa um modelo valioso para se entender a cinética do processo de neurodegeneração e a progressão gradativa de comprometimentos cognitivos e/ou emocionais, os quais, em uma sequência contínua de eventos, podem acometer os indivíduos em fases mais tardias da vida.

2.2. Aprendizagem e memória

Dentre as diversas capacidades cognitivas afetadas pelo envelhecimento, aprendizado e memória têm sido foco de grande interesse nas pesquisas clínicas e da área básica. Definir memória e aprendizado é tarefa difícil, visto que são muitas as perspectivas possíveis para o estabelecimento de marcos conceituais. Ebbinghaus, primeiro pesquisador a estudar memória de forma experimental, contribuiu para o desenvolvimento do entendimento da memória enquanto processo que envolvia associações supostamente formadas entre estímulos e respostas. Seus estudos envolveram a memorização de listas de sílabas sem sentido algum, por meio da repetição, e permitiram a formulação da hipótese do tempo total, a qual postula que “a quantidade de informação aprendida é uma simples função da quantidade de tempo gasto na tarefa de aprendizagem” (Ebbinghaus, 1913). Bartlett, ao contrário de Ebbinghaus, valorizava o aprendizado baseado em tarefas que envolviam o uso de material com significado, como textos literários complexos (Bartlett, 1932). Bartlett estudou os erros de memória cometidos por pessoas treinadas através do uso destes textos, abordagem que considerava a existência de representações internas de suas concepções culturais, portanto, de difícil controle das variáveis envolvidas nestas representações ambíguas do mundo. A partir do uso do computador nas pesquisas relacionadas à

memória realizadas pela Psicologia Experimental (em meados da 2ª Guerra Mundial), o conceito de aprendizado e memória passou a envolver aspectos intrínsecos a esta ferramenta de trabalho, como as capacidades de codificar, armazenar e evocar a informação. Considerando a *metáfora do computador*, Atkinson e Shiffrin (1968) propuseram a existência de três tipos de armazenadores de memória: 1) armazenadores sensoriais, específicos de cada modalidade (por exemplo, visão, audição), que retêm a informação por um período muito curto de tempo; 2) um armazenador de curto prazo com capacidade limitada; 3) um armazenador de longo prazo, com capacidade ilimitada, que pode reter informação durante períodos bem longos.

Aprendizado e memória estão intrinsecamente ligados, compondo um processo maior, o qual envolve uma rede complexa de funções inter-relacionadas distintas que trabalham em conjunto no manejo de uma grande diversidade de informações relevantes para o sujeito, relativas aos meios interno (organismo) e externo (ambiente), as quais são filtradas, adquiridas, classificadas, codificadas, armazenadas, recuperadas, reconsolidadas e extintas, consubstanciando as alterações comportamentais que enfim caracterizam o processo. Por isto, talvez o termo *sistema* de memória reflita melhor o objeto de estudo em questão. No escopo desta caracterização percebe-se que a memória, enquanto processo, apresenta estágios mais ou menos bem definidos ao longo do tempo, dentro dos quais estão incluídas aquisição, consolidação, manutenção e recuperação. Qualquer análise adequada da memória deve considerar tanto a *estrutura* do sistema quanto os *processos* funcionando dentro desta estrutura. Uma memória pode sofrer modificação (re-consolidação), ou ser substituída por outra (extinção ou reaprendizado). A extinção de uma memória não implica sua eliminação, mas sim um novo aprendizado que, ao substituí-la amplia a capacidade de adaptação de um indivíduo, tornando-o mais flexível frente às alterações do ambiente (Bevilaqua *et al.*, 2010). Há evidências em modelos experimentais, utilizando roedores, de que a idade se associa a um declínio da capacidade de extinguir uma memória, ou seja, o envelhecimento parece ser acompanhado por uma redução da flexibilidade comportamental (Schneider-Rivas *et al.*, 1995; Oliveira-Silva *et al.*, 2007). De fato, é comum na prática clínica geriátrica atestar o comportamento perseverante em idosos humanos com declínio cognitivo, frente a novos desafios que alteraram uma rotina já estabelecida.

2.2.1. Memória espacial e hipocampo

Dentro das considerações conceituais de memória, o tempo é parâmetro que permite sua classificação em memória de curta duração e memória de longa duração (Paul *et al.*, 2009). A memória de curta duração é responsável pelo manejo temporário de informações, enquanto a memória de longa duração se responsabiliza pelo manejo de informações por períodos mais longos de tempo (**Figura 1**). Os sistemas de memória de longa duração podem ser divididos em memória declarativa (referente à informação que é transmitida ou expressa de maneira convencional) e memória não-declarativa ou procedural (referente à informação que não pode ser transmitida de forma oral, mas sim vivenciada por meio de estratégias motoras, por exemplo). Os sistemas de memória de curta duração englobam a memória de trabalho, a qual constitui um sistema de capacidade transitória e limitada de armazenamento de informação corrente, ou seja, que está em uso no momento. Os processos relacionados à memória de trabalho atuam mais na manipulação do conteúdo da memória do que sobre a sua manutenção ao longo do tempo (Nadel e Hardt, 2011).

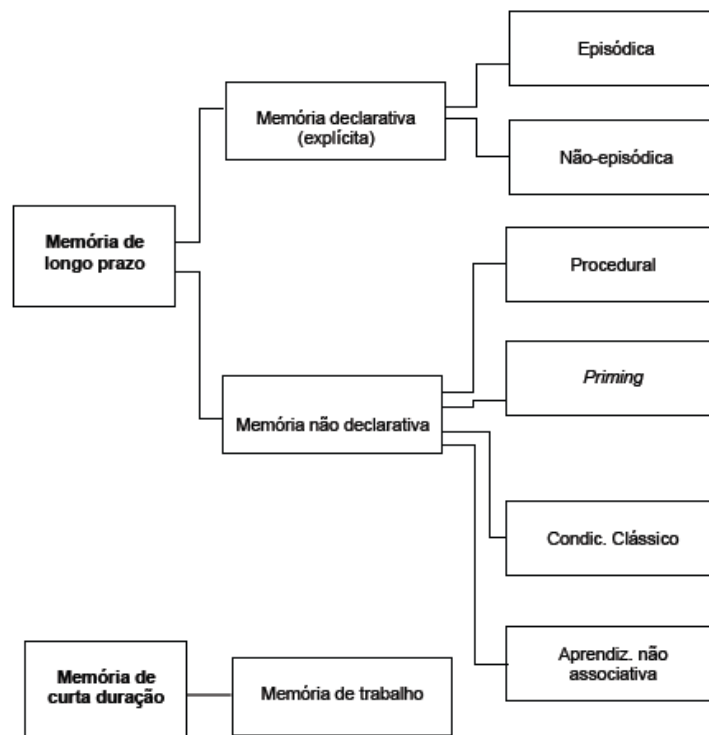


Figura 1. Classificação dos sistemas de memória (Paul *et al.*, 2009)

Prosseguindo no campo conceitual de memória tem-se a memória espacial, a qual não representa ramo algum dos subsistemas de classificação, ainda que apresente interface com parte de várias dessas categorias, visto que envolve aspectos não-declarativos, declarativos, assim como de memória de curta e de longa duração (**Figura 1**). Na interface entre memória espacial e memória de curta duração está a *memória espacial de trabalho*, que é um sistema que permite o acúmulo no tempo (de forma transitória) de uma quantidade limitada de informação espacial, e que a mantém disponível para o acesso imediato (Moscovitch *et al.*, 2005). Este sistema possibilita o uso da informação espacial para outros processos cognitivos. Por outro lado, na interface entre memória espacial e memória de longa duração está a *memória espacial de referência*, cujo conceito foi inicialmente proposto por Olton *et al.* em 1979, já tendo sido atestada experimentalmente (Moscovitch *et al.*, 2005). A memória espacial de referência constitui um sistema envolvido na obtenção de informação espacial através da repetição de uma tarefa. Em contraste com a memória espacial de trabalho, há uma capacidade maior de acúmulo de informação espacial, e por um tempo também maior (Olton *et al.*, 1979). Em 1948 Edward Tolman propôs pela primeira vez a existência de um mapa cognitivo, uma representação real e global do ambiente externo que explicaria, por exemplo, a capacidade de um animal treinado em uma tarefa espacial de estabelecer uma rota ou estratégias redundantes para solucionar um labirinto. Em 1971 O'Keefe e Dostrovsky encontraram um substrato neurobiológico para a hipótese de Tolman ao descobrirem as *place cells* no hipocampo, confirmadas em estudos posteriores (Rosenzweig e Barnes, 2003). Estas células apresentam atividade seletiva para uma região do espaço. Quando um animal, testado em tarefas espaciais que envolvem técnicas de neurofisiologia, não se encontra nesta região quase sempre as *place cells* estão em “silêncio”. A descoberta deste substrato neurobiológico da memória espacial no hipocampo de roedores constitui forte evidência do papel do hipocampo na memória espacial. Muitos estudos de lesão de estruturas cerebrais, tanto em humanos (Abrahams *et al.*, 1996; Astur *et al.*, 2002) quanto em roedores (Morris *et al.*, 1982; Winocur *et al.*, 2013), têm confirmado a importância do hipocampo para os sistemas de memória espacial, principalmente para a memória espacial de referência.

Enfim, a sólida relação entre hipocampo e memória espacial de referência fundamentou a escolha desta região cerebral para a execução do presente trabalho.

2.2.2. Memória espacial, hipocampo e Labirinto de Barnes

O hipocampo concentra grande parte do processamento da aprendizagem e memória espacial (Gallagher *et al*, 1997; Paul *et al*, 2009). Inicialmente sua neurodegeneração foi formalmente vista como uma consequência inevitável do envelhecimento normal, e estaria nas bases fisiopatológicas do declínio cognitivo característico de indivíduos idosos. Entretanto o envelhecimento não parece promover perda neuronal significativa no hipocampo, e mesmo sendo constatadas por microscopia eletrônica anormalidades anatômicas, os déficits de aprendizado e memória encontrados na senescência não necessariamente se associam a estas alterações morfológicas (Gallagher *et al*, 1997). Há na literatura muitos dados indicando que ratos idosos, comparados com animais jovens, têm déficits no aprendizado e memória espacial quando avaliados em tarefas comportamentais hipocampo-dependentes (Barnes, 1979; MacLay *et al*, 1999; Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010; Krause *et al*, 2008). Destes testes, o labirinto aquático de Morris (LAM) é um dos mais utilizados para estudos do processo de aprendizagem espacial em roedores (Morris, 1984). Sabendo que animais idosos saudáveis apresentam maior reatividade emocional a novos ambientes que animais jovens (Blokland *et al*, 1993; Miyagawa *et al*, 1998), e que aspectos emocionais afetam o desempenho de animais idosos em tarefas cognitivas (Kuçuk *et al*, 2008), o labirinto de Barnes (LB), que difere do LAM em termos do valor do estímulo aversivo e tipo de reforço, tem sido utilizado como alternativa ao LAM (Barnes, 1979). O LB não envolve o nado – água como estímulo aversivo – e por isto é considerado menos ansiogênico, além de exigir um esforço motor relativamente menor comparado ao LAM. Sternber *et al* (1992) mostraram em estudo com três linhagens de ratos jovens (Lewis, Fisher e Sprague-Dawley) que a exposição a um campo aberto como a plataforma do LB, ainda que não seja livre de estresse, provoca liberação de corticosterona e de ACTH significativamente menor que o estresse relacionado ao nado, como no LAM. Harrison *et al* (2009,) compararam o LAM e o LB, utilizando camundongos jovens, e verificaram que o LAM induziu maiores níveis de corticosterona plasmática que o LB, com os menores níveis hormonais detectados em animais controle não submetidos aos testes cognitivos. Outra potencial vantagem do LB em relação ao LAM em estudos com animais idosos é que o LB não exige uma aptidão física em grau substancial como o LAM. Por ser um labirinto “seco”, o LB também permite a associação de técnicas de coleta de material biológico (como por exemplo, através de microdiálise) durante a execução da tarefa espacial. Esta possibilidade constitui interesse de nosso grupo de pesquisa, e uma das expectativas relacionadas ao presente trabalho dizia respeito à

padronização dos procedimentos experimentais do LB no laboratório, com a perspectiva de no futuro desenvolver a técnica de microdiálise conjugada ao LB.

Estas observações, associadas à relativa fragilidade de roedores idosos, mais o risco de perda de animais durante o período de condução da tarefa espacial, nos fizeram escolher o LB para a realização dos testes comportamentais.

2.2.3. Bases neurobiológicas do aprendizado e memória espacial: hipocampo, sistema serotoninérgico e disfunção cognitiva presente no envelhecimento

Os déficits de aprendizagem e memória espacial observados em animais idosos têm sido associados a mudanças em componentes da neurotransmissão, especialmente no hipocampo (Rosenzweig e Barnes, 2003). O maior volume de evidências de alterações neuroquímicas relacionadas às disfunções cognitivas envolve os sistemas colinérgico (Carvajal e Inestrosa, 2011) e glutamatérgico (Segóvia *et al*, 2001). O sistema serotoninérgico, fortemente vinculado a distúrbios emocionais (Cools *et al*, 2008), também integra os mecanismos neurobiológicos associados ao desempenho de roedores jovens e idosos em tarefas cognitivas (Hirst *et al.*, 2006; Costa-Aze *et al.*, 2011; Heo *et al.*, 2011), parecendo exercer importante função nos mecanismos de interface entre cognição e emoção (King *et al*, 2008).

A serotonina (5-hidroxitriptamina, ou 5-HT) é uma amina biogênica massivamente sintetizada no trato gastrintestinal, principalmente nas células enterocromafins. Apenas um pequeno percentual é produzido dentro do sistema nervoso central, por neurônios que em sua maioria se localizam na formação reticular do tronco encefálico, agrupados em núcleos (indicados na **Figura 2**), denominados em conjunto como núcleos da *rafe* (Lesurtel *et al.*, 2008; Bertrand e Bertrand, 2010; Deneris e Wyler, 2012). Como podem ser observados na figura, os neurônios serotoninérgicos têm projeções para praticamente todo o sistema nervoso central, de maneira que o sistema serotoninérgico desempenha significativo papel modulatório sobre outros sistemas de neurotransmissão (Charnay e Léger, 2010). Há evidência de que sua síntese, liberação por exocitose dependente de cálcio, recaptação seletiva por um transportador de membrana dependente de energia, metabolismo e recaptação em vesículas ocorram em todos os elementos neuronais dos neurônios serotoninérgicos (isto é, no soma, dendritos, axônios e terminais), juntos participando da homeostase da serotonina (Charnay e Léger, 2010).

A síntese de 5-HT ocorre com a hidroxilação do triptofano, através da triptofano hidroxilase

2, gerando 5-hidroxitriptofano, que por sua vez sofre a ação de uma descarboxilase, produzindo 5-HT (Matthes *et al.*, 2010). Este neurotransmissor, que age tanto em receptores pré quanto pós-sinápticos, é degradado em sua maior parte no meio extracelular pela monoamina oxidase A (MAO A) gerando o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) e outros metabólitos menos importantes (Sirek *et al.*, 1970; Stahl, 2010). A relação 5-HIAA/5-HT é denominada *taxa de renovação da 5-HT*, visto que, sob algumas circunstâncias, reflete o metabolismo da 5-HT (ou seja, as atividades da triptofano hidroxilase 2 e da MAO) e pode ser relacionada à atividade serotoninérgica (Oliveira-Silva, 2007).

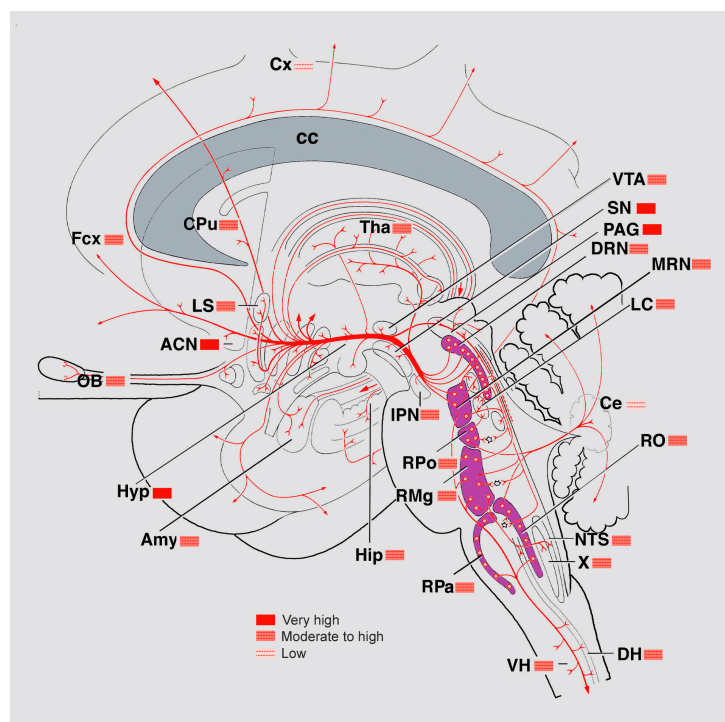


Figura 2. Visão esquemática em corte sagital do cérebro humano mostrando a distribuição do sistema serotoninérgico. Os núcleos da rafe contendo a maioria dos corpos celulares serotoninérgicos aparecem em púrpura. Eles se localizam exclusivamente no tronco cerebral. Seus axônios são mostrados em vermelho. As densidades das redes serotoninérgicas axonais estão representadas nas caixas coloridas. X, nervo motor dorsal do nervo vago; ACN, nervo accumbens; Amy, amígdala; cc, corpo caloso; Ce, cerebelo; CPU, caudado-putamen; Cx, córtex; DH, corno dorsal da medula espinhal; DRN, nervo do núcleo dorsal da rafe; Fcx, córtex frontal; Hip, hipocampo; Hyp, hipotálamo; IPN, nervo interpeduncular; LC, locus coeruleus; LS, septo lateral; MRN, nervo mediano da rafe; n, núcleo; NTS, nervo do trato solitário; OB, bulbo olfatório; PAG, substância cinzenta periaquedutal; RMg, nervo magno da rafe; RO, nervo obscuro da rafe; Rpa, raphe pallidus; RPo, nervo pontinho da rafe; SN, substância negra; Tha, tálamo; VH, corno ventral; VTA, área tegumentar ventral. (modificado de Charnay e Léger, 2010).

Dentro das linhas de pesquisa desenvolvidas por nosso grupo de estudos no Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LANEC) existem aquelas que investigam a participação do sistema serotoninérgico em tarefas cognitivas de animais portadores de processos neurodegenerativos, como a neurodegeneração induzida pela deficiência de tiamina ou relacionada ao envelhecimento natural. Dados obtidos, que foram a base de duas publicações de nosso grupo, abriram perspectivas que motivaram a realização do presente estudo: em 2007, Oliveira-Silva *et al*, trabalhando com ratos Wistar de 16 meses de idade submetidos ao LAM, mostraram evidências do envolvimento do sistema serotoninérgico do núcleo dorsal da rafe com o desempenho da memória espacial dos animais e extinção de um comportamento; e em 2010, Oliveira *et al* verificaram pela primeira vez um efeito da idade sobre a associação de um parâmetro serotoninérgico hipocampal e o desempenho no LAM. Além disto, esses autores observaram uma correlação significativa entre um parâmetro serotoninérgico da amígdala e o desempenho no LAM. Esses dados indicam um possível papel de componentes emocionais, como o sistema serotoninérgico de estruturas do sistema límbico, no desempenho cognitivo, e justificou a escolha do sistema serotoninérgico como alvo de análise do presente trabalho.

Finalmente, a pergunta central abordada no presente trabalho é se a idade afeta o conteúdo, a liberação e o *turnover* de serotonina no hipocampo de ratos submetidos à tarefa de navegação espacial no labirinto de Barnes. Caso afirmativo, se estas alterações se relacionam com o declínio cognitivo espacial eventualmente observado através da análise do desempenho destes animais no LB.

3. OBJETIVOS

3.1. *Geral*

Estudar as relações entre idade, parâmetros cognitivos espaciais e atividade do sistema serotoninérgico no hipocampo de ratos.

3.2. *Específicos*

Estudar o efeito da idade sobre :

- (i). a aquisição e memória de referência em uma tarefa cognitiva de navegação espacial;
- (ii). a flexibilidade comportamental (extinção de um comportamento) em tarefa de navegação espacial;
- (iii). as quantidades (concentrações) de serotonina (5-HT) liberada em condição normal e estimulada e a de seu metabólito ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), assim como sobre a taxa de renovação ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$), no extrato do meio extracelular do hipocampo;
- (iv). as concentrações totais de 5-HT e de 5-HIAA no tecido hipocampal

E ainda estudar:

- (v). as correlações entre os parâmetros neuroquímicos (5-HT e seu metabólito 5-HIAA) e cognitivos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A proposta para a execução do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número de protocolo 380/2012. Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas internacionais de uso e manutenção de animais em laboratório (*National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, 1985).

4.1. Animais: obtenção e cuidados relacionados

O experimento foi realizado com ratos machos Wistar provenientes de dois biotérios de unidades da UFMG: (i) do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas /CeBio-ICB e (ii) do Centro de Bioterismo da Faculdade de Farmácia. Animais provenientes do primeiro (n=20) constituíram o grupo de animais adultos (A, n=10) e o grupo de animais jovens (J, n=10) com 9 e 3 meses de idade, respectivamente, quando do início dos testes comportamentais. Os animais provenientes do segundo biotério (n=27) constituíram o grupo de animais idosos (I). Desses vinte e sete animais, treze conseguiram completar 24 meses em boa condição de saúde, na data de início dos testes comportamentais, sendo que os demais catorze faleceram durante o processo de envelhecimento por causas indeterminadas. Os animais dos grupos adulto e idoso chegaram ao Laboratório (Neurociências Comportamental e Molecular - LANEC) onde os experimentos foram executados com um mês de idade, enquanto os animais do grupo jovem nasceram no LANEC. Todos os animais foram mantidos no biotério do LANEC até atingirem a idade (3, 9 ou 24 meses) específica de cada grupo. Dentro do segundo mês de vida todos foram tratados com anti-helmíntico (mebendazol^a), medicamento contra ectoparasitos (carbarila^b) e antibióticos (^c). Todos foram mantidos em ciclo de 12h claro/escuro, em número de 3 a 5 por gaiola de polipropileno (de 40 x 33 x 17 cm), recebendo ração e água *ad libitum*, inclusive durante os experimentos. As gaiolas e as garrafas de água foram limpas, assim como a maravalha trocada, duas vezes por semana.

^a mebendazol da Aché, em suspensão a 20mg/ml: 1ml desta suspensão diluído para cada 500ml de água oferecida para os ratos, *ad libitum*, por 2 dias.

^b Pulfo[®] da Laippe: 2g de carbarila para cada 100g de excipiente. Cada rato teve seu pelo pulverizado com aproximadamente 2g do produto.

^c *Pentabiótico® Veterinário Reforçado da Fort Dodge: frasco-ampola com 8,6g de pó contendo 3.000.000 UI de benzilpenicilinabenzatina, 1.500.000 UI de benzilpenicilina procaína, 1.500.000 UI de benzilpenicilina potássica, 1.250mg de diidroestreptomicina base (sulfato), e 1.250mg de estreptomicina base (sulfato). Diluir o conteúdo de um frasco-ampola em água destilada estéril q.s.p. 20ml. Cada rato recebeu por via intra-peritoneal 0,1ml desta solução para cada 250g de seu peso, 1 vez por semana, durante 2 semanas.*

4.2. Delineamento experimental

Conforme mencionado acima, no item 4.1, os 33 animais mantidos no biotério do LANEC, foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- **J**: jovem, ~3 meses, n=10,
- **A**: adulto, ~9 meses, n=10,
- **I**: idoso, ~24 meses, n=13,

Dos 13 animais do grupo idoso, dois morreram no segundo dia do teste comportamental. Provavelmente devido a queda que sofreram da plataforma de Barnes, no primeiro dia do teste. Portanto, os dados apresentados do grupo Idoso se referem a uma amostra de 11 animais.

No presente estudo, a mortalidade no grupo dos idosos ($14/27 = 51,9\%$; e contando com os 2 ratos que morreram após o início dos experimentos = $16/27 = 59,2\%$) se assemelhou à experiência em bioterismo do LANEC. A expectativa de vida até os 24 meses de idade para ratos Wistar criados no LANEC é de aproximadamente 50% (dado não publicado). Ponzio *et al.* (1982), introduzindo método de controle de obesidade, observaram taxa de expectativa de vida de 29 meses de 55%.

Os 31 animais que participaram deste estudo foram submetidos à tarefa cognitiva espacial no Labirinto de Barnes para avaliações de aspectos comportamentais: aquisição da informação espacial (aprendizado), memória espacial de referência e comportamento de extinção. Posteriormente, todos foram sacrificados e tiveram um dos hipocampus dissecados para os ensaios neuroquímicos (experimento de liberação de serotonina – 5-HT), enquanto o hipocampo contra-lateral foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido, e logo a seguir armazenado em *freezer* -80°C, para dosagem dos conteúdos totais de 5-HT e 5-HIAA no tecido hipocampal. A escolha de qual hipocampo (hemisfério direito ou esquerdo) seria utilizado no experimento de liberação de 5-HT seguiu método randomizado. Na **Figura 3** está demonstrado o esquema do delineamento experimental em linha cronológica. O detalhamento dos procedimentos realizados segue abaixo, nos itens “Tarefa no Labirinto de Barnes”, “Dissecação cerebral para obtenção dos hipocampus”, e “Estudos neuroquímicos”.

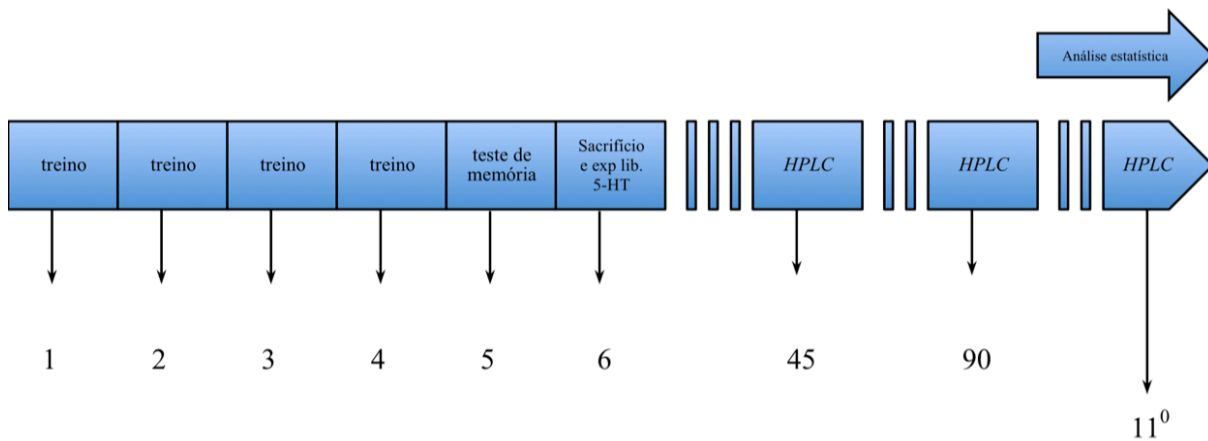


Figura 3. Esquema do delineamento experimental em linha cronológica. Dos dias 1 a 4: treino no labirinto de Barnes (LB). No dia 5: teste de comprobatório. No dia 6: animais mortos por decapitação e, logo a seguir, experimento de liberação de serotonina (5-HT). Dias 45 a 90: determinação das [5-HT] e [5-HIAA] em amostras obtidas no experimento de liberação de 5-HT. No 11^o mês após o início dos testes comportamentais: determinação do conteúdo total de 5-HT e 5-HIAA. Todos os procedimentos estão detalhados no texto.

4.3. Estudo Comportamental

4.3.1. Tarefa no Labirinto de Barnes (LB):

4.3.1.1. Equipamento: as avaliações comportamentais sobre aspectos dos processos de aprendizagem, memória e extinção, realizadas através do LB foram conduzidas em uma plataforma redonda de 105 cm de diâmetro, coberta com um piso removível de borracha preta, contendo na periferia 12 orifícios equidistantes, de 10 cm de diâmetro cada um (**Figura 4**). Cada orifício foi ocluído com uma peça de MDF recoberta por fórmica preta. Apenas um orifício permaneceu aberto e acoplado, por baixo, a uma caixa-escape para ratos (CE: 17 x 23 x 11 cm, medidas internas). A CE foi mantida, durante as tentativas de todas as sessões, em uma posição constante em relação às coordenadas da sala onde se encontrava o LB, posicionado no centro da mesma.

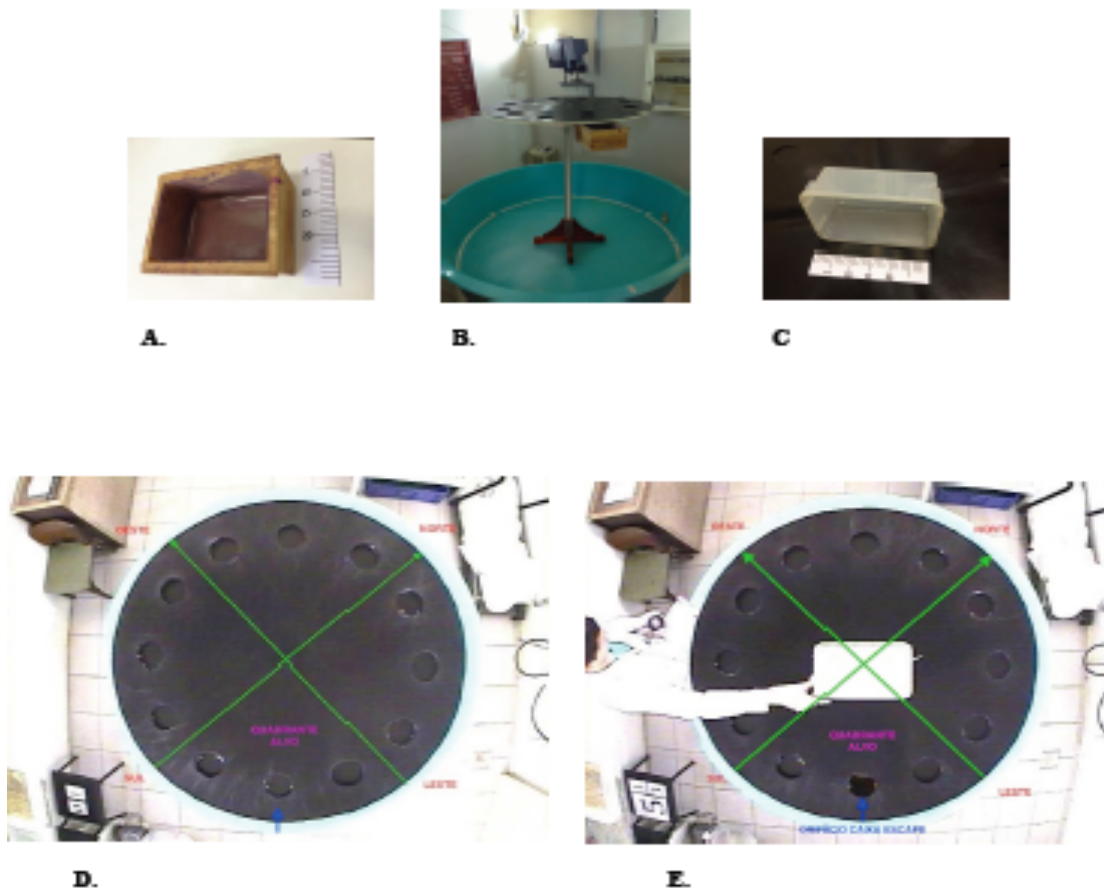


Figura 4. Fotos do Labirinto de Barnes e acessórios. A, caixa-escape (CE). B, Plataforma do LB, com piso de borracha, mais CE acoplada por baixo. A CE foi deslocada para fora a fim de facilitar sua visualização. C, caixa de plástico opaco, utilizada para colocar o animal no centro da plataforma, no início de cada tentativa. D, visão superior da plataforma, indicando divisão imaginária em quadrantes (seta aponta orifício que é a saída para entrada na CE, neste caso ocluído com placa de MDF). E, visão superior da plataforma, com CE acoplada e orifício correspondente aberto, no momento do início de uma tentativa, onde a caixa de plástico opaco utilizada para a colocação do rato no centro da plataforma é visualizada. A graduação da régua apresentada nos painéis A e C é em centímetros.

Esta plataforma permaneceu sobre um suporte que a mantém suspensa a 132 cm do chão, dentro de uma sala iluminada (3x3m, 4 lâmpadas de 45W) com pistas estáveis e distais extra-labirinto (cartaz, equipamento de vídeo, armário, mangueira), de forma que, para se localizar no espaço, o animal sobre a plataforma pode utilizar as coordenadas espaciais – elaborando um mapa cognitivo do ambiente. A plataforma pode ser dividida em quatro quadrantes imaginários denominados NW (noroeste), SW (sudoeste), NE (nordeste) e SE (sudeste). Para impedir a localização da CE (constantemente localizada no quadrante SE) através de trilhas (pistas) olfatórias, o piso de borracha preta foi trocado por outro idêntico e previamente limpo (com solução de etanol a 20%) após cada tentativa para todos os ratos. Ou seja, a troca foi realizada entre as tentativas, entre as sessões e, portanto, entre um rato e o próximo a ser submetido ao treino ou ao teste. Com a

mesma finalidade de eliminar possíveis pistas olfatórias a CE foi recoberta internamente com plástico grosso e transparente, limpo com solução de etanol a 20% após cada tentativa. Uma câmera de vídeo com lente angular fixada no teto da sala acima do ponto central onde se encontrava a plataforma, foi utilizada para captar e registrar os comportamentos dos animais durante o treino e teste. A câmera é conectada a um computador localizado do lado externo da sala. A análise das imagens foi realizada por um programa executado em sistema operacional Linux, desenvolvido no LANEK em colaboração com estudante do Curso de Engenharia Elétrica da UFMG. Os dados obtidos no treino e no teste foram gerados pelo programa, possibilitando uma avaliação qualitativa e quantitativa do desempenho dos animais. A expressão dos resultados sobre o desempenho dos animais está detalhada abaixo, no próximo item.

4.3.1.2. Treino (aquisição de informações – aprendizagem espacial): o treino consistiu de uma sessão por dia (sempre no período de 12 às 19h), por 4 dias consecutivos. Cada sessão foi constituída de 5 tentativas consecutivas para cada rato, com intervalo entre as tentativas de aproximadamente 5 minutos. Os ratos eram levados do biotério do LANEK até a sala de testes, dentro de suas gaiolas originais, minutos antes do início de uma sessão. Cada rato era colocado no centro da plataforma sob uma caixa retangular de plástico opaco (29 x 18 x 13cm, medidas internas; vide foto no **painel C da Figura 4**) que permitia que o animal permanecesse confortavelmente com a face voltada para um dos quadrantes, aleatoriamente escolhido pelo experimentador e não visualizado pelo animal. Após 15 segundos esta caixa era levantada manualmente pelo experimentador, possibilitando a visualização do ambiente pelo animal. Esse momento era registrado como o tempo zero do início de cada tentativa. A cada tentativa esta caixa retangular contendo o rato era posicionada de tal forma que a face do rato ficasse voltada para um quadrante diferente, de uma maneira pseudo-randomizada para o início de cada tentativa. O experimentador permanecia dentro da sala, sempre na mesma posição, observando e anotando dados sobre o comportamento do rato (coleta manual de dados). O rato, sob o estímulo da luz e da exposição à altura do campo aberto (ambos estímulos aversivos) poderia explorar a plataforma pelo tempo máximo de 3 minutos. Caso o animal adentrasse na CE antes deste tempo limite, era permitido que lá permanecesse por 1 minuto, para depois ser retirado e colocado em sua gaiola original, que ficava dentro da sala de testes durante todo o período de duração da sessão. Caso o animal não adentrasse na CE dentro dos 3 minutos (tempo limite para cada tentativa), logo ao fim deste tempo ele era gentilmente conduzido pela mão do experimentador até a CE, sendo colocado dentro dela através de seu orifício, e lá deixado por 1 minuto, para depois retornar para sua gaiola. O término de uma

tentativa com sucesso (ou seja, a localização da CE antes dos 3 minutos) foi considerado o momento em que o rato entrava com as quatro patas na CE. Conforme mencionado, entre as tentativas, o piso de borracha preta que recobria a superfície da plataforma era limpo com solução de etanol a 20%, e também o plástico-forro que internamente cobria o piso e as paredes da CE. Ao fim de uma sessão, o rato retornava ao biotério dentro de sua gaiola. As unidades de medidas que expressam o desempenho dos animais durante o treino foram: (i) latência (s) = o tempo que o animal gasta, em segundos, para entrar na CE, (ii) distância percorrida (cm) para encontrar a CE e (iii) velocidade média (cm/s), calculada dividindo a distância percorrida pela latência. Latência e distância percorrida podem ser consideradas medidas da aquisição, ou seja, quanto menor a latência ou a distância percorrida, melhor o desempenho do animal. A variável “velocidade média” pode ser utilizada como um parâmetro para avaliar a função motora. Para a obtenção da latência e distância percorrida de animais de cada grupo etário (J, A e I) por sessão (sessões 1, 2, 3 e 4) calculamos a média das medianas (\pm intervalo de confiança, IC) das tentativas de cada rato, em uma sessão. Para estudarmos aspectos específicos do processo de aprendizagem e memória espacial relacionados ao tempo de descanso dos animais entre as sessões do treino (intervalo de 24h) calculamos a diferença (delta = D) e a razão (R) entre a latência da primeira tentativa de uma sessão e a latência da última tentativa da sessão anterior. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se a variável distância percorrida. Considerando as 4 sessões do treino, obtivemos três deltas ($D_1 = T1_{\text{sessão}2} - T5_{\text{sessão}1}$; $D_2 = T1_{\text{sessão}3} - T5_{\text{sessão}2}$; $D_3 = T1_{\text{sessão}4} - T5_{\text{sessão}3}$) e três razões ($R_1 = T1_{\text{sessão}2}/T5_{\text{sessão}1}$; $R_2 = T1_{\text{sessão}3}/T5_{\text{sessão}2}$; $R_3 = T1_{\text{sessão}4}/T5_{\text{sessão}3}$) para latência e também para a distância percorrida. A **Figura 5** mostra fotografias de duas tentativas do rato #1, durante o treino.

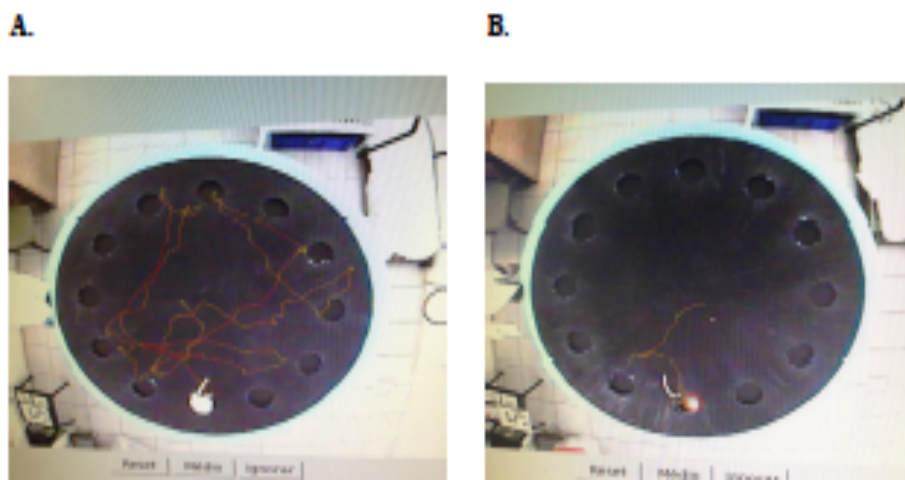


Figura 5. Foto do Labirinto de Barnes ilustrando as trajetórias de um animal na primeira (painel A) e quinta (painel B) tentativas do primeiro dia (primeira sessão) do treino de um rato idoso (rato #1). Observe a imagem do rabo e parte das patas posteriores do animal, no momento da entrada na caixa (CE).

4.3.1.3. Teste comprobatório (memória de referência; extinção do comportamento = flexibilidade): no dia seguinte à última sessão do treino, no período de 12 às 19h, foi realizado o teste comprobatório (denominação baseada no termo técnico em inglês= Probe test) no qual foi possível avaliar a memória espacial de referência dos ratos relativa à tarefa aprendida durante o treino e também a extinção do comportamento aprendido. Para este teste a CE foi retirada da plataforma, e o orifício correspondente ocluído com uma placa de MDF revestida por fórmica preta (idêntica às que ocluíam os outros orifícios). A plataforma foi mantida na mesma situação e condições da fase de treino, em relação às coordenadas espaciais da sala (com o orifício correspondente à CE, agora ocluído e sem a mesma, no quadrante SE). Cada rato foi colocado no centro da plataforma da mesma maneira descrita, item 4.3.1.2., para a fase de “Treino” e permitido explorar a plataforma por 2 minutos (tempo de duração do teste comprobatório). O desempenho de cada rato no teste comprobatório foi expresso em (i) tempo em segundos (s) de permanência do animal no quadrante-alvo (QA) durante o primeiro (t1) e durante o segundo minutos (t2) do teste, (ii) distância total percorrida (cm) durante os dois minutos e (iii) velocidade média (cm/s), calculada pela razão entre a distância percorrida (cm) e o tempo de duração do teste (=2 minutos). A extinção do comportamento, para cada animal, foi analisada através do índice de extinção ($IE=t1/t2$), calculado dividindo-se o tempo de permanência do rato no QA durante o primeiro minuto (t1) do teste comprobatório pelo tempo de permanência no QA durante o segundo minuto (t2).

4.4. Estudos neuroquímicos

4.4.1. Sacrifício dos ratos, dissecação do cérebro para obtenção dos hipocampus e processamento das amostras para: (a) experimento de liberação de 5-HT e (b) determinação do conteúdo total de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo

No dia seguinte ao teste comprobatório os animais foram mortos por decapitação. Imediatamente após a decapitação o encéfalo de cada rato foi removido e colocado sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo, coberta com papel de filtro umedecido com solução fisiológica (Tyrode), para procedimento da dissecação. O encéfalo e o papel absorvente foram constantemente banhados, com um uso de uma pipeta, com a solução Tyrode com baixa concentração de cálcio (meio de repouso – **Tabela 1**). Os hipocampus foram removidos, sendo um deles imediatamente

Tabela 1 – Solução Tyrode. Composição dos tipos de solução Tyrode utilizados nos experimentos de liberação de 5-HT e medida de 5-HIAA. pH=7.4

TYRODE	REPOUSO	PADRÃO (NORMAL)	ESTIMULANTE (DESPOLARIZANTE)
NaCl	1.25mM	1.25mM	1mM
KCl	2.5mM	2.5mM	30mM
CaCl ₂	0.09mM	2mM	2mM
NaH ₂ PO	1.25mM	1.25mM	1.25mM
NaHCO ₃	25mM	25mM	25mM
MgCl ₂	3.15mM	1mM	1mM
Glicose	0.1%pv	0.1%pv	0.1%pv

congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C, para serem posteriormente utilizados para as determinações dos conteúdos total de 5-HT e 5-HIAA (item 4.4.3). O hipocampo obtido do outro hemisfério foi usado, no mesmo dia, para o experimento de liberação de 5-HT. A escolha dos hipocampos (hemisférios direito ou esquerdo) para os ensaios bioquímicos (determinações do conteúdo total ou liberado) foi randômica, mantendo a mesma proporção de hemisférios esquerdos e direitos por grupo de ratos (I, A e J). Os hipocampos para o experimento de liberação de 5-HT foram fatiados manualmente com lâmina (Gillete®), em cubos de aproximadamente 1 mm de aresta. Esta amostra foi dividida em quatro partes (de aproximadamente 13mg cada), transferidas cada uma para tubos de ensaio, mantidos no gelo, contendo 500 µL de solução fisiológica. A amostra de tecido foi colocada sobre uma tela, presa a um suporte, e submersa dentro do tubo de ensaio, de tal forma que o meio fisiológico contido no tubo cobrisse todo o tecido sobre a tela. A tela estava presa a um suporte com uma haste vertical, através da qual era possível remover o tecido sobre a tela e transferi-lo para outro tubo contendo soluções em condição fisiológica normal ou despolarizante. A **Figura 6** mostra uma foto do sistema utilizado para o estudo de liberação do neurotransmissor.

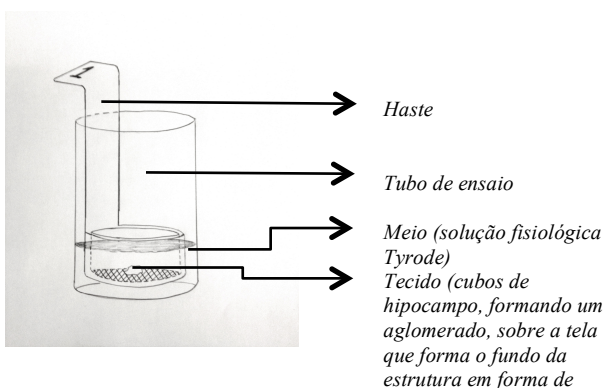


Figura 6. Esquema do aparato utilizado nos experimentos de liberação de 5-HT. A estrutura de suporte para manter o tecido suspenso no meio de incubação foi construída a partir do corpo de uma seringa de 3ml. O fundo da parte inferior desta estrutura foi ocluído com uma tela muito fina, que não permitia o escoamento dos cubos de hipocampo. A estrutura está dentro de um tubo de ensaio, contendo 1ml de solução fisiológica Tyrode. Detalhes no texto (item 4.4.1.)

4.4.2. Experimento de liberação de 5-HT - Incubação das amostras biológicas

Conforme mencionado acima, quatro amostras de um hipocampo fatiado, de cada rato, de aproximadamente 13mg cada, foram incubadas à 0°C (tubos imersos no gelo), por no mínimo 30 min, em 500 µL de meio Tyrode com baixa concentração de cálcio (**Tabela 1**). O objetivo desta incubação foi reduzir o metabolismo e evitar a morte das células até o início do experimento de liberação. Logo a seguir estas amostras foram transferidas para tubos contendo meio Tyrode padrão e incubadas por 5 min a 37°C, com o propósito de reativar as células. Imediatamente depois, duas das quatro amostras foram incubadas em meio Tyrode padrão (condição normal) e as outras duas em meio Tyrode com alta concentração de KCl (condição estimulada), por 5 min. a 37°C. Ao fim desta última incubação, em meio normal ou despolarizante, o tecido foi retirado e os meios de incubação coletados. Para a conservação da 5-HT e do 5-HIAA contidos nos meios de incubação, foram acrescentados ácido perclórico (0,005M, concentração final) e metabissulfito de sódio (0,04%, concentração final). Finalmente, as amostras (meios de incubação) foram congeladas em *freezer* - 80°C para posterior determinação das concentrações de 5-HT e 5-HIAA, presentes nos meios extracelulares (meios de incubação) nas condições normal e estimulada. A **Tabela 1** apresenta a composição dos 3 tipos de meio Tyrode utilizados nesses experimentos.

4.4.3. Processamento das amostras de hipocampo para determinação das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA.

Os ensaios para determinação dos conteúdos totais de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo foram realizados nas amostras armazenadas no *freezer* à -80°C, no 11º mês após o início dos testes comportamentais.. Cada hipocampo (aproximadamente 63mg) foi colocado em 1 ml de solução tampão (980 µL de HClO₄ 0,1M; 10 µL de Na₂S₂O₅ 0,4mM e 10 µL de EDTA 0,1mM), em um Potter mantido em gelo e, posteriormente homogeneizado por 5 vezes. A seguir os “homogenatos” (suspensões) foram então centrifugados a 10.000 r.p.m. por 30 min. (Sorval RC – 5B). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e mantido no gelo (sempre protegido da luz) até a realização, no mesmo dia, dos ensaios para determinação das concentrações de 5-HT e 5-HIAA, por método cromatográfico (descrito abaixo).

4.4.4. Determinações das concentrações de 5-HT e 5-HIAA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As determinações das concentrações de 5-HT e 5-HIAA (estruturas químicas apresentadas na **Figura 7**) nas amostras obtidas do experimento de liberação (meios de incubação) e extratos do tecido hipocampal, conforme descrito nos itens 4.4.2 e 4.4.3, respectivamente, foram realizadas utilizando método estabelecido pelo nosso grupo (Oliveira-Silva *et al.*, 2007), de cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance LiquidChromatography=HPLC*), conforme detalhado abaixo.

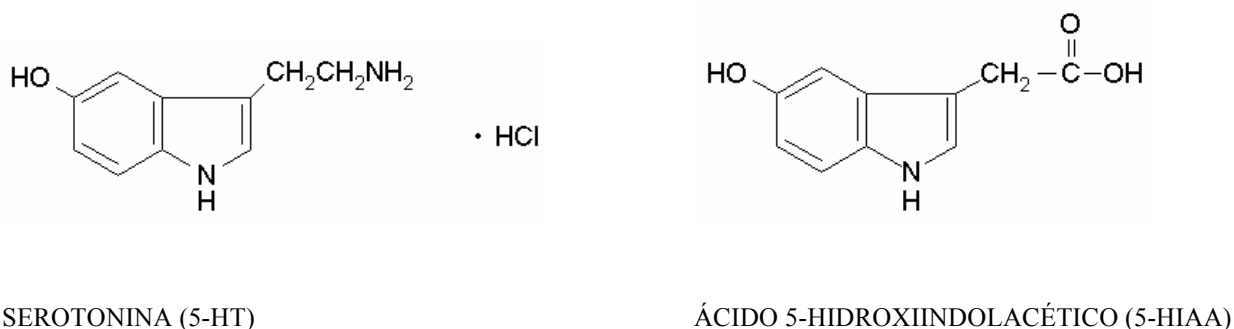
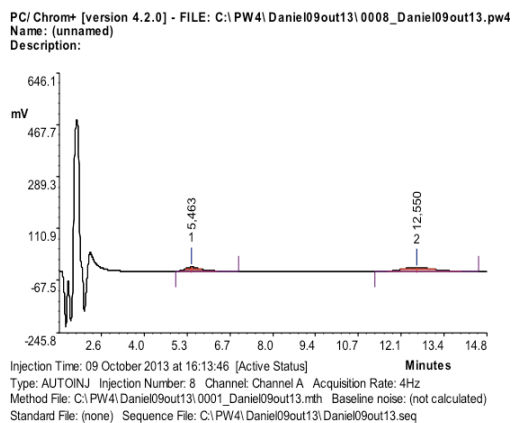


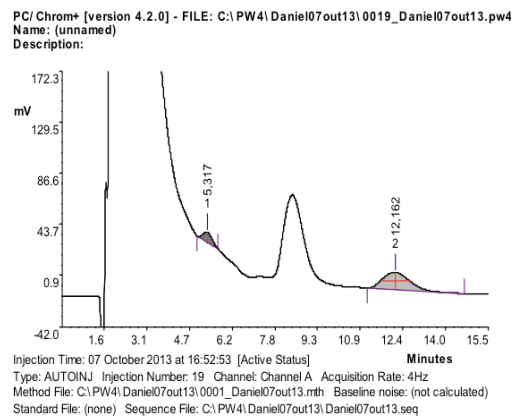
Figura 7. Estrutura química da serotonina e do ácido 5-hidroxi-indolacético

Equipamento: O sistema de HPLC utilizado era constituído de um cromatógrafo [LC-10AD, Tokyo, Japan] com *loop* de 200 μ L [Rheodyne 7725-I, California, USA] e um detector eletroquímico de Ag/AgCl [Shimadzu Electrochemical Detector L-ECD-6AAA-Tokyo, Japan], acoplados a uma bomba LC-10. O sistema foi equipado com uma coluna analítica de fase reversa C18 [Hibar-Futiganle RT] de partículas de 3 μ m [150mm x 4,6mm, ID] com pré-coluna [RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R Germany]. Para análise dos dados foi utilizado um integrador pW4 (PC/Chrom+, versão 4.2.0, H&A Scientific, Inc. USA). A fase móvel utilizada constituía-se de ácido cítrico 0.199 M, acetato de sódio 0.243 M, EDTA 2.95 x 10⁻⁴ M e metanol (9: 1:9,v/v), com pH=4. A fase móvel foi filtrada (filtro Mililipore 0.45 μ m) e degaseificada (por 30 min.) antes de ser usada. A taxa de fluxo foi de 1.0 ml/min e o volume de amostra aplicado foi de 200 μ L do meio de incubação obtido no experimento de liberação de 5-HT (previamente centrifugado a 10.000 r.p.m. por 10 min. – Sorval RC – 5B) , ou 200 μ L do sobrenadante do extrato de hipocampo obtido por

centrifugação da suspensão para determinação dos conteúdos totais da 5-HT e do 5-HIAA. O detector eletroquímico foi configurado com um potencial de detecção da célula eletroquímica de 0.85 V, S+B, resposta “slow” e “range” 16. Os tempos de retenção da 5-HT (de 4 a 6 minutos, **painel A da Figura 8**) e do 5-HIAA (de 10 a 13 minutos, **painel A da Figura 8**) foram determinados a partir de curvas-padrões para cada uma dessas substâncias. As curvas foram construídas através da injeção de soluções-padrão de 5-HT ($P_1=1$ ng/ml; $P_2=4$ ng/ml; $P_3=8$ ng/ml; $P_4=16$ ng/ml; $P_5=20$ ng/ml; $P_6=30$ ng/ml; $P_7=40$ ng/ml) e de 5-HIAA ($P_1=1$ ng/ml; $P_2=4$ ng/ml; $P_3=8$ ng/ml; $P_4=16$ ng/ml; $P_5=20$ ng/ml; $P_6=30$ ng/ml; $P_7=40$ ng/ml) (**Figura 9**). Os picos de 5-HT e 5-HIAA das amostras biológicas foram identificados utilizando-se, padrões internos e os tempos de retenção acima relatados. As concentrações de 5-HT e de 5-HIAA foram calculadas



C:\PW4\Daniel09out13\0008_Daniel09out13.pw4				
Peak	RT	Area	%Ar	Height
1	5,463	469,173	32,81	13,895
2	12,55	960,926	67,19	13,892



C:\PW4\Daniel07out13\0019_Daniel07out13.pw4				
Peak	RT	Area	%Ar	Height
1	5,317	192,574	16,59	8,378
2	12,162	968,43	83,41	14,56

Figura 8. Cromatogramas. Em “A”, o registro correspondente à injeção da solução padrão de 5-HT e 5-HIAA (20ng/ml para ambas as substâncias), onde o pico da 5-HT foi identificado pelo tempo de retenção de 5.5 min, e o pico do 5-HIAA pelo tempo de retenção de 12,6 min. Em “B” perfil cromatográfico referente a uma amostra do rato #1 (idoso), no experimento de determinação do conteúdo total de 5-HT e 5-HIAA hipocampal: os picos correspondentes à 5-HT e 5-HIAA foram detectados nos tempo de retenção de 5,3 min e 12,2 min, respectivamente.

comparando-se a área sob os picos encontrados nas amostras (**painel B da Figura 8**) com as áreas sob os picos obtidos com a injeção das soluções-padrão, através do uso das curvas-padrões (**Figura 9**). Os valores de 5-HT e 5-HIAA obtidos foram expressos em ng/g de tecido.

Em todos os passos acima as amostras biológicas foram mantidas em gelo e ao abrigo da luz, dada à sensibilidade da 5-HT à variação de temperatura e luminosidade.

Para o experimento de liberação de 5-HT calculou-se a taxa de renovação da serotonina = $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$.

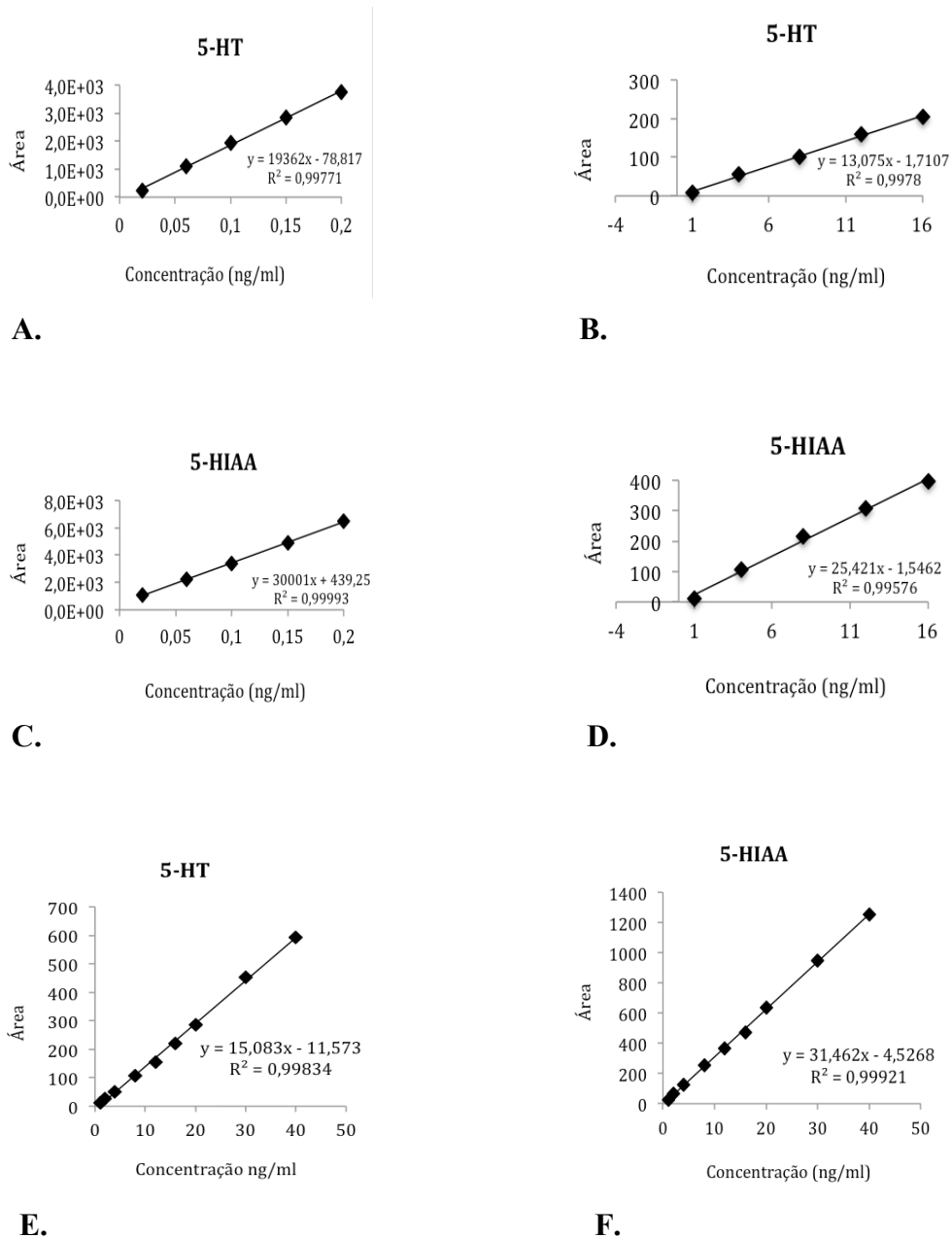


Figura 9. Curvas de calibração dos padrões de 5-HT e 5-HIAA. As respostas lineares para as soluções de 5-HT e 5-HIAA são representadas como média para cada uma das concentrações utilizadas. Em A e C, as curvas para valores abaixo de 0.2ng/ml de 5-HT e 5-HIAA, respectivamente. Em B e D, as curvas para valores acima de 1ng/ml de 5-HT e 5-HIAA, respectivamente. Estas curvas foram as utilizadas na determinação da 5-HT e do 5-HIAA do experimento de liberação de 5-HT. Em E e F, as curvas utilizadas na determinação das concentrações teciduais (conteúdo total hipocampal) de 5-HT e 5-HIAA.

4.5. Análise estatística

Para verificar a influência das sessões, dos grupos e da possível interação existente entre sessões e grupo sobre a velocidade, latência e distância percorrida foram ajustados Modelos Marginais Log-Lineares. Os Modelos Marginais conhecidos também por métodos *Generalized Equations Estimating* (GEE) (Liang e Zeger, 1986) podem ser considerados uma extensão de Modelos Lineares Generalizados (McCullagh e Nelder, 1989) que diretamente incorporam a correlação esperada entre as medidas realizadas na mesma unidade amostral.

Para verificar o efeito de cada componente do modelo (grupo, sessão e interação) foi utilizada a Análise de Desvio sobre a distribuição Qui-Quadrado, sendo que de acordo com os seus resultados, foram realizadas as comparações múltiplas entre os grupos, sessões, ou ainda, para interação sessão e grupos utilizando os Modelos Marginais Log-Lineares com as correções de Holm-Bonferroni (Holm, 1979).

Para verificar se houve diferença significativa dos deltas da latência e distância entre os grupos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (Hollander e Wolfe, 1999), sendo que para as comparações múltiplas, pós Kruskal-Wallis, foi utilizado o teste de Nemenyi (Zar, 1998).

Para verificar se a idade influenciou o índice de extinção, e a preferência pelo quadrante-alvo (PQA) no primeiro e no segundo minutos do teste de memória, assim como para verificar se o fator idade exerceu influência sobre os parâmetros neuroquímicos (5-HT liberada e a concentração de 5-HIAA, ambos no extrato do meio extra-celular do hipocampo dos animais, e a taxa de renovação da 5-HT hipocampal calculada a partir destes dados; concentração tecidual, ou seja, o conteúdo total de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo, e a taxa de renovação da 5-HT calculada a partir destes dados) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Nemenyi para as comparações múltiplas. Já para comparar se houve influência da idade sobre a diferença entre a PQA no segundo minuto e a PQA no primeiro minuto do teste de memória foi utilizado o teste de Wilcoxon (Hollander e Wolfe, 1999).

Para verificar se os parâmetros neuroquímicos exerciam alguma influência sobre os parâmetros comportamentais foram ajustadas Regressões Marginais Log-Lineares Univariadas para cada um dos parâmetros comportamentais a partir dos parâmetros neuroquímicos. As Regressões Marginais por sua facilidade na interpretação e ausência de suposições distribucionais têm sido preferidas como extensão dos Modelos Lineares Generalizados para dados dependentes (Fitzmaurice

et al., 2011). De forma simplificada a correlação entre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos foi medida pela correlação de Spearman (Hollander e Wolfe, 1999).

Foi utilizado o nível de 5% de significância.

Para a representação gráfica de alguns dos dados, expressos como “medianas”, foram calculados os intervalos de confiança por meio do método *bootstrap*. Este é um método de reamostragem a partir da amostra original (Efron & Tibshirani, 1993).

Os dados referentes aos deltas da latência e da distância percorrida (item 4.3.1.2.) foram ajustados pela *função modular*, um tratamento matemático que ajusta os valores considerando um número real sempre positivo ou nulo.

O *software* utilizado na análise foi o R versão 3.0.1., que pode ser conhecido em: www.R-project.org.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros comportamentais

5.1.1. Treino – introdução

Ao fim do treino, 21.8% dos ratos idosos não encontraram a caixa-escape, contra 8.5% dos ratos adultos e 11% dos jovens (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Dados do desempenho dos animais durante as sessões do “Treino” no labirinto de Barnes (LB): número de tentativas sem sucesso, por sessão e grupo

Grupos	Sessão 1	Sessão 2	Sessão 3	Sessão 4	Total (n ^o tentativas sem sucesso)
Idoso	29	11	6	2	48 (21.8%)
Adulto	16	1	0	0	17 (8.5%)
Jovem	18	2	0	2	22 (11%)

A fase de treino no LB consistiu de uma sessão por dia, por 4 dias consecutivos. Cada sessão foi constituída de 5 tentativas consecutivas para cada rato. Cada tentativa tinha o tempo máximo de 3 minutos. O término de uma tentativa com sucesso (localizar a caixa-escape – CE – e nela entrar antes dos 3 minutos) foi considerado o momento em que o rato entrava com as quatro patas na CE. Ao longo do treino: Idosos (n=11): 220 tentativas; Adultos (n=10) e Jovens (n=10): 200 tentativas

5.1.2. Treino – latência, distância percorrida e velocidade

A **Figura 10** mostra as curvas de aprendizado espacial dos animais dos grupos I, A e J, tendo como unidade de medida do desempenho as variáveis dependentes latência (s, painel A) e distância percorrida (cm, painel B). A Análise de Desvio dos dados por meio do Modelo Marginal Log-Linear mostra efeito significativo das sessões (latência - G.L.=3, $\chi^2 = 114.3$, $p < 0.001$; distância – G.L.=3,

$\chi^2=130.8$, $p<0.001$), dos grupos (latência - G.L.=2, $\chi^2=10.2$, $p < 0.006$; distância – G.L.=2, $\chi^2=6.9$, $p<0.032$) e interação significativa entre sessões e grupos (latência - G.L.=6, $\chi^2=32.2$, $p < 0.001$; dis -

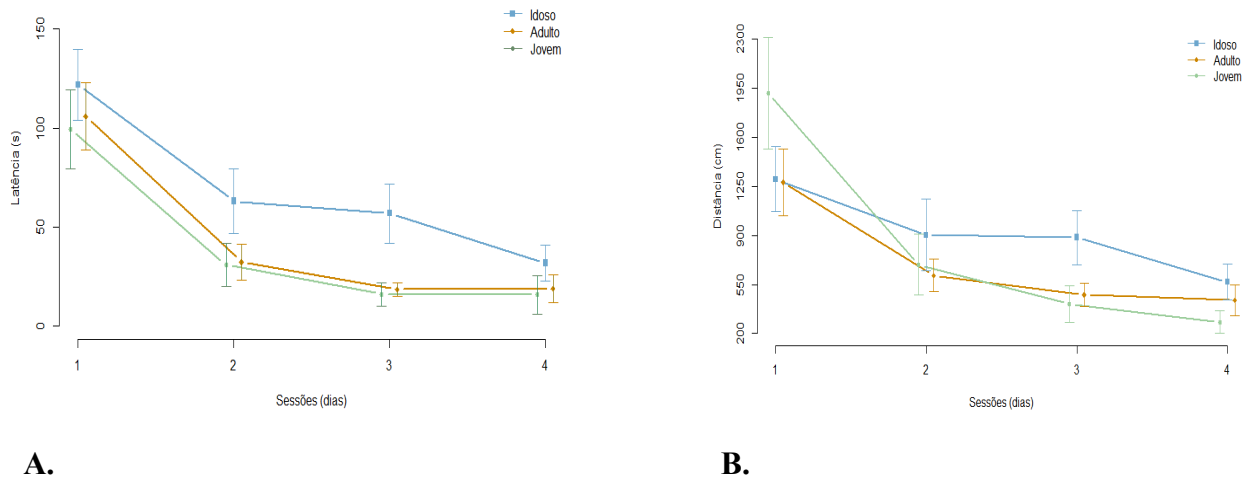


Figura 10. Curvas de aprendizado espacial dos ratos dos grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$). Desempenho expresso em latência (s, painel A) e distância percorrida (cm, painel B) para encontrar a caixa-escape. Eixo da abscissa: sessões (dias) de treino. Cada valor de latência e distância percorrida representa a média das medianas das 5 tentativas (T1, T2, T3, T4 e T5) de todos os ratos de um mesmo grupo em uma sessão (dia), com os respectivos intervalos de confiança. Análise dos dados por meio do método de Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear: houve efeito significativo das sessões de treino (latência - G.L.=3, $\chi^2=114.3$, $p < 0.001$; distância – G.L.=3, $\chi^2=130.8$, $p<0.001$), efeito dos grupos (idade) (latência - G.L.=2, $\chi^2=10.2$, $p < 0.006$; distância – G.L.=2, $\chi^2=6.9$, $p<0.032$) e interação entre sessões e grupos (latência - G.L.=6; $\chi^2=32.2$; $p < 0.001$; distância - G.L.=6; $\chi^2=34.2$; $p < 0.001$).

tância – G.L.=6, $\chi^2=34.2$, $p<0.001$). A análise da distância percorrida (DPer) e da latência (Lat) por meio das comparações múltiplas entre as sessões, por grupos, mostra efeito do tempo dentro de um mesmo grupo, com significativa redução das duas variáveis ao longo das sessões (vide nas **Tabelas 3 e 4** os valores “p” referentes às comparações múltiplas para DPer e Lat, respectivamente). Esses resultados indicam um efeito significativo da idade sobre o aprendizado, e também mostram que os animais dos três grupos aprenderam a tarefa.

Tabela 3 – Efeito do tempo (sessões) sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA (DPer, em cm): dados da análise estatística das médias da DPer por meio das Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre as sessões, por grupos

Grupos	Comparações Múltiplas	Valor-P*	exp(β)	I.C. - 95%*
Idosos	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,109	0,694	[0,46 ; 1,05]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,086	0,681	[0,45 ; 1,03]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,436	[0,34 ; 0,57]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,935	0,981	[0,62 ; 1,55]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,043	0,629	[0,40 ; 0,99]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,010	0,641	[0,44 ; 0,94]
Adulto	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,000	0,481	[0,33 ; 0,70]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,373	[0,24 ; 0,57]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,341	[0,22 ; 0,52]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,091	0,775	[0,58 ; 1,03]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,119	0,710	[0,48 ; 1,05]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,935	0,916	[0,70 ; 1,20]
Jovem	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,000	0,361	[0,20 ; 0,64]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,215	[0,11 ; 0,43]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,147	[0,08 ; 0,27]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,082	0,596	[0,34 ; 1,04]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,000	0,409	[0,27 ; 0,62]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,007	0,685	[0,50 ; 0,94]

* Com correção de Holm Bonferroni

Tabela 4 - Efeito do tempo (sessões) sobre o desempenho no treino, expresso em LATÊNCIA (Lat, em s.): dados da análise estatística das médias da Lat por meio das Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre as sessões, por grupos

Grupos	Comparações Múltiplas	Valor-P*	exp(β)	I.C. - 95%*
Idosos	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,002	0,518	[0,31 ; 0,85]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,467	[0,31 ; 0,71]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,262	[0,16 ; 0,42]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	1,000	0,902	[0,65 ; 1,26]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,007	0,506	[0,29 ; 0,88]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,009	0,561	[0,35 ; 0,91]
Adulto	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,000	0,306	[0,22 ; 0,42]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,176	[0,11 ; 0,27]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,179	[0,09 ; 0,36]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,032	0,574	[0,34 ; 0,97]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,258	0,585	[0,28 ; 1,21]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	1,000	1,019	[0,74 ; 1,40]
Jovem	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,000	0,313	[0,15 ; 0,64]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,163	[0,06 ; 0,44]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,002	0,160	[0,04 ; 0,65]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,003	0,519	[0,31 ; 0,87]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,171	0,512	[0,23 ; 1,16]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,942	0,985	[0,66 ; 1,48]

* Com correção de Holm-Bonferroni

Para entender o efeito da idade sobre o aprendizado, realizamos comparações múltiplas (com correção de Holm-Bonferroni) para os grupos por sessão, tanto para os dados expressos em Lat quanto em DPer (**Tabelas 5 e 6**, respectivamente) e observamos que o aumento da idade se associa a uma piora neste desempenho durante a fase de treino:

- (i) a latência no grupo dos idosos foi significativamente maior que nos grupos jovem (sessão 3: $p=0.006$, $\exp(\beta)=0.284$, IC-95% = [0.10 ; 0.80]) e adulto (sessão 2: $p=0.037$, $\exp(\beta)=0.513$, IC-95% = [0.27 ; 0.98]; sessão 3: $p<0.001$, $\exp(\beta)=0.327$, IC-95% = [0.16 ; 0.65])
- (ii) a distância percorrida no grupo dos idosos foi significativamente maior que nos grupos jovem (sessão 3: $p=0.009$, $\exp(\beta)=0.465$, IC-95% = [0.24 ; 0.89]; sessão 4: $p=0.001$, $\exp(\beta)=0.498$, IC-95% = [0.30 ; 0.83]) e adulto (sessão 3: $p=0.001$, $\exp(\beta)=0.538$, IC-95% = [0.34 ; 0.85]).

Tabela 5 – Efeito da idade sobre o desempenho no treino, expresso em LATÊNCIA (Lat):
dados da análise estatística das médias da Lat por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos, por sessão

Sessões	Comparações Múltiplas	Valor-P*	$\exp(\beta)$	I.C. - 95%*
1	Adulto (Referência = Idoso)	1.000	0.868	[0.57 ; 1.33]
	Jovem (Referência = Idoso)	1.000	0.814	[0.52 ; 1.28]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	1.066	[0.72 ; 1.57]
2	Adulto (Referência = Idoso)	0.037	0.513	[0.27 ; 0.98]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.132	0.492	[0.22 ; 1.10]
	Adulto (Referência = Jovem)	0.866	1.043	[0.64 ; 1.71]
3	Adulto (Referência = Idoso)	0.000	0.327	[0.16 ; 0.65]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.006	0.284	[0.10 ; 0.80]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	1.152	[0.50 ; 2.65]
4	Adulto (Referência = Idoso)	0.639	0.594	[0.26 ; 1.34]
	Jovem (Referência = Idoso)	1.000	0.498	[0.14 ; 1.83]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	1.192	[0.37 ; 3.87]

* Com correção de Holm-Bonferroni

Tabela 6 – Efeito da idade sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA (DPer): dados da análise estatística das médias da DPer por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos, por sessão

Sessões	Comparações Múltiplas	Valor-P*	exp(β)	I.C. - 95%*
1	Adulto (Referência = Idoso)	0.911	0.983	[0.72 ; 1.34]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.085	1.473	[0.97 ; 2.23]
	Adulto (Referência = Jovem)	0.006	0.667	[0.48 ; 0.93]
2	Adulto (Referência = Idoso)	0.319	0.681	[0.40 ; 1.15]
	Jovem (Referência = Idoso)	1.000	0.766	[0.42 ; 1.41]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	0.889	[0.58 ; 1.37]
3	Adulto (Referência = Idoso)	0.001	0.538	[0.34 ; 0.85]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.009	0.465	[0.24 ; 0.89]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	1.156	[0.70 ; 1.91]
4	Adulto (Referência = Idoso)	0.556	0.769	[0.50 ; 1.18]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.001	0.498	[0.30 ; 0.83]
	Adulto (Referência = Jovem)	0.294	1.545	[0.87 ; 2.75]

* Com correção de Holm-Bonferroni

A **Figura 11** mostra as curvas de velocidade de deslocamento, sobre a plataforma durante o treino, dos animais dos grupos I, A e J. A Análise dos dados usando o método de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear revela efeitos significativos das sessões (G.L.=3, $\chi^2 = 58.4$, $p < 0.001$) e dos grupos (G.L.=2, $\chi^2 = 6.2$, $p < 0.031$). Esses resultados indicam que os animais dos três grupos apresentaram elevação significativa da velocidade durante o treino, e também sugerem um efeito significativo da idade sobre a velocidade de exploração do LB. Não houve interação entre sessões e grupos (G.L.=6, $\chi^2 = 6.8$, $p=0.384$), o que significa que as diferenças médias da velocidade entre os grupos se mantêm estatisticamente as mesmas no decorrer das sessões.

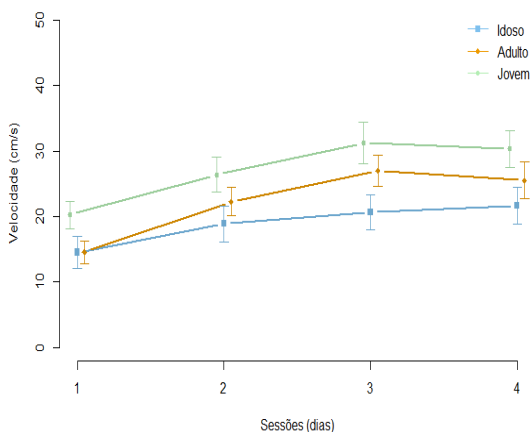


Figura 11. Curvas de velocidade de deslocamento dos animais (cm/s) sobre a plataforma=LB. Grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$). Eixo das abscissas: sessões (dias) de treino. Cada ponto representa as velocidades médias de todos os ratos de um mesmo grupo, em uma sessão, com os respectivos intervalos de confiança. Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear: foram significativos os efeitos das sessões de treino (G.L.=3, $\chi^2 = 58.4$, $p < 0.001$) e dos grupos (idade) (G.L.=2, $\chi^2 = 6.9$, $p=0.031$). Não houve interação entre sessões e grupos (G.L.=6; $\chi^2 = 6.8$; $p=0.384$).

Ao realizarmos comparações múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear (com correção de Holm-Bonferroni) para os grupos (**Tabela 7**) observamos que o efeito da idade sobre a velocidade ocorre de maneira significativa entre os grupos jovem e idoso: (i) a velocidade no grupo dos jovens foi significativamente maior que no grupo idoso ($p=0.044$, $\exp(\beta)=1.431$, $IC=[1,01 : 2.03]$): o grupo dos jovens apresentou valor médio de velocidade 43.1% ($IC-95\% = [1\% ; 103\%]$) acima da velocidade do grupo dos idosos.

Tabela 7 – Dados da análise do desempenho motor (VELOCIDADE de deslocamento dos animais sobre a plataforma=LB): parâmetros estatísticos obtidos por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos

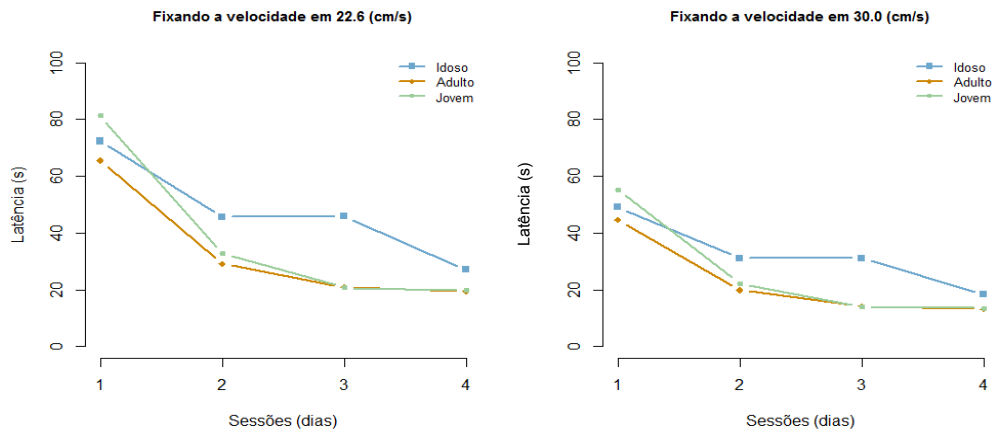
Comparações Múltiplas	Valor-P*	exp(β)	I.C. - 95%*
Adulto (Referência = Idoso)	0.269	1.181	[0.88 ; 1.59]
Jovem (Referência = Idoso)	0.044	1.431	[1.01 ; 2.03]
Adulto (Referência = Jovem)	0.160	0.826	[0.65 ; 1.06]

* Com correção de Holm-Bonferroni

5.1.3. Treino – latência e distância percorrida, valores ajustados pelo fator velocidade

Como a idade afetou de maneira significativa a velocidade de deslocamento dos ratos no LB, esse parâmetro (velocidade) foi inserido no modelo estatístico utilizado (Modelos Marginais Log-Lineares) para avaliar o desempenho cognitivo dos animais, considerando essa variável. Assim, obtivemos os dados expressos em latência e distância percorrida ajustados pelo fator velocidade, a fim de avaliar a presença de possíveis interferências da velocidade no desempenho dos animais na execução da tarefa. A **Figura 12** é análoga à Figura 10, porém mostra as curvas do aprendizado espacial considerando os ajustes da latência (s, Painel A) e da distância percorrida (cm, painel B) pelo fator velocidade.

A.



B.

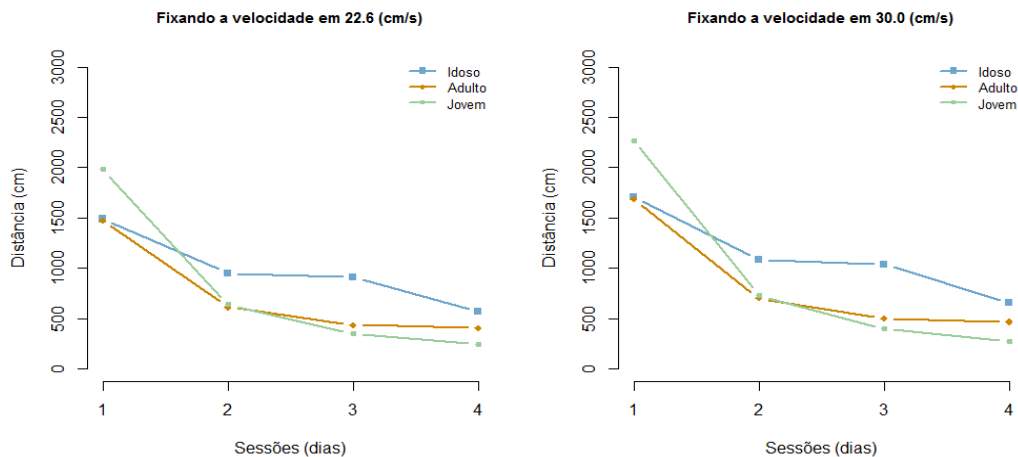


Figura 12. *Curvas de aprendizado espacial, considerado o fator velocidade, dos ratos dos grupos idoso (n=11), adulto (n=10) e jovem (n=10) Desempenho expresso em latência (s, painel A,) e distância percorrida (cm, painel B), considerando o fator velocidade, para encontrar a caixa-escape. Eixo das abscissas: sessões (dias) de treino. Cada valor de latência (Lat) e distância percorrida (DPer) representa a média das medianas das 5 tentativas (T1, T2, T3, T4 e T5) de todos os ratos de um mesmo grupo em uma sessão (dia), com os respectivos intervalos de confiança. A inserção da velocidade na matriz do Modelo Marginal Log-Linear permite o cálculo da Lat e da DPer correspondentes, assim como a construção das curvas, a partir de um valor de velocidade escolhido aleatoriamente para servir como ajuste da variável no cálculo das demais (para a construção das curvas acima os valores de velocidade aleatoriamente escolhidos foram: 22.6 e 30cm/s).*

A Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear para a variável distância percorrida ajustada pelo fator velocidade ($DPer_{vel}$) mostra que o efeito da velocidade sobre esta variável não foi significativo (G.L.=1, $\chi^2 = 2.9$, $p = 0.089$), e que ocorreu efeito significativo das sessões (G.L.=3, $\chi^2 = 111.7$, $p < 0.001$) e dos grupos (G.L.=2, $\chi^2 = 6.7$, $p < 0.035$), sendo que a interação entre sessões e grupos também apresentou significância estatística (G.L.=6, $\chi^2 = 30$, $p < 0.001$). A análise da $DPer_{vel}$

por meio das comparações múltiplas entre as sessões, por grupos, mostra efeito do tempo (sessões) dentro de um mesmo grupo, com significativa redução da variável ao longo das sessões (vide na **Tabela 8** os valores “p” referentes às comparações múltiplas). Os dados referentes à $DPer_{Vel}$ indicam que:

- (i) a $DPer_{Vel}$ constitui uma unidade de medida do desempenho cognitivo dos animais na tarefa espacial, visto que o efeito do fator velocidade sobre esta variável não foi significativo;
- (ii) os animais dos três grupos aprenderam a tarefa.

Tabela 8 – Efeito do tempo (sessões) sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA ($DPer_{Vel}$, em cm), ajustada considerando o fator velocidade: dados da análise estatística das médias da $DPer_{Vel}$ da por meio das Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre as sessões, por grupos, calculadas considerando o fator velocidade.

Grupos	Comparações Múltiplas	Valor-P*	exp(β)	I.C. - 95%*
Idosos	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,023	0,641	[0,43 ; 0,96]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,020	0,612	[0,39 ; 0,96]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,387	[0,29 ; 0,52]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,842	0,956	[0,61 ; 1,49]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,019	0,604	[0,38 ; 0,95]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,007	0,632	[0,43 ; 0,92]
Adulto	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,000	0,404	[0,26 ; 0,62]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,282	[0,16 ; 0,51]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,265	[0,14 ; 0,52]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,072	0,698	[0,48 ; 1,02]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,089	0,655	[0,41 ; 1,04]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	1,000	0,938	[0,72 ; 1,22]
Jovem	Sessão = 2 (Referência = 1)	0,000	0,327	[0,17 ; 0,64]
	Sessão = 3 (Referência = 1)	0,000	0,180	[0,08 ; 0,43]
	Sessão = 4 (Referência = 1)	0,000	0,125	[0,06 ; 0,28]
	Sessão = 3 (Referência = 2)	0,025	0,550	[0,32 ; 0,95]
	Sessão = 4 (Referência = 2)	0,000	0,383	[0,24 ; 0,60]
	Sessão = 4 (Referência = 3)	0,020	0,696	[0,50 ; 0,97]

* Com correção de Holm-Bonferroni

Para melhor entendimento do efeito da idade sobre o aprendizado espacial, considerando a $DPer_{Vel}$ como a medida do desempenho cognitivo dos animais, realizamos comparações múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear (com correção de Holm-Bonferroni) para os grupos, por sessão (**Tabela 9**) e observamos que o aumento da idade se associa a uma piora no desempenho durante a fase de treino:

(i) a $DPer_{Vel}$ no grupo dos idosos foi significativamente maior que nos grupos jovem (sessão 3: $p=0.007$, $\exp(\beta)=0.439$, IC-95% = [0.22 ; 0.87]; sessão 4: $p=0.008$, $\exp(\beta)=0.463$, IC-95% = [0.24 ; 0.88]) e de adultos (sessão 3: $p=0.002$, $\exp(\beta)=0.520$, IC-95% = [0.32 ; 0.85]). Estes resultados são semelhantes aos obtidos da análise da distância percorrida calculada *sem* o ajuste do fator velocidade.

Tabela 9 – Efeito da idade sobre o desempenho dos animais, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA, AJUSTADA PELO FATOR VELOCIDADE ($DPer_{Vel}$, em cm): dados da análise estatística das médias da $DPer_{Vel}$ por meio do método de Comparações Múltiplas estimadas pelo Modelo Marginal Log-Linear entre os grupos, por sessão

Sessões	Comparações Múltiplas	Valor-P*	$\exp(\beta)$	I.C. - 95%*
1	Adulto (Referência = Idoso)	0.959	0.992	[0.74 ; 1.33]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.446	1.312	[0.88 ; 1.96]
	Adulto (Referência = Jovem)	0.169	0.756	[0.54 ; 1.05]
2	Adulto (Referência = Idoso)	0.217	0.639	[0.37 ; 1.11]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.616	0.655	[0.31 ; 1.37]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	0.975	[0.60 ; 1.58]
3	Adulto (Referência = Idoso)	0.002	0.520	[0.32 ; 0.85]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.007	0.439	[0.22 ; 0.87]
	Adulto (Referência = Jovem)	1.000	1.183	[0.69 ; 2.03]
4	Adulto (Referência = Idoso)	0.563	0.745	[0.46 ; 1.20]
	Jovem (Referência = Idoso)	0.008	0.463	[0.24 ; 0.88]
	Adulto (Referência = Jovem)	0.224	1.610	[0.89 ; 2.93]

* Com correção de Holm-Bonferroni

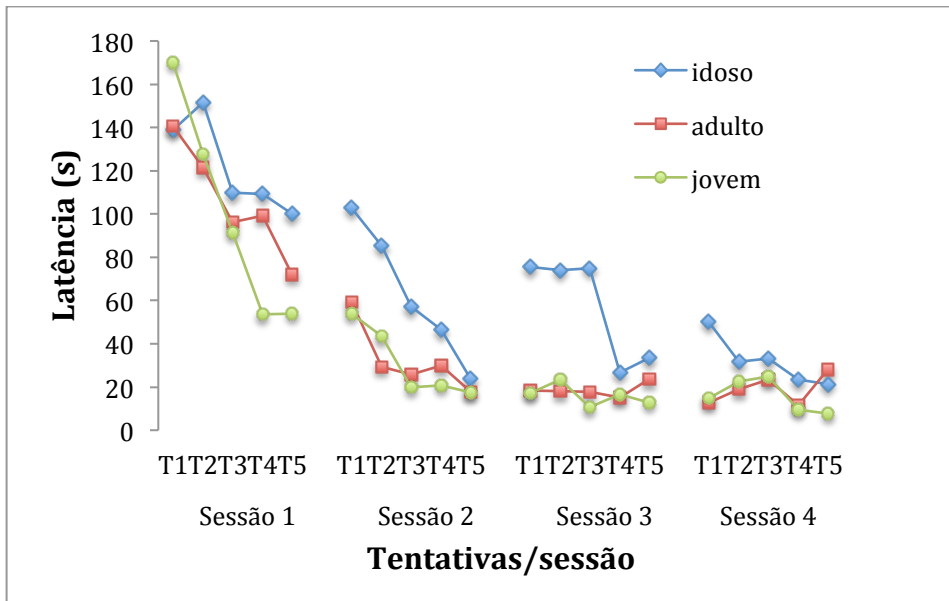
Para o desempenho expresso através da variável “latência” ajustada considerando-se o fator velocidade (Lat_{Vel}), foi aplicado o mesmo processo de análise estatística descrito acima para os dados expressos em $DPer_{Vel}$: a Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear para a variável Lat_{Vel} , mostra que houve efeito significativo da velocidade (G.L.=1, $\chi^2=136.6$ $p<0.001$), das sessões (G.L.=3, $\chi^2=76.2$, $p<0.001$) e da interação grupos \times sessões (G.L.=6, $\chi^2=28.9$, $p<0.001$). Não houve efeito significativo dos grupos (G.L.=2, $\chi^2=5.8$, $p=0.065$). Estes resultados indicam que: (i) o fator velocidade tem impacto sobre a latência, ou seja, a variável “latência” não é um parâmetro adequado para expressar o desempenho dos animais; (ii) que a Lat_{Vel} varia de maneira significativa com o decorrer das sessões; (iii) e que sem considerar a interação sessão \times grupo não há efeito significativo dos grupos (idade), pois, $p=0.065$ (diferentemente do observado na análise da latência *sem* a correção pelo fator velocidade, onde houve efeito dos grupos).

Assim, o efeito que a velocidade de exploração do LB pelos animais tem sobre a latência confirma que esta última, devido ao fato da velocidade de deslocamento dos animais ter sofrido efeito dos grupos, não é uma forma adequada para expressar o desempenho. De forma contrária do que se observa quando o desempenho é expresso em distância percorrida. Portanto, a distância percorrida, e não a latência, é a melhor unidade de medida do desempenho cognitivo dos animais nesta tarefa espacial.

5.1.4. Treino - análise do aprendizado e da memória ao longo das sessões, com foco no intervalo entre as últimas e as primeiras tentativas de sessões consecutivas

A **Figura 13** mostra a mesma curva de aprendizado espacial da Figura 10, porém de forma mais detalhada, onde cada ponto representa a média do desempenho, em cada uma das tentativas (T_n , $n=1, 2, 3, 4$, ou 5), de todos os ratos de um mesmo grupo em uma sessão (p ex, média de T_1 de todos os ratos idosos da sessão 1). Através das figuras se pode observar que o intervalo entre a primeira tentativa de uma sessão ($T_{1_{sess\tilde{a}o\ n}}$) e a última tentativa da sessão anterior ($T_{5_{sess\tilde{a}o\ n-1}}$) pode conter informações a respeito do processo de aprendizagem e memória ao longo do treino. Em busca destas informações, foram obtidos dados através da diferença (*delta* = D) e da *razão* (R) entre $T_{1_{sess\tilde{a}o\ n}}$ e $T_{5_{sess\tilde{a}o\ n-1}}$ de cada animal, considerando a variável distância percorrida (a latência não foi considerada, por sofrer efeito significativo da velocidade): $\text{delta } 1 (D_1) = T_{1_{sess\tilde{a}o\ 2}} - T_{5_{sess\tilde{a}o\ 1}}$, $\text{delta } 2 (D_2) = T_{1_{sess\tilde{a}o\ 3}} - T_{5_{sess\tilde{a}o\ 2}}$, $\text{delta } 3 (D_3) = T_{1_{sess\tilde{a}o\ 4}} - T_{5_{sess\tilde{a}o\ 3}}$; $\text{raz\~{a}o } 1 (R_1) = T_{1_{sess\tilde{a}o\ 2}} / T_{5_{sess\tilde{a}o\ 1}}$, $\text{raz\~{a}o } 2 (R_2) = T_{1_{sess\tilde{a}o\ 3}} / T_{5_{sess\tilde{a}o\ 2}}$, $\text{raz\~{a}o } 3 (R_3) = T_{1_{sess\tilde{a}o\ 4}} / T_{5_{sess\tilde{a}o\ 3}}$. Desta forma, quanto maior o valor do delta (D) ou da Razão (R), pior o desempenho do animal em termos de memória (consolidação e/ou recuperação da informação 24 horas depois, ao longo dos 4 dias do processo de aquisição).

A.



B.

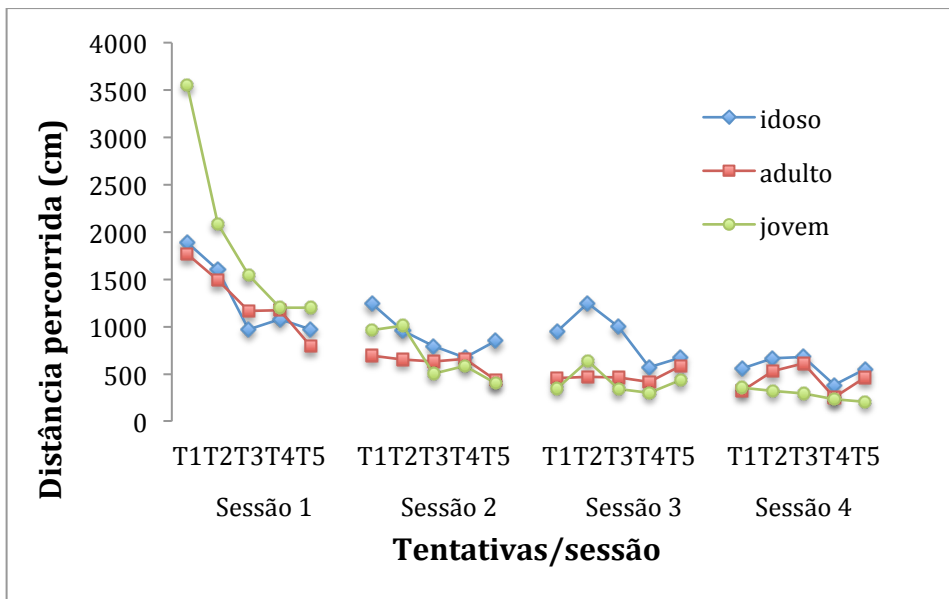


Figura 13. *Curvas de aprendizado espacial dos ratos dos grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$). Desempenho expresso em latência (s, painel A) e distância percorrida (cm, painel B) para encontrar a caixa-escape. Eixo da abscissa: tentativas (T1 a T5) por sessões (dias) de treino. Cada valor de latência e distância percorrida representa a média das tentativas T_n ($n=1, 2, 3, 4$, ou 5) de todos os ratos de um mesmo grupo em uma sessão (p ex, média de T1 de todos os ratos idosos da sessão 1).*

Ao analisar D_1 , D_2 , D_3 , R_1 , R_2 , e R_3 (obtidos com as medidas expressas em DPer) separadamente têm-se dados independentes não normalmente distribuídos com a presença de alguns *outliers*, sendo aplicável nessa situação o teste de Kruskal-Wallis para analisar se existem

diferenças significativas entre os grupos. A **Tabela 10** expõe os deltas (D_1 , D_2 , D_3) obtidos com os dados da distância percorrida, considerando ou não a função modular* em seu cálculo. Não houve diferença significativa entre os grupos. (veja os valores “p” na Tabela 10).

Tabela 10 - Medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para os deltas D_1 , D_2 , e D_3 obtidos com as medidas da DISTÂNCIA PERCORRIDA pelos animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem), durante o treino, com e sem ajuste usando função modular*.

Fonte		N	Média	E.P.	1ªQ	2ªQ	3ªQ	Valor-P	
D_1	Sem f. modular	Idoso	11	271.1	373.5	-476.4	198.5	659.5	0.711
		Adulto	10	-102.5	337.8	-779.5	26.3	218.8	
		Jovem	10	-230.9	533.3	-1121.5	-102.7	495.9	
	Com f. modular	Idoso	11	920.6	249.3	304.3	751.6	1309.5	0.819
		Adulto	10	742.9	232.2	164.9	540.4	1190.6	
		Jovem	10	1105.8	393.1	126.8	808.7	1148.8	
D_2	Sem f. modular	Idoso	11	96.2	612.8	-171.3	131.2	1312.2	0.556
		Adulto	10	18.3	107.3	-262.4	10.1	170.1	
		Jovem	10	-53.8	122.8	-209.3	-28.0	298.2	
	Com f. modular	Idoso	11	1246.4	470.3	171.3	661.7	1475	0.114
		Adulto	10	251.3	67.4	81.9	216.2	329.3	
		Jovem	10	305.2	71	179.9	253.8	425.5	
D_3	Sem f. modular	Idoso	11	-113.6	152.6	-388.3	26.3	307.4	0.546
		Adulto	10	-258.3	143.6	-440.1	-175.6	57.7	
		Jovem	10	-78.7	129.1	-105.9	-18.4	158.9	
	Com f. modular	Idoso	11	393.1	95.4	175.8	344.9	473.7	0.264
		Adulto	10	375.5	111.2	71.3	309.5	440.1	
		Jovem	10	243.1	103.9	74.9	150.5	228.1	

*

Tratamento matemático com função modular, que ajusta os valores de tal forma a se obter um número real sempre positivo ou nulo.

Em destaque (amarelo) as médias do D_2 , com função modular, dos três grupos, discutidas no item 6 (“Discussão”).

$$D_1 = TI_{sess\tilde{a}o2} - T5_{sess\tilde{a}o1}$$

$$D_2 = TI_{sess\tilde{a}o3} - T5_{sess\tilde{a}o2}$$

$$D_3 = TI_{sess\tilde{a}o4} - T5_{sess\tilde{a}o3}$$

** Tratamento matemático com função modular, que ajusta os valores considerando um número real sempre positivo ou nulo.*

Na **Figura 14** visualizamos a representação gráfica das medianas para D_1 , D_2 , e D_3 , utilizando valores expressos em distância percorrida e em latência para os três grupos, com e sem função

modular, e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%. Cabe destacar que para o cálculo desses intervalos foi utilizado o método *bootstrap***.

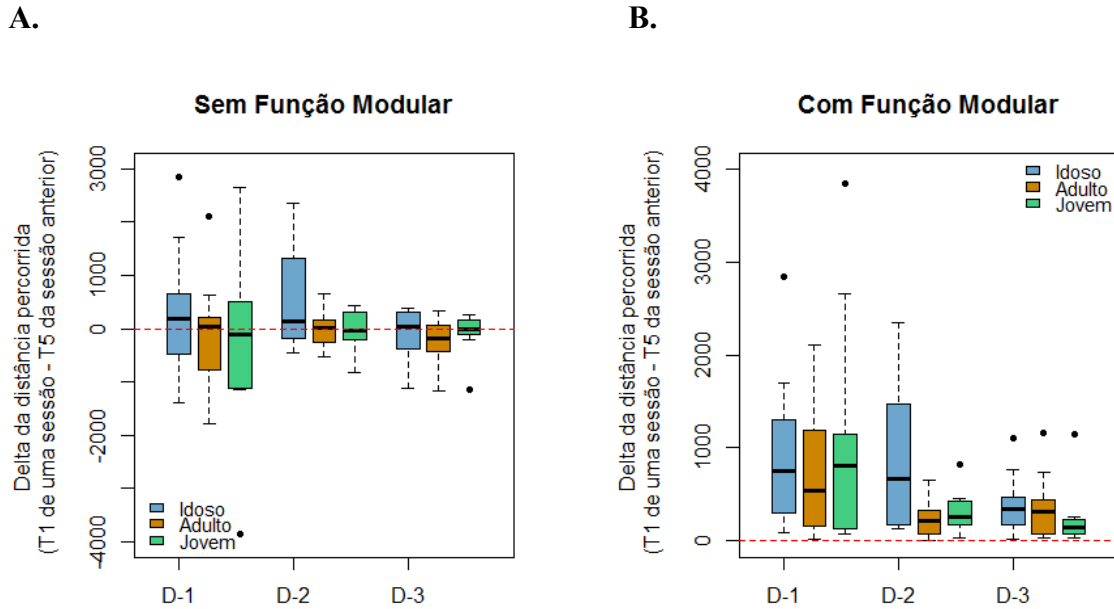


Figura 14. Medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos *bootstrap*** de 95%) dos deltas D_1 , D_2 , e D_3 obtidos das medidas expressas em DISTÂNCIA PERCORRIDA (painéis A e B) dos grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$), sem e com função modular**. $\Delta_{n-1} = T1_n - T5_{n-1}$ (n =número da sessão, podendo ser igual a 2, 3 ou 4; T =tentativa). Os pontos (•) representam os dados outliers. Não houve diferença significativa entre os grupos.

$$D_1 = T1_{sess\tilde{a}o2} - T5_{sess\tilde{a}o1}$$

$$D_2 = T1_{sess\tilde{a}o3} - T5_{sess\tilde{a}o2}$$

$$D_3 = T1_{sess\tilde{a}o4} - T5_{sess\tilde{a}o3}$$

** Método *bootstrap*: método de reamostragem a partir da amostra original utilizado para cálculo do intervalo de confiança

A **Tabela 11** expõe as razões (R_1 , R_2 e R_3) obtidas com os dados da distância percorrida. Não houve diferença significativa entre os grupos (veja os valores “p” na tabela 10).

A **Figura 15** mostra a representação gráfica das medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%, calculados utilizando o método *bootstrap*) para R_1 , R_2 , e R_3 obtidos das medidas do desempenho expressas em distância percorrida.

Tabela 11 - Medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para as razões R_1 , R_2 e R_3 obtidas das medidas em DISTÂNCIA PERCORRIDA. Comparações entre os grupos.

Fonte		N	Média	E.P.	1°Q	2°Q	3°Q	Valor-P	
Distância percorrida	R_1	Idoso	11	2.303	0.660	0.550	1.446	3.590	0.755
		Adulto	10	2.100	0.892	0.270	1.062	1.730	
		Jovem	10	1.912	0.716	0.440	0.755	3.330	
	R_2	Idoso	11	3.420	1.392	0.501	1.507	4.330	0.522
		Adulto	10	1.605	0.450	0.650	1.025	2.060	
		Jovem	10	1.248	0.343	0.346	0.833	2.450	
	R_3	Idoso	11	0.978	0.222	0.295	1.040	1.340	0.479
		Adulto	10	0.870	0.264	0.354	0.650	1.300	
		Jovem	10	1.302	0.268	0.566	0.979	1.980	

$$R_1 = T1_{sess\tilde{a}o2} / T5_{sess\tilde{a}o1}; R_2 = T1_{sess\tilde{a}o3} / T5_{sess\tilde{a}o2}; R_3 = T1_{sess\tilde{a}o4} / T5_{sess\tilde{a}o3}$$

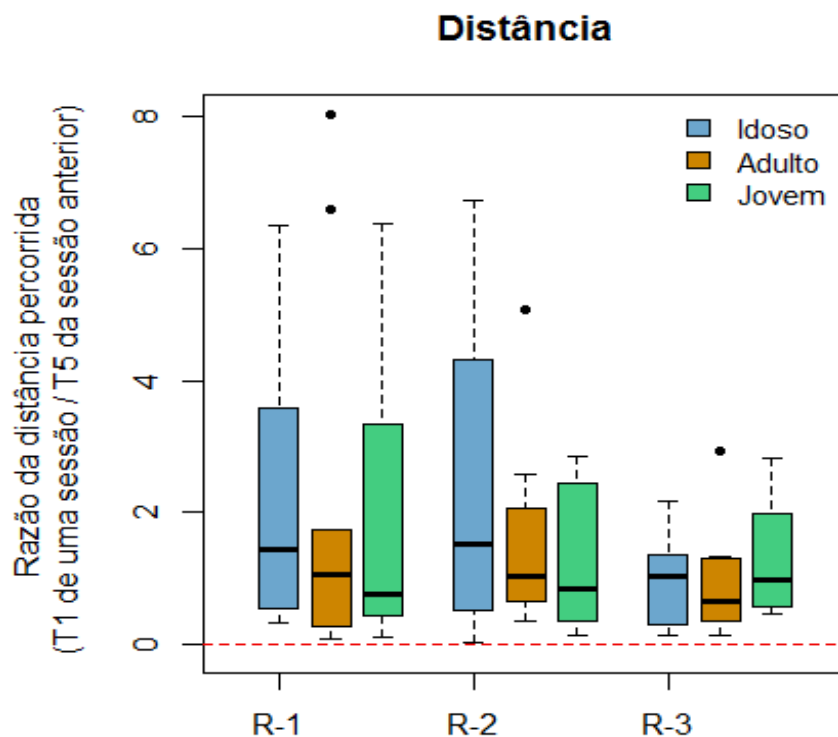


Figura 15. Medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) das razões R_1 , R_2 , e R_3 obtidas das medidas do desempenho dos ratos expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA dos grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$). Razão $_{n-1} = T1_n / T5_{n-1}$ (n =número da sessão, podendo ser igual a 2, 3 ou 4; T =tentativa). Os pontos (•) representam os dados *outliers*. Não houve diferença significativa entre os grupos.

5.1.5. Teste comprobatório - análise da memória e extinção do comportamento, após o treino

Na **Figura 16** observa-se a representação gráfica das medianas e seus respectivos intervalos percentílicos *bootstrap* dos índices de extinção dos animais dos três grupos (I, A e J). O teste de Kruskal-Wallis não indicou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0.367$). Índice de Extinção= $t1/t2$, sendo $t1$ o tempo de permanência do rato no quadrante alvo (QA), dentro do primeiro minuto do teste, e $t2$ o tempo de sua permanência no QA, dentro do segundo minuto do teste. Detalhes no item 4.3.1.3 de Materiais e Métodos.

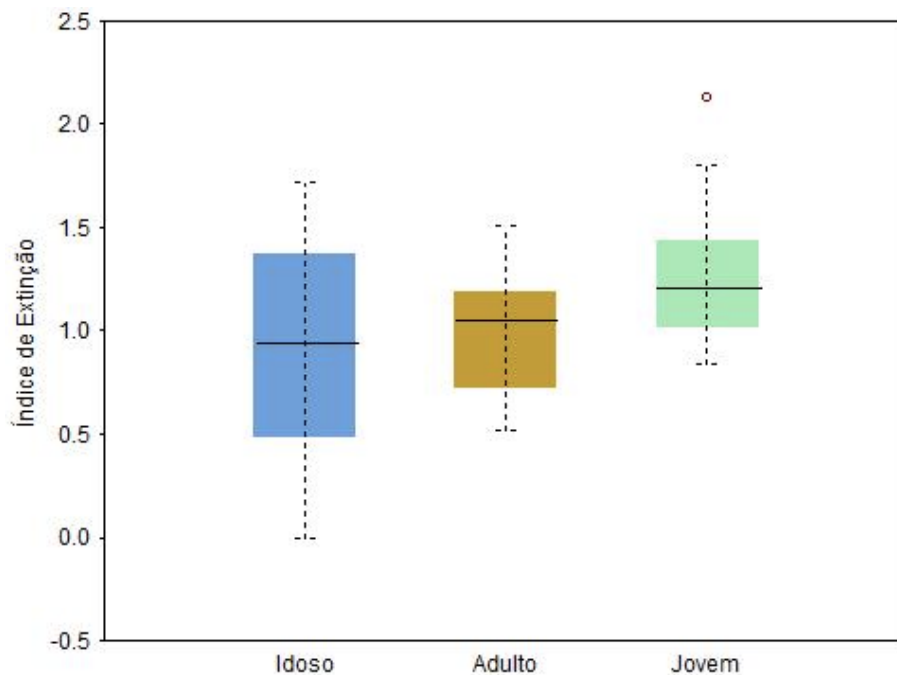


Figura 16. Desempenho dos animais no teste comprobatório: avaliação da flexibilidade comportamental, por meio das medianas do índice de extinção (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%). Grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$). Índice de Extinção (IE)= $t1/t2$, sendo $t1$ o tempo de permanência do rato no quadrante alvo (QA), durante o primeiro minuto do teste, e $t2$ o tempo de sua permanência no QA, durante o segundo minuto do teste. O teste de Kruskal-Wallis mostrou não haver diferença entre os grupos ($p=0.367$). O ponto acima da barra/grupo jovem representa um dado outlier.

Abaixo apresentamos, na **Figura 17** (Painéis A e B), o gráfico *boxplot* para os dados referentes ao parâmetro preferência pelo quadrante alvo (PQA), dos animais dos três grupos (I, A e

J) experimentais, representando as medianas, com seus intervalos percentílicos *bootstrap* de 95%. A mediana do grupo idoso permanece abaixo de 50% do tempo nos 1^o e 2^o minutos do teste, ao contrário da mediana dos grupos adulto e jovem (painéis A e B). O teste de Kruskal-Wallis indicou efeito dos grupos apenas no 2^o minuto do teste ($p=0.051$), sendo estatisticamente significativa a diferença entre os grupos idoso e adulto, conforme verificado por meio das Comparações Múltiplas de Nemenyi ($p=0.032$). Utilizando-se o teste de Wilcoxon, as comparações intragrupo do percentual de tempo no QA entre o primeiro e o segundo minuto do teste comprobatório mostram que houve diferença significativa apenas no grupo jovem ($p=0.025$).

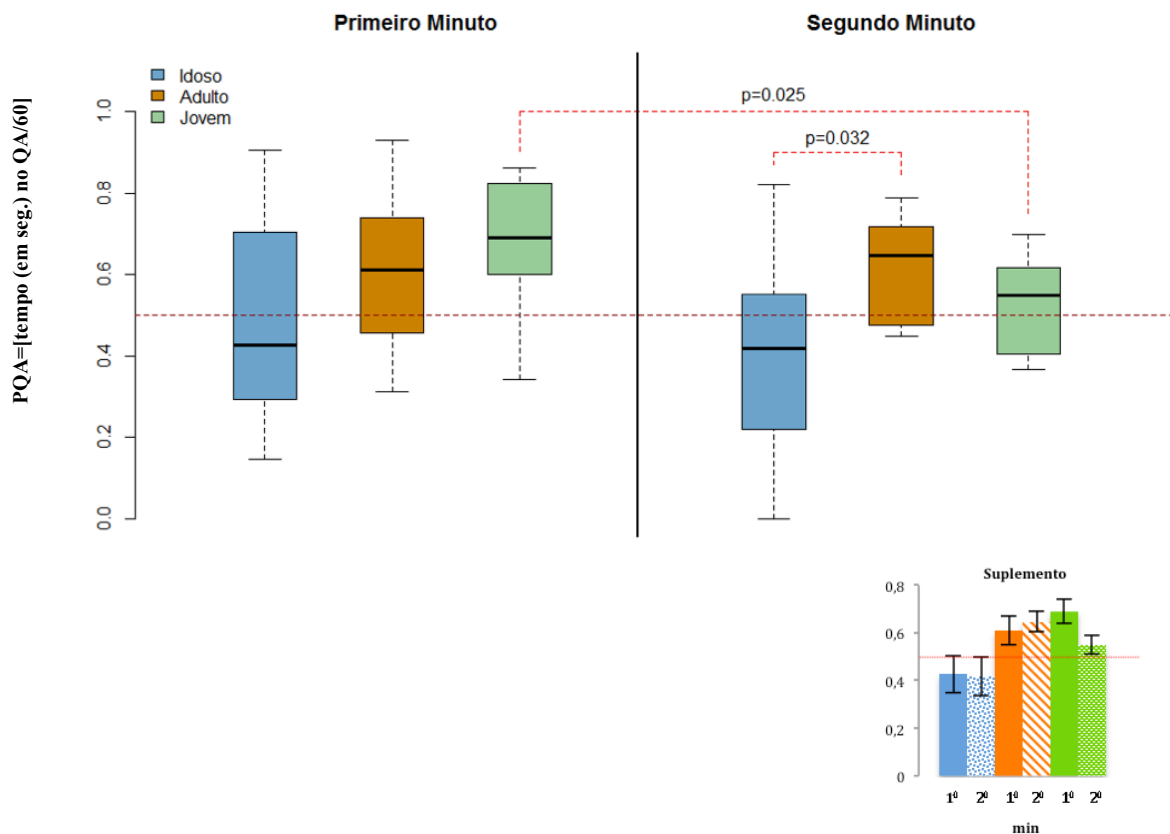


Figura 17. Desempenho dos animais no teste comprobatório: medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) da preferência pelo quadrante alvo (PQA, em % de tempo)* no primeiro e no segundo minuto do teste comprobatório. Grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=10$). Houve efeito dos grupos no 2^o min do teste (Kruskal-Wallis, $p<0.051$), sendo significativa a diferença entre os grupos idoso e adulto, verificada por meio das Comparações Múltiplas de Nemenyi ($p=0.032$). As comparações intra-grupo por meio do teste de Wilcoxon mostram diferença significativa no grupo jovem ($p=0.025$). * $PQA_{1o\ min\ do\ teste} = [tempo\ (em\ seg.)\ no\ QA\ durante\ o\ 1^o\ min\ do\ teste/60] \times 100$; $PQA_{2o\ min\ do\ teste} = [tempo\ (em\ seg.)\ no\ QA\ durante\ o\ 2^o\ min\ do\ teste/60]$. QA:quadrante-alvo

Suplemento (insert): Representação das medianas \pm erro padrão destacando as diferenças entre a PQA no 1^o e no 2^o min para cada um dos três grupos.

5.2. Parâmetros neuroquímicos

5.2.1. Dados da liberação de 5-HT e nível de 5-HIAA no meio extracelular

Devido a problemas técnicos na manipulação das amostras biológicas, os resultados referentes à quantidade de 5-HT liberada no meio de incubação (experimento de liberação de 5-HT) não estão sendo apresentados, já que não foi possível detectar os níveis de 5-HT em parte dessas amostras. A hipótese mais provável é a ocorrência de degradação da 5-HT nestas amostras, durante o período de 3 meses em que as mesmas permaneceram no *freezer* – 80^o C. Portanto, apenas os dados referentes ao 5-HIAA estão sendo apresentados. A **Tabela 12** mostra os dados referentes às concentrações de 5-HIAA no meio extracelular, obtidos dos hipocampus submetidos ao experimento de liberação de 5-HT, nas condições normais e despolarizante.

Tabela 12 – [5-HIAA] no meio extracelular dos hipocampus incubados em condições normal ou despolarizante: medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para comparações dos grupos.

Fonte	Grupos	N	Média	E.P.	1 ^a Q	2 ^a Q	3 ^a Q	Valor-P	
5HIAA	Meio Normal	Idoso	11	55,66	2,74	49,61	59,91	62,72	0,001
		Adulto	9	46,98	7,76	30,68	45,55	50,50	
		Jovem	9	30,16	2,38	24,24	29,75	32,60	
	Meio Despolarizante	Idoso	11	46,31	2,77	39,61	45,15	53,62	0,003
		Adulto	10	61,68	16,16	32,86	44,67	66,84	
		Jovem	9	28,34	1,71	25,81	27,19	30,30	

A **Figura 18** mostra a representação gráfica dos dados da tabela 12. Houve efeito da idade, de acordo com as comparações entre os grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis, tanto no meio normal (Tyrode com concentração fisiológica de KCl; p=0.001), quanto no meio despolarizante (Tyrode com alta concentração de KCl; p=0.003). Quando realizadas as comparações múltiplas de Nemenyi entre os grupos, observou-se: (i) o grupo idoso, comparado ao grupo jovem, apresentou maior concentração de 5-HIAA no meio extracelular proveniente dos hipocampus desses animais. Em condições estimuladas, ou seja, no caso do tecido ser desafiado com alta concentração de

potássio, o valor de “p” foi igual a 0.003 e em condições controles (normal) o valor de “p” foi igual a $p=0.0003$, e (ii) o grupo adulto apresentou maior [5-HIAA] no meio extracelular hipocampal que o grupo jovem, apenas em condição estimulada ($p=0.0147$).

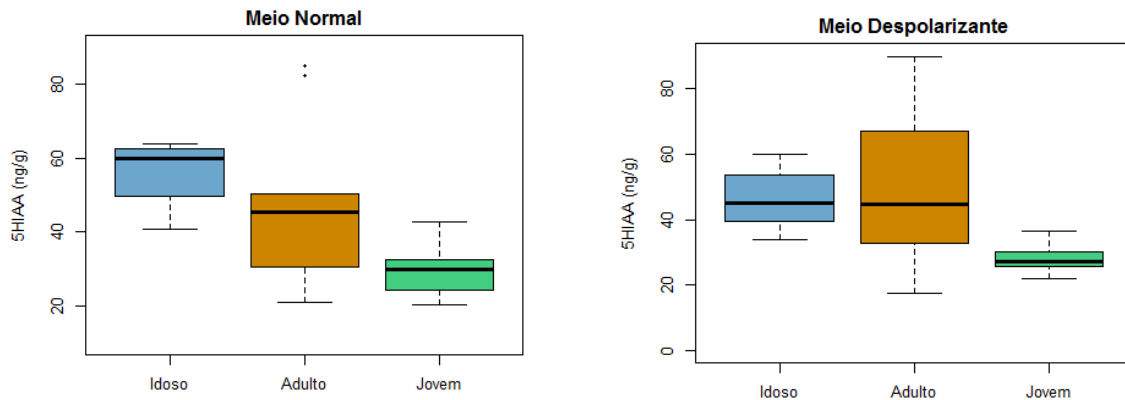


Figura 18. Medianas (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) da concentração de 5-HIAA no meio extracelular dos hipocampos (incubado em Tyrode normal ou despolarizante) de ratos dos três grupos experimentais, submetidos a tarefa espacial no Labirinto de Barnes. O teste de Kruskal-Wallis indicou que houve efeito dos grupos nas duas condições, Normal $[KCl]=2.5mM$ ($p=0.001$) ou estimulada com alta $[KCl]=30mM$ ($p=0.003$). As comparações múltiplas, entre os grupos pelo teste de Nemenyi, revelaram que o grupo idoso apresentou maior [5-HIAA] do que o grupo jovem ($p=0.003$ para meio despolarizante; $p=0.0003$ para o meio normal), e que o grupo adulto também apresentou [5-HIAA] maior que o grupo jovem ($p=0.0147$ para o meio despolarizante).

5.2.2. Determinações das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo

A Tabela 13 e a Figura 19 mostram as concentrações teciduais de 5-HT (Painel A) e 5-HIAA (Painel B) no hipocampo dos ratos dos grupos idoso, adulto e jovem. Através do teste de Kruskal-Wallis observou-se efeito significativo dos grupos (idade) na concentração de 5-HIAA ($p=0.047$). Nas comparações múltiplas via teste de Nemenyi, a diferença mais pronunciada foi entre os grupos jovem e idoso, porém sem significância estatística ($p=0.066$). Tomando este dado por uma tendência, torna-se relevante saber se houve efeito da idade sobre a taxa de renovação da 5-HT. A Tabela 13 mostra que não houve efeito dos grupos (=idade) sobre a taxa de renovação da 5-HT.

Tabela 13 - Medidas descritivas para a [5-HT] e para a [5-HIAA] teciduais (conteúdo total), e para a taxa de renovação [5-HIAA]/[5-HT] no hipocampo de ratos Wistar. Dados do teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos.

Fonte	Grupos	N	Média	E.P.	1ªQ	2ªQ	3ªQ	Valor-P
5-HT	Idoso	11	137.732	25.102	83.413	91.357	191.484	0.303
	Adulto	10	105.721	24.134	49.671	89.266	110.826	
	Jovem	9	85.777	20.333	51.141	62.165	112.767	
5-HIAA	Idoso	11	453.177	19.532	420.648	436.079	484.093	0.047
	Adulto	10	473.951	35.768	384.309	437.119	552.828	
	Jovem	9	367.49	24.223	315.611	364.545	421.872	
5-HIAA/5-HT	Idoso	11	4.614	0.814	2.269	4.373	6.114	0.645
	Adulto	10	6.945	1.486	3.583	5.497	11.946	
	Jovem	9	7.131	1.989	3.741	5.128	7.047	

Os valores encontrados para as [5-HT] e [5-HIAA] no hipocampo dos ratos idosos, adultos e jovens estão dentro da ordem de grandeza observada por outros autores (Ponzio et al., 1982; Oliveira-Silva et al., 2007). Post-hoc: resultados do método de Comparações Múltiplas de Nemenyi entre os grupos = jovem x idoso: $p=0.066$.

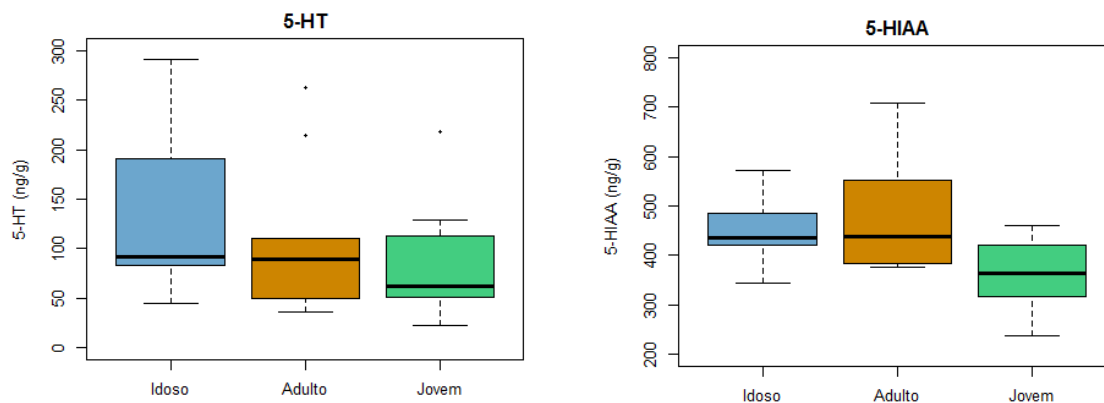


Figura 19. Mediana (e seus respectivos intervalos percentílicos de 95%) das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT (Painel A) e de 5-HIAA (Painel B) no hipocampo de ratos submetidos a tarefa espacial no Labirinto de Barnes. Grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$) e jovem ($n=9$). O teste de Kruskal-Wallis indicou ocorrência de efeito dos grupos (idade) na [5-HIAA] ($p=0.047$). Comparações múltiplas através do teste de Nemenyi detectou uma diferença entre os grupos jovem e idoso com valor de $p=0,066$.

5.3. Relações entre parâmetros comportamentais (medidos no treino e no teste comprobatório) e os seguintes parâmetros neuroquímicos: níveis de 5-HIAA no extrato extracelular do hipocampo incubado em meio normal ou despolarizante

5.3.1. Distância percorrida, latência e velocidade medidas no treino versus concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo (meio normal ou despolarizante)

Para a análise através das Regressões Marginais Log-Lineares Univariadas inicialmente foram consideradas a distância percorrida, latência e velocidade como variáveis de interesse e as concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo como variáveis preditoras. Não houve influência significativa do parâmetro neuroquímico sobre estas três unidades de medida realizadas durante a fase de treino da tarefa de navegação espacial do Labirinto de Barnes (**Tabela 14**). Para esta análise foram utilizados todos os animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem), num total de 31 animais.

Tabela 14 - Dados da análise de Regressão Marginal Log-Linear Univariada: [5-HIAA] no extrato extracelular hipocampal versus DISTÂNCIA PERCORRIDA, LATÊNCIA e VELOCIDADE (medidas durante o treino).

	Modelos Marginais Univariados	β	E.P.(β)	Valor-P	$\exp(\beta)$	I.C. - 95%
Distância percorrida	Intercepto	6,558	0,110	0,000	-	-
	(5HIAA Normal)/100	0,360	0,251	0,152	1,433	[0,88 - 2,35]
Latência	Intercepto	6,739	0,074	0,000	-	-
	(5HIAA Despolarizante)/100	-0,065	0,120	0,586	0,937	[0,74 - 1,19]
Velocidade	Intercepto	3,602	0,195	0,000	-	-
	(5HIAA Normal)*100	0,798	0,453	0,078	2,220	[0,91 - 5,4]
Latência	Intercepto	4,045	0,103	0,000	-	-
	(5HIAA Despolarizante)/100	-0,184	0,111	0,097	0,832	[0,96 - 1,01]
Velocidade	Intercepto	3,337	0,161	0,000	-	-
	(5HIAA Normal)*100	-0,503	0,368	0,171	0,604	[0,88 - 1,02]
Latência	Intercepto	3,110	0,089	0,000	-	-
	(5HIAA Despolarizante)*100	-0,004	0,112	0,972	0,996	[0,98 - 1,02]

Parâmetros comportamentais (dist. percorrida, latência e velocidade): dados ajustados considerando-se o fator velocidade.

Não houve influência dos parâmetros neuroquímicos sobre os parâmetros comportamentais (valores p destacados em azul)

Grupos idoso (n=11, meios normal e despolarizante), adulto (n=9, meio normal; n=10, meio despolarizante), e jovem (n=9, meios normal e despolarizante).

Para a análise de correlação entre distância percorrida, latência e velocidade e as concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo utilizamos a correlação de Spearman. A **Tabela 15** mostra os dados sobre uma correlação significativa negativa entre as concentrações no extrato extracelular de 5HIAA hipocampal em condição estimulada (despolarizante), dos ratos jovens, e a latência (s) média considerando todas as sessões do treino. Para os ratos jovens, quanto maior a concentração de 5-HIAA no extrato extracelular do hipocampo incubado em solução despolarizante, menor a latência para encontrar o reforço durante o treino. Porém, é importante lembrar que a latência sofreu efeito significativo da velocidade, não sendo a unidade de medida adequada para avaliar o desempenho cognitivo.

Tabela 15 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no extrato extracelular do hipocampo incubado em solução normal ou despolarizante versus DISTÂNCIA PERCORRIDA ou VELOCIDADE ou LATÊNCIA (medidas durante o treino).

Grupo	Matriz de Correlação (Spearman)	Distância percorrida	Latência	Velocidade
Idoso	5HIAA (Normal)	0,318	0,055	0,100
	5HIAA (Despolariz.)	-0,245	0,064	0,255
Adulto	5HIAA (Normal)	0,283	-0,050	0,017
	5HIAA (Despolariz.)	-0,055	-0,442	0,333
Jovem	5HIAA (Normal)	0,133	-0,200	0,217
	5HIAA (Despolariz.)	-0,650	-0,767	0,567

Parâmetros comportamentais (dist. percorrida, latência e velocidade): dados não ajustados pelo fator velocidade.

Coefficientes de correlação em negrito foram significativos ao nível de 5% de significância. Coeficiente de correlação entre [5-HIAA] extracelular do hipocampo, em condição despolarizante, de ratos jovens versus latência: destacado em azul

Grupos idoso (n=11, meios normal e despolarizante), adulto (n=9, meio normal; n=10, meio despolarizante), e jovem (n=9, meios normal e despolarizante).

5.3.2. Índice de Extinção e a preferência pelo quadrante alvo no teste comprobatório versus concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo incubado em meio normal ou despolarizante

Para a análise por meio das Regressões Marginais Log-Lineares Univariadas inicialmente foram consideradas o Índice de Extinção (IE) e a preferência pelo quadrante alvo (PQA) como

variáveis de interesse e as concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo como variáveis preditoras. Não houve influência significativa do parâmetro neuroquímico sobre estas duas unidades de medida do desempenho dos animais durante o teste comprobatório da tarefa de navegação espacial do Labirinto de Barnes (**Tabela 16**). Para esta análise foram utilizados todos os animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem), num total de 31 animais.

Tabela 16 – Dados da análise de Regressão Marginal Log-Linear Univariada: [5-HIAA] no meio extracelular do hipocampo incubado em meio normal ou despolarizante versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO, PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no 1^amin e no 2^amin (medidas realizadas durante o teste comprobatório).

Respostas	Modelos Log-Lineares Univariados	β	E.P.(β)	Valor-P	exp(β)	I.C. - 95%
Índice de Extinção	Intercepto	0,182	0,116	0,130	-	-
	5HIAA (Normal)/100	-0,111	0,215	0,610	0,895	[0,59 ; 1,36]
	Intercepto	-0,504	0,127	0,000	-	-
	5HIAA (Despolarizante)/100	-0,040	0,097	0,685	0,961	[0,80 ; 1,16]
Preferência pelo Quadrante Alvo (1 ^a min.)	Intercepto	-0,492	0,128	0,001	-	-
	5HIAA (Normal)/100	-0,116	0,237	0,627	0,890	[0,56 ; 1,42]
	Intercepto	-0,630	0,141	0,000	-	-
	5HIAA (Despolarizante)/100	-0,057	0,108	0,604	0,945	[0,76 ; 1,17]
Preferência pelo Quadrante Alvo (2 ^a min.)	Intercepto	-0,526	0,221	0,024	-	-
	5HIAA (Normal)/100	-0,354	0,467	0,455	0,702	[0,28 ; 1,75]
	Intercepto	-0,662	0,137	0,000	-	-
	5HIAA (Despolarizante)/100	-0,018	0,247	0,942	0,982	[0,61 ; 1,59]

Parâmetros comportamentais ((IE, PQA 1^o min, PQA 2^o min): dados ajustados pelo fator velocidade. Não houve influência dos parâmetros neuroquímicos sobre os parâmetros comportamentais (valores p destacados em azul)

Grupos idoso (n=11, meios normal e despolarizante), adulto (n=9, meio normal; n=10, meio despolarizante), e jovem (n=9, meios normal e despolarizante).

Para a análise de correlação entre IE ou PQA e as concentrações no extrato extracelular de 5-HIAA no hipocampo (incubado em meio normal ou despolarizante) utilizamos a correlação de Spearman. A **Tabela 17** mostra que não houve correlações significativas entre estes parâmetros, nos três grupos. Para esta análise foram utilizados todos os animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem), num total de 31 animais.

Tabela 17 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no extrato extracelular do hipocampo incubado em solução normal ou despolarizante versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO ou PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no 1^o min (PQA 1^o min) – medidas durante o teste comportatório.

Grupo	Matriz de Correlação	Índ. de Extin.	Pref. QA (1min)
Idoso	5-HIAA (Normal)	-0,083	-0,027
	5-HIAA (Despol.)	0,133	0,055
Adulto	5-HIAA (Normal)	0,333	0,417
	5-HIAA (Despol.)	0,006	-0,042
Jovem	5-HIAA (Normal)	-0,233	0,167
	5-HIAA (Despol.)	-0,200	-0,383

Parâmetros comportamentais (IE e PQA 1^o min): dados não ajustados pelo fator velocidade

Não houve correlações significativas entre os parâmetros comportamentais e os parâmetros neuroquímicos

Grupos idoso (n=11, meios normal e despolarizante), adulto (n=9, meio normal; n=10, meio despolarizante), e jovem (n=9, meios normal e despolarizante).

5.4. Relações entre os parâmetros comportamentais (medidos no treino e no teste comportatório) e os seguintes parâmetros neuroquímicos: concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo, e a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT])

5.4.1. Distância percorrida, latência e velocidade, (medidas durante o treino) versus concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA, e da taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo.

Para a análise através das Regressões Marginais Log-Lineares Univariadas inicialmente foram consideradas a distância percorrida, latência e velocidade como variáveis de interesse e as concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo como variáveis preditoras. Não houve influência significativa dos parâmetros neuroquímicos sobre estas três unidades de medida durante a fase de treino da tarefa de navegação espacial do Labirinto de Barnes (**Tabela 18**). Para esta análise foram utilizados todos os animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem), num total de 31 animais.

Tabela 18 – Dados da análise de Regressão Marginal Log-Linear Univariada: [5-HIAA], [5-HT] e a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus DISTÂNCIA PERCORRIDA, LATÊNCIA e VELOCIDADE (medidas durante o treino).

Respostas	Modelos Marginais Log-Linear Univariados	β	E.P.(β)	Valor-P	exp(β)	I.C. - 95%
Distância	Intercepto	6.793	0.082	0.000	-	-
	5-HT/100	-0.076	0.061	0.211	0.927	[0.82 ; 1.04]
	Intercepto	6.578	0.241	0.000	-	-
	5-HIAA/100	0.030	0.060	0.612	1.031	[0.92 ; 1.16]
Latência	Intercepto	6.702	0.079	0,000	-	-
	5HIAA/5HT	0.001	0.01	0.896	1.001	[0.98 ; 1.02]
	Intercepto	3.868	0.151	0.000	-	-
	5-HT/100	0.083	0.116	0.473	1.087	[0.87 ; 1.36]
Velocidade	Intercepto	3.359	0.384	0.000	-	-
	5-HIAA/100	0.137	0.084	0.100	1.147	[0.97 ; 1.35]
	Intercepto	3.964	0.145	0,000	-	-
	5HIAA/5HT	0.000	0.016	0.993	0.990	[0.97 ; 1.03]
Velocidade	Intercepto	3.179	0.095	0.000	-	-
	5-HT/100	-0.077	0.087	0.378	0.926	[0.78 ; 1.1]
	Intercepto	3.474	0.250	0.000	-	-
	5-HIAA/100	-0.088	0.054	0.106	0.916	[0.82 ; 1.02]
Velocidade	Intercepto	3.101	0.109	0.000	-	-
	5HIAA/5HT	-0.001	0.012	0.943	0.999	[0.97 ; 1.02]

Parâmetros comportamentais: dados ajustados considerando-se o fator velocidade

Não houve influência dos parâmetros neuroquímicos sobre os parâmetros comportamentais (valores “p” destacados em azul).

Grupos idoso (n=11), adulto (n=10), e jovem (n=9).

Para a análise de correlação entre distância percorrida, latência e velocidade e as concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT, 5-HIAA, e da taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo utilizamos a correlação de Spearman. A **Tabela 19** mostra uma correlação significativa positiva entre a concentração tecidual (conteúdo total) de 5-HIAA no hipocampo dos animais do grupo idoso e a distância percorrida por estes animais durante a 3ª sessão, de forma que quanto maior a concentração tecidual de 5-HIAA no hipocampo dos ratos idosos, maior é a distância percorrida por estes animais, ou seja, pior o desempenho, durante a 3ª sessão do treino no labirinto de Barnes.

Tabela 19 - Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] ou [5-HT] ou a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus DISTÂNCIA PERCORRIDA ou LATÊNCIA ou VELOCIDADE (medidas durante o treino).

Grupo	Matriz de Correlação	Parâm.bioq versus Dist. perc.	Parâm.bioq versus Latência
		“r”	“r”
Idoso	5-HT	-0,473	0,136
	5-HIAA	0,636	0,255
	5-HIAA/5-HT	0,473	-0,091
Adulto	5-HT	-0,285	-0,648
	5-HIAA	0,03	0,636
	5-HIAA/5-HT	0,176	0,770
Jovem	5-HT	-0,167	0,05
	5-HIAA	0,217	0,233
	5-HIAA/5-HT	0,017	-0,083

Parâmetros comportamentais: dados não ajustados pelo fator velocidade. Coeficientes de correlação em negrito foram significativos ao nível de 5% de significância.

Coeficiente de correlação significativo positivo entre [5-HIAA] do hipocampo (conteúdo total) de ratos idosos versus distância percorrida (destacado em azul; para este valor “r”, $p=0.035$).

Grupos idoso ($n=11$), adulto ($n=10$), e jovem ($n=9$).

A **Tabela 20** mostra o resultado da análise de correlação de Spearman entre a distância percorrida na fase do treino (por sessão) e a concentração tecidual (conteúdo total) de 5-HIAA no hipocampo. Na 3ª sessão há uma correlação significativa positiva entre estas duas variáveis apenas para o grupo idoso: quanto maior a concentração tecidual de 5-HIAA no hipocampo dos ratos idosos, maior é a distância percorrida por estes animais na 3ª sessão do treino, ou seja, pior o desempenho nesta fase do processo de aprendizagem. A representação gráfica destes dados é mostrada na **Figura 20**.

Tabela 20 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no hipocampo (conteúdo total) versus DISTÂNCIA PERCORRIDA por sessão (durante o treino).

Grupo	Sessão	5-HIAA (total) versus DIST. PERCORRIDA	
		r	valor-p
Idoso	Sessão=1	0,355	0,286
	Sessão=2	0,282	0,402
	Sessão=3	0,718	0,017
	Sessão=4	0,173	0,614
Adulto	Sessão=1	-0,212	0,560
	Sessão=2	-0,297	0,407
	Sessão=3	0,370	0,296
	Sessão=4	-0,079	0,838
Jovem	Sessão=1	-0,017	0,982
	Sessão=2	0,233	0,552
	Sessão=3	-0,100	0,810
	Sessão=4	-0,050	0,912

Parâmetros comportamentais: dados não ajustados pelo fator velocidade.

Coefficientes de correlação em destaque (negrito) foram significativos ao nível de 5% de significância.

Correlação significativa positiva entre [5-HIAA] no hipocampo (conteúdo total) dos ratos idosos com a distância percorrida na 3ª sessão do treino (destaque em azul).

Grupos idoso (n=11), adulto (n=9), jovem (n=10).

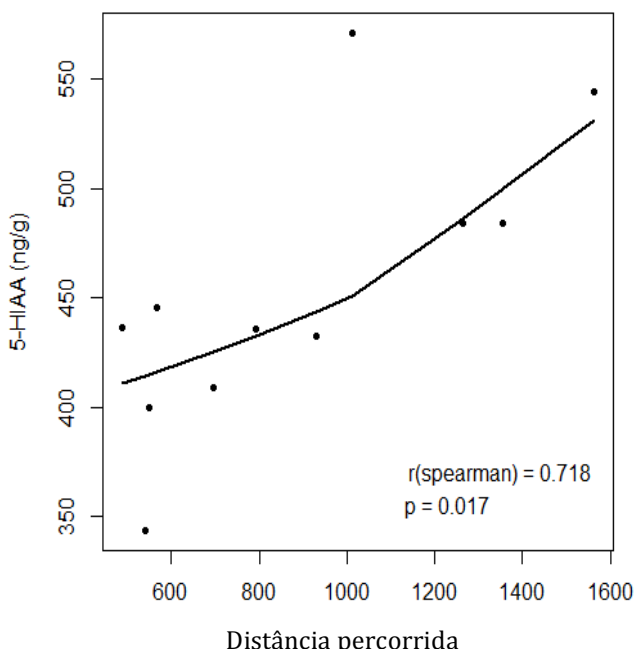


Figura 20. Diagrama de dispersão entre as concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HIAA no hipocampo dos animais do grupo idoso e seu desempenho na 3ª sessão do treino (aquisição da informação na tarefa espacial). Cada ponto representa a média das 5 tentativas de um animal na referida sessão. Ajuste da curva via método de Lowess

5.4.2. Índice de Extinção e preferência pelo quadrante alvo durante o teste comprobatório versus concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e de 5-HIAA no hipocampo, e da taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo

Para a análise através das Regressões Log-Lineares pelo método de Quase-Verossimilhança, inicialmente foram considerados o Índice de Extinção (IE), a preferência pelo quadrante alvo no 1^o minuto (PQA1^o min) e a preferência pelo quadrante-alvo no 2^o min (PQA2^o min) como variáveis de interesse, e as concentrações teciduais de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo, como variáveis preditoras. Não houve influência significativa dos parâmetros neuroquímicos sobre estas três unidades de medida do desempenho dos animais durante o teste comprobatório da tarefa de navegação espacial no Labirinto de Barnes (**Tabela 21**).

Tabela 21 - Dados da análise de Regressão Log-Linear pelo método de Quase verossimilhança: [5-HIAA], [5-HT] e a taxa de renovação da 5-HT ([5-HIAA]/[5-HT]) no hipocampo (conteúdo total) versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO e PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE-ALVO no 1^omin e no 2^omin (medidas realizadas durante o teste comprobatório).

Respostas	Modelos Log- Lineares Univariados	β	E.P.(β)	Valor-P	exp(β)	I.C. - 95%
Índice de Extinção	Intercepto	0.182	0.119	0.140	-	-
	5-HT/100	-0.024	0.091	0.798	0.977	[0.82 ; 1.17]
	Intercepto	0.569	0.311	0.079	-	-
	5-HIAA/100	-0,096	0.072	0.191	0.908	[0.79 ; 1.05]
	Intercepto	0,201	0,115	0,094	-	-
	5HIAA/5HT	-0,007	0,015	0,640	0,992	[0,96 ; 1,02]
Preferência pelo Quadrante Alvo (1^amin.)	Intercepto	-0.504	0.127	0.000	-	-
	5-HT/100	-0.040	0.097	0.685	0.961	[0.8 ; 1.16]
	Intercepto	-0.322	0.336	0.346	-	-
	5-HIAA/100	-0.052	0.076	0.501	0.949	[0.82 ; 1.1]
	Intercepto	-0,584	0,12	0,000	-	-
	5HIAA/5HT	0,006	0,016	0,708	1,005	[0,98 ; 1,03]
Preferência pelo Quadrante Alvo (2^amin.)	Intercepto	-0,63	0,141	0,000	-	-
	5HT/100	-0,057	0,108	0,604	0,945	[0,76 ; 1,17]
	Intercepto	-1,012	0,363	0,009	-	-
	5HIAA/100	0,073	0,081	0,372	1,076	[0,92 ; 1,26]
	Intercepto	-0,808	0,133	0,000	-	-
	5HIAA/5HT	0,018	0,017	0,279	1,018	[0,98 ; 1,05]

Parâmetros comportamentais (IE, PQA 1^o min, PQA 2^o min): dados ajustados pelo fator velocidade. Não houve influência dos parâmetros neuroquímicos sobre os parâmetros comportamentais (valores p destacados em azul)
Grupos idoso (n=11), adulto (n=10) e jovem (n=9).

Para a análise de correlação entre IE e ou PQA no 1º e no 2º minuto do teste comprobatório e as concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA, e a taxa de renovação da 5-HT ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$) no hipocampo utilizamos a correlação de Spearman. A **Tabela 22** mostra que não houve correlações significativas entre estes parâmetros, nos três grupos.

Tabela 22 - Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: $[5\text{-HIAA}]$, $[5\text{-HT}]$ e a taxa de renovação da 5-HT ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$) no hipocampo (conteúdo total) versus ÍNDICE DE EXTINÇÃO, PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no 1º min (PQA 1º min) - medidas no teste comprobatório.

Grupo		Índ. de Extinção (IE)	PQA 1º min
Idoso	5-HT	0,1	-0,018
	5-HIAA	-0,15	0,382
	5-HIAA/5-HT	-0,083	0,091
Adulto	5-HT	-0,164	-0,236
	5-HIAA	-0,091	-0,176
	5-HIAA/5-HT	-0,006	0,018
Jovem	5-HT	0,2	-0,15
	5-HIAA	0	0,217
	5-HIAA/5-HT	-0,117	0,15

Parâmetros comportamentais (IE e PQA 1º min): dados não ajustados pelo fator velocidade.

Não houve correlação dos parâmetros neuroquímicos com os parâmetros comportamentais.

Grupos idoso (n=11), adulto (n=10) e jovem (n=9).

6. DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo heterogêneo para todo ser vivo. Nenhum ser apresenta-se envelhecido da mesma maneira. Constitui um processo que resulta da interação de um grande número de variáveis intrínsecas e extrínsecas do organismo que o vivencia, sofre alterações a partir das múltiplas possibilidades de combinações entre estas variáveis, e segue trajetórias de difícil previsão, culminando com apresentações distintas entre os organismos de uma mesma espécie, o que também explica a elevada variabilidade dos componentes biológicos e comportamentais que o caracterizam. Considerando a conseqüente riqueza de informações que esta grande variabilidade traz, o estudo de aspectos cognitivos relacionados ao envelhecimento por meio da análise do comportamento animal, seja humano ou não, exige paradigmas que propiciem liberdade suficiente para os indivíduos, sob observação, expressarem a maior quantidade possível de comportamentos, com o mínimo de interferência que sempre se associa à tecnologia que eles envolvem. No presente estudo, foi utilizada uma tarefa cognitiva espacial, com estímulos aversivos relativamente moderados e reforço positivo, considerada adequada para avaliações envolvendo sujeitos idosos. Os resultados obtidos confirmam que o LB por exigir menor esforço dos animais idosos, que são mais frágeis, representa uma alternativa interessante ao LAM, para esse tipo de estudo. Os dados obtidos mostram que o método empregado foi apropriado para os propósitos estabelecidos como objetivos do trabalho. Por exemplo, uma curva de aprendizagem típica foi obtida para os animais do grupo jovem, que entre os grupos experimentais foi de certa forma considerado um grupo controle.

Da mesma forma, no que se refere às dosagens neuroquímicas, nas quais os parâmetros serotoninérgicos determinados estão de acordo com os níveis de referência descritos na literatura (Ponzio et al., 1982; Oliveira-Silva et al., 2007).

Em resumo, no presente estudo analisamos o comportamento de três grupos etários (idoso, adulto e jovem) expresso durante a realização de tarefas cognitivas espaciais, e coletamos material biológico por meio da dissecação dos hipocampos destes animais, um dia após esses terem finalizado os testes no LB. Respondemos à pergunta central deste trabalho, verificando que a idade afetou parâmetros do sistema serotoninérgico no hipocampo dos ratos treinados no LB, efeito que se relacionou com o declínio cognitivo observado nos animais idosos, através da análise do desempenho na tarefa espacial. Resumimos também outros resultados interessantes, como: (i) o envelhecimento não afetou a capacidade cognitiva do indivíduo para aprender uma tarefa espacial (todos os ratos idosos aprenderam), desde que essa tarefa seja repetida várias vezes. Entretanto, alterou a cinética do processo de aquisição da informação espacial, especificamente em uma fase intermediária, resultado que se correlacionou com uma alteração em parâmetro serotoninérgico do

hipocampo destes animais (a elevação do conteúdo total do ácido 5-hidroxi-indolacético – 5-HIAA, metabólito da serotonina); (ii) o envelhecimento induziu um aumento significativo nas concentrações de 5-HIAA no extrato extracelular do hipocampo dos ratos idosos, em relação aos jovens, tanto na condição estimulada quanto não estimulada. Adiante seguimos com uma discussão mais detalhada destes, e outros resultados obtidos no presente trabalho.

A análise do envelhecimento, enquanto processo, exige um desenho experimental que inclua grupos de animais de diferentes faixas etárias, o mínimo de três. Ratos Wistar criados em laboratório vivem aproximadamente 2 a 3,5 anos (Pass e Freeth, 1993). No presente estudo, escolhemos as idades de 3, 9 e 24 meses, pois representam respectivamente a fase jovem, adulta e idosa de ratos desta linhagem. Não há na literatura evidências definitivas a respeito dos limites entre estas faixas. Há autores que consideram idoso um rato que apresenta 20 a 22 meses de idade, entretanto a maioria dos trabalhos mais recentes revela uma tendência em utilizar sob esta classificação animais com pelo menos 24 meses. Ratos Wistar com 3 meses de idade já ultrapassaram a puberdade, que ocorre entre os dias 36 e 66 após seu nascimento, apresentando plena maturidade sexual, sendo portanto considerados jovens (Freudenberger, 1932 apud Sengupta, 2011). Também nesta idade o sistema serotoninérgico já atingiu sua maturidade, apresentando níveis de 5-HT e 5-HIAA iguais aos de animais adultos (Herregodts *et al.*, 1990). A fase adulta de ratos, assim como em humanos, pode ser identificada através de sua maturidade musculoesquelética (Sengupta, 2011). O crescimento esquelético cessa a partir do 7^o mês de vida em ratos Sprague-Dawley (Harlan, INC.). Desta forma, é razoável considerar adultos ratos Wistar com 9 meses de idade.

Os três grupos de ratos Wistar integrantes deste estudo – jovens, adultos e idosos – passaram pelos testes comportamentais no LB sem a realização prévia da etapa de habituação. Há autores que realizam uma etapa de habituação antes do início da fase do treino, a qual é caracterizada pela apresentação prévia da caixa-escape (CE) para todos os animais que passarão pelos testes comportamentais (Barnes, 1979; MacLay *et al.*, 1998; MacLay *et al.*, 1999). A habituação reduziria a natural resistência apresentada por alguns animais em adentrar na CE assim que encontrassem o orifício que dá entrada à mesma. Outros autores não incluem a habituação dos animais à CE nos procedimentos experimentais, sem prejuízo do processo de aprendizagem (Mueller e Bale, 2007). No presente trabalho também dispensamos a etapa de habituação, e verificamos que os estímulos presentes no teste comportamental (luz=4 lâmpadas de 45W cada, exposição em campo aberto elevado) foram intensos o suficiente para motivar todos os ratos dos três grupos a se movimentarem pela plataforma, assim como adentrar na CE logo ao encontrarem seu orifício, com exceção de apenas um rato (adulto = 9 meses) que, ao encontrar o orifício da CE, não adentrou na mesma. Este

fato ocorreu em todas as tentativas da primeira sessão deste animal, o qual, da segunda sessão em diante não mais apresentou tal comportamento, passando a entrar na CE, logo ao descobrir seu orifício. A habituação neste teste comportamental parece ser mais necessária quando são utilizados camundongos, pois eles, ao contrário dos ratos, hesitam mais em entrar, e têm maior tendência a explorar a plataforma, mesmo depois de descobrir o orifício da CE, não entrando de imediato (Kennard e Woodruff-Pak, 2011). Quanto à movimentação durante o treino, nenhum animal permaneceu parado ao longo de todo o tempo em que esteve sobre a plataforma. Na primeira sessão esse seria o comportamento esperado já que o ambiente era novo para eles. Com a mobilidade dos animais ficou confirmado que a magnitude utilizada para os estímulos aversivos foi adequada, pois, não provocaram o comportamento de imobilidade/congelamento. Esse comportamento de mobilidade se repetiu da segunda sessão até o fim do treino, onde todos os ratos dos três grupos se movimentaram, sem ficarem parados por longo tempo.

Os animais dos três grupos aprenderam a tarefa, fato ilustrado através da significativa redução da latência (**painel A da Figura 10, pág. 27**) e da distância percorrida (**painel B da Figura 10, pág. 27**) para encontrar a CE, ao longo das sessões, e confirmado através das comparações múltiplas entre as sessões do treino, por grupos (**Tabelas 4 e 3, respectivamente – pág. 28**). Como houve diferença da velocidade de deslocamento dos animais durante o treino – os ratos idosos foram significativamente mais lentos que os jovens ($p=0.044$; $\exp(\beta)=1.431$; IC 95%=[1.01;2.03]) – a velocidade foi inserida no modelo estatístico de análise do desempenho dos animais, expresso em latência e em distância percorrida, a fim de investigar qual o impacto que essa poderia ter sobre estas duas unidades de medida do desempenho. Esse tratamento gerou novos dados de latência e distância percorrida, desta vez ajustados pelo *fator velocidade*. Observou-se significativo efeito da velocidade sobre a variável latência, mas não sobre a distância percorrida. Assim, a distância percorrida ajustada pela velocidade, e não a latência, foi a variável escolhida para expressar o desempenho cognitivo dos animais e interpretar os comportamentos relativos a possíveis diferenças no aprendizado entre os três grupos, considerando possíveis efeitos sobre aspectos motores. Os dados da distância percorrida ajustada pela velocidade mostraram que o efeito das sessões permaneceu, confirmando o aprendizado da tarefa espacial pelos animais dos três grupos (**Tabela 8, pág. 33**).

Uma possível aparente desvantagem do labirinto de Barnes em relação a outros testes comportamentais de navegação espacial seria o favorecimento de um aprendizado muito lento, fato explicado pelo menor estresse envolvido nos estímulos empregados, de menor magnitude, em comparação aos outros testes, o que por sua vez permitiria um comportamento mais exploratório do que uma resposta de escape (Paul *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009). O termo “aparente” foi utilizado por se considerar que esses fatores dependem do objetivo do estudo. Como mencionado

acima, o comportamento exploratório dos animais foi verificado na primeira sessão do treino – ainda na fase inicial em que os animais não tinham conhecimento sobre a tarefa –, quando se observou maior número de trajetórias aparentemente aleatórias indicando cruzamento da plataforma várias vezes em seu diâmetro (**painel A da Figura 5, pág. 17**), sobretudo os ratos jovens, que apesar disto não apresentaram pior desempenho (**Tabela 6, em Anexos, pág. 82; e Tabela 9, pág. 34**). Os dados do presente estudo mostram que esta possível desvantagem do LB, ou seja, uma cinética mais prolongada para a aquisição da tarefa, não ocorreu, visto que já a partir da 2ª sessão é possível observar o início do aprendizado: a distância percorrida ajustada pelo fator velocidade dos três grupos na segunda sessão foi menor que na primeira (**Tabela 8, pág. 33**). Uma possível explicação para a ausência da prevista demora para aprender a tarefa no LB, seria o esquema intensivo do treino utilizado, que comparado à modalidade clássica do LB, poderia ser responsável por acelerar o processo de aquisição. Ao invés de duas, realizamos cinco tentativas por sessão, e ao invés de 8 ou mais sessões consecutivas estabelecemos o número de 4. Esta estratégia também é encontrada em outros trabalhos, com algumas diferenças (MacLay *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2006).

A literatura científica não mostra número tão expressivo de publicações sobre o estudo da cognição espacial em ratos idosos no LB, em comparação com a quantidade de trabalhos que utilizaram o labirinto aquático de Morris (LAM). Busca recente em dois sites especializados em publicações científicas resultaram em proporção de trabalhos que utilizaram o LB *versus* LAM variando entre 4.2% a 18.2%, quando escolhidas as palavras-chave “*aging and Barnes maze*” ou “*aging and Morris water maze*”. O LB foi desenvolvido por Barnes (1979) especificamente para ratos, o que não impediu sua adaptação com sucesso para camundongos. Barnes prossegue sendo um dos autores que muito provavelmente mais publicou utilizando este labirinto, desde 1979 até a atualidade, acumulando contribuição significativa, principalmente para o entendimento de aspectos eletrofisiológicos relacionados ao declínio cognitivo apresentados por ratos idosos durante o aprendizado no LB. Algumas vantagens do LB já foram apresentadas na Introdução. Conforme também já mencionado, a nossa experiência com o LB confirmou a facilidade de seu manuseio, a reprodutibilidade dos resultados relacionados à aprendizagem atestada na fase de estabelecimento das técnicas e com o estudo piloto, a diversidade de alternativas de manipulação da magnitude dos estímulos e reforços para a adequação aos idosos, a flexibilidade na elaboração de esquemas de treino e testes pós-treino (comprobatório, por exemplo) de acordo com os objetivos do estudo e as exigências dos animais idosos. O LB também propiciou aos ratos maior liberdade de expressão de comportamentos, os quais foram gravados e estão estocados e disponíveis para posteriores análises focando outros aspectos, como por exemplo, comportamento ansioso manifesto por meio do número de bolos fecais eliminados durante a tarefa, *rearing*, *grooming*, *freezing*, número de erros

cometidos durante a criação do mapa cognitivo para a localização da caixa-escape, comportamento exploratório ambulante, comportamento de escape e desenvolvimento de estratégias “físicas” espaciais para a solução do labirinto.

O desenvolvimento de estratégias baseadas em pistas espaciais distais extra-labirinto para a localização da caixa-escape (CE) é o comportamento de maior interesse em estudos que focam os aspectos cognitivos espaciais – aprendizado e memória explícita - relacionados ao envelhecimento. Entretanto, os ratos podem desenvolver outras estratégias durante o treino – fase de aquisição de informação. Barnes (1979), em seu artigo clássico, confirmou que os animais aprendiam a localizar a CE através de pistas espaciais, e não olfatórias, ao rodar a plataforma, e assim mudar a posição da CE com relação às dicas espaciais do ambiente, em fase mais avançada do treino, quando os animais já haviam aprendido a localizar a CE. Barnes (1979) observou que, na tentativa seguinte à modificação efetuada, os ratos apresentavam o comportamento de procurar a CE na situação anterior à rotação da plataforma, e não em sua nova localização. Outros autores também mostraram que a limpeza da plataforma com soluções de álcool etílico, mais sua rotação, são suficientes para evitar a utilização de pistas olfatórias (Harrison *et al.*, 2006; Barret *et al.*, 2009). Harrison *et al* (2006), em estudo com camundongos adultos, mostrou que os animais, ainda que tendo pistas intra-labirinto fixas e próximas à CE, apresentavam forte preferência pelo uso das pistas espaciais distais (extra-labirinto) para localizarem a CE. No presente estudo, com a intenção de evitar que os ratos utilizassem pistas espaciais intra-labirinto (olfatórias ou não), a cada nova tentativa durante o treino trocávamos o piso de borracha preta que recobria a plataforma por outro previamente limpo com solução de etanol a 20%, além de limparmos o forro plástico que revestia internamente a CE, com esta solução. Outro dado que favorece a hipótese do uso das pistas espaciais distais para a construção de um mapa cognitivo espacial como instrumento de localização da CE é que, na fase do teste comprobatório, cujos dados mais abaixo serão discutidos, os ratos adultos e jovens lembraram da localização espacial da CE, permanecendo mais tempo no quadrante onde a mesma se encontrava durante o treino. As estratégias acima descritas são ditas *alocêntricas*, pois, usam referências que estão fora do corpo do animal. Para contornar a possibilidade de os animais utilizarem estratégias *egocêntricas* (memorização de uma sequência de movimentos corporais) para encontrar a CE, nós utilizamos a forma pseudo-randomizada de liberar os ratos de pontos diferentes do LB, no início de cada tentativa durante o treino.

O aprendizado da tarefa no LB não foi igual para os três grupos. Ao longo do treino percebemos que a idade afetou a *cinética* do processo de aprendizagem. Esse achado está de acordo com outros autores que também utilizaram o LB, porém empregando ratos ou camundongos de diferentes linhagens, e parâmetros da plataforma e estímulos que diferiram em alguma magnitude

dos empregados nesse estudo. Apesar das diferenças com relação ao modelo utilizado aqui, eles também mostraram um prejuízo cognitivo de animais idosos quando comparados com jovens ou adultos (Barnes, 1979; Bach *et al.*, 1999; Barret *et al.*, 2009;). Ajustando-se ou não a distância percorrida pelo fator velocidade, notamos que os ratos idosos apresentaram um pior desempenho, quando comparados com os jovens (**Tabelas 9, pág. 34, e 6, pág. 30, respectivamente**). Um ponto importante a ser destacado, observado nos resultados sobre o efeito da idade na aquisição da tarefa espacial é o fato dos indivíduos do grupo idoso serem capazes de aprender a tarefa, se a mesma for repetida por várias vezes. Ou seja, o desempenho dos idosos atinge um nível similar aos adultos e jovens desde que tenham oportunidade de repetir a tarefa. Esse dado sinaliza que o envelhecimento parece não interferir com a capacidade de codificar e recuperar a informação ao longo do treino, mas sim com a cinética no qual esses processos acontecem. No caso da tarefa espacial utilizada no presente estudo, os animais dos grupos adulto e jovem foram capazes de aprender relativamente mais rápido, ou seja, com menos tentativas (**Figura 13, pág. 36**). Como observamos no presente estudo, MacLay *et al.* (1999) já haviam verificado que o efeito da idade sobre o aprendizado dos animais diminui à medida que o treino se prolonga. Estes autores utilizaram ratos Fisher de 3, 6 e 25 meses de idade, comparando seu desempenho no LB e no labirinto aquático de Morris (LAM), ambos em treino composto por 4 sessões, com 4 tentativas por sessão. Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa também descreveram este mesmo fenômeno utilizando o labirinto aquático de Morris (Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010). Esses achados sobre os efeitos da repetição da tarefa, corroborado por outros autores que trabalharam com outra linhagem de ratos, são pertinentes para reforçar a relevância do emprego da repetição como estratégia de melhoria das habilidades cognitivas dos indivíduos idosos.

No **painel B da Figura 12 (pág. 32)**, observamos os dados relacionados ao evento discutido no parágrafo acima sobre capacidade de aprendizagem, e outros também integrantes da cinética do processo de aprendizagem, como: na primeira tentativa da primeira sessão do treino (T_1S_1) todos os animais desconhecem o LB, e também não sabem da existência da CE. Assim, em T_1S_1 predomina o comportamento exploratório dos animais, o qual depende mais de aspectos motores relacionados à ambulação no “campo aberto”, LB, do que aos aspectos cognitivos do teste. Este comportamento exploratório foi mais frequente no grupo jovem, ainda que não tenha ocorrido diferença significativa no comportamento deste grupo em relação aos grupos adulto e idoso, conforme já discutido acima. Embora não significativa, essa diferença pode refletir uma maior motivação e maior capacidade de enfrentamento (risco) dos mais jovens com relação à exploração de um ambiente novo. Ou seja, a diferença não sinaliza uma menor capacidade cognitiva dos jovens e sim uma maior capacidade de enfrentamento e motivação em relação aos idosos (Brennan *et al.*, 2012). Ao longo das demais

tentativas da primeira sessão (T2, T3, T4 e T5), rapidamente os animais dos três grupos desenvolveram um comportamento de escape, e o desempenho dos jovens praticamente se igualou ao dos idosos e adultos. Este novo comportamento torna-se evidente a partir da 3^a tentativa, já sugerindo a predominância de aspectos cognitivos, com o surgimento de um aprendizado. Entretanto, em um momento intermediário da fase do treino, especificamente na 3^a sessão, os animais do grupo idoso, em relação aos outros dois grupos, apresentam um pior desempenho na tarefa espacial, expresso em $DPer_{vel}$. Com a aproximação do término do treino, esta diferença se atenuou. Portanto, como mencionado acima, os animais idosos são capazes de aprender a tarefa espacial, desde que lhes seja dado mais tempo: a *cinética* do processo de aprendizagem se altera com o envelhecimento. Rosenzweig e Barnes (2003), em extensa revisão sobre as alterações neurofisiológicas associadas ao envelhecimento, apontaram evidências de déficits na indução e decaimento da manutenção da potenciação de longa duração (*Long Term Potentiation – LTP*). Talvez a dificuldade em adquirir a informação espacial observada em roedores idosos se justifique pelos déficits na indução e/ou pelo decaimento da manutenção da *LTP* (Bach *et al.* 1999). Os referidos déficits seriam superados por um treino mais prolongado, com maior número de tentativas, e o decaimento da *LTP* pela redução do intervalo de tempo entre as sessões. Um argumento interessante que se opõe de forma original à lógica geralmente apresentada para se estudar o efeito do envelhecimento sobre o desempenho de animais (incluindo os humanos) em tarefas cognitivas é apresentado por Ramscar *et al* (2014). Estes autores, em estudo com modelos computacionais de memória de indivíduos idosos e jovens, desafiados com tarefas que envolveram memória explícita de longo prazo, afirmaram que o aprendizado do indivíduo idoso exige mais tempo por causa da necessidade de lidar com maior número de informações já codificadas (quando comparados com indivíduos jovens). Seus sistemas de memória não necessariamente apresentariam menor velocidade de processamento de dados que os jovens, mas sim, teriam mais dados para manipular. Estes autores, ainda que trabalhando com modelos computacionais, não sujeitos a alterações análogas às fisiológicas decorrentes do tempo observadas nos organismos vivos, e mais, utilizando um tipo de memória explícita que apenas os humanos têm (linguagem verbal), questionam a existência de declínio cognitivo decorrente do envelhecimento saudável, na ausência de doenças. Quando confrontados com as referidas alterações fisiológicas impostas pelo tempo sobre os organismos vivos, eles argumentam que ainda não existe um modelo que consiga observar o que está sendo processado e como, e que os estudos neurobiológicos que revelam as alterações estruturais e a biologia do processamento neural não são suficientes como evidência de declínio, pois falta um modelo que estabeleça os princípios e fundamentos da relação entre a atividade neural e a função cognitiva. Na ausência deste modelo, prosseguimos buscando as melhores maneiras de avaliar as

relações entre as alterações biológicas estruturais e funcionais ocasionadas pelo envelhecimento e a função cognitiva. Importante também não descartar outras explicações ou fatores que poderiam interferir com o desempenho cognitivo e que podem acometer indivíduos idosos, como a falta de motivação ou disfunções na capacidade de avaliação de estímulos do meio (Brennan *et al.*, 2012). No entanto, no presente estudo esses fatores parecem pouco prováveis, pois, os animais idosos se movimentaram na plataforma sem comportamentos de imobilidade típicos da ausência de motivação. Somado a isto está o fato de que foram capazes de aprender e o déficit cognitivo aconteceu apenas em uma fase do processo, sinalizando que o problema não parece ser motivacional.

Diante da constatação de a idade afetar a *cinética* do processo de aprendizagem da tarefa espacial no Labirinto de Barnes, corroborado por resultados similares obtidos anteriormente pelo nosso grupo (Oliveira-Silva *et al.*, 2007, Vigil *et al.*, 2010) e de outros autores (MacLay *et al.*, 1999) levantamos a hipótese de que a demanda em termos de componentes neurobiológicos varia ao longo do processo. Coincidentemente, tanto para o envelhecimento como para a neurodegeneração induzida pela deficiência de vitamina B1 parece haver uma etapa limitante, situada entre a segunda e terceira sessões do treino, provavelmente uma fase crítica de aquisição e formação do mapa espacial. No presente estudo, o tratamento dos dados referentes aos intervalos inter-sessões (deltas e razões da distância percorrida entre a primeira tentativa de uma sessão e a última tentativa da sessão anterior) objetivou a compreensão da diferença da cinética do processo de aprendizagem dos animais idosos, em relação aos adultos e jovens. Ainda que não tenha ocorrido efeito da idade sobre os deltas e razões da distância percorrida, observando-se os dados brutos e as médias dos três grupos referentes aos deltas 2 da distância percorrida (D_2 , com função modular, na **Tabela 10, pág. 37**), e suas respectivas representações gráficas (no **painel B da Figura 14, pág. 38**, expressas em medianas), é possível visualizar um perfil distinto dos ratos idosos em relação ao perfil dos adultos e dos jovens. Esse achado vai de encontro com a ideia de que essa etapa parece relevante no desempenho do indivíduo, podendo determinar o grau de facilidade com que a tarefa é aprendida. Também nos levam a considerar a possibilidade de detectar o efeito do envelhecimento sobre deltas e razões da distância percorrida por meio da utilização de um esquema de treino no qual o grau de dificuldade para a aquisição e consolidação da tarefa espacial seja variado através do aumento do tempo de intervalo entre as sessões. Entender as bases moleculares da dinâmica desse processo não apenas irá permitir entender as relações entre aspectos biológicos específicos da dinâmica do processo de aprendizagem de uma tarefa espacial como também irá contribuir para esclarecer as bases de algumas das disfunções cognitivas encontradas em indivíduos idosos. .

Ao passarmos para a análise do primeiro minuto do teste comprobatório (memória), vimos que não houve efeito da idade (=grupos) sobre a preferência pelo QA no 1º min ($PQA_{10\text{ min}}$) (**Figura 17, pág 41; Tabela, 11 em Anexos, pág. 84**). Entretanto, a média da $PQA_{10\text{ min}}$ para o grupo idoso se situou abaixo de 50% (47,5%), o que não ocorreu com os grupos adulto (60.7%) e jovem (67.7%) que, embora não significativo, apresentaram uma memória parcial do local onde se encontrava a plataforma durante o treino. Por outro lado os animais idosos não se recordaram da localização da CE. Este é um dado que sugere a dificuldade de os animais idosos recuperarem a informação espacial aprendida quando da fase do treino. Esse efeito não é tão bem detectado ao longo do treino, que também foi desenhado com um intervalo de 24 horas entre uma sessão e outra, porque no treino o animal tem cinco tentativas por sessão e ao encontrar a CE na primeira tentativa isto de alguma forma facilita o desempenho nas demais tentativas.

Com relação à avaliação do efeito da idade sobre a flexibilidade comportamental, ou seja, mudança de estratégia comportamental quando a anterior deixa de ser reforçada, utilizou-se o índice de extinção (IE) como uma unidade de medida que reflete a flexibilidade do indivíduo perante situações não mais reforçadas. O grupo idoso, apesar de não ter IE significativamente menor que os grupos adulto e jovem (**Figura 16, pág. 40**), apresentou média do IE menor do que 1, ao contrário destes outros dois grupos (0.91 contra 1.02 e 1.34, respectivamente – **Tabela 7 em Anexos, pág. 83**). A provável incapacidade de os animais idosos conseguirem recuperar a informação espacial no 1º min do teste comprobatório, como acima discutido, pode explicar porque eles não apresentaram flexibilidade comportamental: não se lembrando da tarefa, não havia o que extinguir. Em contraste, instigante é ver o comportamento dos animais dos grupos adulto e jovem. O grupo adulto apresentou média do IE praticamente igual a 1 (1.02), ou seja, não extinguiu a memória aprendida, dado que sugere que os animais adultos não foram flexíveis, perseverando no QA durante o 2º minuto do teste comprobatório. O grupo jovem, por sua vez, apresentou média do IE superior a 1 (1.34), indicativa do comportamento de extinção, o que reflete que os animais deste grupo tentaram nova estratégia para localizar o reforço positivo, demonstrando flexibilidade comportamental. Esta hipótese é fortalecida pela constatação de que a diferença entre a $PQA_{20\text{ min}}$ pela $PQA_{10\text{ min}}$ do teste comprobatório foi significativamente maior apenas para o grupo jovem (**Figura 17, pág. 41**). Esta relação ($PQA_{20\text{ min}} - PQA_{10\text{ min}}$) não é a maneira habitual de representar a flexibilidade comportamental, entretanto ao analisar o comportamento nesses dois momentos do teste comprobatório, pode-se inferir sobre essa capacidade. A flexibilidade comportamental é traduzida como estratégia adaptativa, onde um indivíduo, frente a uma alteração do ambiente (a retirada do reforço) a qual desafiou uma memória previamente formada, desiste de um comportamento desenvolvido a fim de solucionar uma tarefa aprendida (estabelecimento de uma trajetória na

plataforma do labirinto de Barnes a partir de um mapa espacial criado em função de pistas distais extra-labirinto) para desenvolver outro comportamento (buscar estabelecer nova trajetória, enquanto tenta localizar o orifício da CE). Ainda que por meio do IE não tenhamos observado este efeito, a observação das medidas descritivas (médias) dos três grupos, mais a análise da $PQA_{20\text{ min}}$ comparada à $PQA_{10\text{ min}}$ apontam para a possibilidade de o envelhecimento ter afetado a flexibilidade comportamental dos ratos quando submetidos ao teste de memória no Labirinto de Barnes (LB): os ratos jovens se lembraram da tarefa, e pareceram ter tentado desenvolver nova estratégia para localizar a CE, os ratos adultos se lembraram da tarefa, mas não apresentaram flexibilidade comportamental, pois perseveraram procurando a CE no QA, e por fim, os ratos idosos não se lembraram da tarefa, e assim, não haveria como apresentar flexibilidade. Oliveira-Silva *et al.* (2007), utilizando ratos Wistar de 3 e de 16 meses de idade, observaram o efeito da idade sobre a flexibilidade comportamental em estudo que empregou outro teste espacial hipocampo-dependente (o labirinto aquático de Morris -LAM). Considerando as evidências a respeito do caráter mais ansiogênico do LAM em relação ao LB (Harrison *et al.*, 2009) e a influência de fatores emocionais na cognição de roedores submetidos a tarefas espaciais (Kuçuk *et al.*, 2008 ; MacLay *et al.*, 1998) é possível que o LAM seja capaz de causar maior impacto negativo sobre aspectos cognitivos em animais envelhecidos que o LB, por exemplo, prejudicando a capacidade de os mesmos substituírem um aprendizado por outro frente a mudanças do ambiente. Pensando desta forma, o LB torna-se mais uma ferramenta interessante quando se pretende estudar a interface cognição/emoção, com maiores possibilidades de variações no esquema de treino e magnitude dos estímulos.

Antes de iniciarmos a discussão dos resultados referentes aos parâmetros neuroquímicos ressaltamos, como mencionado, que os valores de serotonina (5-HT) e de seu metabólito, o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) no hipocampo, apresentadas no presente trabalho, estão de acordo com os níveis encontrados por outros autores (Ponzio *et al.*, 1982; Oliveira-Silva *et al.*, 2007). A técnica de determinação das concentrações de 5-HT e 5-HIAA utilizada no presente estudo (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, ou *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) é método adequado para proceder tais medidas, já amplamente consolidado e utilizado por muitos autores (p.ex. Oliveira-Silva *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010; Castro-Neto *et al.*, 2013). No experimento de liberação de serotonina (5-HT) no hipocampo dos ratos submetidos aos testes comportamentais, por problemas técnicos, obtivemos um número insuficiente de dados referentes à 5-HT liberada. Durante a fase de ajustes das técnicas para a realização do experimento de liberação de 5-HT, consideramos dados prévios do laboratório sobre a preservação apropriada da 5-HT e do 5-HIAA nas amostras armazenadas no *freezer* -80°C , que poderia ser até 30 dias após seu congelamento. No entanto, devido a dificuldades práticas com relação ao uso do equipamento não

foi possível realizar as dosagens no tempo previsto. Esse fato, provavelmente resultou na degradação da 5-HT com impossibilidade de detecção desse composto em várias amostras. O mesmo não ocorreu com o 5-HIAA, que pôde ser detectado na grande maioria das amostras dos três grupos, permitindo o aproveitamento destes dados. Observou-se um efeito da idade sobre a concentração de 5-HIAA: (i) os animais idosos apresentaram maior concentração de 5-HIAA no extrato do meio extracelular hipocampal que os jovens em ambos os meios de incubação (Tyrode com concentração fisiológica de KCl, condição “normal”, $p=0.0003$; e Tyrode com concentração elevada de KCl, condição “despolarizante”, $p=0.003$), (ii) os animais adultos apresentaram maior concentração de 5-HIAA no extrato do meio extracelular hipocampal que os jovens quando o tecido foi incubado em Tyrode despolarizante ($p=0.0147$). Esses dados indicam que a idade interfere com os níveis de 5-HIAA no hipocampo – na condição estimulada ou não, como resultado de possíveis alterações em componentes do sistema serotoninérgico ou disfunções de outros sistemas neuroquímicos que modulam o sistema serotoninérgico hipocampal. Seria razoável supor que a idade promoveria alterações – diretas ou indiretas – sobre o sistema serotoninérgico as quais estariam relacionadas a ajustes metabólicos necessários para a manutenção da capacidade de o animal aprender a tarefa, desde que lhe fosse dado tempo suficiente. Para corroborar esta suposição, analisamos as correlações entre os níveis de 5-HIAA no extrato extracelular do hipocampo dos ratos idosos e seu desempenho nas sessões 2 e 3 da tarefa espacial no LB, exatamente o momento no qual se detectou um pior desempenho – efeito da idade – na fase de treino (aprendizagem) destes animais em relação aos jovens. Não encontramos correlação significativa positiva quando a unidade de medida do desempenho analisada foi a $DPer_{vel}$ (Tabela 2, em Anexos, pág. 128).

Ao contrário do que ocorre com a 5-HT e o 5-HIAA presentes nas amostras constituídas da solução de incubação recuperada no experimento de liberação de 5-HT, nosso grupo já havia observado que estas substâncias permanecem preservadas por muitos meses, sendo detectadas por *HPLC*, quando as amostras biológicas que as contém se constituem de *estruturas cerebrais* mantidas a -80°C . No experimento de determinação das concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo observamos uma tendência de os animais idosos apresentarem maior concentração de 5-HIAA hipocampal que os jovens ($p=0.066$). Foi observada correlação significativa entre os níveis de 5-HIAA total no hipocampo dos idosos e distância percorrida (cm) no treino (**Tabela 19, pág. 50**), especificamente na 3^a sessão (**Tabela 20, pág. 51**). Portanto, a idade afetou a cinética do processo de aprendizagem espacial e variações nos níveis de 5-HIAA parecem fazer parte do mecanismo neurobiológico responsável por essa alteração. Um aumento de 5-HIAA pode ser indicativo de uma tentativa – no caso dos idosos – de induzir um aumento da atividade do sistema serotoninérgico, demanda provavelmente necessária quando o indivíduo é colocado em

situações de desafio como na presença de estímulos aversivos para a execução de uma tarefa cognitiva. Apesar de não ter sido observado efeito significativo da idade sobre a taxa de renovação da serotonina (atividade serotoninérgica), observa-se (**Tabela 13, pág. 44**) que a atividade serotoninérgica no hipocampo dos animais idosos pode ser mais baixa. Os dados apresentados nessa tabela mostram que parece existir um padrão distinto do metabolismo da serotonina no hipocampo, que poderia refletir em atividades diferentes dependendo da idade. Com relação ao resultado obtido sobre o efeito da idade na concentração total de 5-HIAA no hipocampo, a literatura apresenta dados que corroboram e outros que contradizem esse achado. Alguns autores observaram níveis de 5-HIAA hipocampal aumentados (Luijtelaa *et al.*, 1992; Venero *et al.*, 1993) ou não alterados (Ponzio *et al.*, 1982; Gozlan *et al.*, 1990; Míguez *et al.*, 1999) com o envelhecimento, porém nunca reduzidos. Importante destacar, que destes estudos, aqueles que os autores utilizaram ratos Wistar com 24 meses de idade ou mais mostraram aumento dos níveis (conteúdo total) de 5-HIAA no hipocampo.

Como mencionado, o aumento dos níveis de 5-HIAA pode ser indicativo de que a rede neural esteja buscando compensar uma disfunção – induzida pelo envelhecimento – do sistema serotoninérgico ou de outro circuito neuroquímico que afeta indiretamente o sistema serotoninérgico. Nessa direção, o sistema procura aumentar a atividade serotoninérgica mantendo-a em um nível compatível capaz de responder desafios do meio, como por exemplo, durante a execução de uma tarefa cognitiva que envolve a presença de estímulos aversivos. Em parte isto parece ser alcançado, uma vez que os animais idosos são capazes de aprender a tarefa e durante fases importantes do processo de aquisição (3ª sessão) os níveis de 5-HIAA se correlacionam de forma significativa com o desempenho cognitivo dos animais idosos. Algumas das possíveis explicações de como a rede neural poderia manter níveis maiores de 5-HIAA hipocampal – para um aumento relativo da atividade serotoninérgica, ou seja degradação de 5-HT– em ratos idosos em relação aos ratos jovens poderia ser : (i) maior atividade da MAO-A em hipocampo de animais idosos; (ii) menor quantidade de transportadores de 5-HT (5HTT) em terminações serotoninérgicas hipocampais de animais idosos e/ou uma disfunção no mecanismo de liberação da 5-HT ligada a estes transportadores; (iii) redução da atividade de transporte do 5-HIAA para fora do cérebro em animais idosos; (iiii) diminuição dos níveis da “proteína citoplasmática ligante de 5-HT” (SBP: *serotonin binding protein*) e/ou disfunção no mecanismo de liberação da 5-HT pela SBP, o que poderia levar a uma elevação do catabolismo da 5-HT pela MAO. O envelhecimento parece se associar não ao aumento, mas à redução da atividade da MAO-A no hipocampo de ratos (Benedetti *et al.*, 1980; Venero *et al.*, 1993), o que torna essa hipótese menos provável. Com relação ao transportador, Hoekzema *et al.* (2011) mostraram o contrário, um aumento da quantidade de 5HTT hipocampal, talvez um acontecimento

posterior ao aumento das concentrações de 5-HIAA no hipocampo, estando de acordo com a ideia de que o sistema tenta compensar a baixa concentração de 5-HT, aumentando o seu metabolismo com a finalidade de aumentar a atividade do sistema. Quanto à possibilidade de o transporte do 5-HIAA para fora do cérebro dos roedores estar reduzido no envelhecimento, não encontramos dados na literatura a este respeito. Por fim, a hipótese que envolve a SBP também encontra-se em aberto, visto que não existem dados sobre o papel dessa proteína em possíveis disfunções relacionadas ao envelhecimento .

De fato, ainda há muitas dúvidas a respeito de como o fator idade impacta a atividade serotoninérgica refletindo no processo de aprendizagem, e como isto se articula com o diferente desempenho apresentado por indivíduos idosos durante uma fase específica do processo de aprendizagem em uma tarefa cognitiva espacial. Aqui deve-se considerar também a importância de componentes emocionais em tarefas que envolvem estímulos aversivos. Sabe-se que o sistema serotoninérgico está envolvido com o processamento de aspectos emocionais (Cools *et al*, 2008). Essa questão deve ser melhor explorada, por exemplo, analisando a dinâmica do processo de aprendizado considerando tanto aspectos cognitivos quanto emocionais. Nesse sentido, como anteriormente mencionado, o LB pode ser um instrumento interessante para explorar os mecanismos básicos da interface entre esses sistemas, principalmente se o modelo for com indivíduos idosos. Assumindo o envelhecimento como processo associado a alterações neurodegenerativas, é possível compreender algumas alterações neuroquímicas que lhe são características também através de sua comparação com outros processos neurodegenerativos. Vigil *et al.* (2010) testaram ratos Wistar jovens com deficiência de tiamina no labirinto aquático de Morris (LAM) e observaram efeito significativo da idade sobre as concentrações teciduais de 5-HIAA no tálamo dos animais portadores da deficiência quando comparados aos animais controle. Os animais deficientes apresentaram uma curva de aprendizagem com perfil muito semelhante à do presente estudo, e houve uma correlação positiva entre seu pior desempenho na 3ª sessão do LAM com o conteúdo total de 5-HIAA no tálamo destes animais. As fibras serotoninérgicas aferentes do tálamo de animais jovens, diante do agravo promovido pela deficiência de tiamina, e sob o contexto de aprendizagem em uma tarefa de navegação espacial, apresentaram alteração neuroquímica semelhante às fibras serotoninérgicas aferentes do hipocampo de animais idosos, submetidos a uma tarefa equivalente. Sem desconsiderar as diferenças dos dois processos neurodegenerativos – um, decorrente de uma condição anormal, e outro, consequência de um processo fisiológico – é atraente a concepção da ideia de o sistema serotoninérgico sofrer alterações adaptativas integrantes de um rearranjo do substrato neurobiológico necessário para a manutenção da eficiência do aprendizado espacial. Esses dados reforçam a ideia de que ajustes neuroquímicos podem acontecer no hipocampo, na tentativa de compensar disfunções

resultantes do processo neurodegenerativo independente de sua etiologia, que afetam aspectos cognitivos espaciais importantes para a sobrevivência do animal.

A despeito da ocorrência ou não de um processo neurodegenerativo, uma forma de confirmar a hipótese de que o sistema serotoninérgico hipocampal se ajusta às demandas específicas que o envelhecimento confere ao processo de aprendizagem em uma tarefa cognitiva espacial, constituindo um dos componentes que desempenham papel importante nesse processo, seria interessante coletar amostras biológicas *in vivo*, durante a execução da tarefa. O fato de a execução dos procedimentos experimentais para a determinação dos níveis de 5-HT e 5-HIAA terem ocorrido após a realização dos testes comportamentais, por meio do sacrifício dos animais, representa um obstáculo para a detecção das correlações entre esses parâmetros e o desempenho cognitivo. Principalmente se consideramos, conforme indicam os dados do presente estudo, que deve existir uma dinâmica de eventos neurobiológicos com demandas específicas dependendo da fase do processo de aprendizagem. Nesse sentido, a microdiálise abre uma perspectiva atraente. Ela permite a coleta de material representativo do meio extracelular hipocampal durante a execução dos testes comportamentais, assim viabilizando o acompanhamento das flutuações que ocorrem *in vivo* entre as alterações neuroquímicas e os aspectos do processo de aquisição da tarefa cognitiva. Em um experimento em tempo real, onde a coleta do material para as determinações neuroquímicas são efetuadas no momento em que as alterações comportamentais ocorrem, o horizonte de análises das associações torna-se mais rico. Nosso grupo em colaboração com outros autores mostrou, utilizando técnica de microdiálise, que durante a execução de uma tarefa espacial – solução de um problema cognitivo espacial – ocorre um aumento da liberação de acetilcolina na região hipocampal (Savage *et al.*, 2003). Como existe uma interação entre os sistemas colinérgico e serotoninérgico no hipocampo, os resultados do presente estudo relativo aos idosos, nos permite supor que uma demanda cognitiva poderia lançar mão de componentes serotoninérgicos com a finalidade de resolver a tarefa.

Ainda projetando perspectivas para superar as questões levantadas pelo presente trabalho, há que se considerar maneiras de entender como a variabilidade entre os indivíduos idosos, característica marcante e aparentemente mais intensa neste grupo do que em indivíduos mais novos (Wilson *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2004), interfere nos parâmetros comportamentais e neuroquímicos. O fator variabilidade, além de outros já discutidos no presente trabalho, pode justificar a ausência da detecção de efeito da idade sobre a PQA no 1º min do teste comportatório, sobre os deltas 2 da distância percorrida na fase do treino, e sobre as concentrações totais de 5-HT e 5-HIAA (além da taxa de renovação da 5-HT). Usando-se um maior número de animais idosos, poderemos responder essas questões minimizando-se o efeito da variabilidade. Ou melhor, com um

maior número de animais no grupo idoso seria possível identificar subgrupos baseados em critérios comportamentais e/ou neurobiológico permitindo a constituição de grupos com certa homogeneidade na distribuição de algumas características e, assim detectar e estudar melhor o efeito da idade sobre os referidos parâmetros dentro de um ou mais subgrupos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS – CONCLUSÕES

A pesquisa em área básica que busca compreender a neurobiologia do envelhecimento sem o uso de técnicas que, por uma ação não fisiológica e deletéria possam alterar o processo em si, tem se valido de alternativas menos invasivas e mais próximas do tempo real em que os processos metabólicos acontecem.

O Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LANEC) segue uma instigante pista percebida em trabalhos desenvolvidos por seus integrantes, dentro da área da neurodegeneração: uma alteração serotoninérgica comum em modelos experimentais diferentes (com ou sem insulto ao sistema nervoso central), que ocorre em uma fase intermediária do processo de aprendizagem espacial, se correlacionando ao pior desempenho apresentado neste momento do processo, que parece crítico para a aquisição de informação e formação de uma memória (Oliveira-Silva, *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010; Vigil *et al.*, 2010). Até o presente momento a experiência do LANEK neste sentido ocorreu utilizando o labirinto aquático de Morris (LAM), e ratos com menos de 24 meses de idade. Com o presente trabalho, padronizamos as técnicas dos testes comportamentais utilizando o labirinto de Barnes (LB), alternativa ao LAM, com muitos aspectos favoráveis à sua aplicação em estudos a respeito dos efeitos do envelhecimento sobre a cognição espacial. Também utilizamos maior número de faixas etárias (três grupos, constituídos por ratos com 3, 9 e 24 meses de idade), para configurar melhor o processo de envelhecimento.

O presente trabalho apresentou dados a respeito do impacto que o envelhecimento promove sobre o processo de aprendizagem e memória de ratos Wistar em testes comportamentais que envolvem uma tarefa de navegação espacial no LB. Também mostrou o efeito da idade sobre o sistema serotoninérgico no hipocampo destes animais, focando as relações entre os parâmetros comportamentais e neuroquímicos. O principal resultado que encontramos foi a correlação entre uma alteração específica na cinética do processo de aprendizagem apresentada pelos animais idosos e alterações do sistema serotoninérgico no hipocampo destes animais, nos fazendo levantar a hipótese de que o sistema serotoninérgico de roedores idosos sofre ajustes que integram os prováveis mecanismos moleculares responsáveis pela manutenção da capacidade dos idosos aprenderem a tarefa espacial. Uma conclusão importante gerada dos dados obtidos nesse estudo é a existência de uma etapa crítica do processo de aquisição que parece mais susceptível aos efeitos da idade. Além disto, sugere-se que a repetição de uma tarefa cognitiva espacial pode favorecer a aquisição, mesmo que o indivíduo seja idoso e apresente algum grau de deficiência na cinética do processo de aprendizagem. Outra conclusão interessante a ser confirmada em estudos posteriores é que a ausência de flexibilidade comportamental em tarefas espaciais executadas por indivíduos idosos não

reside apenas no fato dos indivíduos não recuperarem a informação sobre as características do reforço positivo anteriormente apresentado, já que os adultos parecem ter recuperado a informação (similar aos jovens), mas não foram capazes de extingui-la quando a mesma deixou de ser reforçada.

Ainda uma outra conclusão é que o sistema serotoninérgico – no caso o parâmetro 5-HIAA - parece desempenhar um papel importante como componente de processos modulatórios de substratos neurobiológicos associados com a aquisição de uma tarefa cognitiva espacial.

A expectativa que existe na população sobre a pesquisa científica para a descoberta de um potencializador cognitivo (*cognitive enhancer*) para idosos saudáveis, ou um medicamento para o tratamento de doenças que comprometem a cognição, como a doença de Alzheimer, motiva o foco no potencial que existe de o sistema serotoninérgico ser fonte promissora de respostas para esta demanda. Em 2011 Wallace e colaboradores levantaram estudos em andamento com agonistas e antagonistas de receptores serotoninérgicos para o tratamento da doença de Alzheimer e outras moléstias neuropsiquiátricas. Havia na época 5 moléculas em fase I e outras 5 em fase II da pesquisa clínica para o desenvolvimento de novos fármacos (todos atuantes em receptores 5-HT_{1A} ou 5-HT₆). Também em 2011, Cirrito e colaboradores observaram em estudo com camundongos transgênicos em tratamento crônico com citalopram, um inibidor seletivo da receptação de serotonina, que a atividade do sistema serotoninérgico estava associada a concentrações cerebrais mais baixas de beta-amilóide e placas senis, sugerindo um possível efeito neuroprotetor de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, contra a deposição anormal de beta-amilóide e a formação de placas senis. Por outro lado, em 2014, Porsteinsson e colaboradores, em estudo randomizado, placebo-controlado, duplo-cego, com 186 portadores da doença de Alzheimer tratados cronicamente com citalopram (30mg/dia) observaram piora cognitiva significativa, apesar de significativa melhora do quadro de agitação, objetivo principal do trabalho. A compreensão do funcionamento de partes da rede neural é a estratégia corrente mais frequente, visto que os recursos tecnológicos da atualidade não contemplam a abordagem simultânea de todos os sistemas neuroquímicos conhecidos. Deve-se considerar que em determinados procedimentos experimentais que isolam componentes da rede, o comportamento observado de uma ou mais partes não seja o mesmo de quando a rede funciona em sua integridade. Ainda assim, não se pode desconsiderar a valiosa contribuição que estudos que abordam aspectos específicos da rede neural têm trazido para a ciência.

Por fim, o presente estudo responde relativamente pouco, mas abre uma série de questões e perspectivas de estudos futuros, sinalizando os vários pontos obscuros que persistem sobre os efeitos da idade e a relação entre a atividade serotoninérgica e aspectos específicos dos processos de aprendizagem e memória.

8. PERSPECTIVAS

O desenvolvimento do presente trabalho gerou, ademais das respostas aos objetivos propostos, outras questões, as quais foram surgindo à medida que os resultados foram sendo obtidos. A seguir algumas delas estão elencadas, apresentadas como perspectivas para futuros estudos:

- antes do início do presente estudo, na fase de planejamento e escolha das técnicas necessárias para o desenvolvimento do trabalho, estivemos por uma semana em treinamento sobre as técnicas de microdiálise, no laboratório de Psicofarmacologia da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, sob a orientação do Prof. Marcos Brandão, e de sua aluna de pós-doutorado, Milene Cristina de Carvalho. Planejavamos viabilizar a conjugação da microdiálise ao labirinto de Barnes, mas não houve tempo suficiente, dentro do projeto de mestrado que resultou no presente trabalho, para realizar este feito. Assim, permaneceu em aberto a perspectiva de se estudar o efeito do envelhecimento sobre: (i) a liberação *in vivo* de 5-HT no hipocampo de ratos enquanto executam a tarefa espacial no labirinto de Barnes (LB), utilizando a técnica de microdiálise;
- o resultado da alteração na cinética do processo de aquisição da informação, verificado nos animais idosos, na fase intermediária do treino no LB, revela uma perspectiva de trabalho com pessoas idosas, tanto investigativo, quanto de reabilitação. É possível criar esquemas de tarefas que reforcem o aprendizado em idosos, com base no entendimento dos mecanismos básicos, moleculares e comportamentais, que suportam estas alterações da cinética do processo de aprendizagem promovidas pelo envelhecimento. Por exemplo, modulando a frequência e a intensidade dos estímulos, aplicando-os nos momento críticos onde parece haver uma disfunção relacionada ao pior desempenho dos idosos em tarefas cognitivas.
- as variáveis que utilizamos no presente estudo (deltas e razões da distância percorrida na primeira tentativa de uma sessão e na última tentativa da sessão anterior) não conseguiram detectar a alteração da cinética do processo de aprendizagem espacial observada nos animais idosos, em relação aos adultos e jovens. Com o intuito de aumentar a resolução para visualizar melhor esses aspectos e efeito da idade, sugerimos alterar o esquema do treino, como por exemplo, elevar o grau de dificuldade para a aquisição, consolidação e manutenção da informação espacial através do aumento do tempo de intervalo entre as sessões (para mais de 24h, talvez até mais, a depender dos objetivos estabelecidos);

- no presente trabalho, para a análise da memória e da flexibilidade comportamental, componentes relacionados ao teste comprobatório, utilizamos a preferência pelo quadrante alvo no 1^o min (PQA_{10 min}) e o índice de extinção (IE), respectivamente. Não observamos efeito da idade sobre estes dois parâmetros comportamentais. No entanto, o perfil dos dados apontam para um possível efeito da idade sobre esses parâmetros. Uma alternativa é aumentarmos o tamanho do grupo idoso, com vistas a aumentar a probabilidade de identificarmos subgrupos de animais, com uma maior homogeneidade da variabilidade de seus integrantes, permitindo utilizar técnicas de “clusterização”.
- o interesse em compreender as relações entre o processo de envelhecimento e o processo de aprendizagem e memória e a flexibilidade comportamental, com ênfase nos fundamentos biológicos e em mecanismos moleculares trouxe a perspectiva de estudar em humanos saudáveis os estados de prejuízo mnemônico associados à idade (estados clínicos que existem em idosos saudáveis, caracterizados por declínio de memória sem aparente prejuízo funcional) e a flexibilidade comportamental, com técnicas de neuroimagem (p.ex. PET *scan* ou ressonância magnética funcional);
- os dados obtidos no presente estudo a respeito do efeito da idade sobre as concentrações de 5-HIAA no extrato extracelular do hipocampo em condição estimulada ou não e sobre as concentrações teciduais (conteúdo total) de 5-HIAA no hipocampo apontam duas perspectivas: estudar como se encontra a atividade do transporte do 5-HIAA para fora do cérebro nos animais idosos; e estudar os níveis e o estado funcional da proteína ligante de serotonina (*serotonina binding protein*– SBP) no hipocampo de animais idosos submetidos ou não à tarefa cognitiva espacial no LB;
- o envelhecimento, além do declínio cognitivo que com frequência nele ocorre, pode também ser acompanhado por redução da capacidade de enfrentamento e por menor motivação, fatores de confundimento nos estudos dos aspectos cognitivos em tarefas que exigem atividade motora e/ou que envolvem desafios de natureza emocional. Os fundamentos biológicos e as bases moleculares do comportamento de enfrentamento e da motivação em animais idosos permanecem pouco estudados, e são perspectivas tangíveis, inclusive utilizando paradigmas espaciais, dentre eles o LB.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahams, S., Pickering, A., Polkey, C.E. e Morris, R.G. (1996). Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia*, 35(1):11-24.
- Astur, R.S., Taylor, L.B., Mamelak, A.N., Philpott, L., Sutherland, R.J. (2002). Humans with hippocampus damage display severe spatial memory impairments in a virtual Morris water task. *Behavioural Brain Research*, 132:77-84.
- Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. In K. W, Spence & J. T. Spence (Eds.), *The psychology of learning and motivation*. Vol.1. London: Academic Press.
- Bach, M.E., Barad, M., Son, H., Zhuo, M., Lu, Y.F., Shih, R., Mansuy, I., Hawkins, R.D., Kandel, E.R. (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 96, 5280-5285.
- Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp. Physiol. Psychol.*, 93:74-104.
- Bartlett, F.C. (1932). *Remembering: a study in Experimental and Social Psychology*. (Cambridge University Press), New York.
- Barret, G.L., Bennie, A., Trieu, J., Ping, S., Tsafoulis, C. (2009). The chronology of age-related spatial learning impairment in two rat strains, as tested by the *Barnes* maze. *Behavioral Neuroscience*, 123(3):533-538.
- Bennedetti, M.S., Keane, P.E. (1980). Differential changes in monoamine oxidase A and B activity in the aging rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 35(issue 5):1.026-1.032.
- Bertrand, P.P., Bertrand, R.L. (2010). Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci.*, 153:47-57.
- Bevilaqua, L.R.M., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Myskiw, J.C., Clarke, J.R., Monteiro, S., Lima, R.H., Medina, J.H., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2008). The role of the entorhinal cortex in extinction: influences of aging. *Neural Plasticity*, ID 595282, 8 pages, doi:10.1155/2008/595282.
- Blokland, A., Raaijmakers, W. (1993). Age-related changes in correlation between behavioral and biochemical parameters in Lewis rats. *Behavioral and Neural Biology*, 60:52-61.
- Brennan, P.L., Holland, J.M., Schutte, K.K., Moos, R.H. (2012). Coping trajectories in later life: a 20-year predictive study. *Aging Mental Health*, 16(3):305-316.

- Carvajal, F. J., Inestrosa, N.C. (2011). Interactions of AChE with A β aggregates in Alzheimer's brain: therapeutic relevance of IDN 5706. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4:19. Epub 2011 Sep 14
- Castro-Neto, E.F., Cunha, R.H., Silveira, D.X., Yonamine, M., Gouveia, T.L.F., Cavalheiro, E.A., Amado, D., Naffah-Mazzacoratti, M.G. (2013). Changes in aminoacidergic and monoaminergic neurotransmission in the hippocampus and amygdala of rats after ayahuasca ingestion. *World Journal of Biological Chemistry*, 4(4):141-147.
- Chaimowicz, F. (1998). *Os idosos brasileiros no século XXI*. (Postgraduate Ed), Belo Horizonte.
- Charnay, Y., Léger, L. (2010). Brain serotonergic circuitries. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(4), 471-487
- Cirrito, J. R., Disabato, B. M., Restivo, J. L., Verges, D. K., Goebel, W. D., Sathyan, A., Hayreh, D., D'Angelo, G., Benzinger, T., Yoon, H., Kim, J., Morris, J. C., Mintun, M. A., Sheline, Y. I. (2011). Serotonin signaling is associated with lower amyloid- β levels and plaques in transgenic mice and humans. *PNAS*, 108(36):14.968-14.973.
- Cools, R., Roberts, A.C., Robbins, T.W. (2008). Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends in Cognitive Sciences*, 12:31-40.
- Costa-Aze, V.D., Dauphin, F., Boulouard, M. (2011). Serotonin 5-HT₆ receptor blockade reverses the age-related deficits of recognition memory and working memory in mice. *Behavioural Brain Research*; doi:10.1016/j.bbr.2011.03.046.
- Deneris, E.S. e Wyler, S.C. (2012). Serotonergic transcriptional networks and potencial importance to mental health. *Nature Neuroscience* 15, 519-527; doi:10.1038/nn.3039.
- Ebbinghaus, H. (1913). *Memory: a contribution to Experimental Psychology*. (Teachers College, Columbia University), New York.
- Efron, B., e R. Tibshirani. (1993). *An Introduction to the Bootstrap*. (Chapman & Hall, Ed.), Washington DC.
- Fitzmaurice, G.M., Laird, N.M., e Ware, J.H.. (2011). *Applied Longitudinal Analysis*. (John Wiley & Sons Ed.), New Jersey.
- Gallagher, M., Burwell, R., Burchinal, M. (1993). Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience*, 107(4):618-626.
- Gallagher, M., Rapp, P.R. (1997). The use of animal models to study the effects of aging on cognition. *Annual Review of Psychology*, 48:339-70.

- Gozlan, H., Daval, G., Verge, D., Spampinato, U., Fattaccini, C.M., Gallissot, M.C., El Mestikawy, S., Hamon, M. (1990). Aging associated changes in serotonergic and dopaminergic pre- and postsynaptic neurochemical markers in the rat brain. *Neurobiology of Aging*, 11:437-449.
- Harlan, Inc. Sprague-Dawley growth chart. Disponível em: <http://www.harlan.com/strain%20details/rats/sd.html>. Acesso em: 12 dez, 2013
- Harrison, F.E., Reiserer, R.S., Tomarken, A.J., McDonald, M.P (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & Memory*, 13:809-819
- Harrison, F.E., Hosseini, A.H., McDonald, M.P. (2009). Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*, 198:247-251.
- Heo, S., Patil, S.S., Jung, G., Hooger, H., Lubec, G. (2011). A serotonin receptor 1A containing complex in hippocampus of PWD/PhJ mice is linked to training effects in the Barnes maze. *Behavioural Brain Research*, 216: 389-395.
- Herregodts, P., Velkeniers, B., Ebinger, G., Michotte, Y., Vanhaelst, L., Hooghe-Peters, E. (1990). Development of monoaminergic neurotransmitters in fetal and postnatal rat brain: analysis by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Neurochemistry*, 55:774-779.
- Hirst, W.D., Stean, T.O., Rogers, D.C., Sunter, D., Pugh, P., Moss, S.F., Bromidge, S.M., Riley, G., Smith, D.R., Bartlett, S., Heidbreder, C.A., Atkins, A.R., Lacroix, L.P., Dawson, L.A., Foley, A.G., Regan, C.M., Upton, N. (2006). SB-399885 is a potent, selective 5-HT₆ receptor antagonist with cognitive enhancing properties in aged rat water maze and novel object recognition models. *European J. of Pharmacology*, 553:109-119.
- Hoekzema, E., Rojas, S., Herance, R., Pareto, D., Abad, S., Jiménez, X., Figueiras, F.P., Popota, F., Ruiz, A., Flotats, N., Fernández, F.J., Rocha, M., Rovira, M., Víctor, V.M., Gisbert, J.D. (2011). [¹¹C]-DASB microPET imaging in the aged rat: frontal and meso-thalamic increases in serotonin transporter binding. *Experimental Gerontology*, 46:1020-1025.
- Hollander, M. e Wolfe, D.A. (1999). *Nonparametric Statistical Methods*. (John Wiley & Sons Ed.), New York.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 65–70.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., Hudspeth, A.J. (2013). *Principles of Neural Science*. (McGraw-Hill Ed.), New York.
- Kennard, J.A. e Woodruff-Pak, D.S. (2011). Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging in mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 3(issue May):1-22.
- King, M.V., Marsden, C.A., Fone, K.C.F. (2008). A role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(9):484-492.

- Kramer, A.F, Bherer, L., Colcombe, S.J., Dong, W., Greenough, W.T. (2004). Environmental influences on cognitive and brain plasticity during aging. *Journal of Gerontology Biological Sciences and Medical Sciences*, 59(9):M940-57.
- Krause, M., Yang, Z., Rao, G., Houston, F.P., Barnes, C.A. (2008). Altered dendritic integration in hippocampal granulate cells of spatial learning-impaired aged rats. *J Neurophysiol*, Jun; 99(6):2769-78.
- Kuçuk, A., Golgeli, A., Saraymen, R., Koç, N. (2008). Effects of age and anxiety on learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 195: 147-152.
- Lesurtel, M., Soll, C., Graf, R., Clavien, P.A. (2008). Role of serotonin in the hepatogastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci.*, 65:940-952.
- Liang, K.Y., Zeger, S.L. (1986). Data Analysis using generalized linear models. *Biometrika*, 73(1):13-22.
- van Luijtelaar, M.G.P.A., Tonnaer, J.A.D.M. e Steinbusch, H.W.M. (1992). Aging of the serotonergic system in the rat forebrain: an immunocytochemical and neurochemical study. *Neurobiology of Aging*, 13:201-215
- McCullagh, P. e Nelder, J.A. (1989). *Generalized Linear Models*. (Chapman and Hall/CRC Ed.), Londres.
- MacLay, R.N., Freeman, S.M., Zadina, J.E. (1998). Chronic corticosterone impair memory performance in the Barnes maze. *Physiology & Behavior*, vol 63, no 5, pp. 933-937
- MacLay, R.N., Freeman, S.M., Harlan, R.E., Kastin, A.J., Zadina, J.E. (1999). Tests used to assess the cognitive abilities of aged rats: their relation to each other and to hippocampal morphology and neurotrophin expression. *Gerontology*, 45:143-155.
- Matthes, S., Mosienko, V., Bashammakh, S., Alenina, N., Bader, M. (2010). Tryptophan hydroxylase as novel target for the treatment of depressive disorders. *Pharmacology*, 85:95-109
- Míguez, J.M., Aldegunde, M., Paz-Valiñas, L., Recio, J., Sánchez-Barceló, E. (1999). Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. *Journal of Neural Transmission*, 106:1089-1098.
- Miyagawa, H., Hasegawa, M., Fujuta, T., Amano, M., Yamada, K., Nabeshima, T. (1998). Dissociation of impairment between spatial memory, and motor function and emotional behavior in aged rats. *Behavioural Brain Research*, 91(1-2):73-81.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868):681-3.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11:47-60.

- Moscovitch, M., Rosenbaum, R.S., Gilboa, A., Addis, D.R., Westmacott, R., Grady, C., McAndrews, M.P., Levine, B., Black, S., Winocur, G., Nadel, L. (2005). Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*, 207:35-66.
- Muller, B.R. e Bale, T. L. (2007). Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. *Physiology & Behavior*, 91:55-65.
- Nadel, L. e Hardt, O. (2011). Update on memory systems and processes. *Neuropsychopharmacology*, 36:251-273.
- O'Keefe, J., Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Behavioral Research*, 34:171-175.
- Oliveira-Silva, I.F. *Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em modelo experimental animal e estudo de mecanismos de neurodegeneração em cultura celular*. 2011. Tese (Doutorado em Anatomia Patológica e Medicina Legal) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- Oliveira-Silva, I.F., Pinto, L., Pereira, S.R., Ferraz, V.P., Barbosa, A.J., Coelho, V.A., Gualberto, F.F., Souza, V.F., Faleiro, R.R., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. (2007). Age-related déficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: correlation between 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. *Behavioural Brain Research*, 180: 226-234
- Oliveira, L., Graeff, F.G., Pereira, S.R., Oliveira-Silva, I.F., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. (2010). Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. *Age, Jun*; 32(2):187-96
- Olton, D.S., Becker, J.T., Handelmann, G.E. (1979). Hippocampus, space and memory. *Behavioral Brain Sciences*, 2:313–65.
- Papaléo Netto. (2011). O estudo da velhice: histórico, definição do campo e termos básicos. In: Freitas, Py, Cançado, Doll, Gorzoni. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. (Guanabara Koogan Ed.), Rio de Janeiro, pp. 3-13.
- Pass, D. e Freeth, G. (1993). The rat. *Anzccart News*, 6:1-4.
- Paul, C.-M., Magda, G., Abel, S. (2009). Spatial memory: theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203:151-164.
- Ponzio, F., Calderini, G., Lomuscio, G., Vantini, G. Toffano, G., Algeri, S. (1982). Changes in monoamines and their metabolite levels in some brain regions of aged rats. *Neurobiology of aging*, 3:23-29.

- Porsteinsson, A.P., Drye, L.T., Pollock, B.G., Devanand, D.P., Frangakis, C., Ismail, Z., Marano, C., Meinert, C.L., Mintzer, J.E., Munro, C.A., Pelton, G., Rabins, P.V., Rosenberg, P.B., Schneider, L.S., Shade, D.M., Weintraub, D.W., Yesavage, J., Lyketsos, C.G. (2014). Effect of citalopram on agitation in Alzheimer disease: the CitAD randomized clinical trial. *Journal of the American Medical Association*, 311(7):682-691.
- Ramscar, M., Hendrix, P., Shaoul, C., Milin, P., Baayen, H. (2014). The myth of cognitive decline: non-linear dynamics of lifelong learning. *Topics in Cognitive Science*, 6:5-42.
- Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. Neurobiol.*, 69, 143–179.
- Savage, L.M., Chang, Q., Gold, P.E. (2003). Diencephalic damage decreases hippocampal acetylcholine release during spontaneous alternation testing. *Learning & Memory*, 10:242-6
- Schneider-Rivas, S., Rivas-Arancibia, S., Vazquez-Pereyra, F., Vázquez-Sandoval, R. e Borgonio-Pérez, G. (1995). *Modulation of long-term memory and extinction responses induced by growth hormone (GH) and growth hormone releasing hormone (GHRH) in rats*. *Life Sciences*, 56 (22):PL433-PL441
- Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A., Mora, F. (2001). Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122: 1-29.
- Sengupta, P. (2011). A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age ? *Biomedicine international*, 2:81-89.
- Sirek, A., Sirek, O.V. (1970). Serotonin: a review. *Can Med Assoc J*, 102:846-849).
- Stahl, S.M. (2010). *Psicofarmacologia – Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas*, (Guanabara Koogan Ed.): Rio de Janeiro, p.230
- Sternberg, E.M, Glowa, J.R., Smith, M.A., Calogero, A.E., Listwak, S.J., Aksentijevich, S., Chrousos, G.P., Wilder, R.L., Gold, P.W. (1992). Corticotropin releasing hormone related behavioral and neuroendocrine responses to stress in Lewis and Fischer rats. *Brain Research*, 570 (1-2):54-60.
- Tolman EC. (1948). Cognitive maps in rats and men *Psychology Review*, 55:189–208.
- Van't Veer-Tazelaar, P.J., Cuijpers, Beekman, A.J. (2011). Prevention of depression and anxiety in older people. *Tijdschrift voor Psychiatrie* 53(9):579-584.
- Venero, J.L., de la Roza, C., Machado, A., Cano, J. (1993). Age-related changes on monoamine turnover in hippocampus of rats. *Brain Research*, 631:89-96.
- Vigil, F.A.B., Oliveira-Silva, I.F., Ferreira, L.F., Pereira, S.R.C., Ribeiro, A.M. (2010). Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behavioural Brain Research*, 140-142.

- Wallace, T.L., Ballard, T.M., Pouzet, B., Riedel, W.J., Wettstein, J.G. Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders. (2011). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 99:130-145.
- Wilson, R.S., Beckett, L.A., Barnes, L.L., Schneider, J.A., Bach, J., Evans, D.A., Bennett, D.A. (2002). Individual differences in rates of change in cognitive abilities of older persons. *Psychology and Aging*, 17(issue 2):179-193.
- Winocur, G., Sekeres, M.J. Binns, M.A. e Moscovitch, M. (2013). Hippocampal lesions produce both nongraded and temporally graded retrograde amnesia in the same rat. *Hippocampus*, 23:330-341.
- Zar, J.H. (1998). *Biostatistical Analysis* . (Prentice Hall Ed.), Upper Saddle River, New Jersey.

10. ANEXOS

Tabela 1 – [5-HIAA] no meio extracelular dos hipocampus incubados em condição normal ou despolarizante: valores “p” obtidos por meio do método das Comparações Múltiplas de Nemenyi entre os grupos.

Comparações Múltiplas	5-HIAA	5-HIAA
	(Normal)	(Despolarizante)
Adulto - Idoso	0,1814	0,9226
Jovem - Idoso	0,0003	0,0033
Jovem - Adulto	0,1490	0,0147

Tabela 2 – Resultados dos testes estatísticos – valor do fator de correlação (r) de Spearman: [5-HIAA] no meio extracelular do hipocampo incubado em solução normal ou despolarizante versus DISTÂNCIA PERCORRIDA na 3ª sessão do treino no LB.

Grupo	Sessão	5-HIAA (Normal)		5-HIAA (Despolar.)	
		r	valor-p	r	valor-p
Idoso	Sessão=1	0,041	0,769	-0,227	0,095
	Sessão=2	0,145	0,290	0,137	0,319
	Sessão=3	0,222	0,104	-0,155	0,257
	Sessão=4	-0,068	0,621	-0,069	0,618
Adulto	Sessão=1	-0,082	0,592	-0,053	0,713
	Sessão=2	0,279	0,063	-0,016	0,914
	Sessão=3	0,262	0,082	-0,216	0,131
	Sessão=4	0,084	0,586	-0,172	0,234
Jovem	Sessão=1	0,133	0,385	-0,263	0,081
	Sessão=2	0,080	0,601	-0,266	0,077
	Sessão=3	-0,174	0,254	-0,047	0,759
	Sessão=4	-0,066	0,665	0,009	0,955

Parâmetros comportamentais (dist. percorrida na 3ª sessão do treino no LB): dados não ajustados pelo fator velocidade.

Não houve correlações significativas entre os parâmetros comportamentais e os parâmetros neuroquímicos (destaque em azul para grupo idoso)

Grupos idoso (n=11, meios normal e despolarizante), adulto (n=9, meio normal; n=10, meio despolarizante), e jovem (n=9, meios normal e despolarizante).

Tabela 3 – Medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para comparações entre os três grupos (Idoso, Adulto e Jovem) com relação à memória expressa como deltas das LATÊNCIAS (diferenças entre a primeira tentativa de uma sessão e a última da sessão anterior): D1, D2 e D3 , durante o treino, com e sem ajuste da função modular*.

	Fonte	N	Média	E.P.	1ªQ	2ªQ	3ªQ	Valor-P	
D1	Idoso	11	2,82	22,05	-21,50	9,00	25,00	0,670	
	Sem Módulo Adulto	10	-12,60	20,11	-64,00	-6,00	3,00		
	Jovem	10	-0,10	28,52	-16,00	-4,50	32,00		
	Com Módulo	Idoso	11	49,55	15,55	16,50	25,00	66,50	0,839
		Adulto	10	48,20	12,80	3,00	63,50	80,00	
		Jovem	10	61,10	19,96	12,00	24,50	120,00	
D2	Idoso	11	51,64	20,48	-6,00	26,00	116,00	0,286	
	Sem Módulo Adulto	10	0,60	4,19	-7,00	-2,00	9,00		
	Jovem	10	-0,30	6,95	-7,00	-3,00	4,00		
	Com Módulo	Idoso	11	60,18	18,00	11,00	26,00	116,00	0,068
		Adulto	10	9,80	2,63	3,00	8,00	11,00	
		Jovem	10	13,30	5,35	3,00	5,50	21,00	
D3	Idoso	11	16,73	19,27	-17,00	1,00	29,50	0,284	
	Sem Módulo Adulto	10	-10,90	5,12	-19,00	-5,00	2,00		
	Jovem	10	2,10	4,63	-2,00	2,50	8,00		
	Com Módulo	Idoso	11	43,45	14,50	6,50	29,00	55,50	0,136
		Adulto	10	13,30	4,45	2,00	7,00	19,00	
		Jovem	10	9,50	3,45	2,00	4,50	10,00	

$$D_1 = T1_{sess\tilde{a}o2} - T5_{sess\tilde{a}o1}$$

$$D_2 = T1_{sess\tilde{a}o3} - T5_{sess\tilde{a}o2}$$

$$D_3 = T1_{sess\tilde{a}o4} - T5_{sess\tilde{a}o3}$$

* Tratamento matemático com função modular, que considera um número real sempre positivo ou nulo.

Tabela 4 - Efeito dos grupos, das sessões e da interação entre grupos e sessões sobre o desempenho no treino, expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA (DPer): dados da análise estatística das médias da DPer por meio do método de Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear.

Fonte	G.L	χ^2	Valor-p
Grupo	2	6,90	0,032
Sessão	3	130,8	<0,001
Grupo*Sessão	6	34,20	<0,001

Grupos idoso (n=11 ratos), adulto (n=10 ratos), jovem (n=10 ratos).

Treino no labirinto de Barnes: composto por 4 sessões consecutivas (1 sessão por dia), cada sessão composta por 5 tentativas consecutivas.

Tabela 5 – Dados da Análise Estatística pelo Modelo Marginal Log-Linear para o desempenho dos animais expresso em DISTÂNCIA PERCORRIDA durante o treino, considerando a variável VELOCIDADE DE DESLOCAMENTO, além da idade (grupo) e sessão.

Fonte	G.L	X ²	Valor-p
Velocidade	1	2,9	0,089
Grupo	2	6,7	0,035
Sessão	3	111,7	<0,001
Grupo*Sessão	6	30,0	<0,001

Tabela 6 – DISTÂNCIA PERCORRIDA (cm) durante o treino no labirinto de Barnes: medidas descritivas estratificadas por sessões, grupos e para interação entre grupos e sessões.

Fonte	N	Média	E.P.	1ºQ	2ºQ	3ºQ	
Sessões	1	155	1493,0	89,5	564,0	1255,0	2136,0
	2	155	742,0	61,7	269,0	564,0	827,0
	3	155	601,0	46,2	209,0	438,0	699,0
	4	155	434,0	33,3	151,0	286,0	559,0
Grupos	Idoso	220	915,0	55,5	341,0	653,0	1187,0
	Adulto	200	702,0	44,4	262,0	532,0	864,0
	Jovem	200	826,0	75,9	166,0	370,0	822,0
Grupos (Sessão=1)	Idoso	55	1302,0	118,9	543,0	1030,0	2101,0
	Adulto	50	1279,0	119,6	610,0	1113,0	1788,0
	Jovem	50	1918,0	202,8	594,0	1766,0	2896,0
Grupos (Sessão=2)	Idoso	55	903,0	130,1	318,0	651,0	885,0
	Adulto	50	615,0	58,2	302,0	536,0	808,0
	Jovem	50	692,0	110,3	223,0	485,0	806,0
Grupos (Sessão=3)	Idoso	55	886,0	98,4	373,0	631,0	1221,0
	Adulto	50	477,0	42,1	225,0	409,0	670,0
	Jovem	50	412,0	66,7	136,0	218,0	502,0
Grupos (Sessão=4)	Idoso	55	568,0	65,2	237,0	430,0	684,0
	Adulto	50	437,0	55,8	141,0	278,0	636,0
	Jovem	50	283,0	40,5	120,0	169,0	346,0

Grupos idoso (n=11 ratos; 220 tentativas), adulto (n=10 ratos; 200 tentativas), jovem (n=10 ratos, 200 tentativas).

Treino no labirinto de Barnes: composto por 4 sessões consecutivas (1 sessão por dia), cada sessão composta por 5 tentativas consecutivas.

Tabela 7 – ÍNDICE DE EXTINÇÃO (IE): medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos.

Grupos	N	Média	E.P.	1ªQ	2ªQ	3ªQ	Valor-P
Idoso	9	0.91	0.15	0.87	1.25	1.37	0.364
Adulto	10	1.02	0.10	0.73	1.02	1.19	
Jovem	10	1.34	0.13	1.02	1.29	1.44	

Tabela 8 – Efeito dos grupos, das sessões e da interação entre grupos e sessões sobre o desempenho no treino, expresso em LATÊNCIA (Lat): dados da análise estatística das médias da Lat por meio do método de Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear.

Fonte	G.L	χ^2	Valor-p
Grupo	2	10,2	0,0062
Sessão	3	114,3	<0,001
Grupo*Sessão	6	32,2	<0,001

Grupos idoso (n=11 ratos), adulto (n=10 ratos), jovem (n=10 ratos).

Treino no labirinto de Barnes: composto por 4 sessões consecutivas (1 sessão por dia), cada sessão composta por 5 tentativas consecutivas.

Tabela 9 - Efeito da VELOCIDADE de deslocamento sobre a LATÊNCIA, durante o treino no Labirinto de Barnes: dados da análise estatística por meio do método do Modelo Marginal Log-Linear, com o fator velocidade inserido na matriz de cálculo do modelo.

Fonte	G.L	χ^2	Valor-p
Velocidade	1	136,6	<0,001
Grupo	2	5,8	0,065
Sessão	3	76,2	<0,001
Grupo*Sessão	6	28,9	<0,001

Tabela 10 - LATÊNCIA (s.) durante o treino no labirinto de Barnes: medidas descritivas estratificadas por sessões, grupos e para interação entre grupos e sessões.

	Fonte	N	Média	E.P.	1ºQ	2ºQ	3ºQ
Sessões	1	155	109,5	5,4	35,0	111,0	180,0
	2	155	42,9	3,9	14,0	25,0	43,5
	3	155	31,4	3,3	7,0	17,0	34,5
	4	155	22,6	2,6	6,0	12,0	26,5
Grupos	Idoso	220	68,5	4,4	18,5	38,5	131,5
	Adulto	200	44,0	3,7	11,0	23,5	43,0
	Jovem	200	40,6	4,0	5,0	14,0	42,0
Grupos (Sessão=1)	Idoso	55	121,9	9,2	52,0	180,0	180,0
	Adulto	50	105,9	8,7	44,0	103,5	180,0
	Jovem	50	99,3	10,2	22,0	87,0	180,0
Grupos (Sessão=2)	Idoso	55	63,1	8,2	19,0	39,0	85,0
	Adulto	50	32,4	4,7	14,0	24,0	37,0
	Jovem	50	31,1	5,5	7,0	18,0	31,0
Grupos (Sessão=3)	Idoso	55	56,9	7,7	18,0	36,0	70,5
	Adulto	50	18,6	1,8	9,0	16,0	24,0
	Jovem	50	16,1	3,1	4,0	7,0	17,0
Grupos (Sessão=4)	Idoso	55	31,9	4,7	12,0	21,0	35,5
	Adulto	50	19,0	3,5	6,0	11,0	21,0
	Jovem	50	15,9	5,0	4,0	5,0	12,0

Grupos idoso ($n=11$ ratos; 220 tentativas), adulto ($n=10$ ratos; 200 tentativas), jovem ($n=10$ ratos, 200 tentativas).

Treino no labirinto de Barnes: composto por 4 sessões consecutivas (1 sessão por dia), cada sessão composta por 5 tentativas consecutivas.

Tabela 11 – Desempenho dos animais dos três grupos (idoso, adulto e jovem) no teste comprobatório, expresso como PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE ALVO no primeiro ($PQA_{10\text{ min}}$) e no segundo ($PQA_{20\text{ min}}$) minutos: medidas descritivas e dados do teste de Kruskal-Wallis para a $PQA_{10\text{ min}}$ e $PQA_{20\text{ min}}$ do teste comprobatório. Comparações entre os grupos.

	Fonte	N	Média	D.P.	1ºQ	2ºQ	3ºQ	Valor-p
PQA 1ºmin	Idoso	11	0,475	0,254	0,293	0,426	0,703	0,163
	Adulto	10	0,607	0,190	0,456	0,610	0,738	
	Jovem	10	0,677	0,159	0,601	0,690	0,822	
PQA 2ºmin	Idoso	11	0,385	0,270	0,219	0,418	0,552	0,051
	Adulto	10	0,623	0,133	0,475	0,647	0,717	
	Jovem	10	0,525	0,121	0,405	0,550	0,617	

Tabela 12 – PREFERÊNCIA PELO QUADRANTE-ALVO (PAQ): medidas descritivas e teste de Kruskal-Wallis entre os grupos, dos dados da PQA no primeiro e no segundo minutos do teste comprobatório.

Fonte		N	Média	D.P.	1ºQ	2ºQ	3ºQ	Valor-p
Preferência pelo quadrante alvo no 1ºmin	Idoso	11	0,475	0,254	0,293	0,426	0,703	0,163
	Adulto	10	0,607	0,190	0,456	0,610	0,738	
	Jovem	10	0,677	0,159	0,601	0,690	0,822	
Preferência pelo quadrante alvo no 2ºmin	Idoso	11	0,385	0,270	0,219	0,418	0,552	0,051
	Adulto	10	0,623	0,133	0,475	0,647	0,717	
	Jovem	10	0,525	0,121	0,405	0,550	0,617	

Tabela 13 – Efeito dos grupos, das sessões e da interação entre grupos e sessões sobre a VELOCIDADE de deslocamento no LB: dados da análise estatística da velocidade média por meio do método de Análise de Desvio do Modelo Marginal Log-Linear.

Fonte	G.L	χ^2	Valor-p
Grupo	2	6,9	0,031
Sessão	3	58,4	<0,001
Grupo*Sessão	6	6,8	0,384

Grupos idoso (n=11 ratos), adulto (n=10 ratos), jovem (n=10 ratos).

Treino no labirinto de Barnes: composto por 4 sessões consecutivas (1 sessão por dia), cada sessão composta por 5 tentativas consecutivas.