



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS COMPORTAMENTAL E MOLECULAR -
LaNeC

ISABELA CRISTINA CAMPOS DE SENA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**O APRENDIZADO DE UMA TAREFA DE NAVEGAÇÃO
ESPACIAL ALTERA OS NÍVEIS DE GABA NO
HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SWISS**

Belo Horizonte,

2015.

ISABELA CRISTINA CAMPOS DE SENA

**O APRENDIZADO DE UMA TAREFA DE NAVEGAÇÃO
ESPACIAL ALTERA OS NÍVEIS DE GABA NO
HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SWISS**

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

Orientadora:

Profa. Angela Maria Ribeiro, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG

Coorientadora:

Profa. Walderez Ornelas Dutra, Departamento de Morfologia, ICB-UFMG

Belo Horizonte,

2015.

- 043 Sena, Isabela Cristina Campos de.
O aprendizado de uma tarefa de navegação espacial altera os níveis de GABA no hipocampo de camundongos SWISS [manuscrito] / Isabela Cristina Campos de Sena. - 2015.
- 90 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Angela Maria Ribeiro. Co-orientadora: Walderez Ornelas Dutra.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.
1. Cognição espacial. 2. Hipocampo (Cérebro) - Teses. 3. Receptores metabotrópicos de glutamato - Teses. 4. Receptores do ácido gama-amicobutírico - Teses. 5. Neurociências - Teses. I. Ribeiro, Angela Maria. II. Dutra, Walderez Ornelas. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Profa. Angela Maria Ribeiro, pelos ensinamentos, por estar sempre disponível para esclarecer dúvidas e discutir resultados.

Agradeço a minha coorientadora, Profa. Walderez Ornelas Dutra, por ter aberto as portas do seu laboratório, sempre me ajudando na discussão dos resultados e a sua aluna Carolina, por toda ajuda na bancada.

Agradeço a Polliana e Cida por terem sido minhas companheiras nos muitos sacrifícios que fizemos e à toda a equipe do LaNeC pelo precioso tempo e deliciosos quitutes compartilhados ao longo desses dois anos.

Agradeço a minha linda família: meus amados pai e mãe, Marco e Antoniêta; Kaká e Felipe, meus adorados irmãos, vocês foram os grandes motivadores para que eu não desistisse dessa loucura chamada pós-graduação.

Agradeço ao meu namorado, Roberto, por toda a paciência com meus estranhos horários de estudo e minhas atividades de fim de semana. Obrigada por ser tão carinhoso e cuidadoso comigo.

Agradeço a minha avó, minhas tias e tios, primas e primos, pelo carinho e incentivo.

Agradeço a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

“Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada.

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Muitos esforços vêm sendo empregados para melhorar a compreensão acerca das bases neurobiológicas da memória e do aprendizado. Dentre os modelos animais utilizados, camundongos representam uma importante opção como modelos experimentais para o estudo de parâmetros biológicos e aspectos comportamentais. Os objetivos do presente trabalho foram: (i) avaliar o desempenho - aprendizado e memória - em tarefa de navegação espacial no Labirinto em Tanque Raso (LTR) em camundongos *Swiss*; (ii) mensurar a concentração de GABA e glutamato no hipocampo e (iii) avaliar as correlações entre os parâmetros neuroquímicos e entre esses e os comportamentais. Para tanto foram utilizados 46 camundongos *Swiss* de três meses de idade, divididos em três grupos: (i) Grupo Controle: animais que não foram submetidos à tarefa cognitiva e nem à exposição ao LTR, (ii) Grupo Controle Atividade animais expostos ao LTR sem a finalidade de resolver a tarefa cognitiva e, (iii) Grupo Aprendizado animais submetidos ao treino e teste de memória espacial no LTR. O treino foi constituído de sete sessões diárias realizadas em dias consecutivos, sendo quatro tentativas/sessão. Após o quinto dia de treinamento da tarefa os animais foram submetidos ao teste comprobatório, e após a última sessão do treino, os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi dissecado para posterior dosagem de GABA e glutamato por cromatografia líquida- HPLC. Houve um efeito significativo do treino, indicando que os animais do grupo “aprendizado” foram capazes de aprender a tarefa. Houve também efeito significativo dos tratamentos sobre a preferência pelo quadrante alvo, indicando que os animais foram capazes de se direcionarem para o local onde deveria estar o reforço, mesmo na ausência desse. Os tratamentos também afetaram a concentração de GABA no hipocampo. Os dados do desempenho dos animais no treino, aquisição da tarefa, e no teste de memória indicam que os animais foram capazes de aprender a tarefa utilizando um mapa cognitivo do ambiente, e a execução dessa tarefa envolve alterações na concentração de GABA no hipocampo desses animais.

Palavras-chaves: COGNIÇÃO ESPACIAL, HIPOCAMPO, GLUTAMATO, GABA, CAMUNDONGOS.

ABSTRACT

Many efforts have been made to understand the neurobiological basis of memory and learning. Among the animal models that have been used to achieve these objectives, mice represent an important alternative for studying some of the biological processes related to behavioral aspects or associated with nervous system dysfunctions. Using Swiss mice, the objectives of the present study were: (i) evaluate the performance - learning and memory - in a spatial navigation task in the Shallow Water Maze (SWM), (ii) measure the concentrations of GABA and glutamate in the hippocampus, and (iii) first evaluate the correlations between the neurochemical data and the behavioral parameters and, second, to evaluate the correlation between the neurochemical parameters themselves. We used 46 three-month-old Swiss mice, divided into three groups: (i) Control Group: animals that underwent neither the cognitive task nor exposure to SWM, (ii) Control Activity Group: animals were exposed to the SWM without exposure to the cognitive task, and (iii) Learning Group: animals that were submitted to the cognitive task in the SWM. The behavioral test consisted of seven consecutive daily sessions with four trials per session. After the fifth session the animals were submitted to the Probe Trail and after the last training session, animals were euthanized and their hippocampus was dissected and separated for GABA and glutamate assays using the HPLC method. There was significant training effect, indicating that the animals of the "learning" group were able to learn the task. There was also a significant treatment effect on the preference for the target quadrant, confirming that the animals used extra-maze spatial cue for exiting the SWM. In addition, the cognitive exercise of solving the spatial navigation task affected (increase) the concentrations of GABA in the hippocampus, which effect was significant related to animal behavioral performance in the two first training sessions. The experimental conditions used in the present study were suitable for assessing spatial cognitive learning using mice as an animal model. Moreover, we show for the first time that the acquisition of a spatial task involves changes in GABA contents in the hippocampus.

Keywords: SPATIAL LEARNING, SWM, HIPPOCAMPUS, GLUTAMATE, GABA, MICE.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados da comparação entre o desempenho (LATÊNCIA, s) na última tentativa (T4) de uma sessão e a primeira tentativa da sessão seguinte (T'1), ao longo das sessões do treino no LTR.....	44
Tabela 2: Dados da comparação entre o desempenho (ERROS COMETIDOS NA TAREFA) na última tentativa (T4) de uma sessão e a primeira tentativa da sessão seguinte (T'1), ao longo das sessões do treino no LTR.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos sistemas de memória.....	17
Figura 2. Anatomia do hipocampo.....	25
Figura 3. Esquemas dos circuitos funcionais do hipocampo.....	26
Figura 4. Esquemas de um terminal glutamatérgico.....	28
Figura 5. Esquema de um terminal GABAérgico.....	29
Figura 6. Delineamento experimental.....	33
Figura 7. Foto de um Labirinto em Tanque Raso (LTR).....	34
Figura 8. Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	38
Figura 9. Perfil de um cromatograma representativo de uma análise, indicando os picos de glutamato e GABA e seus respectivos tempos de retenção.....	39
Figura 10. Curva de aprendizado da tarefa espacial no LTR mostrando desempenho médio dos animais do Grupo “Aprendizado”, ao longo das sessões , expresso em latência (painel A) e em números de erros (painel B).....	41
Figura 11. Curva de aprendizado da tarefa espacial no LTR mostrando desempenho médio dos animais do Grupo “Aprendizado”, ao longo das tentativas , expresso em latência (s) (painel A) e em números de erros (painel B).....	43
Figura 12. Tempo de permanência dos camundongos (n=18) do Grupo “Aprendizado” em cada um dos quadrantes, expresso em porcentagem (%), dos animais durante o teste comprobatório, com duração total de 2 minutos, sem a presença do reforço (saída).....	46
Figura 13. Concentrações de Glutamato e GABA no hipocampo dos camundongos <i>Swiss</i> dos três grupos experimentais.....	48
Figura 14. Taxa [glutamato]/[GABA] no hipocampo de camundongos <i>Swiss</i>	49
Figura 15. Gráfico de dispersão entre as concentrações de glutamato e GABA hipocampais.....	50
Figura 16: Gráficos de dispersão das correlações entre o desempenho dos camundongos expressos em número de erros nas 1ª ou 2ª sessões do treino e as concentrações dos neurotransmissores, glutamato e GABA no hipocampo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	<i>α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionic acid</i> (ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico).
CA	Corno de Amon (1,2,3 e 4).
CE	Córtex Entorrinal.
CD11b	Cluster of differentiation 11b (grupo de diferenciação 11b)
EEG	Eletroencefalograma.
EPSP	<i>Excitatory postsynaptic potencial</i> (potencial excitatório pós-sináptico)
GABA	<i>γ-aminobutírico acid</i> (Ácido γ-aminobutírico).
GAD	Glutamate decarboxylase (glutamato Descarboxilase).
GAT	<i>GABA transporter</i> (Transportador de GABA).
GD	Giro Denteado.
GS	Glutamina Sintetase.
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Performance).
IL-1β	<i>Interleukin 1 beta</i> (Interleucina 1 beta)
LAM	Labirinto Aquático de Morris.
LB	Labirinto de Barnes.
LTM	<i>Long-term memory</i> (Memória de Longa Duração).
LTP	<i>Long-term potentiation</i> (Potencialização de Longa duração)
LTR	Labirinto em Tanque Raso.
MPA	3-mercaptopropionic acid (ácido 3-mercaptopropiônico)
NMDA	N-metil D-aspartato
OPA	<i>Ortophytaldeide</i> (ortoftaldeído)
PAG	<i>Phosphate activated glutaminase</i> (Glutaminase Fosfato-ativada).
S	segundos
SI	Sistema imunológico
SNC	Sistema Nervoso Central
SSD	Succinato Semialdeído Dehidrogenase
STM	<i>Short-term memory</i> (Memória de Curta Duração).
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa (fator de necrose tumoral alfa)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Considerações Iniciais.....	13
1.2. Aprendizado e Memória.....	15
1.2.1. Conceitos e Classificações.....	15
1.2.2. Memória Espacial.....	18
1.2.3. Como Estudar – na pesquisa básica – a Memória Espacial.....	20
1.3. Bases Neurobiológicas do Aprendizado e Memória Espacial.....	23
1.3.1. Teorias.....	23
1.3.2. Hipocampo: Neuroanatomia funcional.....	25
1.3.3. Sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos.....	27
1.3.3.1. Aspectos gerais no SNC.....	27
1.3.3.2. Papel no aprendizado e na memória.....	29
2. HIPÓTESE.....	31
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2. Específicos.....	31
3.2.1. Avaliar o desempenho - aprendizado e memória - em tarefa de navegação espacial no LTR, em camundongos <i>Swiss</i>	31
3.2.2. Mensurar as concentrações de glutamato e GABA no hipocampo.....	31
3.2.3. Avaliar as correlações entre os parâmetros neuroquímicos e entre esses e os comportamentais.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Sujeitos experimentais- Amostras.....	32
4.2. Delineamento experimental.....	32
4.3. Labirinto em Tanque Raso- Tarefa de navegação espacial.....	33
4.3.1. Treino – Aprendizado Espacial.....	34
4.3.2. Teste Comprobatório – Memória Espacial.....	35
4.4. Dissecção do cérebro.....	36

4.5. Dosagem de Glutamato e GABA por Cromatografia Líquida de Alta Performance (<i>High performance liquid chromatography- HPLC</i>) de acordo com método desenvolvido por Freitas-Silva (2009).....	36
4.5.1. Processamento das amostras biológicas.....	36
4.5.2. Derivatização.....	37
4.5.3. Condições cromatográficas.....	37
4.6. Análises Estatísticas.....	39
5. RESULTADOS.....	40
5.1. Desempenho de camundongos <i>Swiss</i> na tarefa de navegação espacial, no LTR.....	40
5.2. Níveis de glutamato e GABA no hipocampo.....	47
5.3. Análises das correlações entre os dados bioquímicos e entre esses e os dados comportamentais.....	50
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	60
8. PERSPECTIVAS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS.....	76
1. Certificado do CEUA –UFMG.....	76
2. Planilha com os dados brutos.....	77
2.1. Dados comportamentais.....	77
2.2. Dados bioquímicos.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Iniciais

Muitos esforços vêm sendo empregados para preencher as lacunas acerca do conhecimento das bases neurobiológicas da memória e do aprendizado, principalmente da memória espacial, um dos tipos de memória que é primeiramente afetado nos casos de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA). Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à função desse componente cognitivo se torna extremamente relevante, não apenas para o entendimento da fisiologia celular, mas também para contribuir no esclarecimento de disfunções nesses processos. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à investigação das bases neurobiológicas de aspectos comportamentais, utilizando ratos como sujeitos experimentais para estudar processos de neurodegeneração, como o envelhecimento fisiológico (Oliveira-Silva e cols., 2007; Oliveira e cols., 2010) e os induzidos por drogas e/ou pela deficiência de tiamina (Pinto e cols., 2006; Vigil e cols., 2010; Pires e cols., 2001, 2005; Carvalho e cols., 2006; Oliveira-Silva e cols., 2007). Os dados obtidos, pela equipe do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC) da UFMG, ao longo desses anos, tem gerado questões que demandam o uso de novos métodos de estudo e de outros modelos para responde-las. Como por exemplo: (i) existiriam componentes dos substratos neurobiológicos da cognição espacial que dependem de um mecanismo de interação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imunológico (SI)? (ii) Quais seriam esses componentes moleculares? (iii) Qual seria o mecanismo molecular funcional dessa interação e a relação com o desempenho cognitivo?

Dentre os modelos animais empregados para avaliação dos processos de aprendizado e memória, os roedores, incluindo ratos e camundongos, estão entre os mais utilizados. Os ratos vêm sendo usados pelo nosso grupo e por outros autores, como um importante modelo para o estudo de funções cognitivas complexas (Tolman, 1948; Barnes, 1979; Morris, 1981; Deacon & Rawlins, 2002; Carvalho e cols., 2006; Oliveira-Silva e cols., 2007; Liguz-Leczna e cols., 2014). No entanto, dependendo dos objetivos do estudo, camundongos oferecem algumas vantagens

em relação aos ratos. Camundongos possuem um maior número de linhagens transgênicas, que permitem uma manipulação mais específica de determinados parâmetros, incluindo parâmetros imunes. No presente estudo, decidimos implantar no LANE-UFMG, um método da psicologia experimental adequado para se avaliar o desempenho cognitivo de camundongos submetidos a uma tarefa de navegação espacial. A implantação desse método representou um primeiro passo na efetivação dos objetivos do presente estudo e também ampliou as possibilidades de estudos futuros sobre os mecanismos que envolvem a participação de componentes do sistema imune em processos cognitivos espaciais.

O método estabelecido no LANE, do Labirinto em Tanque Raso (LTR), que representou um passo fundamental para a realização desse trabalho, foi desenvolvido por Deacon & Rawlins (2002) e modificado no presente estudo. As modificações objetivaram, utilizando alternativas de materiais economicamente mais viáveis sem prejuízo na acurácia, ajustar as melhores condições nas quais os camundongos foram capazes de adquirir a tarefa de navegação espacial. A seguir, utilizando o LTR como instrumento para avaliação do desempenho cognitivo espacial de camundongos, propusemos verificar se a aquisição dessa tarefa envolveria alterações nos níveis hipocâmpais de glutamato e GABA. Além disto, se essas alterações estariam associadas com o desempenho no LTR.

Perspectivas: Com base nas hipóteses/questões mencionadas acima, e sabendo-se que esses dois parâmetros neuroquímicos – glutamato e GABA - desempenham papéis funcionais tanto no SNC como no SI, os dados obtidos no presente estudo tem como perspectiva contribuir para direcionar o desenho de estudos futuros. Como por exemplo, o desenvolvimento de projetos para verificar se as funções exercidas por esses parâmetros nos SNC e SI seriam pontos de associação entre esses dois sistemas e se essa interação teria importância na composição das bases biológicas da cognição espacial.

1.2. Aprendizado e Memória

1.2.1. Conceito e classificações

O aprendizado e a memória, apesar de serem um dos fenômenos mais intensivamente estudados, ainda existem muitas lacunas no entendimento de seus mecanismos celulares e moleculares (Fields e cols., 2014). Esses processos cognitivos, ao longo do tempo, receberam várias definições, principalmente nos campos da filosofia e psicologia: Izquierdo (1989) propôs que a memória “*é o armazenamento e evocação de informação adquirida através de experiências; a aquisição de informações denomina-se aprendizado*” e, mais recentemente, Squire & Kandel (2003) afirmam que “*A memória é o processo pelo qual aquilo que é aprendido persiste ao longo do tempo. Nesse sentido, o aprendizado e a memória estão conectados de forma inextricável.*” O processo de aprendizado é determinado pelas experiências vividas e sem ele não há memória (Marshall, 1988).

Nos últimos anos, pesquisas no campo da Biologia - básica e clínica- têm contribuído, juntamente com a Filosofia e a Psicologia, para a compreensão dos substratos neurobiológicos dos processos cognitivos. As primeiras contribuições para o estudo das correlações anátomo-funcionais dos processos de memória foram fornecidas por pacientes com lesões cerebrais conhecidas que levaram a algum quadro de amnésia. O caso mais famoso é do paciente Henry Molaison, o paciente H.M., que após a remoção bilateral de parte do lobo temporal medial para conter crises de epilepsia, perdeu a capacidade de formar novas memórias (amnésia anterógrada) (Scoville & Milner, 1957). H.M. teve suas memórias remotas preservadas, exceto o período que envolve três anos antes da cirurgia, nesse período sua memória se tornou progressivamente mais afetada até o total esquecimento dos eventos que ocorreram mais próximos da cirurgia, um quadro denominado de amnésia retrógrada (Scoville & Milner, 1957). Outras funções, como capacidade de conversar e de adquirir habilidades motoras estavam intactas.

Em 1970, Shallice & Warrington descreveram uma síndrome um pouco diferente da do paciente H.M., nesse caso a paciente, K.F., sofreu uma lesão na região occipitoparietal esquerda decorrente de um traumatismo craniano. Essa paciente era

capaz de reter apenas dois dígitos de informação, porém sua capacidade de formar novas memórias em longo prazo estava intacta. No início dos anos 80 foi demonstrada a participação do cerebelo no *condicionamento de atraso* de piscar os olhos (McCormick e cols., 1982), um comportamento preservado em pacientes amnésicos (Clark & Squire, 1998). Esse fenômeno, de lesões em determinadas regiões encefálicas afetarem o desempenho em uma tarefa, mas não em outra, é chamado *dissociação*. Essas dissociações são apontadas como evidências da existência de diferentes sistemas de memórias, pelo menos no que se concerne ao substrato neurobiológico.

Os diferentes tipos de sistemas de memória vêm, ao longo do tempo, sendo avaliados em diferentes trabalhos experimentais e estudos clínicos, resultando em diversas propostas de classificações baseadas em conteúdo, função e tempo de duração. Várias classificações foram propostas fazendo distinção entre: memória e hábitos (James, 1890); memória explícita e implícita (McDougall, 1923); “saber como” e “saber que” (Ryle, 1949); memória semântica e episódica (Tulving, 1972), memória recente e remota (Schacter & Moscovitch, 1984). Há um consenso atual de que existem três distintos sistemas de aprendizado e memória bem definidos: memória de trabalho, memória de longo prazo implícita e memória de longo prazo explícita (Smith & Grossman, 2008). Na **figura 1** apresentamos um resumo dos diferentes tipos de memória.

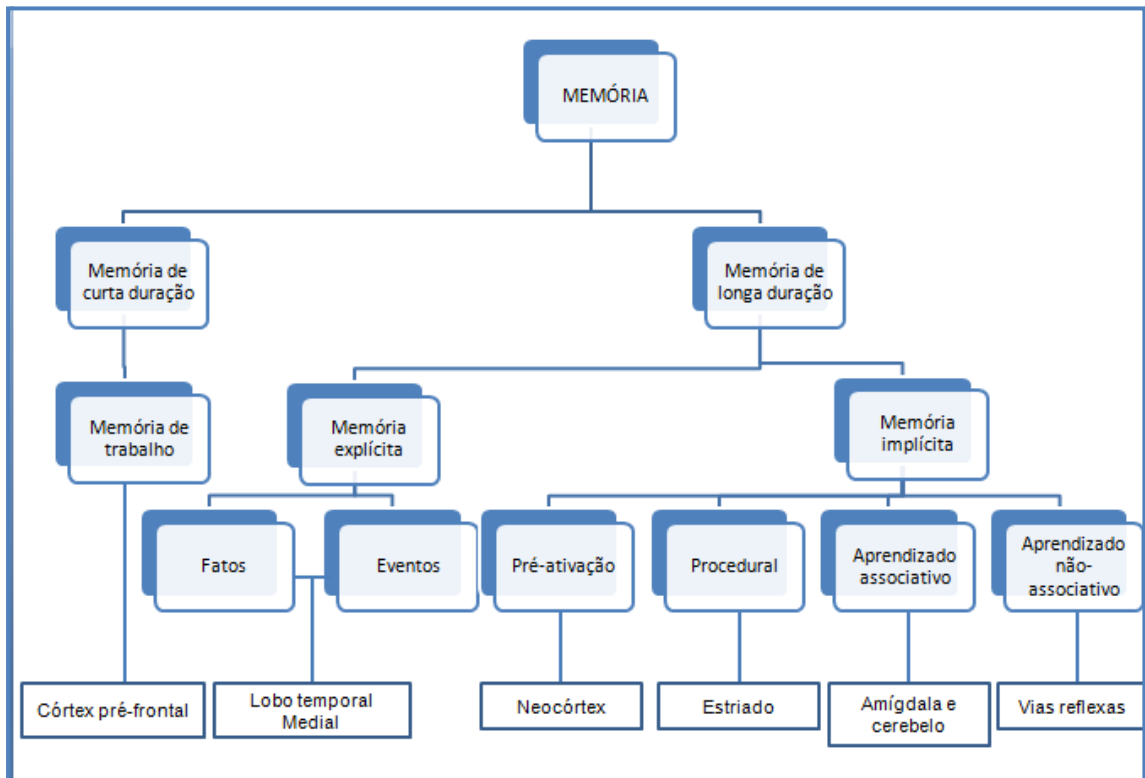


Figura1: Classificação dos sistemas de memória, de acordo com Gasic e cols (2006). No fluxograma estão indicados os tipos de memórias e as principais estruturas encefálicas relacionadas aos processos centrais.

Memória de trabalho, que pode também ser denominada memória operacional é um tipo de memória de curta duração, definida como um sistema de manutenção e manipulação ativa de uma quantidade limitada de informação durante uma quantidade limitada de tempo (Jonides, 1995). A memória de trabalho abrange o executivo central, um sistema de controle de atenção, suportado por dois sistemas responsáveis pelo arquivamento e manipulação temporária de informação, os sistemas visuo-espacial e fonológico. A memória de curta duração está relacionada ao córtex pré-frontal (Janowsky e cols., 1989), cerebelo (Pascual-Leone e cols., 1993), regiões occipital e parietal (Farah, 1988) e giros supramarginal e angular (Vallar & Shallice, 1990).

A memória de longo prazo implícita, também chamada processual ou não-declarativa, envolve grande quantidade de informações que podem ser armazenadas e mantidas por longo período. A recuperação da memória implícita ou processual é feita sem a utilização da consciência, assim essa informação não pode ser declarada (Smith & Grossman, 2008). Esse sistema de memória é revelado quando uma experiência

anterior melhora o desempenho em uma tarefa que não requer sua evocação consciente (Schacter, 1987). A memória implícita ou processual pode ser dividida em (i) pré-ativação, relacionada com estruturas do neocórtex, (ii) procedural, relacionada ao estriado, (iii) condicionamento, relacionado a amígdala e cerebelo e, (iv) aprendizado não-associativo, relacionado a vias reflexas (Smith & Grossman, 2008).

A memória de longo prazo explícita, ou memória declarativa, também envolve a codificação e armazenamento de grande quantidade de informação por um longo período de tempo. Diferentemente da memória implícita, essa memória pode ser evocada de forma consciente (Smith & Grossman, 2008). A memória declarativa pode ser subdividida em dois componentes, o semântico e o episódico. Memória semântica está relacionada ao armazenamento de informação de conhecimentos gerais acerca do mundo, enquanto a memória episódica engloba eventos dos quais participamos, ou seja, uma memória autobiográfica (Eisenkraemer, 2006). A codificação dessa informação dentro do sistema está relacionada a estruturas do lobo temporal medial e diencéfalo (Squire & Knowlton, 1995). Apesar de bem estabelecida, a classificação apresentada aqui, não abrange todos os tipos de memória descritos, alguns tipos ficam na interface entre duas classificações.

1.2.2 Memória espacial

Um tipo de memória que não foi considerada na classificação citada acima é a memória espacial, que apresenta características que se ajustam nas interfaces com várias subdivisões, visto que apresenta componentes não-declarativos, declarativos, de curta e de longa duração.

Até o início do século passado, grande parte do conhecimento sobre memória veio da observação de pacientes com lesões cerebrais conhecidas e seus efeitos sobre os diversos sistemas de memória. Mais tarde, além da observação, alguns experimentos envolvendo memória foram realizados com humanos, uma vez que estes eram capazes de relatar ao experimentador as informações requeridas permitindo que os processos mentais fossem avaliados. Apesar das grandes contribuições desses estudos clínicos comparativos, o estudo unicamente com humanos traz muitas limitações éticas e práticas, tornando necessário o

desenvolvimento e utilização de modelos animais experimentais, que permitissem a manipulação dos parâmetros de interesse e o estudo em outros níveis, como por exemplo, o molecular, de diferentes tipos de memória.

O uso de animais experimentais, como os roedores, no estudo da memória resolvia algumas das questões, mas criava outras, como por exemplo, o estudo da memória declarativa em animais cuja existência de consciência ainda é um tema controverso. Assim, alguns conceitos foram sendo modificados para permitir o estudo de componentes declarativos da memória espacial em modelo animal. Em uma abordagem experimental, a memória espacial pode ser subdividida em um componente de curta duração, a memória espacial de trabalho, e um componente de longa duração, a memória espacial de referência. Conforme descrito acima, na definição da memória de trabalho, acrescentando-se agora a consideração de que se trata de codificações de informações espaciais, a memória espacial de trabalho é um sistema que permite a aquisição transitória de uma quantidade limitada de informação espacial, e que a mantém disponível para o acesso imediato (Moscovitch e cols., 2005). A memória espacial de referência, conceituada inicialmente por Olton e cols. em 1979, consiste em um sistema envolvido na obtenção de informação espacial através da repetição de uma tarefa, envolve a habilidade para codificar, armazenar por longo período e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas (Kessels e cols., 2001). O estudo da memória espacial de referência torna-se muito importante na medida em que esse tipo de memória é prejudicado nos processos neurodegenerativos, que ocorrem em condições fisiológicas (envelhecimento) ou patológicas (doenças).

A utilização de animais para o estudo de memória espacial rendeu muitas descobertas. Em 1948, Edward Tolman propôs pela primeira vez a existência de um mapa cognitivo, uma representação global real, no cérebro, do ambiente externo. Em 1971, O'Keefe & Dostrovsky encontraram um substrato neurobiológico para a hipótese de Tolman, ao descobrirem em experimentos com ratos as "*place cells*", células piramidais do hipocampo, que disparam em conjunto dependendo da localização do animal. Anos mais tarde o grupo de pesquisa de May-Britt & Edvard Moser demonstraram a existência das "*grid cells*", células presentes no córtex entorrinal de ratos que mantêm um padrão de disparo em locais específicos,

sustentando a teoria dos mapas cognitivos (Hafting, 2005). A descoberta destes substratos neurobiológicos da memória espacial de roedores constitui forte evidência do papel do hipocampo e do córtex entorrinal na memória espacial.

1.2.3 Como estudar – na pesquisa básica - a memória espacial.

Pesquisadores do mundo inteiro tentam encontrar formas de avaliar memória e aprendizado espacial em modelo animal, incluindo ratos e camundongos. Dentre esses roedores, os ratos vêm sendo usados de forma eficiente, como um importante modelo de estudo de funções cognitivas complexas (Tolman, 1948; Barnes, 1979; Morris, 1981); no entanto, camundongos oferecem algumas vantagens em relação aos ratos. Camundongos possuem várias linhagens transgênicas que permitem uma manipulação mais específica de determinados parâmetros, incluindo expressão gênica diferenciada, padrões de resposta imunes e outros. Alguns autores já vem se dedicando ao estudo sobre se camundongos serem capazes de alcançar os níveis satisfatórios de desempenho cognitivo de ratos. Jaramillo & Zador (2014) mostraram que camundongos e ratos possuem níveis similares de desempenho em tarefa de tomada de decisão.

Com o propósito de desenvolver métodos para avaliar memória e aprendizado, pesquisadores da área da psicologia experimental desenvolveram inúmeros testes para avaliar diferentes tipos de memória (Vincent, 1915). A maioria dos testes usados para avaliar memória espacial faz uso de labirintos, nos quais o animal deve aprender a desempenhar um determinado comportamento, que depende do conhecimento espacial (Tolman, 1948; Barnes, 1979; Morris, 1981; Deacon & Rawlins, 2002; Carvalho e cols., 2006; Oliveira-Silva e cols., 2007; Deacon, 2013; Liguz-Leczna e cols., 2014). No caso da memória espacial de referência, o animal deve aprender e lembrar-se de uma localização alvo, que lhe proporcione alguma recompensa, que pode ser segurança, comida ou água, a serem acessados por meio de dicas visuo-espaciais fixas e extra-labirinto (Carrillo-Mora e cols., 2009).

Existe uma considerável diversidade de labirintos utilizados para avaliar memória espacial de referência: labirintos abertos com múltiplas rotas como o Labirinto de Barnes (Barnes, 1979) e o Labirinto Aquático de Morris - LAM (Morris, 1981);

labirintos abertos com rotas restritas como os labirintos radiais, em 'Y' ou 'T' (Olton & Samuelson, 1976) e labirintos complexos como o Labirinto de Biel (Biel, 1940) e o Labirinto Cincinati (Vorhees, 1983). Apesar dessa grande diversidade, os labirintos mais utilizados são o Labirinto Aquático de Morris (LAM), o Labirinto de Barnes (LB) e o Labirinto radial projetado por Olton & Samuelson (1976). Dentre esses, o LAM e o LB serão discutidos em mais detalhes abaixo, devido à importância dos fundamentos e princípios de utilização dos mesmos, em relação ao método utilizado no presente trabalho.

Os labirintos, LAM e LB, são similares em relação à tarefa, que consiste no animal aprender e lembrar a localização de uma zona alvo, criando um mapa espacial a partir de dicas, fixas e extra-labirinto, presentes no ambiente (Rudy, 1987). Ambos os labirintos foram desenvolvidos para ratos e sua utilização para camundongos requer algumas modificações.

O LB consiste em uma plataforma circular de 120 cm de diâmetro, aberta e elevada em relação ao chão, na qual existem vários orifícios/saídas falsas e apenas uma real, todas presentes ao longo da borda da plataforma, sendo que o número de saídas pode variar dependendo do objetivo e do modelo utilizado. Embaixo de uma dessas saídas existe uma caixa (reforço) que permite que o animal se abrigue, enquanto que as outras saídas são falsas, pois, estão fechadas. O animal é colocado no centro da plataforma, que funciona como um campo aberto, iluminado, e a tendência do animal é tentar encontrar um refúgio. O objetivo do teste é que o animal aprenda a localizar a saída que permite refúgio. Para localizar a saída real, o animal faz uso de dicas extra-labirinto, sempre fixas, presentes no ambiente. Porém, esse tipo de labirinto apresenta a desvantagem de que o aprendizado é relativamente lento, devido à ausência de estímulos suficientemente fortes (Sunyer, 2007), além de permitir que o animal se guie por dicas olfativas ao invés de dicas espaciais para solucionar o labirinto (Carrillo-Mora e cols., 2009).

O LAM consiste em uma piscina circular de aproximadamente 130 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade, na qual se encontra submersa em 40 cm de água, uma plataforma de 15 cm de diâmetro (reforço) de material transparente, invisível para o rato. Para solucionar o labirinto, o animal deve encontrar a plataforma, que está deslocada para o centro da piscina, usando como referência as dicas espaciais

presentes no ambiente. Devido a localização da plataforma, para solucionar o labirinto, o animal deve ir contra sua tendência natural de nadar na periferia da piscina (tigmotaxia) (Deacon, 2013; Carrillo-Mora e cols., 2009). Apesar da utilização da água diminuir a chance do animal se guiar por dicas olfativas e, portanto, não espaciais, esse mesmo estímulo pode ser muito aversivo e estressante para o animal, podendo comprometer seu desempenho na tarefa cognitiva. Já foi demonstrado que, comparado ao LAM, a exposição ao LB induz a liberação de menores níveis de corticosterona em camundongos, sugerindo que o LB causa menos estresse (Harrison e cols., 2009). No caso da utilização do LAM para testar o desempenho de camundongos, deve-se considerar que esses animais são piores nadadores que ratos (Wishaw, 1995), além de haver uma grande preocupação com a rápida perda de calor dos camundongos (Deacon, 2013).

Considerando as desvantagens e o fato de que esses labirintos foram desenvolvidos em uma época na qual os ratos eram os animais preferencialmente utilizados em pesquisa comportamental, alguns pesquisadores vêm tentando desenvolver testes que permitam a utilização de camundongos como modelo experimental em avaliações de funções cognitivas espaciais. Em 2002, Robert Deacon e Nicholas Rawlins (Deacon & Rawlins, 2002) desenvolveram um equipamento, que pode ser considerado um híbrido do LB e do LAM, ou seja, um labirinto com características desses dois labirintos, na tentativa de ajustar as melhores condições para avaliação do desempenho cognitivo de camundongos. O labirinto desenvolvido por Deacon & Rawlins, denominado Labirinto em Tanque Raso (LTR) contém 2,5 cm de profundidade de água, o que minimiza as chances do animal se guiar por dicas olfativas, além da saída para escape estar disposta na periferia do equipamento, se adequando ao comportamento natural do animal (Deacon & Rawlins, 2002; Schmitt, 2004; Deacon, 2013). Camundongos com lesão no hipocampo mostraram um enorme prejuízo para encontrar a saída no LTR, demonstrando novamente a importância do lobo temporal medial para aprendizado e memória espacial de referência (Deacon & Rawlins, 2002).

1.3. Bases Neurobiológicas do Aprendizado e Memória Espacial.

1.3.1 Teorias.

Atualmente, a principal, mas não única divisão envolvendo sistemas de memória é a divisão entre curta (STM- *short-term memory*) e longa duração (LTM- *long-term memory*). Dessa forma os pesquisadores estão interessados em descobrir dois mecanismos fisiológicos distintos para a formação da memória (Graham, 1990). Uma das hipóteses sobre as bases neurobiológicas para a STM é a atividade de circuitos reverberatórios. Essa teoria se baseia na existência de circuitos com alças, que permitem que o sinal continue sendo retransmitido – mantendo a ativação do circuito - mesmo após o estímulo inicial ter cessado. O estudo da anatomia histológica do córtex mostrou a existência de circuitos com alças, corroborando a possibilidade da existência desse mecanismo reverberatório. Burns (1950) utilizando eletroencefalograma (EEG) mostrou que fatias de córtex excitadas por estimulação elétrica continuavam a apresentar atividade por até 30 minutos, mesmo após cessar o estímulo inicial. Assim a reverberação parece ser uma explicação possível para a formação da STM (Graham, 1990).

No caso da LTM, não se considera que circuitos reverberatórios possam explicá-la, é consenso que para a memória persistir deve haver modificações moleculares e estruturais no sistema. Assim surgiu o conceito de *engrama*, que representa uma informação codificada em um circuito ou via dentro do SNC. Ou seja, a hipótese é que, quando você pensa na prova do dia seguinte você dispara um *engrama* e quando pensa no rosto da sua mãe dispara outro. Para que você reconheça a sua mãe na próxima vez que encontrá-la, o mesmo conjunto de neurônios deve ser disparado, para isso alguma modificação deve ocorrer entre esses neurônios. Essas modificações parecem estar relacionadas às conexões entre os neurônios. Uma vez que o neurotransmissor liberado na sinapse é capaz de desencadear um potencial excitatório pós-sináptico (ESPS) no neurônio seguinte, essa sinapse poderia ser fortalecida toda vez que fosse utilizada. Dessa forma, segundo Hebb (1949), o aprendizado seria o fortalecimento das conexões entre neurônios.

Algumas evidências foram surgindo e corroborando a teoria de Hebb. Utilizando métodos da eletrofisiologia, pesquisadores mostraram que uma sequência de choques de mesma intensidade em um único neurônio acarreta ESPS cada vez maiores no neurônio pós-sináptico. Esse aumento dos ESPS após o uso repetitivo das sinapses é chamado Potenciação de Longa Duração (LTP – do inglês *Long-Term Potenciation*). A LTP pode durar dias ou semanas (Teyler & DiScenna, 1986), favorecendo a idéia de que esse mecanismo poderia explicar a LTM. Ainda restam dúvidas quanto ao processo que levaria ao fortalecimento dessas sinapses, seria o aparecimento de novas sinapses entre os neurônios ou seria o fortalecimento de sinapses já existentes? Ou ambos, representando as bases de processos diferentes?

No caso da formação de novas sinapses, já existem evidências que a suportam, como por exemplo, as observações que cérebros adultos de ratos são capazes de formar novos terminais sinápticos (Cotman & Nieto-Sampedro, 1982; Tsukahara, 1981). Sabendo que essas estruturas, assim como dendritos, são formadas por proteínas, Rosenzweig & Bennet (1984) mostraram que a inibição da síntese proteica no cérebro de ratos afeta a memória, indicando que a incapacidade de sintetizar proteína impede a LTM. No caso do fortalecimento de sinapses já existentes, a síntese proteica também teria um papel importante. Shashoua (1985) propôs uma hipótese na qual, proteínas produzidas logo após a aquisição de uma tarefa – aprendizado - poderiam ser usadas como um modelo imediato, porém temporário para guiar os processos mais lentos de construção de novas estruturas. Nesse trabalho usando peixes dourados, Shashoua mostrou que duas proteínas estão significativamente aumentadas em animais que aprenderam uma tarefa em comparação ao grupo controle e que a utilização de um anticorpo específico contra essas proteínas impede que os peixes retenham a informação aprendida. Resultados semelhantes foram encontrados por Pirong & Schmidt (1988). Como a memória espacial apresenta componentes tanto da STM quanto da LTM, um ou outro fenômeno, ou ainda a associação de vários deles podem ser considerados viáveis como possíveis bases neurobiológicas desse tipo de memória.

1.3.2. Hipocampo: Neuroanatomia funcional.

A Formação Hipocampal está localizada na região medial do lobo temporal (**Figura 2**), sendo constituída pelo hipocampo, complexo subicular e córtex entorrinal (CE) (Amaral & Witter, 1989; Knowles, 1992). O hipocampo é uma estrutura alongada no eixo dorso-ventral em roedores e no eixo ântero-posterior em primatas. Composto por um arqueocórtex formado por uma lâmina contínua de neurônios que se dobra sobre si mesma durante o desenvolvimento, dando origem a duas estruturas em forma de C. Essa forma específica do hipocampo rendeu a uma dessas estruturas o nome de Corno de Amon (CA) pela semelhança com o chifre presente na cabeça do Deus Egípcio Amon, e a outra estrutura o nome de Giro Denteado (GD).

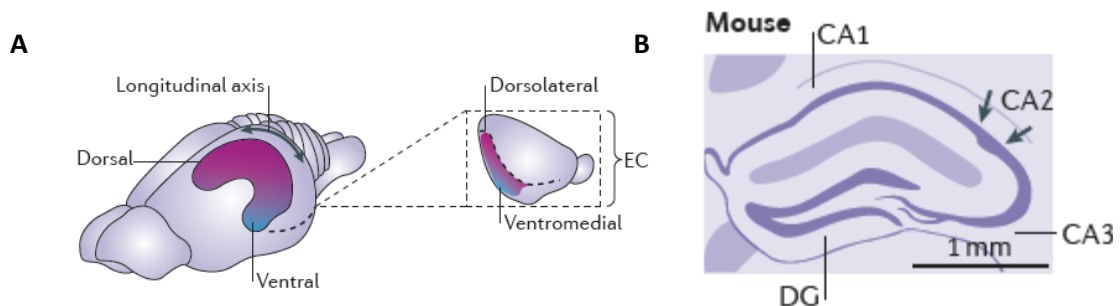


Figura 2: Anatomia do hipocampo, em duas diferentes perspectivas, indicando no **painel A** as porções dorsal e ventral, destaque no esquema em aumento à direita, o córtex entorrinal (EC= entorhinal córtex); no **painel B**, um corte sagital mostrando as sub-regiões da formação hipocampal. DG- Giro Denteado, CA3 – Área CA3 do corno de Ammon, CA2 - Área CA2 do corno de Ammon, CA1 - Área CA1 do Corno de Ammon. Fonte: Strange, 2014.

O espanhol Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1909) foi o primeiro a descrever a anatomia do hipocampo, mais tarde seu aluno Rafael Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1934) continuou as pesquisas do seu professor e é responsável pela atual terminologia e vias de conexões hipocampais, aceitas pela maioria dos pesquisadores. Lorente de nó subdividiu o CA em quatro sub-regiões, numeradas de um a quatro: CA4 é a região onde o CA encontra o GD, composta por células polimórficas, pertence mais ao GD do que ao CA; CA3 é a região que recebe fibras musgosas projetadas pelo GD; CA2 é uma região intermediária entra CA3 e CA1 e CA1 é uma região que não recebe projeções das fibras musgosas do GD, porém

recebe fibras de CA3 e emite a maioria das fibras do CA para o complexo subicular (Lorente de Nó, 1934).

A conexão intrínseca da circuitaria hipocampal foi descrita como trissináptica, uma via glutamatérgica que se inicia pela via perforante, via que parte do CE projetando para o GD onde se fazem as primeiras sinapses; em seguida as fibras musgosas que partem do GD fazem sinapses com as células piramidais em CA3 formando o segundo grupo de sinapses; por fim, as fibras que partem de CA3 formando o colateral de Schafer fazem sinapses com as células piramidais em CA1 (Henze, 2000). Porém, atualmente já se conhece outras vias que atuam em paralelo às vias do sistema trissináptico; uma via monossináptica que liga fibras que saem de CE para o GD diretamente a CA1, CA2 e CA3 e uma via bissináptica que liga o CE a CA1, CA2 e CA3 sem passar pelo GD (Steward, 1976; Tamamaki, 1988). Essas vias estão apresentadas nos esquemas da **Figura 3**.

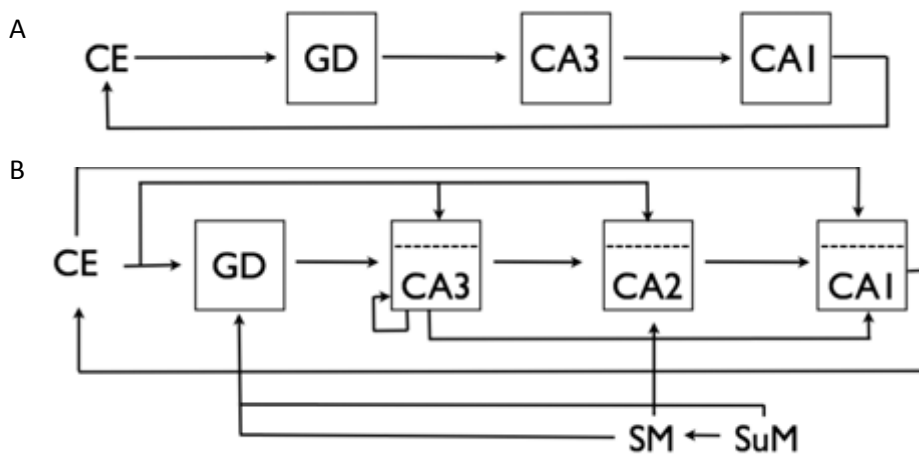


Figura 3 – Esquemas de Circuitos Funcionais do Hipocampo. **Painel A:** Circuitaria trissináptica, que conecta o CE ao GD, CA1 e CA3. **Painel B:** Alças paralelas, circuitaria córtico-hipocampal, composta por diversas alças paralelas entre as distintas regiões. CE – Córtex Entorrinal. GD – Giro Denteado. CA3, CA2 e CA1: são as subáreas, 3, 2 e 1, do Corno de Ammon (CA). SM – Septo Medial. SuM – Núcleo supramamilar do hipotálamo. Fonte: Schemberg, 2010.

Após o caso do paciente H.M., dados obtidos em outros trabalhos demonstraram a participação do hipocampo no aprendizado e memória episódica, visto que lesões dessa estrutura afetam o desempenho de animais em tarefas que requerem aprendizado de dicas espaciais para serem resolvidas (Nilson, 1987; Eichenbaum &

Cohen, 2001; Deacon & Rawlins, 2002). Além disso, o hipocampo participa juntamente com a amígdala nos comportamentos defensivos, de fuga e esquiva, relacionados ao medo e à ansiedade, respectivamente (Gray, 1982; Gray & McNaughton, 2000; Bannerman e cols., 2004). Existem também evidências que ao longo do eixo dorso-ventral, o hipocampo pode ser funcionalmente diferente, sendo que a memória episódica estaria mais relacionada à região dorsal (Risold & Swanson, 1996; Moser e Moser, 1998; Bannerman e cols., 2004, Strange, 2014).

1.3.3 Sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos

1.3.3.1. Aspectos gerais no SNC

Dos vários circuitos envolvidos na neurotransmissão no sistema SNC de mamíferos, o balanço entre os estímulos excitatórios e inibitórios dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, respectivamente, é fundamental tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção de funções cognitivas complexas, como aprendizado e memória (Foster & Kemp, 2006). O equilíbrio funcional desses dois sistemas está envolvido com vários processos fisiológicos como, neurogênese, migração celular e plasticidade neuronal (Nacher e cols., 2002; McGee & Brecht, 2003, Foster & Kemp, 2006).

O glutamato é o neurotransmissor excitatório do SNC mais bem estudado. Na **figura 4** está apresentado o esquema de um terminal nervoso indicando os componentes, que participam da síntese, liberação e degradação do neurotransmissor. O glutamato pode ser sintetizado a partir de α -cetogluturato, pela enzima glutamato desidrogenase, ou a partir de glutamina, pela enzima glutaminase ativada por fosfato (PAG- *Phosphate-activated glutaminase*). Após ser liberado o glutamato é convertido em glutamina, pela enzima glial Glutamina Sintetase (GS) e, depois novamente convertido em glutamato pela PAG. Esse processo é conhecido como “ciclo da glutamina” e parece garantir o reabastecimento desse neurotransmissor. O glutamato é então acumulado em vesículas sinápticas por transportadores especializados e, após despolarização da membrana, é liberado na fenda sináptica (Foster & Kemp, 2006).

Após ser liberado na fenda, o glutamato pode se ligar a dois tipos de receptores, levando à despolarização da membrana pós-sináptica: (i) os ionotrópicos do tipo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), N-metil D-aspartato (NMDA) e Kainato; e (ii) os metabotrópicos do tipo mGlu, acoplados à proteína G. Os receptores do tipo AMPA e NMDA podem coexistir na mesma sinapse, porém os receptores de kainato têm distribuição mais restrita (Foster & Kemp, 2006; Palmer, 2005).

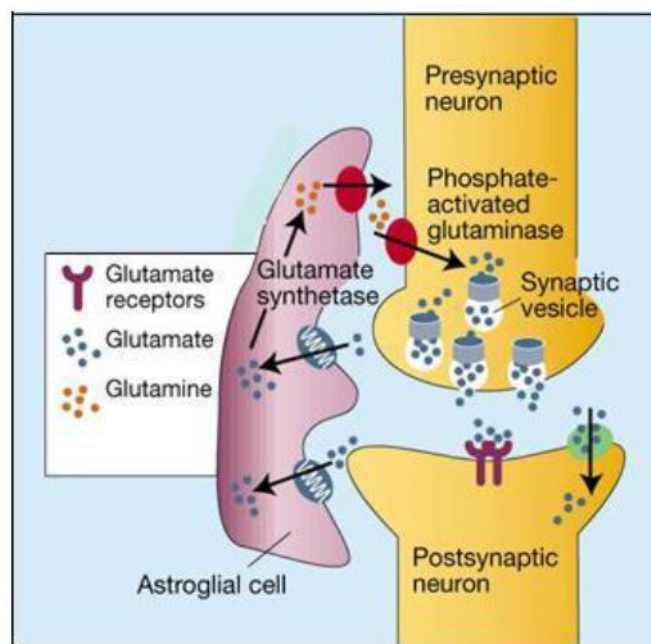


Figura 4: Esquema de um terminal glutamatérgico indicando a síntese a partir da glutamina, pela ação da enzima glutaminase ativada por fosfato, excitação, recaptação e ativação de um receptor pós-sináptico. A estrutura em rosa representa uma célula da glia e as estruturas em amarelo as células neuronais pré e pós-sinápticas. Fonte: Rothstein, 2000.

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC. Conforme apresentado na **Figura 5**, o GABA é sintetizado nos terminais sinápticos a partir do glutamato, pela enzima glutamato descarboxilase (GAD). O GABA é metabolizado, após alguns outros passos, a succinato pela enzima succinato semialdeído desidrogenase (SSD). A liberação de GABA também está envolvida no “ciclo da glutamina”, indicando que esse ciclo mantém ambos os reabastecimentos de glutamato e GABA. Após ser liberado na fenda sináptica, o GABA pode se ligar a

diferentes receptores causando a hiperpolarização da membrana pós-sináptica: os receptores ionotrópicos GABA_A e GABA_C; e o receptor metabotrópico GABA_B.

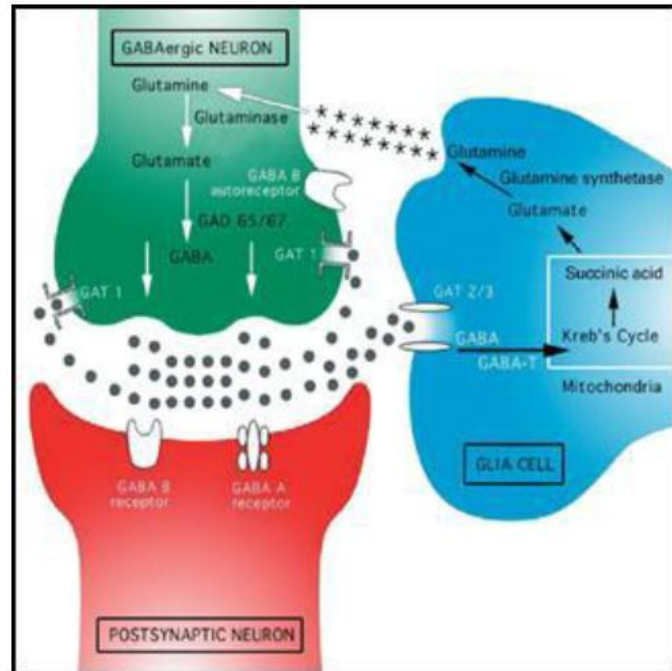


Figura 5: Esquema de um terminal GABAérgico indicando a síntese de GABA a partir de glutamato, exocitose na fenda sináptica, recaptação e ligação em receptores dos tipos ionotrópicos GABA_A e GABA_C e o receptor metabotrópico GABA_B. GAD= GABA Descarboxilase; GAT= Transportador de GABA. Fonte: Bambrilla e cols., 2003.

1.3.3.2. Papel no aprendizado e na memória

Alguns trabalhos sugerem o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA na LTP, processo eletrofisiológico provavelmente envolvido na formação de memória (Riedel e cols., 1996; Whitlock e cols., 2006). Estudos farmacológicos, com drogas que afetam a LTP levam a alterações comportamentais, dependentes do hipocampo, que podem ser quantificadas por déficit no desempenho de tarefas espaciais (Bikbaev e cols., 2008, Neyman & Manahan-Vaughan, 2008).

Segundo Sanchez-Perez e cols. (2005) os receptores cerebelares do tipo NMDA também são essenciais para a aquisição do aprendizado motor e para a execução de atividades relacionadas à coordenação motora. Em tarefas de navegação espacial, o aprendizado motor também é requerido para a solução do labirinto.

O circuito Gabaérgico também está envolvido no aprendizado e memória (Toso e cols., 2007; McNally e cols., 2008). Foram descritos diversos tipos de interneurônios GABAérgicos no hipocampo formando sinapses em diferentes domínios das células alvo pós-sinápticas, exercendo importante papel modulatório (Han e cols., 1993; Freund & Buzsáki, 1996). Dados obtidos por diferentes autores corroboram o importante papel deste circuito no aprendizado e memória. Utilizando drogas que ativam o sistema GABAérgico eles mostraram que ocorre prejuízo na formação da memória, quando essas são administradas no ventrículo lateral, hipocampo e amígdala (Nagahara & McGaugh, 1992; Spanis e cols., 1999; Maruki e cols., 2001). Assim como o glutamato, receptores para GABA também estão relacionados ao aprendizado motor, mas nesse caso, em vias estriato-palidais e estriato-nigrais (Bianchi e cols., 2003)

A transmissão GABAérgica também pode estar envolvida no mecanismo de LTP, pois, a administração de antagonistas de receptores de GABA resulta na facilitação da indução de LTP. Assim, a LTP pode estar relacionada ao aumento da atividade excitatória glutamatérgica e diminuição da atividade inibitória GABAérgica, corroborando o papel desses sistemas no aprendizado e memória (Mott & Lewis, 1991).

2. HIPÓTESE

O desempenho cognitivo de camundongos *Swiss*, em uma tarefa de navegação espacial, envolve alterações nas concentrações de glutamato e de GABA no hipocampo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Estabelecer as condições experimentais para avaliação de aspectos cognitivos espaciais em camundongos e verificar o efeito da aquisição da tarefa sobre parâmetros neuroquímicos no hipocampo.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar o desempenho - aprendizado e memória - em tarefa de navegação espacial no LTR, em camundongos *Swiss*.

3.2.2. Mensurar as concentrações de glutamato e GABA no hipocampo.

3.2.3. Avaliar as correlações entre os parâmetros neuroquímicos (item 3.1.2.) e entre esses e os comportamentais (item 3.1.1.).

Objetivo lateral: implantar no LaNeC, o método do LTR descrito por Deacon & Rawlins (2002), para avaliação de aspectos cognitivos espaciais em camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sujeitos experimentais - Amostras

Foram utilizados quarenta e seis camundongos machos, adultos (três meses de idade), da linhagem *Swiss*, provenientes do biotério de criação da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os camundongos foram mantidos no biotério experimental do Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC), sob ciclo de 12 horas claro/escuro, recebendo água e ração *ad libitum* durante o tempo de realização de todos os experimentos. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela *Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA* da UFMG sob número de protocolo 161/2014 (Anexo 1).

4.2. Delineamento experimental

O estudo consistiu de um experimento e uma réplica, independentes, contando ao todo com 46 camundongos alocados em três grupos: **Grupo Controle** (n=14); **Grupo Controle Atividade** (n=14) e **Grupo “Aprendizado”** (n=18). No Grupo Controle os camundongos não foram submetidos à tarefa cognitiva e nem à exposição ao LTR, no Grupo Controle Atividade os camundongos foram expostos ao LTR, sem a finalidade de resolver a tarefa cognitiva e, no Grupo “Aprendizado” os camundongos foram submetidos ao treino e teste espacial no LTR. Os camundongos foram treinados durante sete dias consecutivos (sete sessões) no LTR, como detalhado abaixo, sendo eutanasiados por decapitação no sétimo dia. Após decapitação, os camundongos tiveram o cérebro rapidamente retirado e mantido sobre uma placa de Petri invertida no gelo, para dissecação do hipocampo de cada hemisfério. As amostras de hipocampo foram pesadas e mantidas congeladas à -80° C. Os ensaios bioquímicos foram realizados, dentro de no máximo 60 dias, conforme descrito abaixo. A **figura 6** apresenta um fluxograma do delineamento experimental.

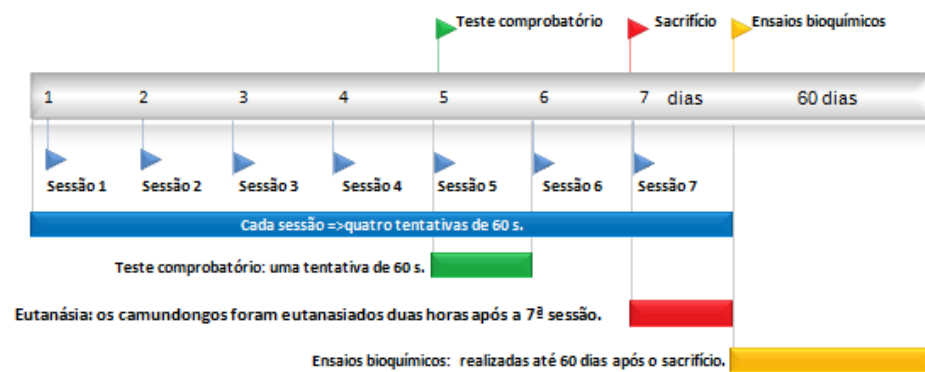


Figura 6: Esquema do Delineamento Experimental. Barra superior representa a sequência de dias ao longo do experimento. Teste comprobatório: realizado duas horas após a sessão 5. A eutanásia foi executada duas horas após a sessão 7. Os ensaios bioquímicos foram realizados até 60 dias após a eutanásia.

4.3. Labirinto em Tanque Raso- Tarefa de navegação espacial

As avaliações comportamentais foram realizadas utilizando o LTR, um labirinto construído de acordo com especificações descritas por Deacon & Rawlins (2002), porém com modificações, conforme detalhado abaixo. Os protocolos dos procedimentos de treino e teste também foram diferentes do proposto por esse pesquisador. *Equipamento:* consistiu de um labirinto (LTR) circular, o qual inicialmente foi construído em uma base (plataforma) de 70 cm de diâmetro, de MDF, recoberta por material adesivo preto. No entanto, depois de colocada a água (2,5 cm de altura), detectou-se vazamentos e a plataforma foi recoberta com material emborrachado preto. Na borda circular da plataforma ou base, foi colocada uma parede de acrílico transparente, composta por 12 placas de 17 cm de altura e 30 cm de largura, compondo um dodecágono. Na **Figura 7**, que apresenta uma foto do labirinto, pode-se ter uma ideia da estrutura da plataforma e de sua borda constituída por uma parede de acrílico. Em cada junção entre duas placas consecutivas de acrílico, na borda, há uma saída construída com tubos de material plástico preto, com 40 mm de diâmetro. Apenas uma das 12 saídas existentes é aberta e permite o animal fugir do labirinto (saída verdadeira), as outras 11 saídas são falsas, ou seja, são vedadas com material plástico preto para não permitir a saída do camundongo através do tubo.

O LTR se encontra em uma sala de 3,7 m², com luminosidade em torno de 560 lux, a uma altura de 30 cm do chão. A luminosidade e altura funcionaram como estímulos aversivos. A sala possui pistas visuais fixas extra-labirinto, que servem de referências visuo-espaciais, utilizadas pelo camundongo para localizar a saída (reforço). O equipamento não possui nenhuma pista, marca ou sinal interno, que pudesse servir de pista intralabirinto. Uma câmera de televisão com lente angular foi fixada no teto da sala bem acima do labirinto para registrar o comportamento do animal durante as tentativas do treino e do teste. As imagens foram gravadas e analisadas pelo experimentador, revendo os vídeos.



Figura 7- Foto do Labirinto em Tanque Raso utilizado no presente estudo. Consiste em um equipamento circular com doze saídas, sendo apenas uma verdadeira. Detalhes no item 4.3.

4.3.1. Treino – Aprendizado Espacial

O treino (aquisição) foi realizado em sete sessões consecutivas, sendo uma sessão por dia. Cada sessão foi constituída de quatro tentativas com rodízio dos camundongos entre as tentativas. Todas as sessões do treino foram realizadas no período da manhã, entre 9h e 12h. Durante o treino a saída (reforço) estava localizada em uma posição constante, em relação às dicas extra-labirinto, na periferia

do quadrante Norte (quadrante alvo). Cada tentativa consistiu em colocar o animal no centro do labirinto com a cabeça virada para um quadrante diferente. O camundongo foi deixado no equipamento por no máximo 60 segundos. A tentativa era finalizada quando o camundongo encontrava a saída ou o tempo de 60 segundos era atingido e, neste último caso, o camundongo era gentilmente conduzido até a saída, pelo experimentador, com o auxílio de duas placas transparentes. Depois de encontrar ou ser guiado até a saída, o tubo em que camundongo estava era retirado do equipamento e dessa forma, o animal era recolocado dentro de sua gaiola. A latência (tempo em segundos gasto pelo camundongo para encontrar a saída) foi utilizada como unidade quantitativa do desempenho do camundongo durante o treino no LTR. A latência, em segundos, foi obtida através do cálculo da mediana dos valores nas quatro tentativas de cada sessão. Quanto menor a latência, melhor o desempenho do animal. Outra unidade de registro do desempenho dos animais foi o número de erros. Foi considerado “erro” todas as vezes em que o animal introduzia a cabeça em um tubo sem saída. Resumindo: o desempenho do animal, em cada tentativa de uma sessão, foi registrado em duas unidades: (i) latência (s), definida como o tempo gasto para o animal encontrar o reforço (saída) e (ii) número de erros, definido como o número de vezes que o animal tentava entrar, colocando a cabeça, em um tubo sem saída, ou seja, errava o alvo. O resultado final do desempenho dos animais em cada sessão foi expresso: (i) pela mediana das latências (s) das quatro tentativas em cada sessão, (ii) pela mediana do número de erros das quatro tentativas em cada sessão.

4.3.2. Teste Comprobatório – Memória Espacial

Duas horas após a sessão cinco, foi realizado o teste comprobatório para avaliar a memória espacial de referência. Neste teste, a saída verdadeira (reforço) foi obstruída e o labirinto foi girado em relação à sala em 180°, sendo cada camundongo colocado no equipamento uma única vez e deixado permanecer no labirinto por um tempo total de dois minutos. O tempo de permanência no quadrante alvo, registrado durante o primeiro minuto, foi utilizado como um índice da memória espacial de referência. O tempo de permanência no quadrante alvo durante o segundo minuto, foi utilizado para expressar o índice de extinção. Após o teste comprobatório (5º dia), outras duas sessões de treino foram executadas nos dias posteriores (6º e 7º dias) para garantir que os camundongos que eventualmente tivessem extinguido o

comportamento durante o teste comprobatório (5^a sessão), readquirisse a tarefa antes de serem eutanasiados. Assim, a coleta dos hipocampos para a determinação dos parâmetros neuroquímicos foi realizada, duas horas após a 7^a sessão, com os camundongos em condições de desempenho máximo, relativo ao processo de aprendizagem da tarefa espacial.

4.4. Dissecação do cérebro

Após a eutanásia, os encéfalos foram rapidamente retirados da cavidade craniana e embebidos em solução de Ringer, sobre uma placa de Petri invertida sobre gelo. Após a separação dos hemisférios, o mesencéfalo foi removido e o hipocampo exposto foi cuidadosamente dissecado da região cortical de cada hemisfério. As amostras de hipocampo foram pesadas e armazenadas em microtubo, e mantidas à -80° C até o dia dos ensaios bioquímicos, para determinação das concentrações de glutamato e GABA.

4.5. Dosagem de Glutamato e GABA por Cromatografia Líquida de Alta Performance (*High performance liquid chromatography*- HPLC)

O método utilizado no presente estudo para as dosagens de GABA e Glutamato foi desenvolvido pelo nosso grupo (Freitas-Silva e cols., 2009), e se encontra detalhado abaixo.

4.5.1. Processamento das amostras biológicas

De cada animal foi escolhido aleatoriamente um dos hipocampos, ou do hemisfério direito ou do esquerdo, para serem utilizados nas dosagens neuroquímicas. As amostras de hipocampo foram descongeladas e pesadas e homogeneizadas em 15 volumes de solução metanol: água (85:15 v/v) em homogeneizador semiautomático. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 4°C, durante 15 minutos em uma rotação de 7.800 g (Sorvall RC-5B). O sobrenadante obtido após centrifugação foi coletado e mantido no gelo, até ser submetido à derivatização, que ocorreu no mesmo dia, um minuto antes de aplicar a amostra no HPLC.

4.5.2. Derivatização

Devido à ausência de características eletroativas ou fluorescentes intrínsecas dos aminoácidos glutamato e GABA, utilizou-se a técnica de derivatização pré-coluna para a separação e identificação cromatográfica desses compostos. A derivatização pré-coluna foi realizada conforme descrito previamente por Mengerink e cols. (2002) e Kutlán & Molnár-Perl (2003). A reação de derivatização foi feita misturando-se 100 µL de amostra, 20 µL de de ortoftaldeído (OPA) metanólico (5 mg/mL) preparado no dia do ensaio, 75 µL de tampão borato (pH 9,9) e 5 µL de ácido 3-mercaptopropiônico (MPA). A solução resultante foi levemente agitada e injetada no sistema cromatográfico após um minuto, à temperatura ambiente.

4.5.3. Condições cromatográficas

A **Figura 8** apresenta um esquema do sistema cromatográfico utilizado, indicando os componentes do sistema. O sistema utilizado foi o cromatógrafo *Shimadzu* (LC-10AD, Tokyo, Japan) com válvula injetora de 200 µL (*Rheodyne 7725-I*, California, USA) e detector fluorescente (FLD - *Shimadzu spectrofluorometric detector* RF-551, Tokyo, Japan) acoplado a uma bomba LC-10. Os comprimentos de onda de excitação e emissão utilizados foram de 337 e 454 nm, respectivamente. Uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa C18 (150 mm×4,6 mm, ID) e pré-coluna (RT 250-4 E. Merck, Darmstadt E.R., Germany) foram utilizadas nas análises.

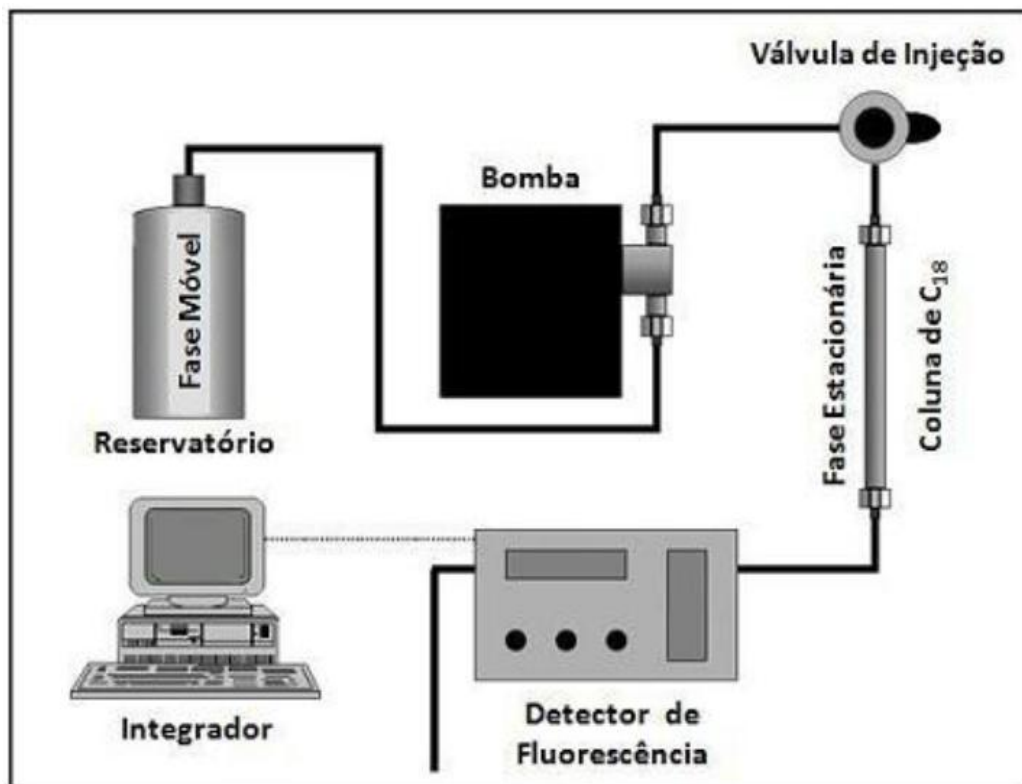


Figura 8: Representação esquemática dos componentes de um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) – Figura retirada do site: <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia-.html>, acesso em 05-02-15.

A fase móvel isocrática consistiu de uma solução 0,05 M de acetato de sódio, tetrahydrofurano e metanol (50:1:49 v/v), pH 4,0. Glutamato e GABA foram eluídos em um tempo inferior a 9 minutos e as concentrações desses neurotransmissores nas amostras de tecido cerebral – hipocampo - foram calculadas de acordo com as áreas dos picos e respectivas curvas padrões. A **Figura 9** mostra o perfil de um cromatograma representativo de uma análise, indicando os picos de glutamato e GABA e seus respectivos tempos de retenção. Um integrador (Shimadzu C-R7Ae plus) contendo um programa de análise de dados acoplado ao sistema cromatográfico forneceu a área dos picos dos cromatogramas a partir da intensidade de fluorescência. Os dados das concentrações de glutamato e GABA foram expressos como média das triplicatas de cada amostra em $\mu\text{g/g}$ de tecido e ng/g de tecido, respectivamente.

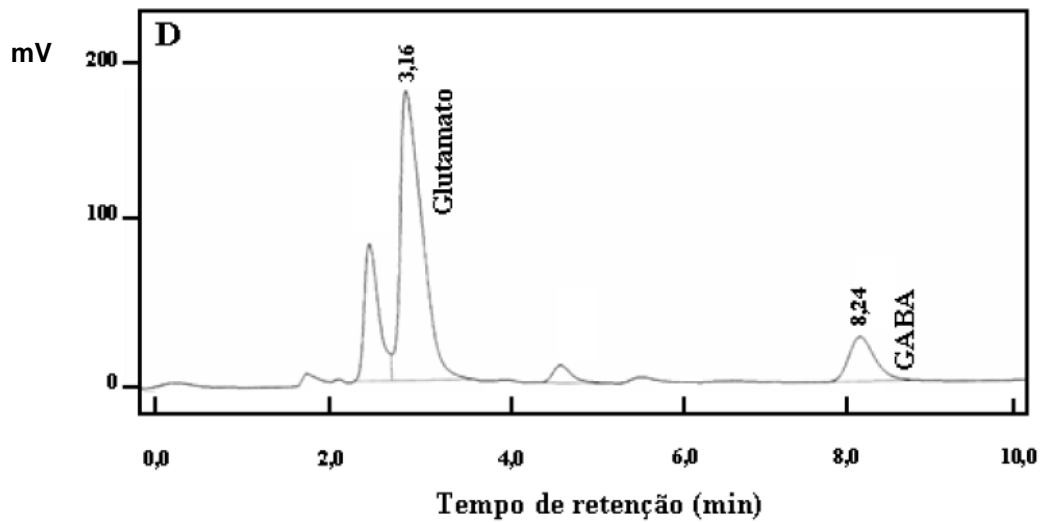


Figura 9: Perfil de um cromatograma representativo de uma análise, indicando os picos de glutamato e GABA e seus respectivos tempos de retenção. min=minutos, mV=milivolts.

4.6. Análises Estatísticas

A análise dos dados foi feita através do programa GraphPad Prism 5.0/2007. A normalidade dos dados foi verificada através dos testes de Kolmogorovi-Smirnov e Shapiro-Wilk. Os dados comportamentais foram analisados por Análise de Variância com medida repetida para dados não paramétricos (Teste Friedman), o tempo gasto no quadrante alvo foi analisado utilizando Kruskal-Wallis seguido de *post-hoc*, teste de múltiplas comparações de Dunn. As dosagens bioquímicas foram realizadas em triplicata e a média também foi analisada por ANOVA de uma via seguido de *post-hoc*, teste de múltiplas comparações de Tukey. Todos os valores foram expressos como média \pm erro-padrão. Diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % ($p < 0,05$). Para verificar a existência de associação entre os dados neuroquímicos e entre esses e os dados comportamentais foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para dados paramétricos e o teste de correlação de Spearman para dados não paramétricos.

5. RESULTADOS

5.1. Desempenho de camundongos *Swiss* na tarefa de navegação espacial, no LTR

Treino no LTR: Os animais foram submetidos a quatro tentativas por sessão/dia durante sete dias. O desempenho dos camundongos submetidos ao LTR foi expresso na forma de latência, em segundos, definida como o tempo gasto para encontrar a saída (**Tabela 1**) resultando em uma típica curva de aprendizado (**Figura 10A**). O teste de Friedman mostrou efeito significativo do treino ($F_{(6,21)} = 34,54$ e $p = 0,0001$) indicando que os animais foram capazes de aprender a tarefa. O teste *post-hoc* de Dunn apontou diferença significativa entre os dias cinco ($p = 0,001$), seis ($p = 0,01$) e sete ($p = 0,0001$), quando comparados ao primeiro dia do treino. Durante o treino foram contabilizados os erros que o animal cometeu em cada tentativa. Um erro é considerado quando o animal tenta colocar a cabeça em qualquer um dos tubos sem saída (**Tabela 2**), essa medida de erros forneceu outra curva de aprendizado (**Figura 10B**). O treino no LTR teve efeito significativo ($F_{(6,21)} = 40,23$, $p = 0,0001$) sobre o número de erros cometidos pelos camundongos ao longo das sessões. O teste *post-hoc de Dunn* mostrou diferença estatística entre os dias três ($p = 0,01$), quatro ($p = 0,01$), cinco ($p = 0,0001$), seis ($p = 0,0001$) e sete ($p = 0,0001$), quando comparados ao primeiro dia.

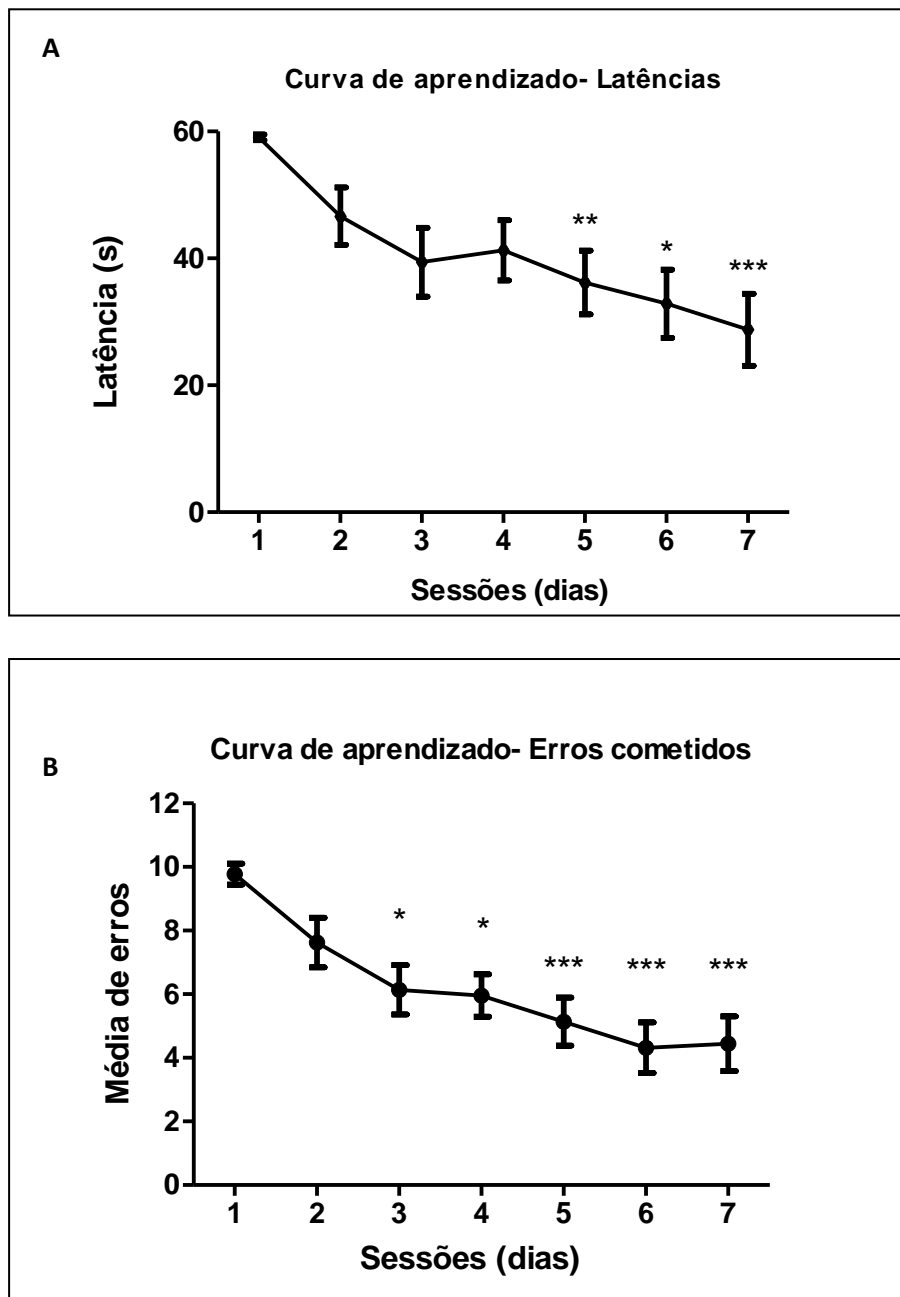


Figura 10: Curvas de aprendizado da tarefa espacial no LTR, mostrando o desempenho médio dos animais do Grupo “Aprendizado” (n=18), ao longo das sete **sessões**. Cada ponto representa a média da mediana das quatro tentativas, para os 18 camundongos, em cada uma das sessões. **Painel A** Curva de aprendizado expressa como latência (s) média. **Painel B** Curva de aprendizado expressa como a média dos erros cometidos na tarefa. Os asteriscos se referem aos valores de “p” obtidos do teste *post-hoc*, quando se comparou cada sessão com a primeira: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

A **figura 11** mostra as curvas de aprendizado espacial apresentadas na **figura 10**, com a diferença na expressão dos dados. Na **figura 11** cada ponto representa a média do desempenho dos 18 camundongos, em cada uma das **tentativas** (T1, T2, T3, T4) em uma sessão. No **painel A** está representada a curva usando a média das latências (s) em cada tentativa e no **painel B** a média dos erros cometidos, também em cada tentativa. Através das figuras pode-se observar que a comparação entre o desempenho na última tentativa (T4) de uma sessão e a primeira tentativa da sessão seguinte (T'1) pode fornecer informações do processo de aprendizagem e memória ao longo do treino. Essas comparações foram feitas de forma quantitativa, expressando-se a diferença através do delta (*D*) e da *razão* (*R*) entre as duas tentativas (“T4 de uma sessão” e “T'1 da sessão subsequente”). Assim, $(D1)=T1_{sess\ 2} - T4_{sess\ 1}$, $(D2)= T1_{sess\ 3} - T4_{sess\ 2}$, e assim por diante, e $(R1)=T1_{sess\ 2}/T4_{sess\ 1}$, $(R2)= T1_{sess\ 3}/T4_{sess\ 2}$, e assim por diante. 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 sete dias do processo de aquisição. As **tabelas 3 e 4** apresentam os valores obtidos para *D* e *R* considerando as variáveis como latência (**Tabela 1**) e erro cometidos pelos camundongos (**Tabela 2**). O teste de Kruskal-Wallis não apontou efeito do treino entre os deltas ($F_{(5,15)}= 1,98$; $p=0,85$) nem entre as razões ($F_{(5,15)}=5$; $p=0,41$) para o desempenho expresso em latência(s). Também não foi encontrado efeito entre os deltas ($F_{(5,15)}=1,83$; $p=0,89$) nem entre as razões ($F_{(5,15)}=4,46$; $p=0,78$) para o desempenho expresso em erro.

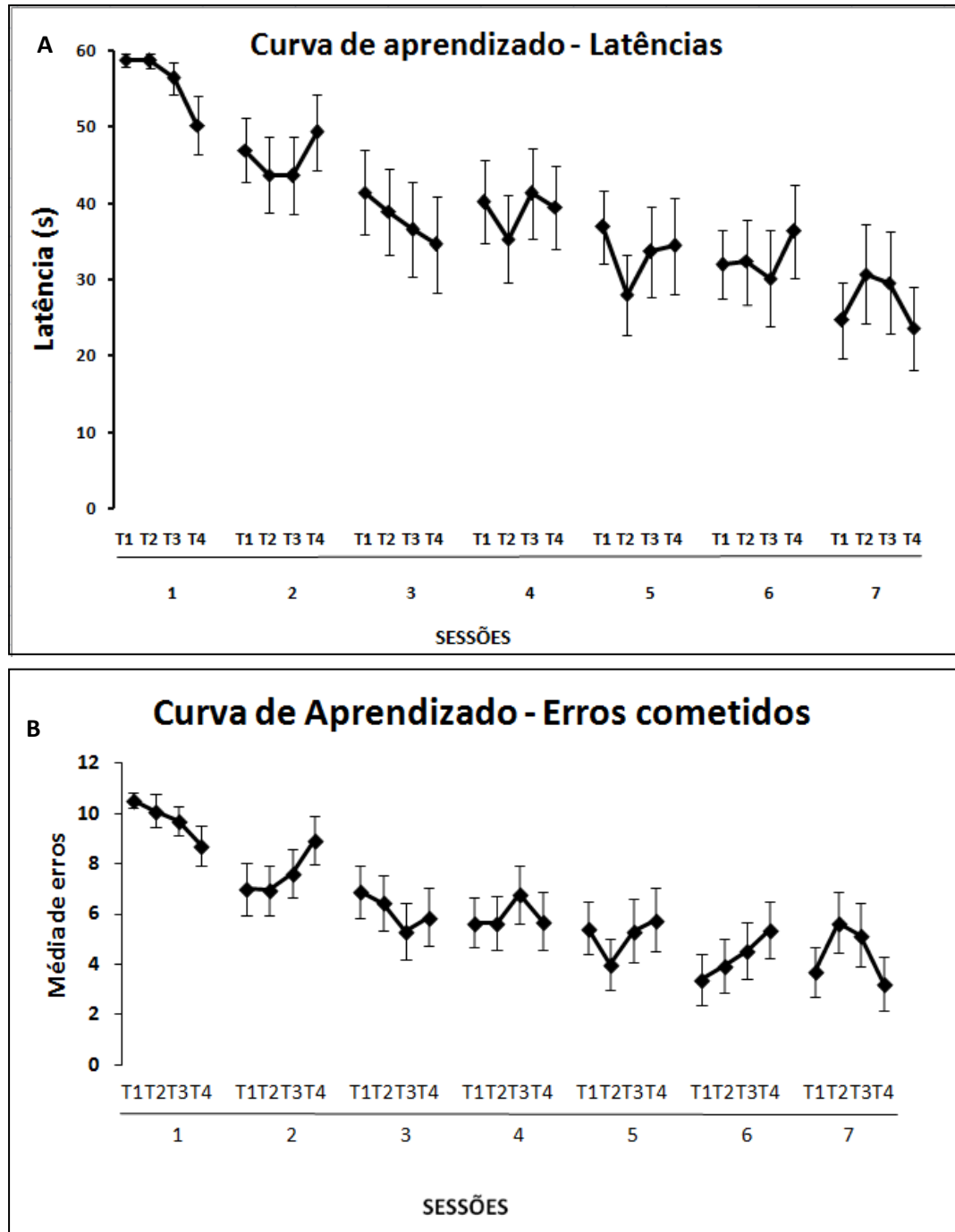


Figura 11: Curvas de aprendizado da tarefa espacial no LTR mostrando o desempenho (média \pm erro padrão) dos animais do Grupo “Aprendizado” (n=18), ao longo das **tentativas**. T1T2T3T4 : tentativas 1, 2, 3 e 4. **Painel A:** dados expressos como médias das **latências** (s) e **Painel B:** dados expressos como médias dos **erros cometidos** = entradas nos tubos errados (sem saída).

Tabela 1: Dados da comparação entre o desempenho (**LATÊNCIA**, s) na última tentativa (T4) de uma sessão e a primeira tentativa da sessão seguinte (T'1), ao longo das sessões do treino no LTR. Delta (D) = T1' – T4 e Razão (R) = T1'/T4.

Comparação entre o desempenho (LATÊNCIA) em duas tentativas (T'1 e T4) de sessões subsequentes						
Comparações entre duas sessões	1	2	3	4	5	6
	1ª. e 2ª.	2ª. e 3ª.	3ª. e 4ª.	4ª. e 5ª.	5ª. e 6ª.	6ª. e 7ª.
n	18	18	18	18	18	18
DELTA	-3,2	-7,8	5,5	-2,6	-2,5	-11,6
RAZÃO	0,9	0,8	1,2	0,9	0,9	0,7

Tabela 2: Dados da comparação entre o desempenho (**ERROS COMETIDOS NA TAREFA**) na última tentativa (T4) de uma sessão e a primeira tentativa da sessão seguinte (T'1), ao longo das sessões do treino no LTR. Delta (D) = T1' – T4 e Razão (R) = T1'/T4.

Comparação entre o desempenho (ERROS COMETIDOS NA TAREFA) em duas tentativas (T'1 e T4) de sessões subsequentes						
Comparações entre duas sessões	1	2	3	4	5	6
	1ª. e 2ª.	2ª. e 3ª.	3ª. e 4ª.	4ª. e 5ª.	5ª. e 6ª.	6ª. e 7ª.
n	18	18	18	18	18	18
Delta	-1,7	-2,0	-0,2	-0,2	2,3	-1,6
Razão	0,8	0,7	0,9	0,9	0,5	0,6

Teste comprobatório: No dia cinco após duas horas da última sessão do treino, os camundongos foram submetidos ao teste comprobatório. O teste teve duração total de 2 min, sendo os comportamentos dos camundongos registrados separadamente, no primeiro minuto do tempo total e no segundo minuto do tempo total. Após a saída (reforço) ter sido obstruída (reforço removido) e o labirinto girado em relação à sala, foi medida a porcentagem de tempo que o animal passou em cada quadrante. A **figura 12** apresenta no **painel A**, a % de tempo que os animais permaneceram nos quadrantes durante o primeiro minuto do teste comprobatório e o **painel B** no segundo minuto. O teste Kruskal-Wallis indicou efeito ($F_{(3,6)} = 16,93$; $p=0.0007$) do treino, mostrando que os animais se lembravam em qual quadrante estava anteriormente a saída, considerando que eles permaneceram mais tempo no quadrante alvo durante o primeiro minuto. O teste *post-hoc* de Dunn mostrou que há diferença significativa entre os tempos nos quadrantes, confirmando que os camundongos passaram significativamente mais tempo no quadrante alvo, quando comparado com as porcentagens de permanência nos demais quadrantes. Os dados obtidos no segundo minuto do teste comprobatório referem-se à extinção. O teste Kruskal-Wallis mostrou que não houve efeito ($F_{(3,6)} = 6,973$; $p=0,0728$) do treino sobre o tempo de permanência nos quadrantes durante o segundo minutos do teste comprobatório.

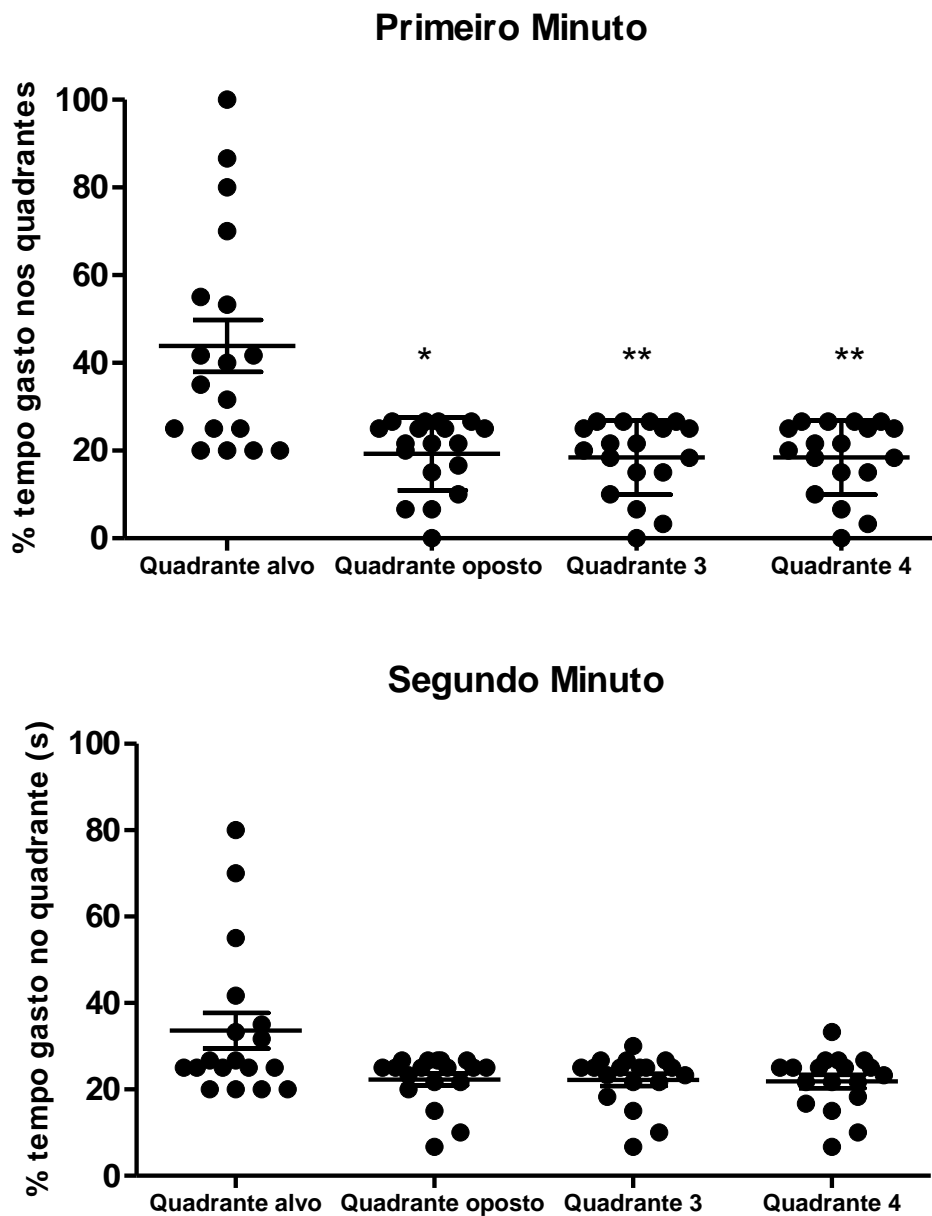


Figura 12: Tempo de permanência dos camundongos ($n=18$) do Grupo “Aprendizado” em cada um dos quadrantes, expresso em porcentagem (%), dos animais durante o teste comprobatório, com duração total de 2 minutos, sem a presença do reforço (saída). **Painel A:** no primeiro minuto do teste. **Painel B:** no segundo minuto de teste. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. Os asteriscos se referem aos valores de “p” obtidos no teste *post-hoc*, (*) $p<0,05$, (**) $p<0,01$.

5.2. Níveis de glutamato e GABA no hipocampo

As concentrações de glutamato e GABA presentes no hipocampo dos animais dos três grupos foram analisadas por ANOVA de uma via com *post-hoc* de Tukey (**Figura 13**). ANOVA não mostrou efeito ($F_{(2,43)}=1,82$; $p=0,17$) do treino sobre a concentração de Glutamato no hipocampo. Por outro lado, o treino afetou de forma significativa a concentração de GABA no hipocampo ($F_{(2,43)}= 8,37$; $p=0,008$) . O teste *post-hoc* mostrou diferença significativa entre o grupo aprendido, quando comparado ao grupo controle ($p=0,0001$) e controle atividade ($p=0,02$). A aquisição da tarefa espacial causou um aumento na concentração hipocampal de GABA. Não foi verificado efeito significativo ($F_{(2,3)}= 2,742$; $p= 0,25$) do treino sobre as taxas [glutamato]/[GABA] (**Figura 14**), utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

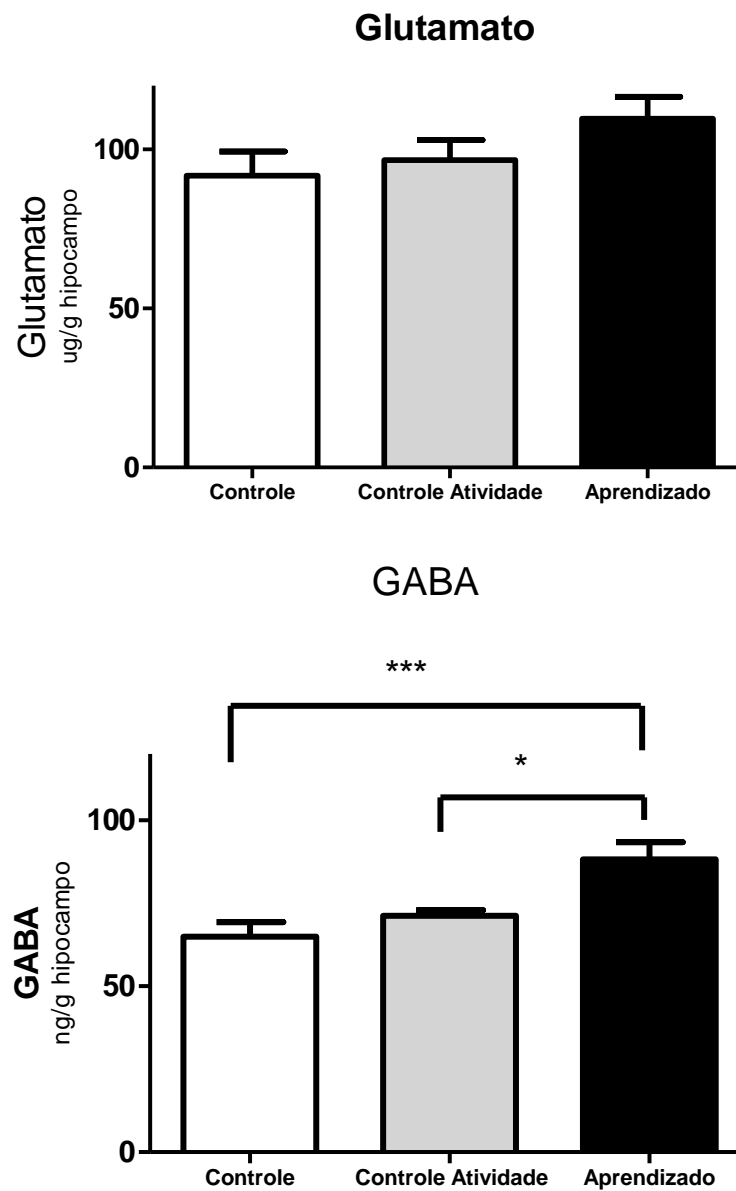


Figura 13: Concentrações de Glutamato e GABA no hipocampo dos camundongos *Swiss* dos três grupos experimentais. Grupo Controle, $n=14$, Grupo Controle Atividade, $n=14$ e Grupo "Aprendizado", $n=18$. As amostras biológicas obtidas de cada camundongo foram analisadas em triplicada e a média utilizada para calcular a média do grupo, para as concentrações de glutamato e GABA. Os dados são apresentados pela média \pm erro padrão de cada grupo. (*) $p<0,05$ e (***) $p<0,001$.

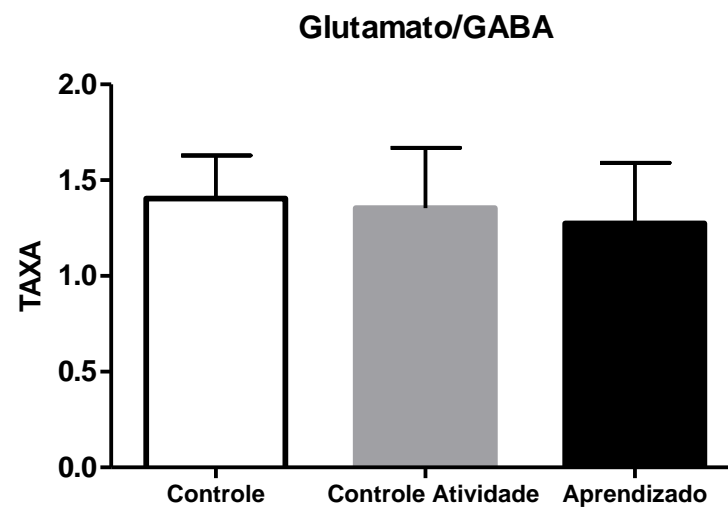


Figura 14: Taxa [glutamato]/[GABA] no hipocampo de camundongos Swiss dos três grupos experimentais. Grupo Controle, n=14, Grupo Controle Atividade, n=14 e o Grupo Aprendizado, n=18. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão.

5.3. Análises das correlações entre os dados bioquímicos e entre esses e os dados comportamentais.

O teste de correlação de Pearson mostrou correlação linear positiva entre as concentrações de glutamato e GABA (**Figura 15**) no hipocampo dos camundongos controle ($r=0,61$; $p=0,01$) e aprendido ($r=0,69$; $p=0,001$), porém no grupo Controle Atividade essa correlação não foi verificada ($r=0,43$; $p=0,12$).

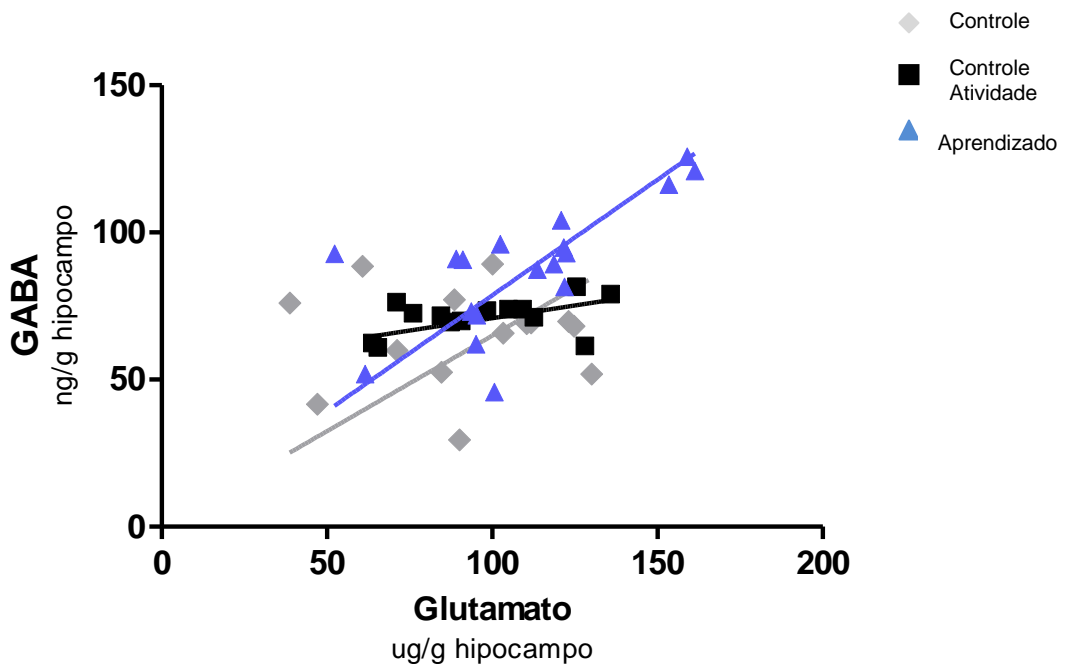
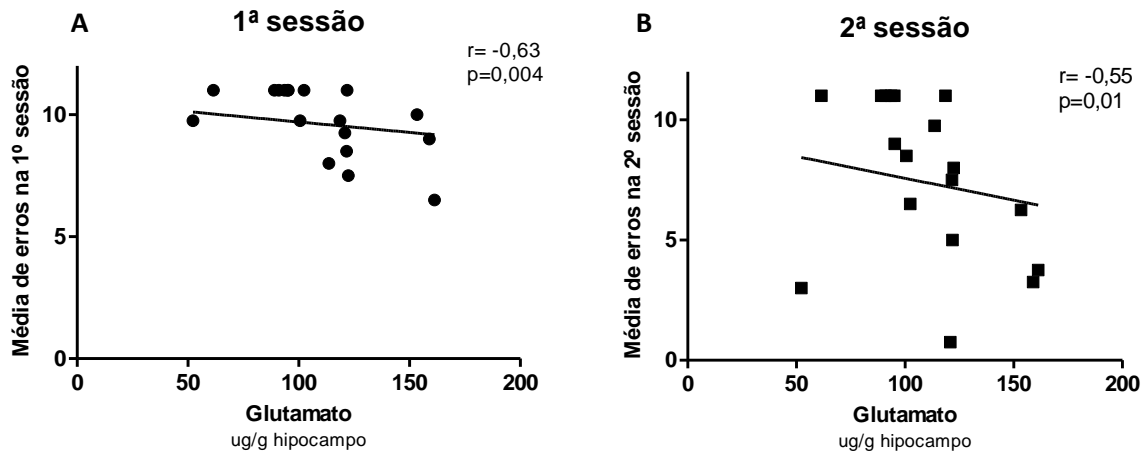


Figura 15: Gráfico de dispersão entre as concentrações de glutamato e GABA hipocampais. Losango cinza representa Grupo Controle ($n=14$) ($r=0,61$ $p=0,01$), quadrado preto o Grupo Controle Atividade ($n=14$) ($r=0,43$ $p=0,12$) e o triângulo azul o Grupo Aprendizado ($n=18$) ($r=0,69$; $p=0,001$).

O teste de correlação de Spearman mostrou correlação linear negativa entre o número de erros cometidos no teste (Grupo Aprendizado), na 1ª ($r = -0,63$; $p = 0,004$) e 2ª ($r = -0,55$; $p = 0,01$) sessões do treino e as concentrações de glutamato no hipocampo desses animais. Mostrou também correlação negativa entre o número de erros observados na 1ª ($r = -0,52$; $p = 0,02$) e 2ª ($r = -0,67$; $p = 0,002$) sessão e as concentrações de GABA no hipocampo (**Figura 16**). Não houve correlação significativa entre as demais variáveis comportamentais e bioquímicas.

GLUTAMATO



GABA

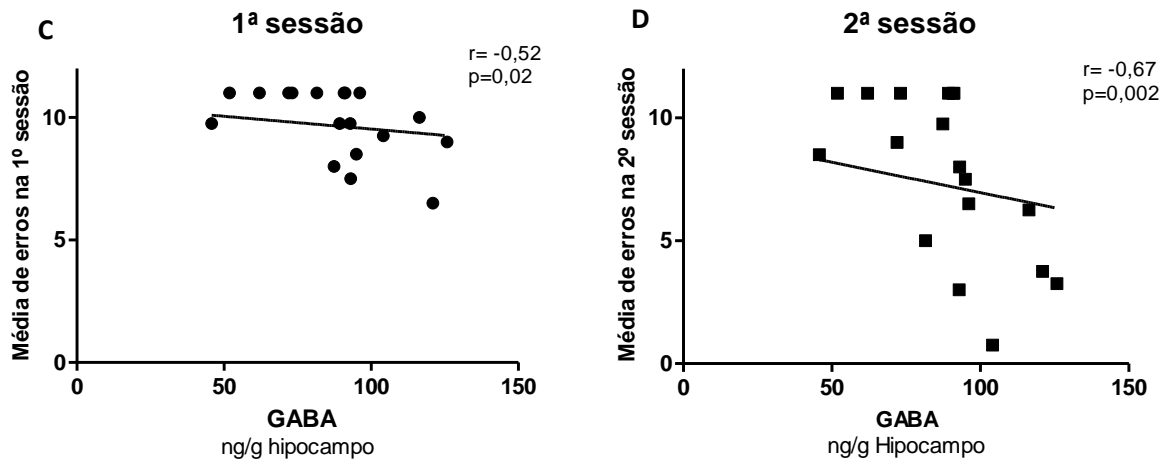


Figura 16: Gráficos de dispersão das correlações entre o desempenho dos camundongos, expressos em número de erros, nas 1ª ou 2ª sessões do treino e as concentrações dos neurotransmissores, glutamato e GABA no hipocampo. **Painéis A e B** mostram as correlações negativas entre as concentrações de glutamato e o número de erros cometidos nas 1ª ($r = -0,63$; $p = 0,004$) e 2ª ($r = -0,55$; $p = 0,01$) sessões do treino no LTR, respectivamente. **Painéis C e D** mostram as correlações negativas entre as concentrações de GABA e o número de erros cometidos na 1ª ($r = -0,52$; $p = 0,02$) e 2ª ($r = -0,67$; $p = 0,002$) sessões do treino no LTR, respectivamente.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que os camundongos foram capazes de aprender a tarefa de navegação espacial e que a estratégia para resolver o labirinto foi a utilização de dicas espaciais extra-labirinto. Esses dados também confirmam que o equipamento LTR é adequado para avaliar o desempenho cognitivo de camundongos em tarefas espaciais. Com relação aos ensaios neuroquímicos, os dados do presente trabalho mostram pela primeira vez, que o processo de aprendizagem da tarefa no LTR tem efeito significativo sobre os níveis de GABA no hipocampo. Além disto, considerando a correlação significativa entre as concentrações de GABA e glutamato, esses resultados sugerem a ocorrência de um ajuste neuroquímico na região do hipocampo, induzida pela atividade cognitiva gerada durante o processo de aprendizado espacial.

Interessante destacar que, diferentemente da maioria dos trabalhos na área de neurociências comportamental e molecular, no qual a variável independente é biológica, o desenho experimental deste estudo foi baseado no uso de uma variável independente da categoria comportamental (execução de uma tarefa cognitiva espacial) e variáveis dependentes biológicas (níveis de GABA e Glutamato no hipocampo).

Até onde pudemos verificar, desde que Robert Deacon e colaboradores propuseram e validaram o LTR (Deacon & Rawlins, 2002; Schmitt, 2004), como sendo um método adequado para avaliar o desempenho cognitivo espacial de camundongos, apenas o grupo de Deacon publicou artigos com resultados obtidos em estudos nos quais esse labirinto foi utilizado. Considerando a importância do uso de camundongos como modelo experimental para responder questões de interesse na área de neurociências, decidimos estabelecer o método do LTR no Laboratório de Neurociências Comportamental e Molecular (LaNeC) da UFMG. A implantação desse método visa o desenvolvimento de projetos integrados, utilizando-se ferramentas da bioquímica, imunologia e psicologia experimental para estudar mecanismos moleculares da interface entre o Sistema Nervoso Central e o Sistema Imunológico, relacionados aos processos de aprendizagem e memória espacial.

Durante o treino no LTR observou-se efeito significativo do tempo, mostrando que os camundongos foram capazes de aprender a tarefa espacial (localização do tubo-saída), resultando em uma típica curva de aprendizado. Esse efeito foi verificado pela significativa redução, tanto da latência para encontrar a saída quanto do número de erros cometidos ao longo das sessões. As curvas de aprendizado encontradas no presente trabalho e no trabalho de Deacon & Rawlins possuem algumas diferenças. Essas distinções são devido a diferenças entre os protocolos utilizados. Deacon & Rawlins utilizaram um protocolo, no qual os animais, antes de terem contato com o LTR, foram submetidos a uma tarefa para aprender o princípio de escapar. Os animais foram colocados em uma pequena caixa retangular contendo 2,5 cm de água, com dois tubos de saída (iguais àqueles do LTR) em extremidades opostas, um fechado e outro aberto. O objetivo era que o camundongo aprendesse a escapar da caixa pelo tubo, sendo colocado na caixa de cinco a oito vezes durante um dia, dependendo do nível do desempenho. Dessa forma, a curva apresentada por Deacon & Rawlins tem no seu primeiro dia, latência e número de erros cometidos bem menores do que os verificados neste nosso trabalho. Porém, mesmo sem a etapa de pré-treino, os camundongos foram capazes de aprender a tarefa.

Ao analisarmos as curvas de aprendizado mostrando o desempenho dos camundongos ao longo das tentativas, verificamos que não houve diferença significativa entre o desempenho na última tentativa de uma sessão e a primeira tentativa na sessão seguinte. Esse dado indica que, o que foi aprendido em uma sessão foi recuperado no dia seguinte. Ou seja, as 24 horas de intervalo entre as sessões não afetaram o desempenho dos animais, que foi gradativamente melhorando ao longo do treino. Porém, na curva de aprendizado construída usando-se a latência como unidade de expressão do desempenho em cada tentativa, é possível visualizar, entre a terceira e quarta sessões, a ocorrência de uma queda no desempenho dos animais nessa etapa do processo. No entanto, esse fato não foi observado quando o desempenho é expresso em “número de erros cometidos”. Como a expressão através do “número de erros cometidos” sofre menor interferência do desempenho motor do que a latência, esse resultado sugere que algo relacionado à motricidade possa ter influenciado o desempenho dos animais nessa fase do aprendizado. Não sabemos explicar esse dado e também não podemos descartar

hipóteses de que algum fator ambiental, presente no 4º dia do treino, possa ter interferido com a resposta motora dos animais.

Com a finalidade de verificar se os camundongos tinham de fato aprendido a tarefa utilizando estratégias espaciais extra-labirinto, foi realizado o teste comprobatório, no qual a saída verdadeira foi fechada e o labirinto, em relação ao seu eixo central, foi girado em um ângulo de 180°. Desta forma, assegurou-se o controle de qualquer pista de odor e/ou dicas intra-labirinto (visuais) que eventualmente estivessem sendo usadas pelos animais para encontrar o tubo saída. O teste comprobatório foi realizado duas horas após a quinta sessão do treino. A análise do comportamento dos animais durante o primeiro minuto do teste mostrou que os animais se lembravam da localização do reforço (saída), permanecendo significativamente mais tempo no quadrante alvo, onde antes estava a saída. O direcionamento dos animais para o quadrante correto, no primeiro minuto do teste comprobatório indica que estavam utilizando pistas espaciais extra-labirinto e, portanto, haviam construído um mapa espacial do ambiente. No entanto, como não estavam mais sendo reforçados, o natural seria a ocorrência da extinção desse comportamento. Quando analisamos o comportamento dos animais durante o segundo minuto do teste, observamos que não existe diferença significativa entre o tempo de permanência nos quadrantes, indicando que os camundongos extinguiram o comportamento de procurar a saída no quadrante alvo. No entanto, ao verificar os dados apresentados no gráfico da **Figura 12**, embora os valores das médias se aproximem no 2º minuto do teste (média do 1º quadrante diminui e as demais aumentam) podemos perceber que alguns animais ainda permanecem durante a maior parte do tempo no quadrante alvo. Assim, ao fazer uma análise estatística comparando o tempo de permanência no quadrante alvo no primeiro e no segundo minuto, não houve diferença significativa, reforçando a ideia de que a extinção do comportamento foi apenas parcial ou para apenas alguns animais. Como mostra o gráfico da **Figura 12**, esse dado pode ser explicado pela variabilidade do comportamento entre os animais. Uma análise semiquantitativa dos dados brutos indica que aproximadamente 61% dos animais apresentaram certa preferência pelo quadrante alvo no primeiro minuto do teste, sendo que essa porcentagem cai para aproximadamente 39% dos animais, durante o 2º minuto. Uma análise mais detalhada, como por exemplo, um registro do comportamento segundo por segundo e ampliando-se a duração do teste comprobatório, poderia esclarecer

melhor a extinção desse comportamento em camundongos. O tempo de dois minutos de duração, escolhido para realizar o teste comprobatório, foi baseado em estudos do nosso grupo de pesquisa (Pires e cols., 2007; Oliveira e cols., 2010; Silva e cols., 2009) que mostrou que ratos treinados no LAM em cinco sessões (quatro tentativas por sessão) e testados 24 horas após a última sessão, foram capazes de lembrar-se da tarefa no 1º minuto do teste e extinguir o comportamento no 2º minuto do teste comprobatório. Sabe-se que a extinção de um comportamento depende de uma série de variáveis (Skinner, 1979/2003) como o esquema de aprendizado, tipo de reforço, esquema temporal de apresentação do reforço e, é também plausível levantar a hipótese de que existam diferenças entre as espécies em relação a extinção de um mesmo comportamento aprendido em contexto similar. Como camundongos são uma espécie de roedores que permite maiores manipulações biológicas, relativamente mais viáveis e rápidas, o uso desse modelo para estudar as bases neurobiológicas da extinção pode ser um instrumento importante para a área de neurociências comportamental e molecular. Por exemplo, utilizando ratos como modelo experimental, o nosso grupo mostrou que o reaprendizado de uma mesma tarefa no LAM – aprendizado extensivo e reforçado – envolve a participação de componentes neurobiológicos diferentes daqueles utilizados no processo de aprendizagem da mesma tarefa pela primeira vez (Pirez e cols, 2005).

A técnica para a determinação das concentrações de glutamato e GABA, HPLC, utilizada no presente estudo é amplamente consolidada e vem sendo utilizada por muitos autores (Freitas-Silva e cols., 2009; Oliveira-Silva e cols., 2007; Oliveira e cols., 2010; Castro-Neto e cols., 2013). Os valores médios obtidos para os animais do Grupo Controle, para as concentrações ($\mu\text{g/g}$ hipocampo) de Glutamato ($91,7 \pm 7,7$) e para as concentrações (ng/g de hipocampo) de GABA ($64,9 \pm 4,5$) estão de acordo com a literatura (Sierra-Paredes e cols., 2015).

Como mencionado na “Introdução”, tanto GABA quanto o Glutamato são componentes neuroquímicos que fazem parte de dois importantes sistemas regulatórios no Sistema Nervoso. Conforme mostrado por outros autores, esses sistemas desempenham funções importantes no fenômeno da plasticidade neuronal (McEntee, 1993; Toso e cols., 2007; McNally e cols., 2008).

O treino no LTR não afetou significativamente os níveis de glutamato no hipocampo, mas aumentou de forma significativa os níveis de GABA no Grupo “Aprendizado”, quando comparado aos outros dois grupos. De acordo com esse resultado era de se esperar que a taxa entre as concentrações de glutamato e GABA estivesse diminuída, porém não foi verificada diferença significativa com relação aos valores das taxas, entre os grupos. Isso sugere que houve aumento na concentração de glutamato apesar desse aumento não ser significativo. Esse fato pode ser observado no **painel A da Figura 13** e também no exame dos dados brutos. A ausência da detecção de efeito sobre a concentração de Glutamato poderia ser explicada pela maior variabilidade dos dados obtidos nessas medidas. Outro resultado que corrobora, mas não confirma, essa hipótese de que ocorreu um certo ajuste nos níveis de glutamato no hipocampo, é que houve correlação significativa e positiva entre as concentrações de glutamato e GABA no hipocampo dos camundongos do Grupo Controle e do Grupo “Aprendizado”. A reta de correlação entre esses dois parâmetros para o Grupo “Aprendizado” possui uma inclinação similar à reta obtida para o Grupo Controle. A diferença é que nos animais do Grupo “Aprendizado” houve um deslocamento para a esquerda, indicando um aumento nas concentrações dos dois parâmetros, talvez refletindo um aumento da atividade neural. Uma observação interessante, mas que não sabemos ainda explicar é que essa correlação significativa desaparece nos animais do Grupo “Atividade”, indicando que a atividade motora (na ausência da atividade cognitiva) induziu um reajuste nos níveis desses componentes moleculares no hipocampo. Como existem circuitos no cerebelo e estriado (Hoshi et al., 2005), que se interligam com o hipocampo uma hipótese que poderia ser levantada seria que alterações no cerebelo induziriam reajustes neuroquímicos no hipocampo. No entanto, esse efeito não acontece se o indivíduo se encontra frente a uma demanda cognitiva que depende da atividade hipocampal, como no caso do aprendizado espacial. Esses resultados em conjunto sugerem que há um efeito da atividade cognitiva sobre esses parâmetros neuroquímicos, indicando que possa ter ocorrido um ajuste na rede neural para manter o balanço entre os sistemas glutamatérgico e GABAérgico. Alguns autores sugerem que mais importante que as concentrações isoladas desses neurotransmissores, seria o balanço entre eles, cuja disfunção poderia levar a apoptose neuronal relacionada com um pior desempenho cognitivo. Gao e cols. (2014) mostraram que ratos estressados apresentam prejuízo no desempenho no LAM e uma taxa GABA/glutamato no hipocampo aumentada em

relação ao grupo controle. Considerando os dados de Gao e cols. (2014), poderíamos também levantar a hipótese de que o aumento do GABA fosse consequência de um estresse induzido pela exposição ao LTR. No entanto, no caso apresentado aqui, esse efeito não foi observado para os animais do Grupo Controle Atividade, que tiveram valores da concentração de GABA e taxa similares aos animais do Grupo Controle. Além disto, como mencionado, não observamos aumento na taxa entre GABA e glutamato, o que nos permite descartar a hipótese de um efeito do estresse e considerar que o efeito observado no Grupo “Aprendizado” parece ter sido induzido pela atividade cognitiva. Esses resultados mostram que o balanço entre esses sistemas é importante para a manutenção das funções cognitivas (Mishra, 2013; Liguz-Leczna e cols., 2013; Gao e cols., 2014). Além disso, os papéis desses dois sistemas na plasticidade sináptica, aprendizado e memória já foram bem demonstrados (McEntee, 1993; Toso e cols., 2007; McNally e cols., 2008).

Com a finalidade de analisar se existiria alguma relação entre as alterações neuroquímicas e o desempenho comportamental dos animais, realizamos testes estatísticos para verificar a existência ou não de correlações significativas entre esses parâmetros. Para essas análises, decidimos utilizar os dados de desempenho comportamental, expressos como “número de erros cometidos” e não a “latência”. Isso porque quando avaliamos o desempenho dos camundongos baseado no tempo gasto para encontrar o reforço, o dado reflete aspectos cognitivos, mas também a atividade motora, diferentemente de quando o desempenho é expresso pelo “número de erros cometidos”. Outro fator considerado como critério na escolha da unidade da através do número de erros medida, foi um menor número de valores que atingiram “o teto”, já que a latência de 60 segundos representou um valor de “censura” da tarefa. Verificamos correlação negativa significativa entre os números de erros na 1ª e 2ª sessões de treino e as concentrações de GABA e também glutamato. Ou seja, quanto melhor o desempenho, maior os níveis de GABA e Glutamato. Como essas correlações significativas não são observadas em relação ao desempenho dos animais nas sessões subsequentes do treino, levantamos a hipótese de que os componentes neurobiológicos requisitados durante as oito tentativas iniciais (1ª e 2ª sessões em dois dias consecutivos) podem ser diferentes das demandas posteriores onde as informações de “dicas de referências” da tarefa já estariam mais bem consolidadas. No entanto, deve-se notar que as análises bioquímicas foram

realizadas em estruturas coletadas no final do processo de aprendizagem, duas horas depois da 7ª sessão, sugerindo que as modificações que ocorreram nos níveis de GABA persistiram até depois do treino. Essa hipótese de que a demanda em termos de componentes neurobiológicos varia ao longo do processo de aprendizagem foi levantada com base em resultados de experimentos utilizando ratos, anteriormente obtidos pelo nosso grupo (Oliveira-Silva e cols., 2007, Vigil e cols., 2010) e também por outros autores (MacLay e cols., 1999). Nesses estudos, é interessante observar que, tanto o envelhecimento como a neurodegeneração induzida pela deficiência de vitamina B1 causaram disfunções no processo de aprendizagem, que são detectados nas sessões iniciais do treino, entre a segunda e terceira sessões, provavelmente uma fase crítica da aquisição da tarefa e formação do mapa espacial. Nos dois modelos, animais idosos e animais deficientes de vitamina B1, os efeitos sobre o processo de aprendizagem de uma tarefa espacial desaparece com a repetição da tarefa, ou seja, com o treino. Estas observações, com modelos de neurodegeneração e no presente estudo, sinalizam a possibilidade da existência de um mecanismo neurobiológico crítico na fase inicial do processo de aprendizagem. Nesse sentido, os camundongos podem representar um modelo importante para o entendimento da sequência e da cinética das etapas do mecanismo neurobiológico hipocampal, envolvidas com a aprendizagem e memória espacial.

Além de estabelecer um método para o estudo de aspectos cognitivos espaciais em camundongos, o resultado do presente trabalho, traz como contribuição relevante a demonstração de que o treino em uma tarefa de navegação espacial envolve a alteração de um importante parâmetro neuroquímico GABAérgico no hipocampo, que possui papel fundamental na regulação da atividade neural. Esse dado abre novas questões e perspectivas de estudos, que podem contribuir para a compreensão dos substratos neurobiológicos que são a base desse fenômeno.

7. CONCLUSÕES

Os camundongos do Grupo “Aprendizado” foram capazes de aprender a tarefa de navegação espacial no LTR, utilizando dicas extra-labirinto. Esse resultado sugere a formação de um mapa cognitivo espacial do ambiente para a solução do labirinto. A atividade cognitiva gerada na execução da tarefa espacial envolve alterações nos níveis de GABA no hipocampo. Embora não tenha sido verificada alteração significativa nos níveis hipocâmpais de glutamato, a ausência de efeito sobre a razão entre as concentrações de glutamato e GABA e a correlação significativa entre esses dois parâmetros neuroquímicos sugerem a ocorrência de um possível ajuste modulatório no hipocampo, induzido durante a execução da tarefa espacial cognitiva. Esses ajustes neuroquímicos parecem ocorrer nas primeiras etapas do processo de aprendizado, persistindo até depois de finalizado o treino.

8. PERSPECTIVAS

Durante o desenvolvimento do presente trabalho levantamos questões baseadas nos resultados que foram sendo obtidos. Algumas dessas questões são apresentadas a seguir, como perspectivas a serem abordadas nos próximos estudos:

1. As atividades dos sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos hipocampais desempenham papéis regulatórios nos processos de aprendizagem e memória espacial, como apontado no presente estudo? Um desequilíbrio nesses sistemas, no hipocampo, interfere com o desempenho cognitivo nessas tarefas?

Sugestões para contribuir nas respostas para essa questão:

- a. Avaliar outros parâmetros neuroquímicos desses sistemas, como: liberação dos neurotransmissores, atividade de receptores, metabólitos, taxa de renovação.
 - b. Utilizar instrumentos farmacológicos para ativar e/ou inibir esses sistemas – usando método estereotáxico – e avaliar as consequências nas atividades dos circuitos e as relações com aspectos do comportamento cognitivo espacial.
 - c. Utilizar técnicas da Biologia Molecular para manipular esses sistemas neuroquímicos (p.ex. expressão de receptores), avaliando as consequências nas atividades dos circuitos e as relações com aspectos do comportamento cognitivo espacial.
2. Testar a hipótese de que as demandas neurobiológicas que fazem parte da aquisição da tarefa cognitiva espacial variam ao longo desse processo. Ou seja, existiriam eventos neurobiológicos com uma cinética de etapas sucessivas no hipocampo, que são as bases desse fenômeno de aquisição da informação espacial e que ocorrem ao longo do processo?
 - a. Usar as estratégias experimentais listadas no item 1, analisando as relações entre fatores neurobiológicos e comportamentais, para cada fase do processo de aprendizado, ou seja, para

grupos de animais avaliados em cada sessão do treino e do teste comprobatório.

3. Qual a cinética do processo de extinção do aprendizado espacial, em camundongos? Envolveria a regulação dos sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos?
4. O processo de extinção desse comportamento difere (p.ex. em termos cinéticos e/ou biológicos) com o processo de extinção que ocorre em ratos?
5. Alterações em parâmetros GABAérgicos e glutamatérgicos hipocâmpais, com consequente mudança na atividade desses sistemas, envolveria alterações funcionais em parâmetros imunológicos e vice-versa? Essas alterações estariam associadas ao desempenho em tarefas cognitivas espaciais?
6. Quais outros sistemas neuroquímicos participam do mecanismo molecular associado a esses fenômenos cognitivos espaciais: aprendizado, memória e extinção?

Como mencionado nas considerações iniciais, o presente trabalho representa um passo em direção ao estabelecimento de uma nova linha de pesquisa no LaNeC, com objetivos de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na interface entre o SI e o SNC e o papel dessa interação em aspectos comportamentais. Além disto, avaliações quantitativas e manipulações no SI e/ou SNC, com o objetivo de compreender as bases moleculares das relações entre parâmetros imunológicos e aspectos funcionais do SNC nos estados fisiológicos e patológicos, como nas doenças neurodegenerativas, representam importantes alvos para a elaboração de projetos nessa linha de pesquisa.

Seguindo os objetivos expostos acima, como um primeiro passo nessa trajetória, amostras biológicas obtidas dos animais que fizeram parte do presente estudo foram armazenadas para que possam ser feitas algumas análises imunológicas

envolvendo microscopia confocal. A realização dessas análises requer padronizações de etapas dessa técnica, que já estão em andamento.

Etapas já concluídas:

- a) Preparação das amostras para corte em criostato;
- b) Confeção das lâminas;
- c) Fixação dos cortes.
- d) Treinamento no microscópio confocal.

Etapas em andamento:

- a) Titulação dos anticorpos contra F4/80 e CD11b (marcadores de microglia) e contra TNF- α e IL-1 β (citocinas).
- b) Padronização do protocolo de marcação.

REFERÊNCIAS

Amaral, D.G., Witter, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31(3):571-91.1989.

Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28: 273-283. 2004.

Barnes, C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 93:74–104. 1979.

Bianchi, L. Galletti, F. Bolam, J.P & Della Corte, L. The effect of 6-hydroxydopamine lesions on the release of amino acids in the direct and indirect pathways of the basal ganglia: a dual microdialysis probe analysis. *European Journal of Neuroscience.*; 18: 856-868. 2003.

Biel, W. C. Early age differences in the maze performance of the albino rat. *J Genet Psychol* 56: 439--453, 1940.

Bikbaev, A., Neyman, S., Ngomba, R.T., Conn, J., Nicoletti, F., Manahan-Vaughan, D. MGlur5 mediates the interaction between late-LTP, network activity and learning. *PLoS ONE*; 3(5): e2155. 2008.

Burns, B. D. Some properties of the cat's isolated cerebral cortex. *Journal of Physiology (London)*. 11, 50-60. 1950.

Carrillo-Mora, P., Giordano, M., Santamaria A. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research* 203, 151–164. 2009.

Carvalho, F.M., Pereira, S.R., Pires, R.G., Ferraz, V.P., Romano-Silva, M.A., Oliveira-Silva, I.F., Ribeiro, A.M. Thiamine deficiency decreases glutamate uptake in the prefrontal cortex and impairs spatial memory performance in a water maze test. *Pharmacol Biochem Behav.* 83: 481-489. 2006.

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. 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. 2013.

Clark, R. E., & Squire, L. R. Classical conditioning and brain systems: A key role for awareness. *Science*, 280, 77–81. 1998.

Cotman, C.W. & Nieto-Sampedro, M. Brain function, synapse rewal and plasticity. *Annual Reviw of Psychology*, 33, 371-401. 1982.

Deacon, R.M.J. Shallow Water (Paddling) Variants of Water Maze Tests in Mice. *J Vis Exp* (76), e2608. 2013.

Deacon, R.M.J. and Rawlins, J.N.P. Learning Impairments of Hippocampal-Lesioned Mice in a Paddling Pool. *Behavioural Neuroscience*. 116(3):472-478. 2002.

Eichenbaum, H. & Cohen, N.J. From conditioning to conscious recollection: Memory systems of the brain. Oxford Univ. Press, London; 2001.

Eisenkraemer, R.E. Nas cercanias das falsas memórias. *Ciências e Cognição*. 9:97-110. 2006.

Farah, M.J. Is visual memory really visual? Overlooked evidence from neuropsychology. *Psychological Reviews*, 95, 307-317. 1988.

Fields, R. D., e cols. Glial Biology in Learning and cognition. *The Neuroscientist*. 20(5):426-3. 2014.

Foster, A.C., Kemp, J.A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 6: 7-17.2006.

Freitas-Silva, D.M., Ferraz, V.P., Ribeiro, A.M. Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 177: 289-293. 2009.

Freund, T.F., Buzsáki, G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6: 347-470. 1996.

Gao, J. e cols. Glutamate and GABA imbalance promotes neuronal apoptosis in hippocampus after stress. *Med Sci Monit*, 20: 499-512. 2014.

Gasic, G.P., Barco, A., Avila, J. & Lerma, J. A meeting to remember: Meeting on Memory and Related Disorders. *EMBO reports*(2006) 7, 768–773. 2006.

Graham, R. *Physiological Psychology*. California. Wadsworth, p743.1990.

Gray, J.A. *The neuropsychology of anxiety: an inquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press, Oxford. 1982.

Gray, J.A., McNaughton, N. *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the functions of the septo-hippocampal system* (2nd ed.) New York: Oxford University Press. 2000.

Hafting, T. e cols. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 436:801-806. 2005.

Han, Z.S., Buhl, E.H., Lörinczi, Z., Somogyi, P. A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.*; 5: 395-410. 1993.

Harrison, F.E., Hosseini, A.H., McDonald, M.P. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behavioural Brain Research*. 198:247–251. 2009.

Hebb, D. *The organization of behavior*. New York. John Wiley. 1949.

Henze, D.A., Urban, N.N. e Barrionuevo, G. The multifarious hippocampal mossy fiber pathway: a review. *Neuroscience*, 98:3,407-27. 2000.

Hoshi, E., Tremblay, L., Feger, J., et al. The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat. Neurosci.* 8:1491–1493. 2005.

Izquierdo, Ivan. Memórias. *Estud. av.* [online]. 3(6):89-112.1989.

James, W. *The Principles of Psychology*. New York: Holt, Rinehart and Winston. 1890.

Janowsky, J.S., Shimamura, A.P. e Squire, L.R. Source memory impairment in patients with frontal lobe lesions. *Neuropsychologia*, 27 (8), 1043-1056. 1989.

Jaramillo, S. & Zador, A.M. Mice and rats achieve similar levels of performance in an adaptive decision-making task. *Front. Syst. Neurosci.* 8:173. 2014.

Jonides, J. Working memory and thinking. In: Smith, E., Osherson, D. (Eds.), *An Invitation to Cognitive Science: Thinking*, vol. 3, second ed. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 215–265. 1995.

Kessels, R.P.C., Haan, E.H.F., Kappelle, I.J., Postma, A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Rev*, v.35, p.295- 303, 2001.

Knowles, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol.*9(2):252-63. 1992.

Liguz-Leczmar, M., Lehner, M., Kaliszewska, A., Zakrzewska, R., Sobolewska, A. e Kossut, M. Altered glutamate/GABA equilibrium in aged mice cortex influences cortical plasticity. *Brain Struct Funct.* 2014.

Lorente de Nó, R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II Continuation on the study of the ammonic system. *Journal fur Psychologie und Neurologie*, v.46, p.113-177. 1934.

Marshall, J.C. Sensation and semantics. *Nature*, 334:378. 1988.

Maruki, K., Izaki, Y., Hori, K., Nomura, M., Yamauchi, T. Effects of rat ventral and dorsal hippocampus temporal inactivation on delayed alternation task. *Brain Res.* 895, 273-276. 2001.

McCormick, D. A., Clark, G. A., Lavond, D. G., & Thompson, R. F. Initial localization of the memory trace for a basic form of learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 79, 2731–2735. 1982.

McDougall, W. *Outline of psychology*. New York: Scribners. 1923.

McEntee WJ, Crook TH. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 111:391–401. 1993.

McGee, A.W., Bredt, D.S. Assembly and plasticity of glutamatergic postsynaptic specialization. *Curr Opin Neurobiol.* 13: 111-118. 2003.

McNally, G.P., Augustyn, K.A., Richardson, R. GABA(A) receptors determine the temporal dynamics of memory retention. *Learn Memory.* 15(3): 106-111. 2008.

Mishra, A. & Goel, R.K. Psychoneurochemical Investigations to Reveal Neurobiology of Memory Deficit in Epilepsy. *Neurochem Res* 38:2503–2515. 2013.

Morris, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*;12:239-60. 1981.

Moser, M.B., Moser, E.I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8: 608-619. 1998.

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. Functional neuroanatomy of remote episodic, semantic and spatial memory: a unified account based on multiple trace theory. *Journal of Anatomy*, 207:35-66. 2005.

Mott, D.D., Lewis, D.V. Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA receptors. *Science*,; 252: 1718-1720. 1991.

Nagahara, A.H., McGaugh, J.L. Muscimol infused into the medial septal area impairs long-term memory but not short-term memory in inhibitory avoidance, water maze place learning and rewarded alternation tasks. *Brain Res*, 591: 54-61. 1992.

Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D., McEwen, B.S. NMDA receptor antagonist treatment increases the production of new neurons in the aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging*. 5759: 1-12. 2002.

Neyman, S., Manahan-Vaughan, D. Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro. *Eur J Neurosci*. 27(6): 1345-1352. 2008.

Nilson, O.G., Shapiro, M.L., Gage, F.H., Olton, D.S. Bjorklund, A. Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp. Brain Research*, 67(1):195-215. 1987.

Oliveira, L., Graeff, F.G., Pereira, S.R., Oliveira-Silva, I.F., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. *Age*, 32 (2):187-196. 2010.

Oliveira-Silva, I.F., Pinto, L., Pereira, S.R.C., Ferraz, V.P., Barbosa, A.J.A., Coelho, V.A.A., Gualberto, F.F.A.S., Souza, V.F., Faleiro, R.R.M., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. Age-related deficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: Correlation between 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. *Behav Brain Res*,; 180: 226-234. 2007.

Olton, D.S. Mazes, maps and memory. *Am Psychol*,; 34: 583-596. 1979.

Olton, D.S., Becker, J.T., Handelmann, G.E. Hippocampus, space and memory. *Behav Brain Sci*,; 2: 313-365. 1979.

Olton, D.S., Samuelson, R.J. Remembrance of place passed. Spatial memory in rats. *J Exp Psychol: Anim Behav Process*. 2:97-116. 1976.

O'Keefe, J., Dostrovsky, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Behavioral Research*, 34:171-175. 1971.

O'Keefe, J. & Nadel, L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Clarendon. 1978.

Packard, M. G., Hirsh, R., & White, N. M. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: Evidence for multiple memory systems. *Journal of Neuroscience*, 9, 1465–1472. 1989.

Palmer, C.L., Cotton, L., Henley, J.M. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev*, 57:253-277. 2005.

Pascual-Leone, A., Grafman, J., Clark, K., Steward, W., Massaquoi, S., Low, J.S. e Hallett, M. Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. *Annals of Neurology*, 34, 594-602. 1993.

Pinto, L.S.N.M., Gualberto, F.A.S., Pereira, S.R.C., Barros, P.A., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. Dietary restriction protects against chronic-ethanol-induced changes in exploratory behavior in Wistar rats. *Brain Res*,; 1078: 171-181. 2006.

Pires, R.G., Pereira, S.R., Oliveira-Silva, I.F., Franco, G.C., Ribeiro, A.M. Cholinergic parameters and the retrieval of learned and re-learned spatial information: a study using a model of Wernicke-Korsakoff syndrome. *Behav Brain Res*, 162 (1): 11-21. 2005.

Pires, R.G.W., Pereira, S.R.C., Pittella, J.E.H., Franco, G.C., Ferreira, C.L.M., Fernandez, P.A., Ribeiro, A. M. The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rat's open-field performance impairment. *Pharmacol Biochem Behav*, 70, 227-235. 2001.

Pirong, M.L. & Schmidt, R. Inhibition of long-term memory formation by anti-ependymin antisera after active shock-avoidance learning in goldfish. *Brains research*, 442, 53-62. 1988.

Ramón y Cajal, S. *Histologie du system nerveux de l'homme & des vertebres*, Äé. 1909.

Riedel, G., Wetzell, W., Reymann, K.G. Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Progr Neuropsychoph*, 20, 761-789. 1996.

Risold, P.Y., Swanson, L.W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. *Science*, 272, 1484-1486. 1996.

Rosenzweig, M.R. & Bennet, E.L. Studying stages of memory formation with chicks and rodents. In L. R. Squire & N. Butters (Eds), *Neuropsychology of memory*. New York: Guilford Press. 1984.

Rothstein, J.D. Bundling up excitement. *Nature*, 407, 141-143. 2000.

Rudy, J.W., Stadler-Morris, S., Albert, P. Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: dissociation of "proximal"- and "distal"-cue-based behaviors. *Behav Neurosci*, 101, 62-73. 1987.

Ryle, G. The concept of mind. San Francisco, CA: Hutchinson. 1949.

Sanchez-Perez, A.; Llansola, M.; Cauli, O. & Felipo, V. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum*. 4(3): 162-70. 2005.

Schacter, D.L. Implicit memory: history and current status. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition* 13, 501–518. 1987.

Schacter, D.L. and Moscovitch, M. Infants, amnesics and dissociable memory systems. In *Infant memory*, M. Moscovitch, ed. New York: Plenum, pp. 173-216. 1984.

Schenberg, E. E. Caracterização eletrofisiológica da circuitaria hipocampal durante o ciclo sono-vigília do rato. São Paulo, 2010.

Schmitt W.B., Deacon R.M.J, Reisel, D., Sprengel R., Seeburg P.H., Rawlins J.N.P., and Bannerman, D.M. Spatial Reference Memory in GluR-A-Deficient Mice Using a Novel Hippocampal-Dependent Paddling Pool Escape Task. *HIPPOCAMPUS*, 14:216–223. 2004.

Scoville, W.B. & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 20, 11-12. 1957.

Shallice, T. e Warrington, E.K. Independent functioning of verbal memory stores: A Neuropsychological study. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 22, 261-273. 1970.

Shashoua, V.E. The role of extracellular proteins in learning and memory. *American Scientist*, 73, 364-370. 1985.

Sierra-Paredes, G., Loureiro, A.I., Wright, L.C., Sierra-Marcuño, G., Soares-da-Silva, P. Effects of eslicarbazepine acetate on acute and chronic latrunculin A-induced

seizures and extracellular amino acid levels in the mouse hippocampus. *BMC Neurosci.* 15(1):134. 2015.

Skinner, B.F. *Ciência e Comportamento Humano*. Martins fontes, ed.11, São Paulo. Trabalho original publicado em 1979. 2003.

Smith, E.E. and Grossman, M. Multiple systems of category learning. *Neurosc Behavior Reviews.* 32:249-264. 2008.

Spanis, C.W., Bianchin, M.M., Izquierdo, I., McGaugh, J.L. Excitotoxic basolateral amygdala lesions potentiate the memory impairment effect of muscimol injected into the medial septal area. *Brain Res,* 816, 329-336. 1999.

Squire, R.L. e Kandel E.R. *Memória: da mente às moléculas*. (Trad. Dalmaz, C. e Quillfeldt, J.A.). Porto Alegre: Editora Artmed. 2003.

Squire, L.R. e Knowlton, B.J. Memory, hippocampus, and brain systems. In Gazzaniga, M.S. (Ed.). *The cognitive neurosciences*. Cambridge, A Bradford Book, p. 825-837. 1995.

Steward, O. Topographic organization of projections from entorhinal area to hippocampal formation of rat. *Journal Of Comparative Neurology,* v.167, n.3, p.285-314. 1976.

Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S., Moser, E.I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature Neuroscience.* 15, 655-669. 2014.

Sunyer, B., Patil, S., Hoyer, H., Lubec, G. Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Nat Protoc,* 390,10-38. 2007.

Tamamaki, N., Abe, K. e Nojyo, Y. Three-dimensional analysis of the whole axonal arbors originating from single CA2 pyramidal neurons in the rat hippocampus with the aid of a computer graphic technique. *Brain Research,* 452:(1-2), 255-72. 1988.

Teyler, T. J. & DiScenna, P. The hippocampal memory indexing theory. *Behavioral Neuroscience*. 100, 147-154. 1986.

Tolman, E. C. Cognitive maps in rats and men. *Psychol. Rev.* 55, 189–208. 1948.

Toso, L., Johnson, A., Bissell, S., Roberson, R., Abebe, D., Spong, C.Y. Understanding the mechanism of learning enhancement: NMDA and GABA receptor expression. *Am J Obstet Gynecol*, 197(3): 267 e1-4. 2007.

Tsukahara, N. Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, 4, 351-379. 1981.

Tulving, E. Episodic and semantic memory. In E. Tulving & W. Donaldson (Eds.), *Organisation of memory*. London: Academic Press. 1972.

Tulving, E. What is episodic memory? *Current Directions in Psychological Sciences*, 2, 67-70.1993.

Vallar, G. & Shallice, T. *Neuropsychological impairments of short-term memory*. Cambridge, Cambridge University Press. 1990.

Vigil, F.A., Oliveira-Silva, I.F., Ferreira, L.F., Pereira, S.R., Ribeiro, A.M. Spatial memory deficits and thalamic serotonergic metabolite change in thiamine deficient rats. *Behav Brain Res*, 210(1): 140-142. 2010.

Vincent, S.B. The white rat and the maze problem. *J Anim Behav*, 5, 1–24.1915.

Vorhees, C.V. Influence of early testing on postweaning performance in untreated F344 rats, with comparisons to Sprague-Dawley rats, using a standardized battery of tests for behavioral teratogenesis. *Neurobehav Toxicol Teratol*. Sep-Oct;5(5):587-91. 1983.

Wishaw, I.Q. A Comparison of Rats and Mice in a Swimming Pool Place Task and Matching To Place Task: Some Surprising Differences. *Physiology & Behavior*, Vol. 58(4): 687-693. 1995.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313(5790): 1093-1097. 2006.

ANEXOS

1. Certificado do CEUA – UFMG.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 161 / 2014, relativo ao projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS SWISS SUBMETIDOS À TAREFA DE APRENDIZADO E MEMÓRIA.", que tem como responsável Angela Maria Ribeiro, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 12/08/2014. Este certificado espira-se em 12/08/2019.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 161 / 2014, related to the Project entitled "EVALUATION OF NEUROCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN SWISS MICE SUBJECTED TO THE TASK OF LEARNING AND MEMORY.", under the supervision of Angela Maria Ribeiro, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 12/08/2014. This certificate expires in 12/08/2019.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 12/08/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

2. Planilha com os dados brutos.

2.1. Dados comportamentais.

Tabela 1. Latência (s) durante o treino no LTR: mediana das quatro tentativas de cada camundongo em cada sessão. Cadg = camundongo.

Animais	Sessões de treino no LTR (<i>segundos</i>)						
	1	2	3	4	5	6	7
Cadg 1	60	60	44,5	26,5	13,5	11	5
Cadg 2	60	42,5	48,5	42	33,5	5	5,5
Cadg 3	60	60	60	37,5	8	2	4,5
Cadg 4	60	60	42,5	43,5	46,5	34	37
Cadg 5	60	60	60	60	60	60	60
Cadg 6	60	60	60	47	40	47	41
Cadg 7	60	60	60	46	38,5	24	12
Cadg 8	60	60	60	60	45	60	49
Cadg 9	60	27,5	60	60	60	60	12,5
Cadg 10	60	20	19,5	60	54	60	60
Cadg 11	60	3,5	6	6	60	8	4
Cadg 12	60	60	37,5	59,5	60	60	60
Cadg 13	60	26	59	56,5	60	60	60
Cadg 14	60	56	3,5	6	5	10	3
Cadg 15	54	14,5	15,5	17	15,5	23	19
Cadg 16	55,5	54,5	9,5	48	14,5	31	23
Cadg 17	57,75	55	3,5	7,5	2	6,5	2
Cadg 18	56	60	60	60	35,5	30	60

Tabela 2: Dados descritivos e análise da normalidade da distribuição das medianas das latências (s).

	Sessões de treino no LTR						
	1	2	3	4	5	6	7
Number of values	18	18	18	18	18	18	18
Minimum	54,00	3,500	3,500	6,000	2,000	2,000	2,000
25% Percentile	59,44	27,13	14,00	24,13	14,25	9,500	4,875
Median	60,00	58,00	46,50	46,50	39,25	30,50	21,00
75% Percentile	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
Maximum	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
Mean	59,07	46,64	39,42	41,28	36,19	32,86	28,75
Std. Deviation	1,905	19,16	23,05	20,11	21,30	22,82	24,09
Std. Error	0,4491	4,515	5,433	4,740	5,021	5,378	5,679
Lower 95% CI of mean	58,12	37,11	27,95	31,28	25,60	21,51	16,77
Upper 95% CI of mean	60,02	56,17	50,88	51,28	46,79	44,21	40,73
KS normality test							
KS distance	0,4651	0,3259	0,2467	0,1810	0,1677	0,2162	0,1944
P value	P<0.0001	P<0.0001	0,0050	P > 0.10	P > 0.10	0,0258	0,0705
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes
P value summary	***	***	**	ns	ns	*	ns
Shapiro-Wilk normality test							
W	0,5584	0,7309	0,7940	0,8284	0,8790	0,8503	0,8221
P value	P<0.0001	0,0002	0,0013	0,0039	0,0251	0,0086	0,0032
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No	No	No	No
P value summary	***	***	**	**	*	**	**
Coefficient of variation	3.23%	41.08%	58.47%	48.72%	58.85%	69.43%	83.80%
Sum	1063	839,5	709,5	743,0	651,5	591,5	517,5

Tabela 3. Número de erros durante o treino no LTR: mediana das quatro tentativas de cada camundongo em cada sessão. Cadg= camundongo.

Animais	Sessões de treino no LTR (<i>mediana de erros cometidos</i>)						
	1	2	3	4	5	6	7
Cadg 1	9	3,2	8,5	11	8,2	3,5	3,2
Cadg 2	9,7	3	4,7	8,7	6	8,2	8,2
Cadg 3	9,2	0,7	1,5	2,5	9,2	3	0,2
Cadg 4	9,7	11	5,5	7,5	8,7	11	9,2
Cadg 5	11	5	8,2	5,5	9	9	11
Cadg 6	10	6,2	2,7	1,5	2,2	2	2
Cadg 7	6,5	3,7	2,2	3,7	1,2	3,5	3,2
Cadg 8	7,5	8	1,2	7	2	3,7	3,7
Cadg 9	8,5	7,5	3,2	3,5	0,2	1,2	0,2
Cadg 10	8	9,7	9,5	10,5	7	4,7	8,5
Cadg 11	9,7	8,5	4,7	3,7	0,7	0,5	0,2
Cadg 12	11	6,5	7,2	6,2	4,2	1	0,2
Cadg 13	11	11	11	5,7	0,2	0	0,2
Cadg 14	11	11	3	2,5	6,5	2,2	5,7
Cadg 15	11	11	9,2	8,5	8,2	8,5	8,5
Cadg 16	11	11	8,5	6,2	5,7	5,7	6,7
Cadg 17	11	9	8,2	4	6,2	1,2	2
Cadg 18	11	11	11	8,7	6,5	8,5	6,5

Tabela 4: Dados descritivos e análise da normalidade da distribuição das medianas do número de erros.

	Sessões de treino no LTR						
	1	2	3	4	5	6	7
Number of values	18	18	18	18	18	18	18
Minimum	6,500	0,7500	1,250	1,500	0,2500	0,0	0,2500
25% Percentile	8,875	4,688	2,938	3,688	1,813	1,250	0,2500
Median	9,875	8,250	6,375	6,000	6,125	3,500	3,500
75% Percentile	11,00	11,00	8,688	8,563	8,250	8,313	8,313
Maximum	11,00	11,00	11,00	11,00	9,250	11,00	11,00
Mean	9,778	7,625	6,139	5,958	5,139	4,319	4,444
Std. Deviation	1,406	3,330	3,290	2,822	3,208	3,390	3,662
Std. Error	0,3314	0,7849	0,7755	0,6652	0,7560	0,7990	0,8631
Lower 95% CI of mean	9,079	5,969	4,503	4,555	3,544	2,634	2,623
Upper 95% CI of mean	10,48	9,281	7,775	7,362	6,734	6,005	6,265
KS normality test							
KS distance	0,2521	0,1779	0,1839	0,1450	0,1867	0,1778	0,1517
P value	0,0036	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	0,0976	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk normality test							
W	0,8380	0,8872	0,9211	0,9603	0,8925	0,9095	0,8977
P value	0,0055	0,0345	0,1352	0,6068	0,0426	0,0842	0,0525
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes
P value summary	**	*	ns	ns	*	ns	ns
Coefficient of variation	14.38%	43.67%	53.60%	47.37%	62.42%	78.48%	82.39%
Sum	176,0	137,3	110,5	107,3	92,50	77,75	80,00

Tabela 5. Latências (s) durante o primeiro minuto do teste comprobatório no LTR, representadas como % do tempo de permanência nos quadrantes. Cadg = camundongo.

<i>Tempo de permanência nos quadrantes 1° minuto (Porcentagem)</i>				
Animais	Quadrante alvo	Quadrante oposto	Quadrante 3	Quadrante 4
Cadg 1	53,3	16,6	15	15
Cadg 2	25	25	25	25
Cadg 3	20	26,6	26,6	26,6
Cadg 4	41,6	21,6	18,3	18,3
Cadg 5	35	21,6	21,6	21,6
Cadg 6	20	26,6	26,6	26,6
Cadg 7	20	26,6	26,6	26,6
Cadg 8	86,6	6,6	3,3	3,3
Cadg 9	100	0	0	0
Cadg 10	40	20	20	20
Cadg 11	31,6	25	21,6	21,6
Cadg 12	41,6	21,6	18,3	18,3
Cadg 13	80	6,6	6,6	6,6
Cadg 14	70	10	10	10
Cadg 15	55	15	15	15
Cadg 16	20	26,6	26,6	26,6
Cadg 17	25	25	25	25
Cadg 18	25	25	25	25

Tabela 6: Dados descritivos e análise da normalidade da distribuição das latências (s) durante o primeiro minuto do teste comprobatório.

	Quadrante alvo	Quadrante oposto	Quadrante 3	Quadrante 4
Number of values	18	18	18	18
Minimum	20,00	0,0	0,0	0,0
25% Percentile	23,75	13,75	13,75	13,75
Median	37,50	21,67	20,83	20,83
75% Percentile	58,75	25,42	25,42	25,42
Maximum	100,0	26,67	26,67	26,67
Mean	43,89	19,26	18,43	18,43
Std. Deviation	25,19	8,289	8,488	8,488
Std. Error	5,936	1,954	2,001	2,001
Lower 95% CI of mean	31,36	15,14	14,20	14,20
Upper 95% CI of mean	56,41	23,38	22,65	22,65
KS normality test				
KS distance	0,2018	0,2254	0,1696	0,1696
P value	0,0509	0,0162	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes
P value summary	ns	*	ns	ns
Shapiro-Wilk normality test				
W	0,8607	0,8326	0,8696	0,8696
P value	0,0126	0,0045	0,0175	0,0175
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No
P value summary	*	**	*	*
Coefficient of variation	57.38%	43.04%	46.07%	46.07%
Sum	790,0	346,7	331,7	331,7

Tabela 7. Latências (s) durante o segundo minuto do teste comprobatório no LTR, representadas como % do tempo de permanência nos quadrantes. Cadg = camundongo.

<i>Tempo de permanência nos quadrantes 2° minuto (Porcentagem)</i>				
Animais	Quadrante alvo	Quadrante oposto	Quadrante 3	Quadrante 4
Cadg 1	31,6	25	21,6	21,6
Cadg 2	25	25	25	25
Cadg 3	41,6	21,6	18,3	18,3
Cadg 4	20	26,6	26,6	26,6
Cadg 5	25	25	25	25
Cadg 6	80	6,6	6,6	6,6
Cadg 7	25	25	25	25
Cadg 8	70	10	10	10
Cadg 9	55	15	15	15
Cadg 10	26,6	26,6	23,3	23,3
Cadg 11	25	25	25	25
Cadg 12	26,6	26,6	25	21,6
Cadg 13	33,3	20	30	16,6
Cadg 14	20	23,3	23,3	33,3
Cadg 15	20	26,6	26,6	26,6
Cadg 16	35	21,6	21,6	21,6
Cadg 17	20	26,6	26,6	26,6667
Cadg 18	25	25	25	25

Tabela 8: Dados descritivos e da análise da normalidade da distribuição das latências (s) durante o segundo minuto do teste comprobatório.

	Quadrante alvo	Quadrante oposto	Quadrante 3	Quadrante 4
Number of values	18	18	18	18
Minimum	20,00	6,667	6,667	6,667
25% Percentile	23,75	21,25	20,83	17,92
Median	25,83	25,00	25,00	24,17
75% Percentile	36,67	26,67	25,42	25,42
Maximum	80,00	26,67	30,00	33,33
Mean	33,61	22,31	22,22	21,85
Std. Deviation	17,51	5,917	6,077	6,465
Std. Error	4,127	1,395	1,432	1,524
Lower 95% CI of mean	24,90	19,37	19,20	18,64
Upper 95% CI of mean	42,32	25,26	25,24	25,07
KS normality test				
KS distance	0,2653	0,2861	0,2414	0,2108
P value	0,0016	0,0004	0,0068	0,0335
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No
P value summary	**	***	**	*
Shapiro-Wilk normality test				
W	0,7412	0,7307	0,8164	0,9069
P value	0,0003	0,0002	0,0026	0,0758
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	Yes
P value summary	***	***	**	ns
Coefficient of variation	52.10%	26.52%	27.35%	29.58%
Sum	605,0	401,7	400,0	393,3

2.2. Dados bioquímicos.

Tabela 9: Concentrações de glutamato no hipocampo. As concentrações estão representadas como média dos resultados de triplicatas em $\mu\text{g/g}$ de hipocampo.

Concentração de Glutamato no Hipocampo ($\mu\text{g/g}$ de tecido)		
Controle	Controle Atividade	Aprendizado
71,19	125,49	158,97
60,71	135,85	52,28
38,77	112,65	120,79
124,67	128	118,62
100	109,16	121,79
88,47	104,9	153,36
84,63	76,05	161,27
47,03	65,35	122,36
90,01	98,42	121,64
110,34	84,45	113,63
123,03	87,38	100,59
103,31	90,64	102,34
111,71	71,03	93,59
130,09	63,67	61,52
		91,01
		95,11
		95,27
		89,09

Tabela 10: Dados descritivos e da análise da normalidade da distribuição das concentrações de glutamato no hipocampo em ug/g de tecido.

	Controle	Controle Atividade	Aprendizado
Number of values	14	14	18
Minimum	38,77	63,67	52,28
25% Percentile	68,57	74,80	92,95
Median	95,01	94,53	108,0
75% Percentile	114,5	115,9	121,9
Maximum	130,1	135,9	161,3
Mean	91,71	96,65	109,6
Std. Deviation	28,74	23,62	29,58
Std. Error	7,680	6,313	6,971
Lower 95% CI of mean	75,12	83,01	94,92
Upper 95% CI of mean	108,3	110,3	124,3
KS normality test			
KS distance	0,1170	0,1032	0,1667
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk normality test			
W	0,9473	0,9543	0,9457
P value	0,5202	0,6293	0,3611
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns
Coefficient of variation	31.33%	24.44%	26.98%
Sum	1284	1353	1973

Tabela 11: Análises comparativas entre os valores dos três grupos para Glutamato.

Análises comparativas entre os valores dos três grupos para Glutamato									
Number of families	1								
Number of comparisons per family	3								
Alpha	0,05								
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary					
	Controle vs. Controle Atividade	-4,934	-30.30 to 20.43	No	ns	A-B			
	Controle vs. Aprendizado	-17,91	-41.82 to 6.000	No	ns	A-C			
	Controle Atividade vs. Aprendizado	-12,98	-36.89 to 10.93	No	ns	B-C			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF	
Controle vs. Controle Atividade	91,71	96,65	-4,934	10,45	14	14	0,66	43	
Controle vs. Aprendizado	91,71	109,6	-17,91	9,851	14	18	2,57	43	
Controle Atividade vs. Aprendizado	96,65	109,6	-12,98	9,851	14	18	1,86	43	

Tabela 12: Concentrações de GABA no hipocampo. As concentrações estão representadas como média dos resultados de triplicatas em ng/g de hipocampo.

Concentração de GABA no Hipocampo (ng/g de tecido)		
Controle	Controle Atividade	Aprendizado
69,05	81,54	125,79
59,89	79,01	92,87
29,52	71,15	104,13
77,14	61,43	89,25
89,32	73,89	81,5
68,24	73,88	116,35
52,56	72,59	120,98
41,63	60,88	93
76,07	73,45	94,95
88,57	71,67	87,4
69,83	69,62	45,76
65,77	69,88	96,09
69,28	76,33	73,13
51,88	62,46	51,89
		90,83
		62
		71,99
		91,09

Tabela 13: Dados descritivos e da análise da normalidade da distribuição das concentrações de GABA no hipocampo em ng/g de tecido.

	Controle	Controle Atividade	Aprendizado
<i>Number of values</i>	14	14	18
<i>Minimum</i>	29,52	60,88	45,76
<i>25% Percentile</i>	52,39	67,83	72,85
<i>Median</i>	68,65	72,13	90,96
<i>75% Percentile</i>	76,34	74,50	98,10
<i>Maximum</i>	89,32	81,54	125,8
<i>Mean</i>	64,91	71,27	88,28
<i>Std. Deviation</i>	16,74	6,192	21,75
<i>Std. Error of Mean</i>	4,475	1,655	5,127
<i>Lower 95% CI of mean</i>	55,24	67,70	77,46
<i>Upper 95% CI of mean</i>	74,58	74,84	99,10
<i>Shapiro-Wilk normality test</i>			
<i>W</i>	0,9531	0,9315	0,9597
<i>P value</i>	0,6100	0,3198	0,5963
<i>Passed normality test (alpha=0.05)?</i>	Yes	Yes	Yes
<i>P value summary</i>	ns	ns	ns
<i>Coefficient of variation</i>	25.79%	8.69%	24.64%
<i>Sum</i>	908,8	997,8	1589

Tabela 14: Análises comparativas entre os valores dos três grupos para GABA.

Análises comparativas entre os valores dos três grupos para GABA									
Number of families	1								
Number of comparisons per family	3								
Alpha	0,05								
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary					
	Controle vs. Controle Atividade	-6,359	-21.80 to 9.086	No	ns	A-B			
	Controle vs. Aprendizado	-23,37	-37.93 to -8.805	Yes	***	A-C			
	Controle Atividade vs. Aprendizado	-17,01	-31.57 to -2.446	Yes	*	B-C			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF	
	Controle vs. Controle Atividade	64,91	71,27	-6,359	6,363	14	14	1,41	43
	Controle vs. Aprendizado	64,91	88,28	-23,37	5,999	14	18	5,50	43
	Controle Atividade vs. Aprendizado	71,27	88,28	-17,01	5,999	14	18	4,00	43