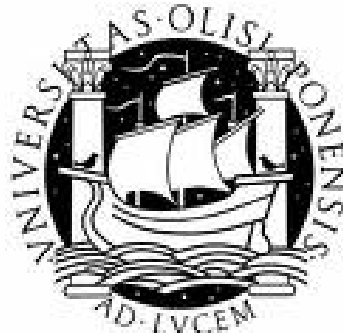


Faculdade de Medicina de Lisboa



**Efeito da Separação Maternal
na Memória Dependente do Hipocampo de Rato**

Joana Vital de Figueiredo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Lisboa para prestação de
provas de Mestrado em Neurociências

Lisboa, 2009

Índice

<u>Lista de Abreviaturas</u>	<u>3</u>
<u>Resumo</u>	<u>4</u>
<u>1.Introdução</u>	<u>6</u>
Objectivo	10
<u>2.Testes comportamentais</u>	<u>12</u>
Teste do campo aberto (open-field)	13
Teste do labirinto elevado (elevated plus maze)	14
Teste do labirinto de Morris (Morris water maze)	16
Protocolo de memória espacial (dependente do hipocampo)	17
<u>3.Materiais e métodos</u>	<u>19</u>
3.1.Protocolo de separação maternal	20
3.2.Manipulação e testes comportamentais	21
3.2.1.Campo aberto (open-field)	23
3.2.2.Labirinto elevado (elevated plus maze)	25
3.2.3.Labirinto de Morris (Morris water maze)	25
3.3.Efeito do MK-801 no labirinto de Morris	29
3.4.Efeito da cafeína em ratos CTR e SM adultos	29
3.5.Métodos estatísticos	30
<u>4.Resultados</u>	<u>31</u>
4.1.Ratos jovens-adultos	32
4.1.1.Campo aberto (open-field)	32
4.1.2.Labirinto elevado (elevated plus maze)	35
4.1.3.Labirinto de Morris (Morris water maze)	36
4.2.MK-801	40
4.3.Ratos idosos	43
4.3.1.Campo aberto (open-field)	43
4.3.2.Labirinto elevado (elevated plus maze)	46
4.3.3.Labirinto de Morris (Morris water maze)	47
4.4.Efeito da cafeína na separação maternal em ratos jovens-adultos	51
4.4.1.Campo aberto (open-field)	51
4.4.2.Labirinto elevado (elevated plus maze)	54
4.4.3.Labirinto de Morris (Morris water maze)	56
<u>5.Discussão</u>	<u>61</u>
<u>6.Conclusão</u>	<u>65</u>
<u>7.Agradecimentos</u>	<u>66</u>
<u>8.Bibliografia</u>	<u>67</u>

Lista de abreviaturas

ACTH – corticotrofina (“adrenocorticotropic hormone”)

BDNF – factor neurotrófico (“brain-derived neurotrophic factor”)

CORT – corticosterona

CRH – hormona de libertação da corticotrofina (“corticotrophin-releasing hormone”)

CRH₁ e CRH₂ – Receptores 1 e 2 da hormona de libertação da corticotrofina

CTR – controlo

CTRc – controlo com tratamento de cafeína

DPN – dia pós-natal

HPA – eixo hipotalâmico-hipofisário (“hypothalamic-pituitary-adrenal”)

LTD – depressão de longo termo (“long-term depression”)

LTP – potenciação de longo termo (“long-term potentiation”)

MWM – labirinto de Morris (“Morris water maze”)

NGF – factor de crescimento neuronal (“nerve growth factor”)

NMDA – receptor de glutamato do subtipo N-metil-D-aspartato

NT-3 – neurotrofina-3

SM – separação maternal

SMc – separação maternal com tratamento de cafeína

Resumo

O *stress* modula a função cerebral e a cognição. Acontecimentos com forte carga emocional marcam-nos fortemente a memória, enquanto níveis excessivos de *stress* parecem interferir com a recordação de memórias previamente adquiridas. É importante estudar se alterações induzidas pelo *stress*, no cérebro, e particularmente no hipocampo – estrutura cerebral crucial na aprendizagem e memória – terão um impacto significativo na função cognitiva. Estudos clínicos têm demonstrado que experiências de *stress* durante a infância tornam os indivíduos mais vulneráveis à psicopatologia na vida adulta. Por outro lado, há cada vez mais factos que suportam a ideia de que eventos traumáticos ocorridos no período pós-natal têm um impacto permanente no cérebro. Um dos modelos utilizados e aceite pela comunidade científica como paradigma de *stress* crónico no adulto, consiste na perturbação da normal relação mãe-filho, em animais de laboratório, denominado de separação maternal. A separação maternal resulta em níveis elevados de corticosterona plasmática e alterações permanentes no sistema nervoso central (Ladd *et al.*, 2000) que se prolongam até à idade adulta.

Tem sido muito pouco estudado de que forma o *stress* modula o desempenho em situações de défice cognitivo subjacente, tal como acontece no envelhecimento. O objectivo do presente estudo foi o de investigar o efeito do *stress* neonatal – usando como paradigma a separação maternal – na memória dependente do hipocampo em animais idosos.

Foram utilizados dois grupos de ratos Wistar machos divididos em controlo (CTR) e separação maternal (SM). O grupo SM foi separado da mãe durante 3 horas diárias entre os dias 2-14 pós-natal, enquanto o grupo CTR não foi manipulado. O seu desempenho em testes comportamentais para avaliação de actividade motora (teste do campo aberto), ansiedade (teste do labirinto elevado) e memória espacial (labirinto de Morris) foi quantificado às 6-8 semanas de vida (jovens-adultos), e posteriormente às 70 semanas (idosos).

Observou-se um decréscimo da velocidade percorrida no teste do campo aberto, em idosos CTR comparativamente a animais jovens CTR, não tendo a mesma sido alterada pela separação maternal, nos dois grupos etários. Contudo, no teste do labirinto elevado, os animais SM apresentaram um comportamento mais ansioso: os animais jovens SM permaneceram cerca de metade do tempo total nos braços abertos, relativamente aos animais jovens CTR. Estas diferenças mantiveram-se nos animais idosos: os idosos SM

permaneceram cerca de um terço do tempo nos braços abertos, quando comparados com os animais CTR da mesma idade. Estas diferenças não foram consequência de alterações na actividade motora, já que o número total de entradas não sofreu variações com o *stress*. No protocolo de memória espacial do labirinto de Morris, os animais jovens SM permaneceram uma maior percentagem de tempo na periferia da piscina e apresentaram uma curva de aprendizagem mais lenta: os animais CTR encontraram a plataforma mais rapidamente que os animais SM, durante os cinco dias de treino e passaram mais tempo no quadrante da plataforma, no teste final, comparativamente aos animais SM. Mais relevante é o facto do *stress* induzido numa fase precoce da vida, ter efeitos ainda observáveis nos animais idosos, ou seja, o tempo passado no quadrante da plataforma no teste final foi menor nos animais SM idosos, relativamente aos animais CTR da mesma idade. Em geral, os animais idosos CTR apresentaram uma curva de aprendizagem mais baixa do que os animais jovens CTR.

Foi ainda avaliado, num pequeno número de animais, o possível efeito benéfico de administração oral de cafeína durante um mês, numa dose de 20 mg/Kg/dia, em animais adultos previamente sujeitos a separação maternal. O tratamento com cafeína aumentou o tempo de permanência no quadrante da plataforma do labirinto de Morris, em animais SM, para valores semelhantes aos do grupo CTR. Mas o número limitado de animais e o facto da cafeína ter tido efeito mesmo no grupo CTR, implica prudência nas conclusões. Estes resultados preliminares são, contudo, promissores e justificam um estudo mais completo, com maior número de animais.

Em conclusão, o *stress* induzido numa fase neonatal, em ratos, induz um comportamento mais ansioso e um desempenho inferior no labirinto de Morris na idade adulta. A separação maternal tem um impacto duradouro na memória espacial, sendo observável mesmo em animais com 70 semanas de idade. Estes exibem um comportamento mais ansioso e défices na memória dependente do hipocampo. O mecanismo de acção responsável por estes efeitos não foi explorado no âmbito deste trabalho e merece uma análise mais detalhada. Estes resultados sugerem que a exposição a *stress* numa fase precoce da vida poderá contribuir e exacerbar os défices na função cognitiva característicos do envelhecimento.

1. Introdução

1. Introdução

O *stress* desempenha um papel crucial na patogénese das doenças mentais (McKinney, 1984; Willner, 1997), como a ansiedade e a depressão que são extremamente comuns, dramáticas e debilitantes. Níveis excessivos de corticosteróides poderão ocorrer como consequência de uma patologia ou devido a uma hipersecreção em resposta a um estímulo de *stress* (Belanoff *et al.*, 2001).

A hormona de libertação da corticotrofina (CRH) e os seus receptores (CRH₁ e CRH₂), são expressos em estruturas do eixo hipotálamico-hipofisário (HPA), e participam na resposta neuroendócrina às perturbações externas. Em resposta ao *stress*, a CRH, que é sintetizada no núcleo paraventricular do hipotálamo, é segregada para a eminência mediana, sendo depois transportada para a hipófise, estimulando os receptores CRH₁. Esta estimulação leva à libertação da hormona corticotrofina (ACTH) na corrente sanguínea; por sua vez a ACTH vai estimular a segregação de glucocorticóides (corticosterona no rato e cortisol no homem) do córtex supra-renal (Figura 1). Os glucocorticóides preparam o organismo para as reacções agudas ao *stress* e têm também como função controlar a resposta ao *stress*, uma vez que inibem retroactivamente a actividade do sistema HPA (Kaplan, 1992).

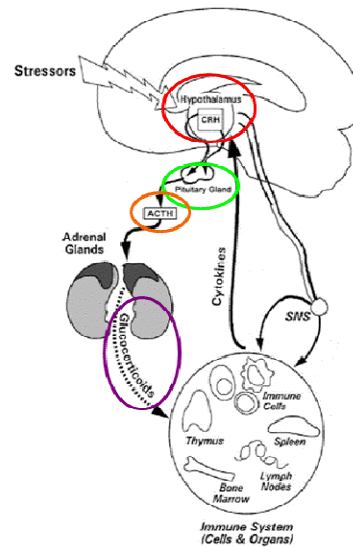


Figura 1 – Esquema representativo da resposta neuroendócrina às perturbações externas/*stress* (Bakshi & Kalin, 2000). São representadas as principais estruturas intervenientes na resposta ao *stress*.

Paradigma de separação maternal

A interacção mãe-filho é um factor chave na maturação cerebral e na susceptibilidade a patologias (Heim & Nemeroff, 2001). A separação maternal, induzida em laboratório, consiste num paradigma válido e útil para estudar disfunção associada a *stress* induzido na fase precoce da vida. Nos roedores, um dos mais importantes comportamentos maternos, que determinam a qualidade da relação mãe-filho é o reflexo de lambar ou catar as crias pela mãe (Caldji *et al.*, 2000). A separação diária das crias das suas mães durante 180 minutos durante a fase pós-natal, do dia 2 ao dia 14 de vida, provoca uma alteração no comportamento maternal, com uma redução significativa do tempo na expressão deste comportamento (Ladd *et al.*, 2000). Este *stress* neonatal, provocado pela redução da interacção entre mãe e filho, tem como principais consequências alterações permanentes no sistema nervoso central das crias, que foram documentadas ao nível da expressão génica, neuroquímica, electrofisiologia e morfologia (e.g. Heim *et al.*, 1997; Ladd *et al.*, 2000; Daniels *et al.*, 2003) e que são aceites como modelos válidos para estudar a depressão crónica e a ansiedade (Kalueff & Tuohimaa, 2004). A separação maternal induz alterações que permanecem até à idade adulta tais como comportamento associado a depressão e ansiedade, aumento da susceptibilidade do HPA ao *stress* agudo na idade adulta e aumento dos níveis de expressão do mRNA para a CRH no núcleo paraventricular (Aisa *et al.*, 2007).

Efeitos do stress no hipocampo

O hipocampo é a área cerebral crucial para os processos de aprendizagem e memória, assim como para a plasticidade sináptica (Kim & Diamond, 2002). É simultaneamente um alvo preferencial da acção das hormonas de *stress* (McEwen, 1999). O hipocampo tem uma extensa abundância de receptores de glucocorticóides (McEwen *et al.*, 1986) e através da sua acção, esta área cerebral é uma parte integrante do mecanismo de retroalimentação responsável por terminar o processo de libertação de glucocorticóides durante a resposta ao *stress* (McEwen, 1999; McEwen *et al.*, 1999), através da diminuição da sua libertação. Tanto o *stress* como a exposição aos glucocorticóides numa fase inicial da vida têm sido associados a danos a nível da aprendizagem e da memória (Huot *et al.*, 2002), assim como a atrofia do hipocampo. A plasticidade dos circuitos do hipocampo, necessária para as suas funções na aprendizagem e memória, pode aumentar a sua vulnerabilidade a várias agressões ambientais, incluindo o *stress* (Aisa *et al.*, 2006). A exposição a níveis elevados de corticosterona durante o período neonatal (como demonstrado em crias pelos níveis significativamente mais elevados de corticosterona comparando com os animais controlo durante o período de separação maternal), podem afectar o desenvolvimento do hipocampo (Huot *et al.*, 2002). A separação maternal induz défices na aprendizagem espacial (dependente do hipocampo), medida no labirinto de Morris e diminuição da densidade das fibras musgosas do hipocampo (Huot *et al.*, 2002; Aisa *et al.*, 2007), em ratos adultos. Estas alterações poderão estar relacionadas com uma diminuição dos níveis dos receptores de glucocorticóides observados nesta área cerebral após *stress* neonatal (Aisa *et al.*, 2007). Consequentemente, a separação maternal efectuada durante o período crítico de desenvolvimento do hipocampo, pode afectar negativamente a citoarquitECTURA do hipocampo de uma forma constante, o que pode contribuir para os défices de aprendizagem observados naqueles ratos (Aisa *et al.*, 2006). Postula-se que o mecanismo subjacente a certos tipos de aprendizagem e memória é a plasticidade sináptica do hipocampo (Bliss & Collingridge, 1993; Dudek & Bear, 1992) podendo ser estudada utilizando paradigmas como a potenciação de longo termo (LTP) e a depressão de longo termo (LTD). O *stress* compromete a aprendizagem espacial e a memória no labirinto de Morris (de Quervain *et al.*, 1998), um modelo frequentemente utilizado para estudar as funções do hipocampo na aprendizagem e memória (Morris *et al.*, 1986). Além disso, o *stress* compromete formas de LTP (Foy *et al.*, 1987) e facilita a LTD (Kim *et al.*, 1996) no hipocampo.

O factor neurotrófico, BDNF, tem um importante papel na regulação, na diferenciação e sobrevivência neuronal (Faure *et al.*, 2007). O BDNF em conjunto com o receptor de NMDA, desempenha um papel importante na aprendizagem espacial e memória (e.g. Poo, 2001). Roceri e colaboradores (2002) quantificaram a expressão de BDNF e de duas subunidades do receptor NMDA, NR-2A e NR-2B, em ratos sujeitos a um modelo de separação maternal de 24 horas, no DPN 9. Numa fase adulta, estes animais apresentaram níveis significativamente reduzidos tanto de BDNF como de NR-2A e NR-2B, no hipocampo. A maioria dos estudos publicados sobre as consequências de experiências adversas numa fase precoce da vida, têm-se focado no eixo HPA e nos níveis circulantes de glucocorticóides. Um dos poucos trabalhos em animais idosos, conduzido por Lehamn e colaboradores (2002), testou os efeitos da manipulação numa fase precoce da vida dos animais. Este estudo mostra que animais idosos, com um ano e meio de vida, têm um desempenho superior em testes de memória comparados com animais sujeitos a uma separação maternal muito curta (6h/dia em quatro dias não consecutivos).

Estes dados sugerem que o *stress* neonatal pode interferir com o desenvolvimento da estrutura do hipocampo e consequentemente ter efeitos irreversíveis nas funções associadas a esta estrutura, nomeadamente na memória espacial. Apesar destas observações anteverem um possível efeito em animais idosos, tem sido muito pouco explorado de que forma o stress modula o desempenho em situações de défice cognitivo subjacente, tal como acontece no envelhecimento.

Objectivo

O objectivo do presente estudo foi o de investigar o efeito do stress neonatal – usando como paradigma a separação maternal – na memória dependente do hipocampo em animais idosos. Para tal foram utilizados dois grupos de ratos Wistar machos divididos em controlo (CTR) e separação maternal (SM). O grupo SM foi separado da mãe durante 3 horas diárias entre os dias 2-14 pós-natal, enquanto o grupo CTR não foi manipulado. O impacto da separação maternal foi avaliado em testes comportamentais para avaliação de actividade motora e exploração (teste do campo aberto), ansiedade

(teste do labirinto elevado) e memória espacial (labirinto de Morris) às 6-8 semanas de vida (jovens-adultos) e posteriormente às 70 semanas (idosos).

2. Testes comportamentais

2. Testes comportamentais:

Teste do campo aberto (*open-field*)

O teste do campo aberto (*open-field*) foi concebido para medir respostas comportamentais tais como a actividade motora, a hiperactividade e comportamentos exploratórios (Tremml *et al.*, 1998). Para este espaço utiliza-se uma arena quadrangular (67 cm x 67cm) fechada, com iluminação homogénea, onde o animal é deixado durante cinco a dez minutos, enquanto o seu comportamento é observado. Os ratos e os ratinhos tendem a evitar iluminação forte e espaços abertos, portanto o ambiente do teste funciona como um estímulo ansiogénico, permitindo a medição da actividade locomotora induzida pela ansiedade, assim como dos comportamentos exploratórios. A interpretação da actividade locomotora centra-se principalmente no medo e na exploração, pois ambos os comportamentos motivam a actividade do animal (Markel *et al.*, 1989). Sendo assim, o campo aberto também pode ser utilizado, secundariamente, como uma medida de ansiedade (Belzung, 1999).

O teste do campo aberto pode ser feito em estruturas mais modernas, com sensores horizontais e verticais de movimento, ou simplesmente num espaço fechado, de dimensões variáveis, sem marcas ou pistas. O animal é colocado no centro da arena e durante cinco minutos o seu comportamento é gravado, para posterior análise. Este teste requer limpeza depois de cada sessão individual, para evitar que o animal seguinte seja influenciado pelos odores provenientes dos dejectos do animal anterior. Uma sessão de cinco minutos na arena do campo aberto permite a avaliação da locomoção e do comportamento exploratório, num ambiente novo. Este teste tem como principais índices a distância percorrida (actividade motora) e o número de transições (actividade exploratória) (Belzung, 1999).

Um dos parâmetros que também se analisa neste teste é a posição tigmotáctica, ou seja, a percentagem de tempo que o rato permanece nos cantos ou perto da periferia da arena. Mais tempo passado no centro do campo aberto indica um efeito tipo ansiolítico de uma mutação ou droga (Crawley *et al.*, 1997). Menos tempo no centro da arena pode reflectir um comportamento ansioso. O tempo dispendido no centro do teste pode ser afectado por vários factores, incluindo défices motores e sensoriais (Crawley *et al.*, 1997).



Figura 2 – Fotografia do teste do campo aberto utilizado ao longo deste trabalho (sala de comportamento do laboratório do Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa)

Teste do labirinto elevado (*elevated plus maze*)

O teste do labirinto elevado é um dos modelos mais populares para estudar a ansiedade animal (Pellow *et al.*, 1985). O teste do labirinto elevado consiste numa estrutura em cruz, composta por dois braços abertos perpendiculares a dois braços fechados. Esta estrutura encontra-se a 60 cm do chão. O rato é colocado no centro do labirinto, virado para um dos braços abertos, e regista-se o seu comportamento durante cinco minutos. O tempo de duração do teste baseia-se nos estudos iniciais de Montgomery (1958) que demonstram que os ratos revelam reacções de fuga mais vigorosas nos primeiros cinco minutos depois de serem colocados nos braços do labirinto. No labirinto elevado é medida a ansiedade ou o medo dos espaços abertos e das alturas em roedores. O animal depara-se com um conflito, entre a tendência natural para explorar novos espaços e a tendência natural para evitar as propriedades adversas que possam existir numa área aberta, estreita, elevada e luminosa (Handley & Mithani, 1984).

O rato é colocado no centro do labirinto, onde os quatro braços se cruzam, a partir de onde ele pode escolher qualquer um dos quatro braços. Dois dos braços são abertos, permitindo ao rato ver o chão. Os outros dois braços são fechados. Os ratos preferem os braços fechados, mas irão explorar os braços abertos. Considera-se que o animal está num dos braços quando tem as quatro patas dianteiras nesse mesmo braço do labirinto. Depois de cada sessão, o labirinto é limpo com uma solução de 50% de etanol em água, para minimizar as pistas de odor deixadas pelo animal anterior.

Outros comportamentos relacionados com a ansiedade, como o *freezing* e a defecação, aumentam de frequência nos braços abertos do labirinto quando comparados com os braços fechados (Pellow *et al.*, 1985). O teste do labirinto elevado é hoje em dia o modelo de comportamento mais utilizado para estudar o efeito ansiolítico ou ansiogénico de novos fármacos (Dawson & Tricklebank, 1995).



Figura 3.1 – Fotografia do labirinto elevado utilizado ao longo deste trabalho (sala de comportamento do laboratório do Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa)

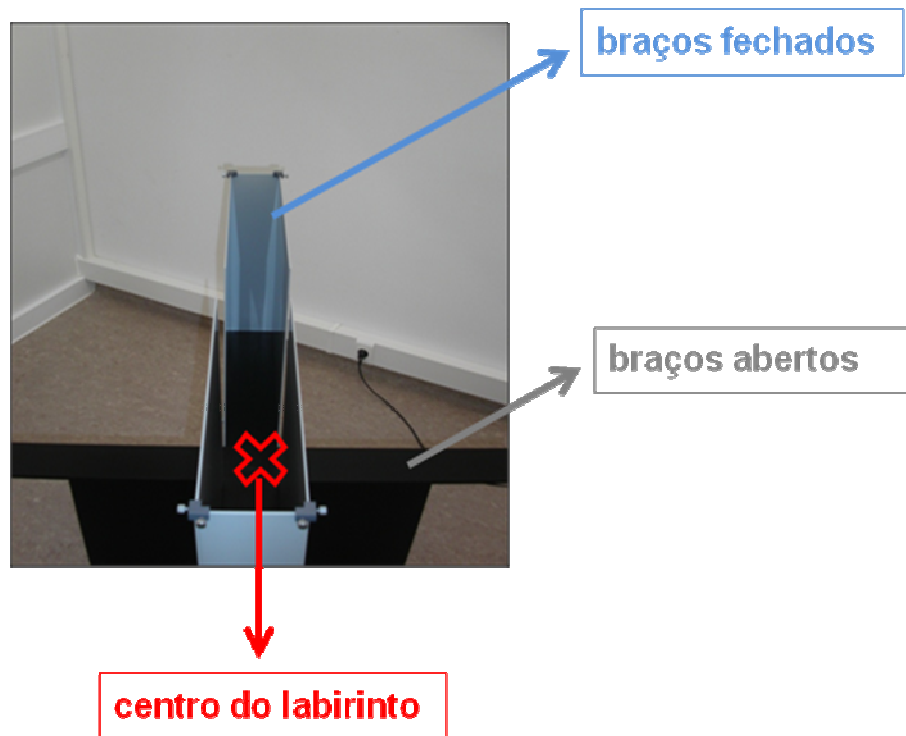


Figura 3.2 – Fotografia do labirinto elevado utilizado ao longo deste trabalho (sala de comportamento do laboratório do Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa)

Teste do labirinto de Morris (*Morris water maze*)

O teste do labirinto de Morris (MWM) foi descrito há 20 anos atrás como um teste para investigar a aprendizagem espacial e a memória em roedores (Morris, 1981). Desde aí que este teste se tornou num dos modelos mais frequentemente usados em neurociência comportamental. Este teste foi originalmente utilizado para investigar, anatomicamente, estruturas cerebrais importantes para a aprendizagem espacial e memória em ratos. Uma das descobertas mais consistentes é que as lesões no hipocampo comprometem a fase de aquisição no teste do labirinto de Morris, tanto em ratos (Morris *et al.*, 1982; Eichenbaum *et al.*, 1990), como em ratinhos (Logue *et al.*, 1997). Demonstrou-se que lesões em regiões cerebrais distintas como o hipocampo, o estriado, o cerebelo e o córtex cerebral, provocam alterações no desempenho deste teste. A aprendizagem espacial em geral e o desempenho no labirinto de Morris em particular, dependem da acção coordenada de diferentes áreas cerebrais, que são discriminadas consoante protocolos específicos (D’Hooge & De Deyn, 2001). O labirinto de Morris tem também

sido frequentemente utilizado para validar modelos de roedores de doenças neurodegenerativas e para avaliar possíveis terapêuticas (D'Hooge & De Deyn, 2001). O teste do labirinto de Morris consiste num modelo de navegação espacial no qual o animal nada para encontrar uma plataforma escondida, utilizando marcas visuais do ambiente em que decorre o teste. O reforço positivo para o rato é escapar da água. O teste é baseado no princípio de que os roedores são altamente motivados para escapar do ambiente aquático, pelo caminho mais rápido e curto (Wenk, 1998).

Protocolo específico para testar a memória espacial (dependente do hipocampo) (Vorhees & Williams, 2006)

Este teste consiste numa piscina cheia de água, dividida em quatro quadrantes virtuais que permitem realizar a análise pretendida. A piscina é circular, com um diâmetro que varia dos 80 aos 200 cm e uma altura que varia dos 30 aos 50 cm (Wahlsten *et al.*, 2003). A profundidade da piscina varia dos 20 aos 50 cm e esta está cheia dos 20 aos 30 cm, para que o rato nem consiga fugir pelo topo, nem apoie a cauda no fundo do tanque. Cada sessão de treino começa com o experimentador a tirar o rato da jaula e a pô-lo na água. Normalmente coloca-se o rato na periferia da piscina, com a cabeça virada para a parede. O local de entrada do animal é aleatório entre os quadrantes em cada sessão de treino, mas a plataforma encontra-se sempre no mesmo quadrante para cada rato. O rato é treinado durante cinco dias para encontrar uma plataforma submersa e invisível. A plataforma escondida está submersa de maneira que a sua superfície superior esteja entre um a dois cm abaixo da superfície da água. A sala tem objectos e imagens que funcionam como pistas, permitindo ao animal formar uma imagem espacial da sala. As pistas da sala de experimentação podem incluir um computador, uma porta ou um interruptor, por exemplo. Cada sessão tem uma duração máxima de 60 segundos após os quais, se o animal não encontrar a plataforma, este é colocado nesta pelo experimentador, onde fica durante 10 segundos. Em condições não patológicas, o tempo que o animal demora a encontrar a plataforma (denominado latência) diminui ao longo dos dias. O ideal antes de fazer o teste final é que o animal atinja uma latência entre 5-10 segundos (Vorhees & Williams, 2006). No final do último dia de teste, cada rato é submetido a um teste final (*probe test*). O teste final testa a capacidade do animal de identificar a localização espacial da plataforma. A plataforma é removida e o rato é colocado na piscina como anteriormente. Um rato com boa retenção da memória espacial irá procurar preferencialmente a plataforma no quadrante que a tinha

previamente. Se o rato aprendeu a localização da plataforma escondida utilizando as pistas que se encontram na sala, este irá nadar directamente para o quadrante que tinha a plataforma e passará predominantemente os 60 segundos da sessão de treino nesse mesmo quadrante. Os dados serão registados e parâmetros como a velocidade de natação, a latência, a distância percorrida para localizar a plataforma e o tempo dispendido no quadrante certo (ou seja, aquele que tem ou tinha a plataforma) são analisados e comparados entre grupos.



Figura 4 – Fotografia da piscina do labirinto de Morris utilizado ao longo deste trabalho (sala de comportamento do laboratório do Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa)

3. Materiais e métodos

3. Materiais e métodos:

3.1. Protocolo de separação maternal

Neste trabalho foram utilizados ratos Wistar (machos). As fêmeas grávidas foram recebidas no biotério, duas semanas antes do fim da gestação, sendo depois deixadas a recuperar do *stress* induzido pelo transporte. Para reduzir o efeito da herança genética, ao dia pós-natal 2 (DPN), as crias foram distribuídas aleatoriamente por progenitoras diferentes da sua, que as adoptaram.

As crias foram sujeitas a um modelo de separação maternal, denominado 180 (180 minutos de separação), que consiste em separar as mesmas da sua progenitora, durante 3 horas por dia, do dia DPN 2 ao dia DPN 14 de vida (Figura 5.1 e 5.2), como descrito anteriormente (Ladd *et al.* 2000). Foram investigados dois grupos diferentes: um grupo foi sujeito a separação maternal (SM) e o outro grupo foi deixado com a sua progenitora, o grupo controlo (CTR). A separação maternal foi feita sempre à mesma hora (entre as 9h e as 12h). No procedimento da separação, primeiro a progenitora foi removida da gaiola e depois é que as crias foram retiradas para uma gaiola mais pequena. Posteriormente as crias foram colocadas, em condições de segurança, numa incubadora com uma temperatura entre os 31 e os 33°C, já que estas não regulam a temperatura corporal (Figura 5.2), numa sala à parte, enquanto as crias do grupo controlo (CTR) foram deixadas junto da progenitora sem serem incomodadas. Após o período de separação maternal, as crias foram colocadas na gaiola de origem com a progenitora, e estas foram mantidas em condições de segurança até ao dia seguinte. Por uma questão de controlo, as crias foram pesadas ao segundo e décimo quarto DPN, respectivamente, o primeiro e o último dia da separação maternal. Após o dia DPN 14 as crias foram deixadas a crescer com a progenitora até ao dia DPN 21, sendo os machos seleccionados e desmamados. Ao longo do estudo, os animais estavam alojados no biotério, com temperatura constante entre 21-22 °C e um fotoperíodo de luz/escuridão de 12:12 h (as luzes acendem às 7 h).

A primeira série de testes comportamentais foi feita entre as sete e oito semanas de vida (animais jovens-adultos). A segunda série de testes foi feita às 70 semanas de vida (animais idosos). Excepto para limpeza das gaiolas, os animais não foram incomodados desde o desmame (DPN 21) até à fase jovem-adulto (7/8 semanas de vida) e depois até à fase idosa (70 semanas de vida).



Figura 5.1 – Fotografia de uma ninhada antes do período de separação maternal



Figura 5.2 – Fotografia de uma ninhada, durante o período de separação maternal (3 horas/dia). Os animais foram colocados durante 3 horas/dia numa incubadora a 31-33 °C, numa sala adjacente.

3.2. Manipulação e testes comportamentais

Os animais machos controlo e sujeitos a separação maternal, foram analisados, nos testes comportamentais, entre as 7 e as 10 semanas de vida (jovens-adultos) e depois às 70 semanas de vida (idosos).

Antes de os animais serem submetidos aos testes comportamentais tem de haver um período de habituação dos mesmos ao experimentador (Mechiel & De Boer, 2003). Experiências de manipulação, *stress* e/ou injeções podem alterar a resposta

comportamental nos roedores nesses mesmos testes (Mechiel & De Boer, 2003). É importante assegurar que a manipulação de roedores e algum evento de *stress* anterior, principalmente imediatamente antes dos testes, é consistente em todos os animais e grupos tratados. Nos três dias consecutivos que antecederam os testes comportamentais, os animais analisados foram sempre transportados para a sala de teste uma hora antes de serem submetidos ao teste comportamental, para se habituarem ao ambiente e, posteriormente, manipulados pelo experimentador durante cerca de 20 minutos, diariamente. A manipulação manteve-se no período de tempo em que decorreram os testes comportamentais, segundo o esquema da Figura 6.

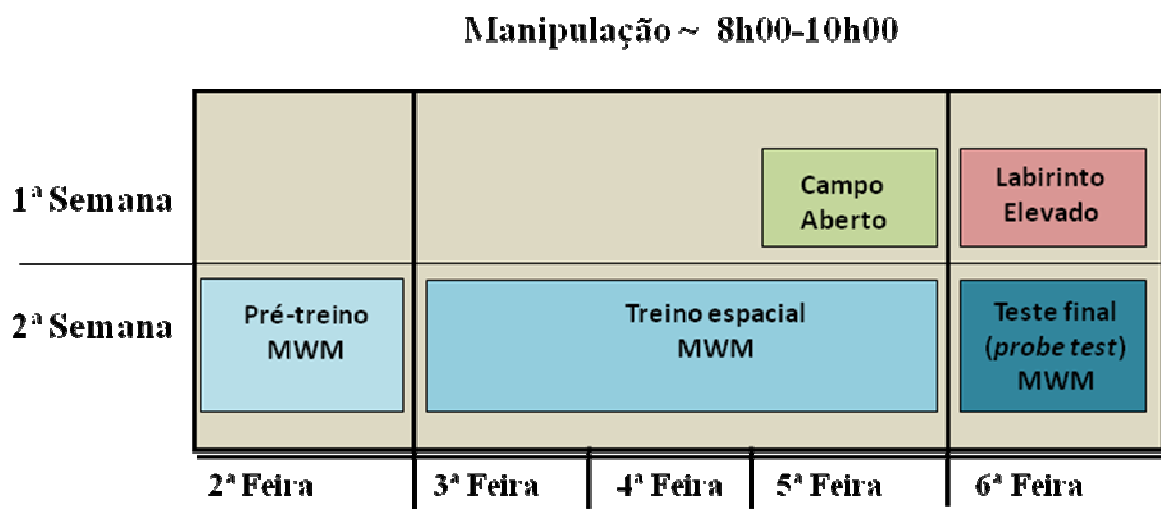


Figura 6 – Diagrama da sequência dos testes comportamentais efectuados

MWM = Morris water maze (labirinto de Morris)

Antes do início dos testes, cada animal foi identificado individualmente pela marcação da respectiva cauda, segundo o código abaixo indicado (Figura 7).

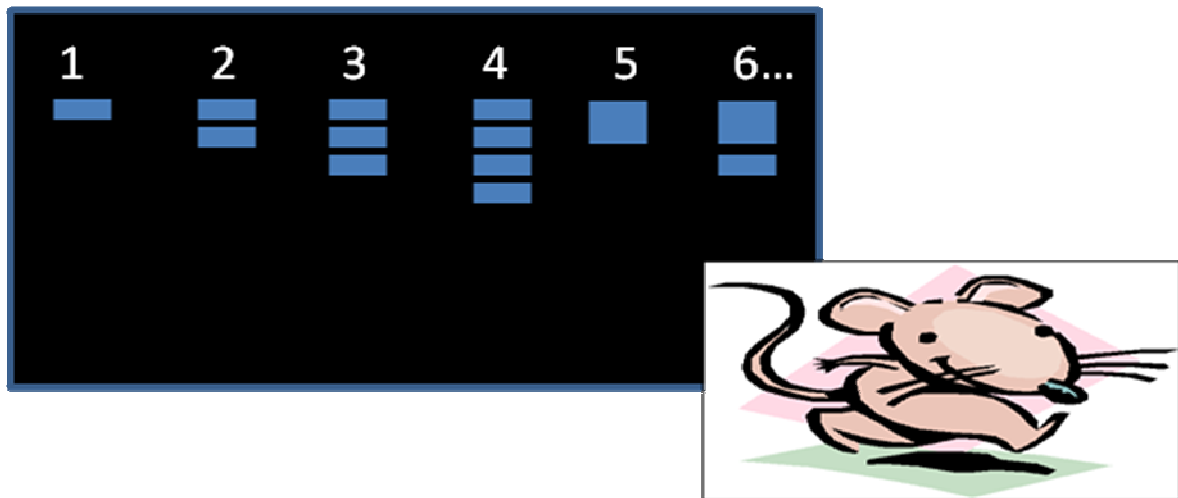


Figura 7 – Esquema de marcação das caudas dos animais. Cada grupo (CTR e SM) foi marcado com cores diferentes, segundo o código acima indicado

Os primeiros testes a que os animais foram submetidos foram o teste do campo aberto e do labirinto elevado. Estes testes provocam menos *stress* aos animais e só podem ser feitos uma vez, porque um dos parâmetros avaliados é a reactividade do animal a um local novo e desconhecido. A ordem de realização dos testes deve iniciar-se com o que provoca menos *stress* para o que provoca mais (van Gaalen & Steckler, 2000). No final destes é feito o teste do labirinto de Morris.

3.2.1. Campo aberto (*open-field*)

O teste do campo aberto foi feito numa arena quadrangular, com 67 cm de comprimento e 51 cm de altura, pintada uniformemente (Figura 8.1). O comportamento dos animais foi registado durante cinco minutos, com o auxílio de uma câmara de vídeo e de software específico (Smart v2.5, Panlab, Barcelona). O teste do campo aberto foi feito uma única vez para cada rato.

O animal foi colocado no centro da arena e deixou-se que este a explorasse livremente, enquanto se registava o seu comportamento durante cinco minutos. Após cada sessão, a arena foi limpa com uma solução de 50% de etanol em água, para minimizar as pistas de odor deixadas pelo animal anterior. Cada sessão foi gravada em vídeo e analisada

posteriormente com o software (Smart v2.5, Panlab, Barcelona). Os parâmetros analisados foram: a distância percorrida, a velocidade média e ainda a percentagem de tempo passado na periferia da arena (posição tigmotáctica), que é uma medida de ansiedade (Figura 8.2). Registaram-se ainda comportamentos como o *rearing*, o *grooming* e o *freezing*, e contaram-se o número de dejectos (defecções e urina) como medidas de ansiedade. Foi considerado comportamento de *rearing*, quando o rato se erguia nas patas traseiras, tocando ou não com as patas da frente na parede. Considerou-se comportamento *grooming*, quando o rato esfregava repetidamente o focinho e o resto do corpo. Considerou-se comportamento de *freezing*, quando o animal ficava totalmente imobilizado. Optou-se por não traduzir estes termos já que não existe uma denominação consensual na língua portuguesa.

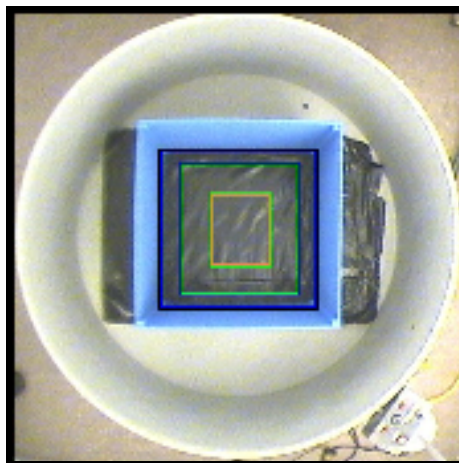


Figura 8.1 – Fotografia do teste do campo aberto utilizado ao longo deste trabalho (sala de comportamento do laboratório do Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa)

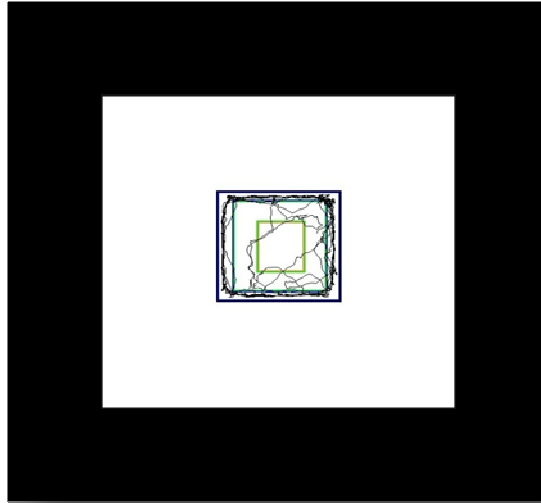


Figura 8.2 – Fotografia da trajetória do rato no teste do campo aberto utilizado ao longo deste trabalho

3.2.2. Labirinto elevado (elevated plus-maze)

Foi utilizado um labirinto elevado padrão (Panlab, Barcelona) (Handley & Mithani, 1984). O teste do labirinto elevado foi feito uma única vez para cada rato (Figura 3.1). Os animais a testar foram colocados no centro do labirinto, com a cabeça virada para um dos braços abertos, e o seu comportamento foi registado durante cinco minutos. Entre cada sessão o labirinto foi limpo, com uma solução de 50% de etanol em água, para eliminar vestígios de odor do animal anterior. Os parâmetros analisados foram o número de entradas nos braços abertos e o tempo dispendido nos mesmos. Considerou-se a entrada em qualquer um dos braços do labirinto, quando o rato colocava as quatro patas da frente no respectivo braço.

O comportamento dos ratos e dos ratinhos no labirinto elevado pode ser influenciado pelos ritmos circadianos (e.g. Carobrez & Bertoglio, 2005). No nosso laboratório, os ratos são sempre testados na fase diurna (entre as 9h00 e as 17h00).

3.2.3 Labirinto de Morris (*Morris water maze*)

Para o teste do labirinto de Morris utilizou-se uma piscina redonda de 142 cm de diâmetro, com capacidade de 900 L e temperatura constante de 25°C (Panlab, Barcelona). O contraste para detecção do animal, pela câmara de vídeo, é obtido

diluindo tinta de água preta não-tóxica na piscina (1 ml de tinta preta, Dyrup (Ref. 5148) para 10 L água) (Figura 9.1). Cada dia de treino é constituído por quatro sessões. Na primeira sessão do primeiro dia a plataforma foi colocada no centro da piscina. Colocou-se o rato no interior da piscina, deixou-se que o animal nadasse durante 60 segundos e, no fim, pôs-se o mesmo em cima da plataforma durante dez segundos. O tempo em cima da plataforma permite que o animal perceba que esta serve como escapatória da piscina. O rato é depois retirado da piscina, limpo e colocado em ambiente aquecido (30 °C). É feito o mesmo procedimento para todos os ratos. Na segunda sessão de treino a plataforma é deslocada do centro da piscina para um dos quadrantes e segue-se o procedimento da sessão anterior. A plataforma é sempre colocada no mesmo quadrante para o mesmo rato. Cada dia tem quatro sessões de treino e entre cada sessão há um intervalo de pelo menos 15 minutos (Vorhees & Williams, 2006). Este procedimento repete-se ao longo de quatro dias consecutivos. No quinto dia faz-se o teste final (*probe test*), em que a plataforma é retirada da piscina, coloca-se o rato no interior da mesma e o parâmetro analisado é o tempo dispendido pelo animal no quadrante que deveria ter a plataforma (Figura 9.2). A trajectória seguida pelo animal e a sua velocidade são registadas numa câmara de vídeo e analisadas posteriormente pelo software (Smart v2.5, Panlab, Barcelona) (Figura 9.3).

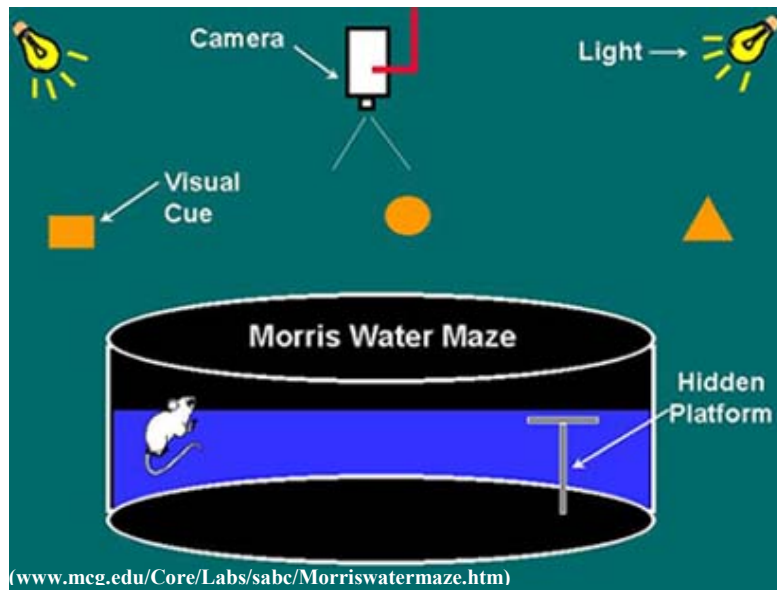


Figura 9.1 – Esquema representativo da piscina do labirinto de Morris utilizada neste trabalho. No MWM o roedor é colocado na piscina, onde, utilizando as pistas visuais da sala, procura uma plataforma escondida mesmo abaixo da superfície da água. O teste final (*probe trial*) é utilizado para aceder à capacidade que o animal tem em reter a informação aprendida nos testes anteriores



Figura 9.2 – Fotografia da plataforma da piscina do labirinto de Morris utilizado ao longo deste trabalho (sala de comportamento do laboratório do Instituto de Farmacologia e Neurociências da Faculdade de Medicina de Lisboa)

Em cada sessão de treino é registada a latência, tempo que o animal leva a encontrar a plataforma, velocidade média, distância percorrida, percentagem de natação tigmotáctica, percentagem de tempo dispendido em cada quadrante.

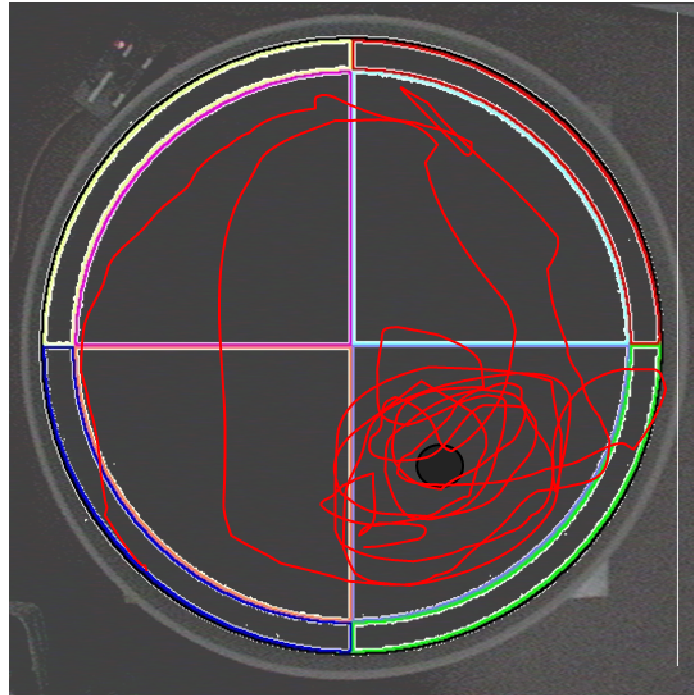


Figura 9.3 – Fotografia da trajectória do rato na piscina do labirinto de Morris utilizada ao longo deste trabalho. A piscina está dividida em quatro quadrantes (virtuais) e estes por sua vez estão divididos numa zona periférica, que é utilizada para analisar a natação tigmotáctica. É possível ver a plataforma colocada num dos quadrantes da piscina (local onde o animal permaneceu mais tempo)

Para uma melhor compreensão do processo, apresenta-se abaixo o diagrama (Quadro 1) correspondente ao protocolo do labirinto de Morris.

Quadro 1 – Protocolo correspondente ao labirinto de Morris

Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Manipulação (20 minutos)	Manipulação (20 minutos)	Manipulação (20 minutos)	Manipulação (20 minutos)	Manipulação (20 minutos)
1ª Sessão Plataforma no Centro	1ª Sessão Plataforma no Quadrante	1ª Sessão Plataforma no Quadrante	1ª Sessão Plataforma no Quadrante	1ª Sessão Plataforma no Quadrante
2ª Sessão Plataforma no Quadrante	2ª Sessão Plataforma no Quadrante	2ª Sessão Plataforma no Quadrante	2ª Sessão Plataforma no Quadrante	2ª Sessão Plataforma no Quadrante
3ª Sessão Plataforma no Quadrante	3ª Sessão Plataforma no Quadrante	Teste final (<i>probe test</i>) Sem Plataforma	3ª Sessão Plataforma no Quadrante	Teste final (<i>probe test</i>) Sem Plataforma
4ª Sessão Plataforma no Quadrante	4ª Sessão Plataforma no Quadrante		4ª Sessão Plataforma no Quadrante	

3.3. Efeito do MK-801 no labirinto de Morris:

Como controlo para o teste do labirinto de Morris foi utilizado MK-801 (Tocris Cookson, UK), um antagonista dos receptores de subtipo NMDA. Foi administrado, por injeção intraperitoneal (0,2 mg/Kg dissolvido em NaCl 0.9%), a dois ratos de sete semanas diariamente, meia hora antes de cada sessão de treino no labirinto de Morris.

3.4. Efeito da cafeína em ratos CTR e SM adultos:

O tratamento de cafeína crónico foi dado aos animais jovens-adultos por um período de seis semanas, desde as 7 às 12 semanas, em que a última semana correspondeu à semana dos testes comportamentais. Os animais foram divididos em 4 grupos diferentes: grupo controlo, designado por CTR, grupo controlo com cafeína, designado por CTRc, grupo sm, designado por SM, e grupo sm com cafeína, designado por SMc. A cafeína foi administrada na água dos biberões, numa concentração de 1,0 g/l. Os biberões eram trocados a cada dois dias e o volume ingerido registado. Assim, a dose estimada diária para cada animal foi de 20 mg/Kg.

3.5. Métodos estatísticos

Os valores apresentados são médias \pm erro padrão da média de n (número de indivíduos), calculadas com o programa GraphPad Prism 4. As diferenças significativas entre as médias foram calculadas através do teste t de student. Valores de P inferiores a 0.05 foram considerados como representando diferenças significativas.

4. Resultados

4. Resultados:

4.1. Ratos jovens-adultos

Neste trabalho os ratos jovens-adultos, que foram sujeitos a separação maternal nos primeiros dias de vida, foram submetidos a três testes comportamentais: o campo aberto, o labirinto elevado e o labirinto de Morris. Animais adultos sujeitos ao modelo de separação maternal (180), apresentam geralmente menos entradas nos braços abertos e uma preferência pelos braços fechados no labirinto elevado (Daniels *et al.*, de 2003). Estes resultados sugerem que os animais sujeitos à separação maternal, apresentam um comportamento mais ansioso, quando comparados com os animais controlo. Nesta fase caracterizámos o modelo de separação maternal em animais adultos induzido nas nossas condições, para que fosse válida a sua utilização posterior em animais idosos.

4.1.1 Campo aberto

O teste do campo aberto mede o comportamento exploratório e a actividade motora.

Em termos de distância percorrida, observou-se que os ratos do grupo controlo (CTR) percorreram 7838 ± 196 cm ($n=3$), uma distância semelhante à percorrida pelo grupo sujeito à separação maternal (SM) que foi de 6863 ± 715 cm ($n=4$). (Figura 10.1). Embora o mínimo aceitável para testes comportamentais seja de 8-10 animais, neste teste, devido a um problema na gravação dos dados, só se obtiveram dados para 3-4 animais.

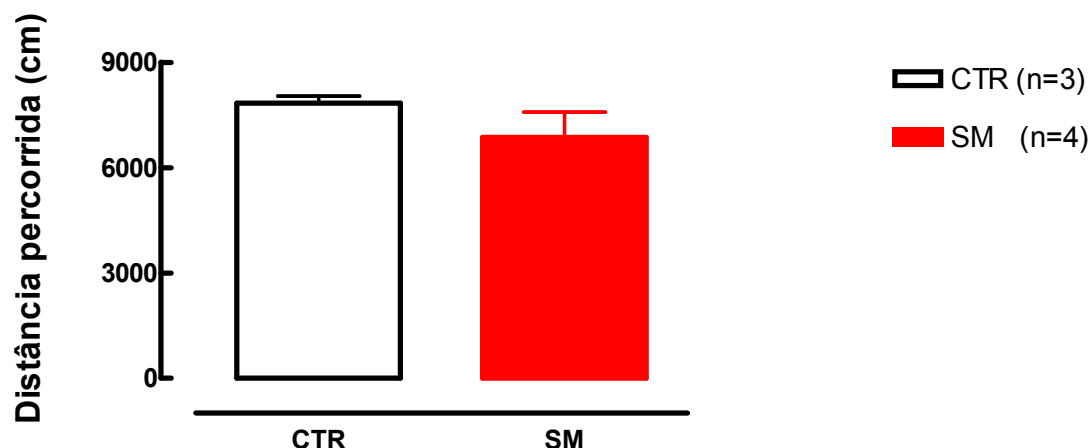


Figura 10.1 - Distância percorrida, medida em cm, do grupo controlo (CTR; n=3) e do grupo de separação maternal (SM; n=4), em ratos jovens-adultos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Em termos de velocidade média (cm/s) não se verificam diferenças significativas entre animais CTR e SM. Os animais CTR alcançaram uma velocidade média de $25,7 \pm 0,7$ cm/s (n=3), enquanto os SM apresentaram uma velocidade média de $22,2 \pm 2,5$ cm/s (n=4) (Figura 10.2).

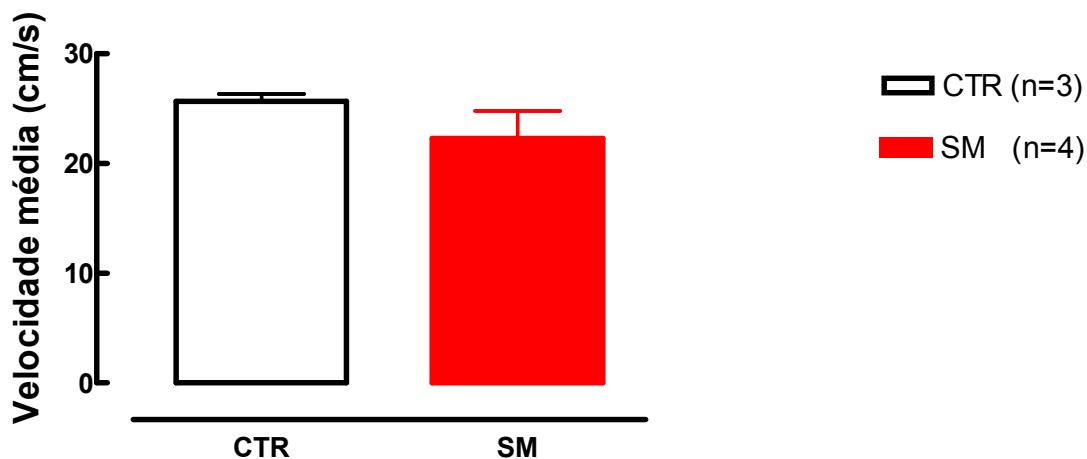


Figura 10.2 - Velocidade média, medida em cm/s, no grupo controlo (CTR; n=3) e no grupo de separação maternal (SM; n=4), em ratos jovens-adultos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de posição tigmotáctica não apresenta diferenças significativas entre o grupo CTR e o SM. Os animais CTR têm valores de $65,7 \pm 1,1\%$ ($n=3$), enquanto os animais SM têm valores de $70,5 \pm 6,4\%$ ($n=4$) (Figura 10.3).

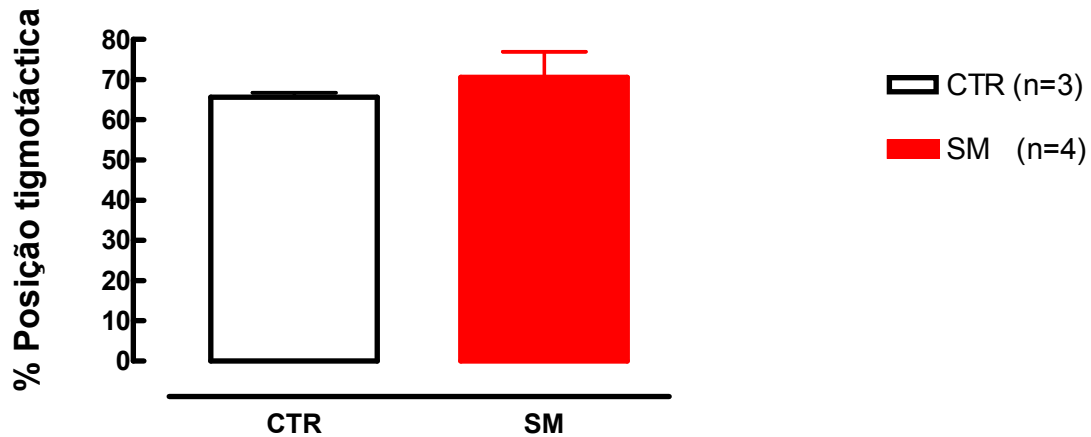


Figura 10.3 – Percentagem da posição tigmotáctica no grupo controlo (CTR; $n=3$) e no grupo de separação maternal (SM; $n=4$), em ratos jovens-adultos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Também foram analisados outros comportamentos como o *rearing*, *grooming* e *freezing*, assim como o número de vezes que o animal defecou e urinou, dentro do período do teste. Estes resultados indicam que a actividade motora não parece ter sido afectada pelo paradigma da separação maternal, sendo este um controlo indispensável para a realização dos testes subseqüentes.

Quadro 2 – Outros parâmetros de comportamento analisados no decurso do teste do campo aberto, em animais jovens-adultos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média. A unidade ocorr/min significa ocorrências por minuto.

Média\pmErro padrão	CTR (n=7)	SM (n=13)
<i>Rearing</i>	0,4 \pm 0,3 ocorr/min	2,0 \pm 2,5 ocorr/min
<i>Grooming</i>	0,8 \pm 0,9 ocorr/min	0,9 \pm 0,7 ocorr/min
<i>Freezing</i>	0,0 \pm 0,0 ocorr/min	0,04 \pm 0,1 ocorr/min
<i>Defecação</i>	0,4 \pm 0,7 ocorr/min	0,4 \pm 0,7 ocorr/min
<i>Urina</i>	0,3 \pm 1,1 ocorr/min	0,3 \pm 0,7 ocorr/min

4.1.2. Labirinto elevado

Para avaliar se nas nossas condições experimentais o paradigma de separação maternal resultava num comportamento ansioso, testámos os animais no labirinto elevado.

A percentagem de tempo dispendida nos braços abertos apresenta diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$). Os animais do grupo SM (15,5 \pm 4,2%, n=13) apresentaram valores inferiores aos do grupo CTR (33,7 \pm 6,2%, n=5) (Figura 11.1).

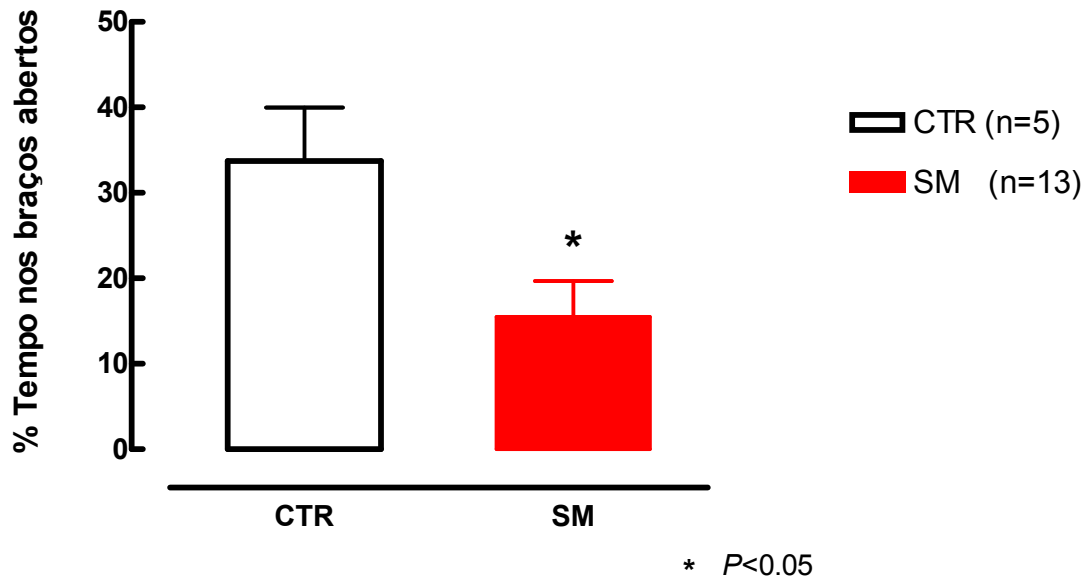


Figura 11.1 – Percentagem de tempo dispendida nos braços abertos do labirinto elevado no grupo controlo (CTR; n=5) e no grupo de separação maternal (SM; n=13), em ratos jovens-adultos. Os dois grupos testados apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P<0.05$). Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Em relação ao número total de entradas o grupo CTR e o grupo SM têm valores semelhantes. O grupo CTR tem $12,2 \pm 1,9$ (n=6) e o grupo SM $10,9 \pm 1,6$ (n=8), o que confirma a ausência de défices motores (Figura 11.2).

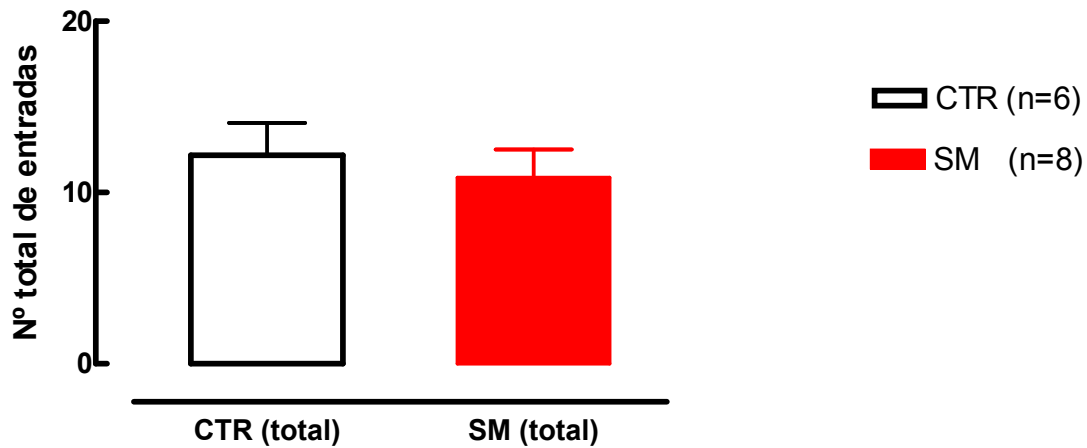


Figura 11.2 – Número total de entradas nos braços do labirinto elevado no grupo controlo (CTR; n=6) e no grupo de separação maternal (SM; n=8), em ratos jovens-adultos. O número total de entradas nos braços do labirinto elevado resulta da soma das entradas nos braços abertos e nos braços fechados e respectivos valores médios \pm erro padrão da média.

4.1.3. Labirinto de Morris

Para avaliar o impacto da separação maternal na memória espacial, dependente do hipocampo, utilizámos o labirinto de Morris, na sua versão de aquisição espacial (Vorhees & Williams, 2006).

A latência, que é o tempo que o animal leva a encontrar a plataforma e a posicionar-se em cima da mesma, diminuiu consideravelmente ao longo da semana de treino nos dois grupos testados, o que indica que a aprendizagem do local da plataforma está a decorrer. No entanto, a curva de aprendizagem (Figura 12.1) para os ratos SM é mais lenta que para os ratos CTR, particularmente no 3º dia de treino. Tendo em conta que para os animais controlo, os valores de latência já atingiram o seu máximo no 3º dia, fizemos o teste final de retenção de memória, tanto no 3º como no 5º dia de treino. No 3º dia de treino o grupo SM apresenta valores ($28,3 \pm 5,0$ s; n=8) superiores ao grupo CTR ($14,3 \pm 2,7$ s; n=7). No 4º dia de treino o grupo SM tem também valores ($24,8 \pm 5,2$ s; n=8) mais altos de latência do que o grupo CTR ($13,7 \pm 3,1$ s; n=7), o que significa que os ratos controlo levaram em média menos tempo a encontrar a plataforma (Figura 12.1).

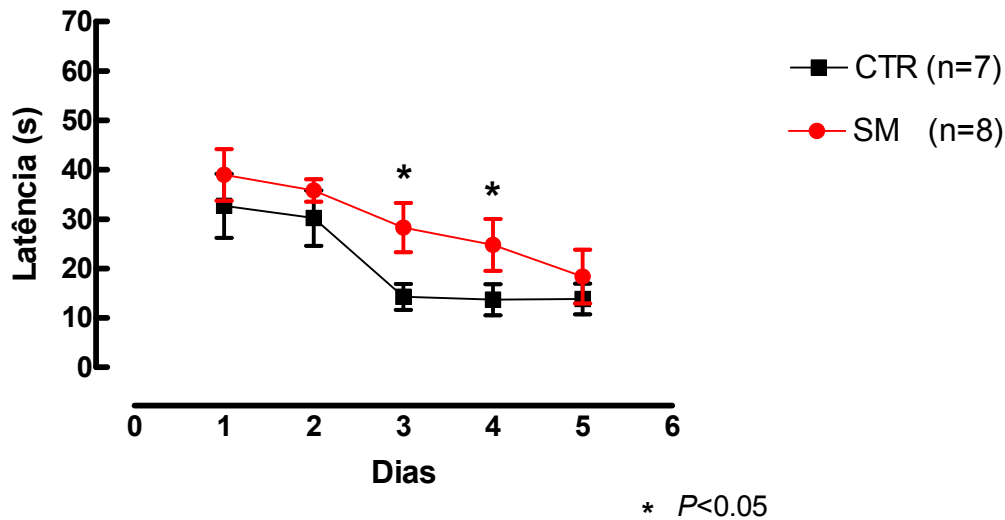


Figura 12.1 – Curva de aprendizagem. Latência, medida em s, do grupo controlo (CTR; $n=7$) e do grupo de separação maternal (SM; $n=8$) nos 5 dias de treino do labirinto de Morris, em ratos jovens-adultos. Existem diferenças significativas no 3º e no 4º dia de treino, entre os dois grupos ($P < 0.05$). No 5º dia de treino essas diferenças são atenuadas. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de tempo dispendida no quadrante da plataforma apresenta diferenças significativas ($P < 0.05$), tanto no 3º como no 5º dia de treino.

No teste final do 3º dia, que mede a retenção da memória, o grupo CTR ($57.7 \pm 12.0\%$, $n=8$) passou mais tempo no quadrante da plataforma do que o grupo SM ($37.3 \pm 20.8\%$, $n=8$) (Figura 12.2).

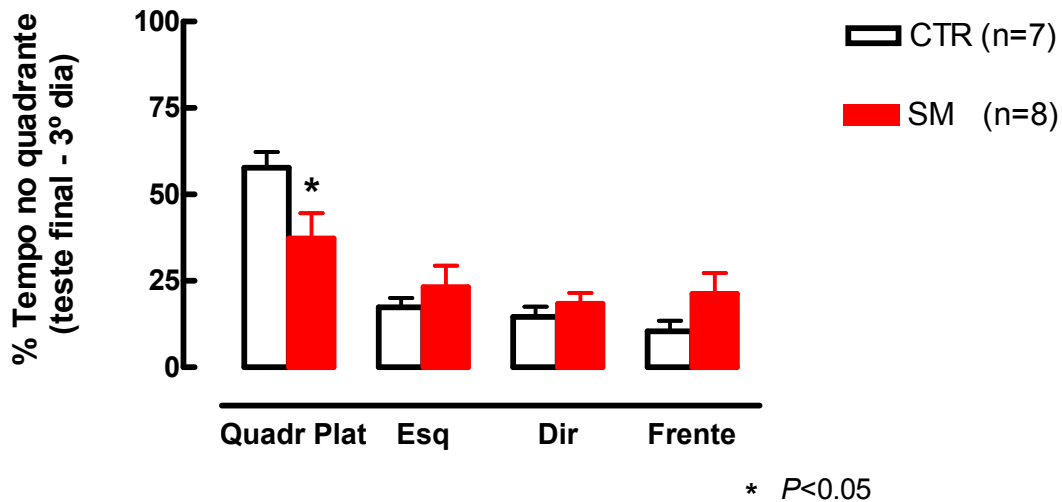


Figura 12.2 – Percentagem de tempo dispendida no quadrante da plataforma no 3º dia de treino - teste final – no grupo controlo (CTR; n=8) e no grupo de separação maternal (SM; n=7), em ratos jovens-adultos. As duas colunas da esquerda representam a percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no teste final do 3º dia. As colunas seguintes são do quadrante à esquerda, à direita e em frente, respectivamente, do quadrante correspondente à plataforma. Existem diferenças significativas no quadrante da plataforma ($P < 0.05$). Nos restantes quadrantes não existem diferenças significativas. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

No teste final do 5º dia, o grupo CTR ($58.7 \pm 8.9\%$, n=6) apresenta, mais uma vez, valores mais elevados do que o grupo SM ($48.7 \pm 5.7\%$, n=7), isto é, aquele grupo passou mais tempo no quadrante da plataforma do que o grupo SM (Figura 12.3).

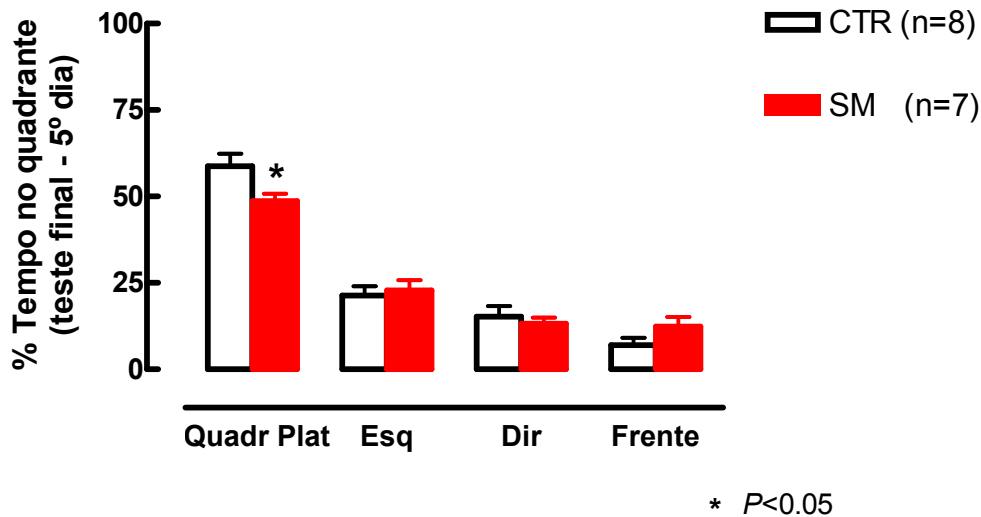


Figura 12.3 – Percentagem de tempo dispendido no quadrante da plataforma, no 5º dia de treino - teste final – no grupo controlo (CTR; n=8) e no grupo de separação maternal (SM;n=7), em ratos jovens-adultos. As duas colunas da esquerda representam a percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no teste final do 5º dia. As colunas seguintes são do quadrante à esquerda, à direita e em frente, respectivamente, do quadrante correspondente à plataforma. Existem diferenças significativas no quadrante da plataforma ($P < 0.05$). Nos restantes quadrantes não existem diferenças significativas. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de tempo de natação tigmotáctica analisada revela o tempo que o animal passou na periferia da piscina e, como tal, o seu estado de ansiedade. Existem diferenças significativas no 2º, 3º e 4º dia de treino. Nestes três dias em que se verificaram diferenças entre os dois grupos, o grupo SM apresenta sempre valores mais altos de percentagem de tempo de natação tigmotáctica do que o grupo CTR, o que significa que aqueles passaram mais tempo a nadar na periferia da piscina do que os animais controlo (Figura 12.4). No 2º dia, o grupo SM passou em média $37,1 \pm 4,3$ % (n=8) na periferia da piscina e o grupo CTR $22,6 \pm 4,8$ % (n=7). No 3º dia, o grupo SM passou em média $27,2 \pm 5,5$ % (n=8) na periferia da piscina e o grupo CTR apenas $11,1 \pm 2,9$ % (n=7). No 4º dia, o grupo SM passou em média $22,7 \pm 4,3$ % (n=8) na periferia da piscina e o grupo CTR $15,4 \pm 6,2$ % (n=7) (Figura 12.4).

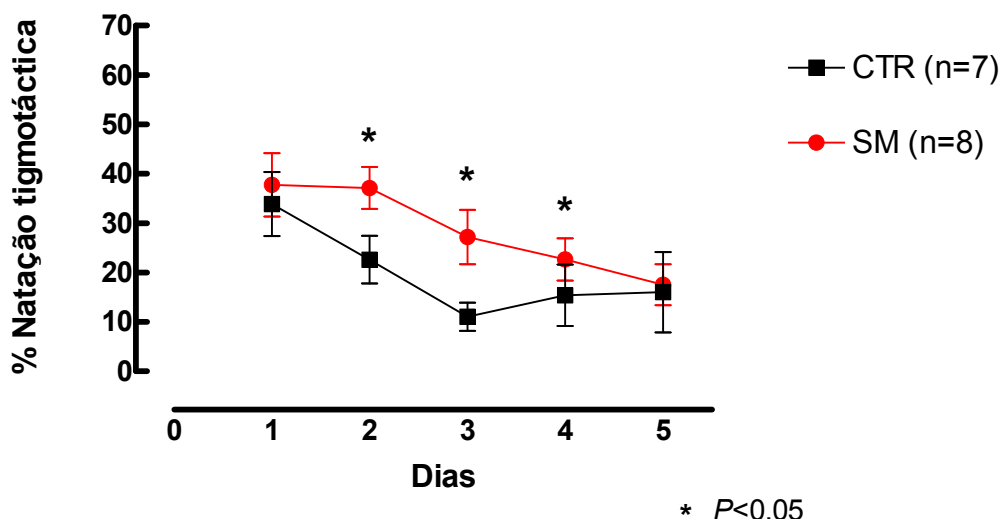


Figura 12.4 – Percentagem de tempo de natação tigmotática do grupo controlo (CTR; $n=7$) e do grupo de separação materna (SM; $n=8$) nos 5 dias de treino do labirinto de Morris, em ratos jovens-adultos. Existem diferenças no 2º, 3º e 4º dia de treino, entre os dois grupos ($P < 0.05$). No 5º dia de treino essas diferenças são atenuadas. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Quadro 3 - Outros parâmetros analisados no decurso do teste do labirinto de Morris. Nenhum dos parâmetros apresentou diferenças estatisticamente significativas. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Média \pm Erro padrão	CTR ($n=7$)	SM ($n=8$)
Velocidade média (cm/sec)	22,9 \pm 0,3	22,2 \pm 0,6
Distância percorrida (cm)	453 \pm 111,7	651 \pm 103,4

4.2. MK-801:

Como controlo, de que o comportamento que estamos a observar é dependente dos receptores de NMDA, testámos no labirinto de Morris, dois animais aos quais foi administrado o antagonista de receptores NMDA, o MK-801, numa dose de 0,2 mg/Kg, trinta minutos antes de cada sessão. A administração de MK-801 provocou alterações significativas no desempenho dos animais, que se reflectiu nos valores da latência e da percentagem de tempo dispendida no quadrante da plataforma.

Os ratos tiveram dificuldade em encontrar a plataforma, como forma de escapatória da piscina, e a latência apresenta valores médios de 55.95 ± 1.91 s ($n=2$, $P<0.05$), no total de sessenta segundos, que não melhorou com o aumento de dias de treino. (Figura 13.1) Em virtude de termos feito este controlo em apenas dois animais, são apresentados os valores individuais e não as médias.

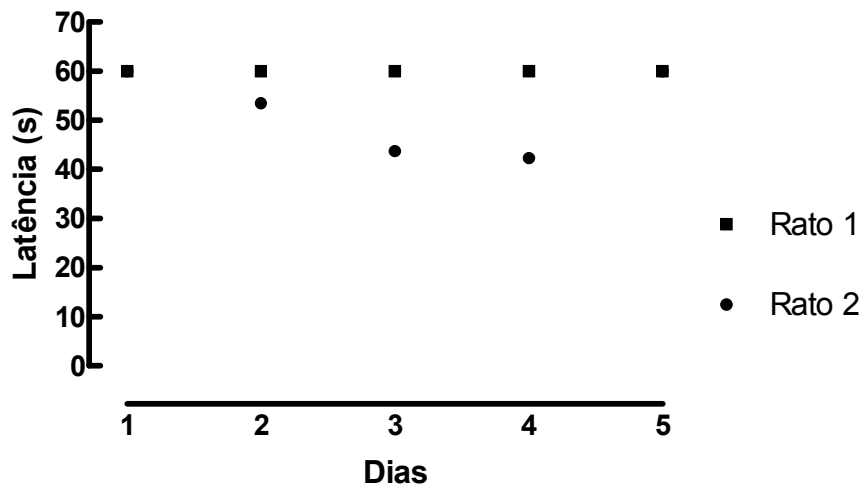


Figura 13.1 – Latência, medida em s, em animais sob efeito do MK-801 ($n=2$). Os ratos apresentam valores muito elevados de latência (média de 55.95 num total de 60 segundos), o que reflecte a sua dificuldade em encontrar a plataforma. Os resultados apresentados são valores individuais obtidos para dois animais.

No teste final no 5º dia de treino, estes animais dividiram o seu tempo de permanência em todos os quadrantes de forma igual (Figura 13.2).

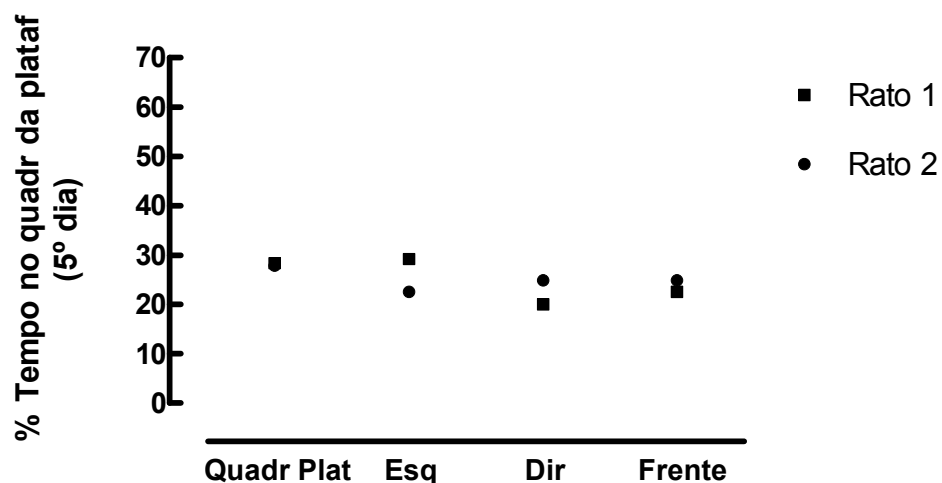


Figura 13.2 – Percentagem de tempo dispendido no quadrante da plataforma, no 5º dia de treino - teste final - em animais sob efeito do MK-801 (n=2). Os resultados apresentados são valores individuais obtidos para dois animais.

Quadro 4 - Outros parâmetros analisados no decurso do teste do labirinto de Morris, em animais sob efeito do MK-801 (n=2). Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Média\pmErro padrão	• Rato 1	▪ Rato 2
Velocidade média (cm/sec)	47,5 \pm 1,6	39,9 \pm 1,2
Distância percorrida (cm)	2857 \pm 98,6	2114 \pm 178,3

4.3. Ratos idosos

As experiências indutoras de *stress* que ocorrem ao longo da vida podem ter um impacto a longo prazo no envelhecimento. Desde uma fase tão inicial como o período neonatal, o *stress* pode alterar a frequência do declínio cognitivo e das mudanças neurodegenerativas (Pardon & Rattay, 2008). Após o período de desenvolvimento inicial, desconhece-se actualmente a forma como o *stress* influencia o processo de envelhecimento, por falta de estudos (Pardon & Rattay, 2008). Há evidências que os níveis de corticosterona permanecem aumentados em animais idosos, muito tempo após a indução do *stress* (Lehmann *et al.*, 2002). Por outro lado, existem provas que apontam para uma falta de plasticidade dos sistemas cerebrais monoaminérgicos na resposta ao *stress* durante o envelhecimento e para mudanças determinadas pela idade no impacto imediato do *stress*, que é maior em indivíduos vulneráveis ao declínio cognitivo relacionado com a idade (Pardon & Rattay, 2008). A primeira fase do trabalho (Capítulo 4.1) permitiu-nos validar a utilização do modelo no nosso laboratório, reproduzindo resultados previamente descritos. A demonstração de diferenças claras nos animais sujeitos a separação maternal na idade adulta, legitimou o avanço para o estudo no envelhecimento. Testámos então o impacto da separação maternal no desempenho de animais idosos (70-80 semanas de idade).

4.3.1. Campo aberto

Relativamente aos ratos idosos, os valores da distância percorrida (cm) e da velocidade média (cm/s), são em média inferiores aos obtidos para os ratos jovens-adultos. No entanto, os animais controlo - CTR - ($1614 \pm 87,2$ cm, $n=8$) têm valores semelhantes aos animais SM ($1565 \pm 140,1$ cm, $n=12$) (Figura 14.1). Na velocidade média (cm/s), os valores entre os animais controlo - CTR - ($5,4 \pm 0,3$ cm/s) e os animais SM ($5,2 \pm 0,5$ cm/s) também são semelhantes (Figura 14.2).

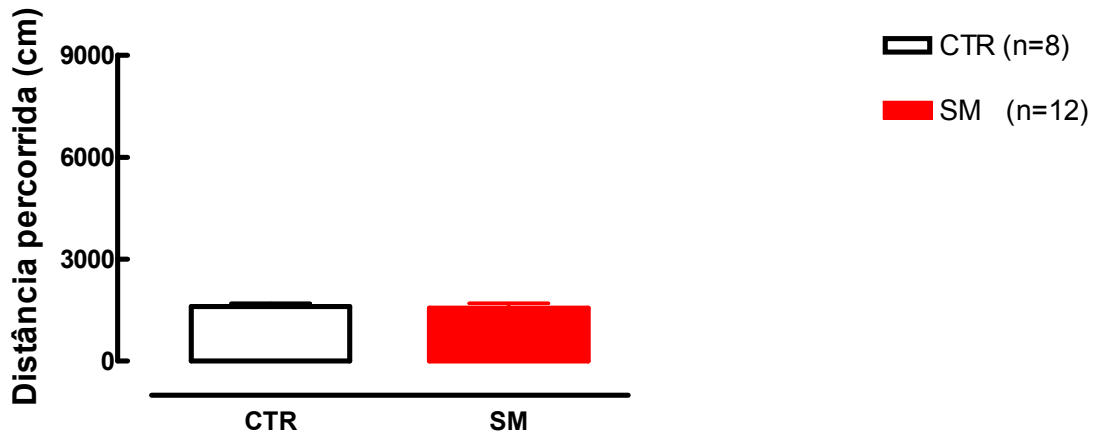


Figura 14.1 - Distância percorrida, medida em cm, pelos ratos do grupo controlo (CTR) e do grupo de separação maternal (SM). Os ratos idosos apesar de terem valores inferiores de distância percorrida (cm) quando comparados com os ratos jovens-adultos, apresentam valores semelhantes entre o grupo controlo (CTR; n=8) e o grupo sujeito a separação maternal (SM; n=12). Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

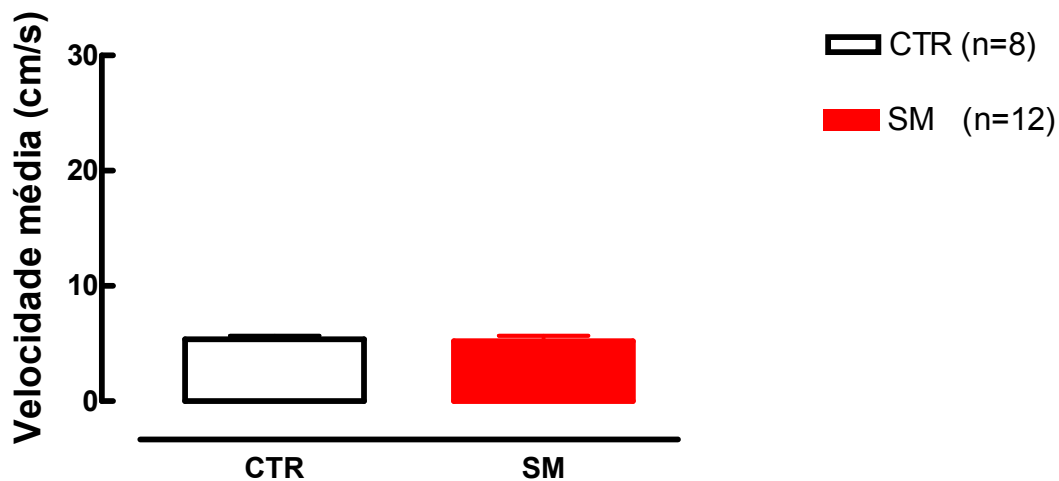


Figura 14.2 - Velocidade média, medida em cm/s, do grupo controlo, CTR, e do grupo de separação maternal, SM. Os ratos idosos apesar de terem valores inferiores de velocidade média (cm/s) quando comparados com os ratos jovens-adultos, apresentam valores semelhantes entre o grupo controlo (CTR; n=8) e o grupo sujeito a separação maternal (SM; n=12). Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

Na percentagem da posição tigmotáctica os ratos idosos apresentam valores para o grupo CTR ($46,1 \pm 5,9\%$, $n=8$) semelhantes aos do grupo SM ($44,2 \pm 5,9\%$, $n=12$). O que significa que os animais de ambos os grupos passaram aproximadamente o mesmo tempo na periferia da arena do campo aberto, como se pode observar pelo gráfico (Figura 14.3).

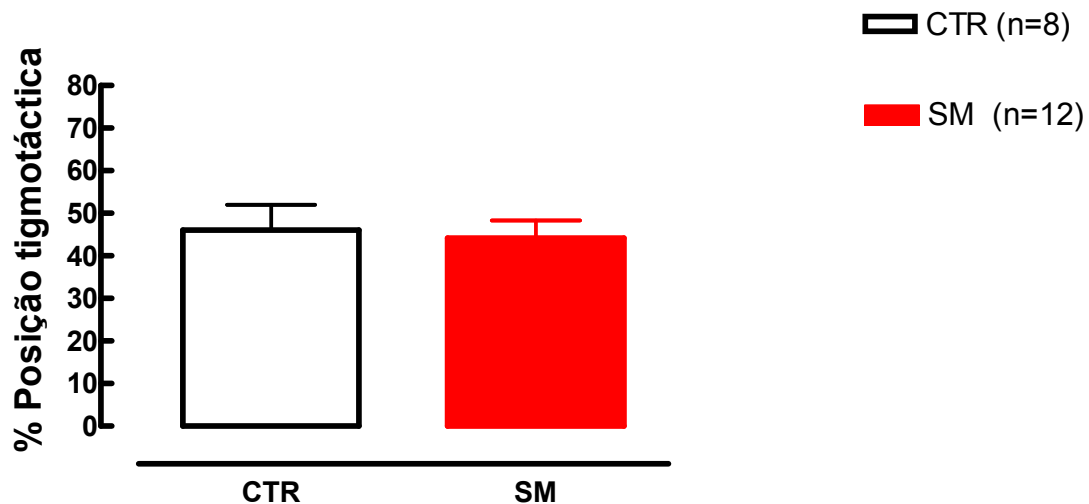


Figura 14.3 – A percentagem da posição tigmotáctica é a percentagem de tempo que o animal permanece na periferia da arena do campo aberto. Percentagem da posição tigmotáctica do grupo controlo (CTR; $n=8$) e do grupo de separação maternal (SM; $n=12$). Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

Quadro 5 – Outros parâmetros de comportamento analisados no decurso do teste do campo aberto, em animais idosos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média. A unidade ocorr/min significa ocorrências por minuto.

Média \pm Erro padrão	CTR (n=8)	SM (n=12)
<i>Rearing</i>	2,1 \pm 0,3 ocorr/min	2,2 \pm 0,4 ocorr/min
<i>Grooming</i>	0,9 \pm 0,2 ocorr/min	0,9 \pm 0,1 ocorr/min
<i>Freezing</i>	0,08 \pm 0,04 ocorr/min	0,08 \pm 0,08 ocorr/min
<i>Defecação</i>	0,5 \pm 0,1 ocorr/min	0,5 \pm 0,1 ocorr/min
<i>Urina</i>	0,4 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min

4.3.2. Labirinto elevado

Ao compararmos os ratos jovens-adultos com os ratos idosos é possível observar que estes têm valores inferiores no que se refere ao número total de entradas nos braços do labirinto, o que seria de esperar uma vez que os ratos idosos têm menor mobilidade que os ratos jovens-adultos. O grupo CTR (2,1 \pm 0,4; n=8) e o grupo SM (2,0 \pm 0,3; n=12) têm valores muito semelhantes para este parâmetro (Figura 15.1).

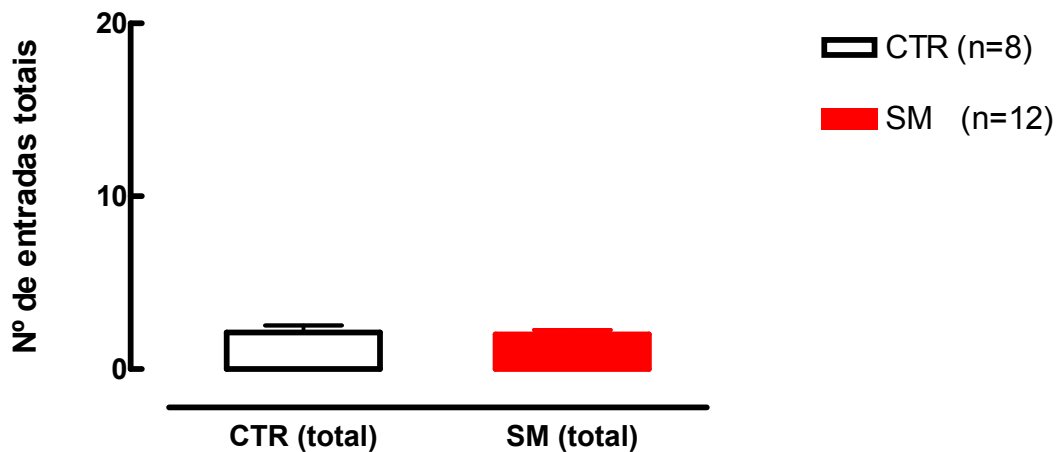


Figura 15.1 – O número total de entradas nos braços do labirinto elevado resulta da soma das entradas nos braços abertos e nos braços fechados e respectivos valores médios \pm padrão da média. Número total de entradas nos braços do labirinto elevado no grupo controlo (CTR; n=8) e no grupo sujeito a separação maternal (SM; n=12).

Nos ratos idosos, a percentagem de tempo dispendido nos braços abertos, apresenta diferenças significativas entre o grupo CTR e o grupo SM ($P < 0.05$). O grupo SM ($6,6 \pm 1,6\%$, $n=12$) passou menos tempo nos braços abertos do que o grupo CTR ($19,8 \pm 4,8\%$, $n=5$) (Figura 15.2).

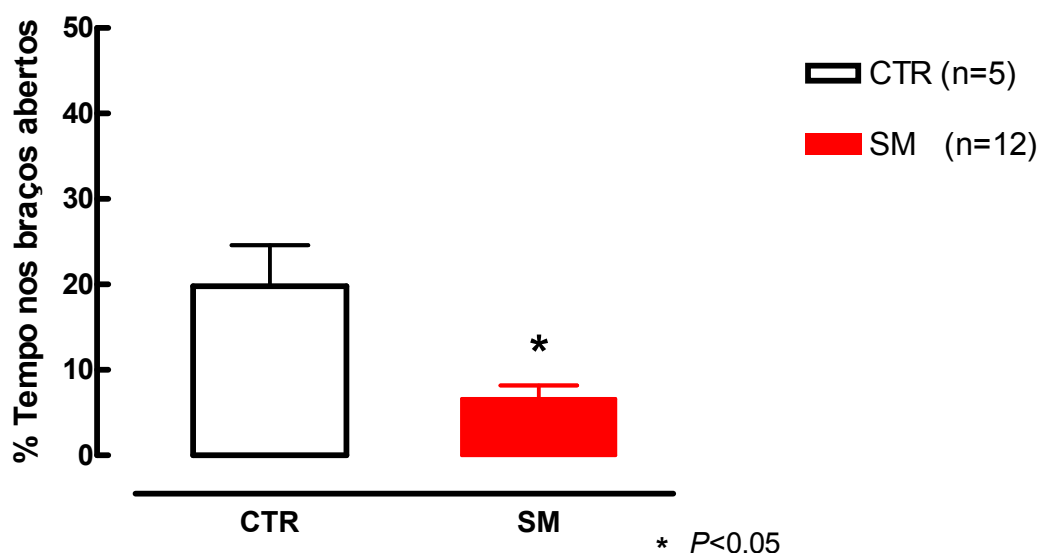


Figura 15.2 – Percentagem de tempo dispendido nos braços abertos do grupo controlo (CTR; $n=5$) e do grupo de separação maternal (SM; $n=12$). Os dois grupos testados apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$). Apesar da diferença de idades entre os animais jovens-adultos e idosos, as diferenças entre o grupo CTR e o SM permanecem no envelhecimento. Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

4.3.3. Labirinto de Morris

A curva de aprendizagem não apresenta diferenças significativas nos ratos idosos entre o grupo CTR e o grupo SM, excepto no 4º dia de treino. No 4º dia de treino o grupo SM apresenta valores ($30,03 \pm 5,0$ s; $n=10$) superiores ao grupo CTR ($19,73 \pm 2,9$ s; $n=6$), o que significa que os ratos controlo levaram em média menos tempo a encontrar a plataforma (Figura 16.1).

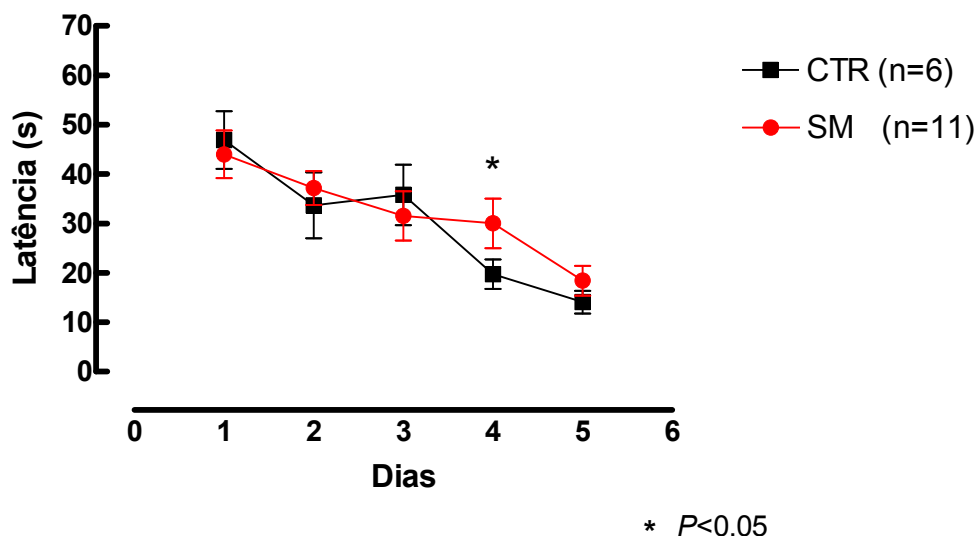


Figura 16.1 – Curva de aprendizagem. Latência, medida em s, do grupo controlo (CTR; n=6) e do grupo de separação maternal (SM; n=11) nos 5 dias de treino do labirinto de Morris, em ratos idosos. Verificam-se diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$) no 4º dia de treino, entre os dois grupos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Na percentagem de tempo de natação tigmotáctica verificam-se diferenças significativas ($P < 0.05$) entre o grupo CTR e o grupo SM, no 4º e no 5º dia de treino. Nestes dois dias em que se verificaram diferenças entre os dois grupos, o grupo SM apresenta sempre valores mais altos de percentagem de tempo de natação tigmotáctica do que o grupo CTR, o que significa que aqueles passaram mais tempo a nadar na periferia da piscina do que os animais controlo. No 4º dia, o grupo SM passou em média $21,6 \pm 5,8$ % (n=10) na periferia da piscina e o grupo CTR $9,1 \pm 3,4$ % (n=7). No 5º dia, o grupo SM passou em média $17,2 \pm 6,3$ % (n=10) na periferia da piscina e o grupo CTR apenas $4,7 \pm 2,9$ % (n=7) (Figura 16.2).

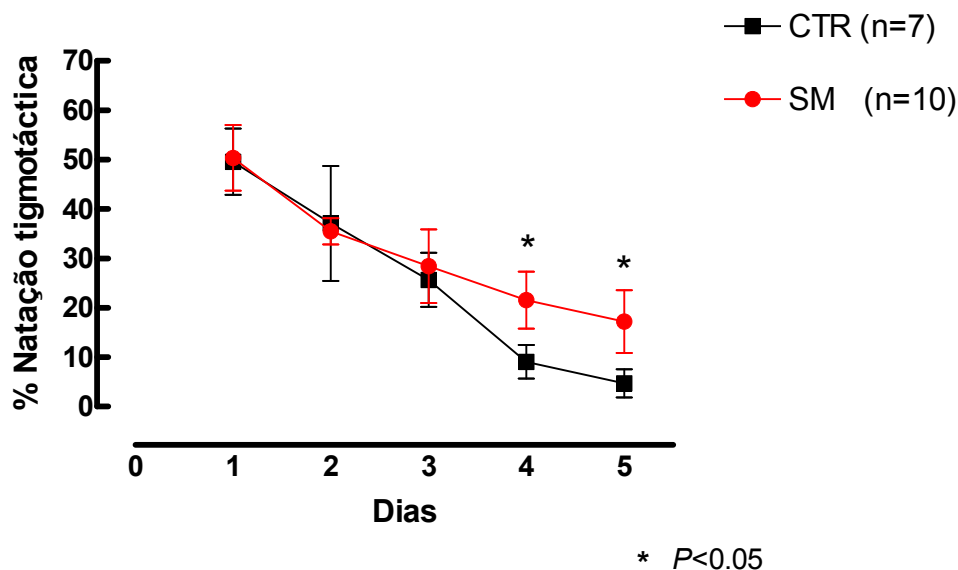


Figura 16.2 – Percentagem de tempo de natação tigmotática do grupo controlo (CTR; n=7) e do grupo de separação maternal (SM; n=10) nos 5 dias de treino do labirinto de Morris, em animais idosos. Existem diferenças no 4º e no 5º dia de treino, entre os dois grupos ($P < 0.05$). Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de tempo dispendido no quadrante da plataforma ao 5º dia de treino apresenta diferenças significativas ($P < 0.05$) entre o grupo CTR e o grupo SM. O grupo CTR ($26,7 \pm 9,1\%$, n=6) passou mais tempo no quadrante da plataforma do que o grupo SM ($25,3 \pm 5,3\%$, n=10). Nos restantes quadrantes da piscina não se verificam diferenças significativas (Figura 16.3).

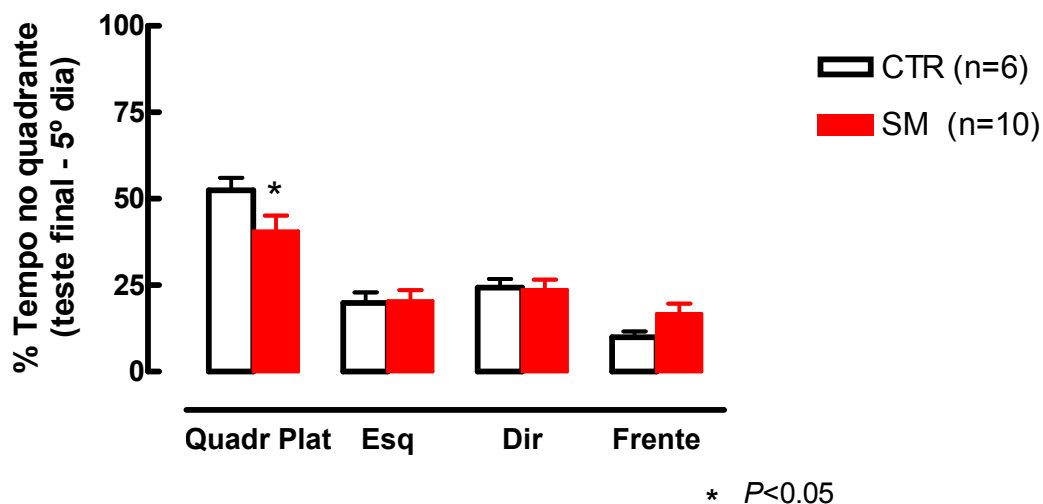


Figura 16.3 – Percentagem de tempo dispendida no quadrante da plataforma no 5º dia de treino - teste final – no grupo controlo (CTR; n=6) e no grupo de separação maternal (SM; n=10), em ratos idosos. As duas colunas da esquerda representam a percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no teste final do 5º dia. As colunas seguintes são do quadrante à esquerda, à direita e em frente, respectivamente, do quadrante correspondente à plataforma. Existem diferenças significativas no quadrante da plataforma ($P < 0.05$). Nos restantes quadrantes não existem diferenças significativas. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

4.4. Efeito da cafeína na separação maternal em ratos jovens-adultos

A cafeína, que é a droga psicoactiva mais consumida, actua como um antagonista dos receptores de adenosina em doses não tóxicas (Fredholm *et al.*, 1999). Alguns dos efeitos mais evidentes da cafeína, tal como os efeitos psicomotores (e.g. Svenningsson *et al.*, 1997) ou os efeitos benéficos em tarefas de memória em ratos (e.g. Prediger *et al.*, 2005), são agora reconhecidos como sendo devido à capacidade da cafeína de antagonizar os receptores A_{2A} da adenosina. O consumo crónico de cafeína parece atenuar o declínio da memória no envelhecimento em humanos (Ritchie *et al.*, 2007) e diminuir o risco de doença de Alzheimer (Maia & de Mendonça, 2002).

Sendo assim, fizemos um pequeno estudo exploratório, para avaliar se a cafeína melhorava o desempenho dos animais sujeitos a separação maternal. Subdividimos os animais jovens-adultos previamente sujeitos a separação maternal (ver secção 4.1) e administrámos cafeína oralmente durante um mês numa dose de 20 mg/Kg/dia a metade destes, cujo comportamento foi depois testado. Obviamente que os resultados a seguir apresentados têm apenas um valor indicativo, já que se reportam a um número limitado de animais.

4.3.1. Campo aberto

A distância percorrida não apresenta diferenças significativas entre os quatro grupos analisados. Os animais que foram sujeitos ao tratamento de cafeína, tanto o grupo CTRc (3837±480,9 cm; n=4) como o grupo SMc (4070±459,4 cm; n=5), apresentam valores semelhantes de distância percorrida, comparativamente com o grupo CTR (3527±259,3 cm; n=8) e o grupo SM (2345±1043 cm; n=3) (Figura 17.1).

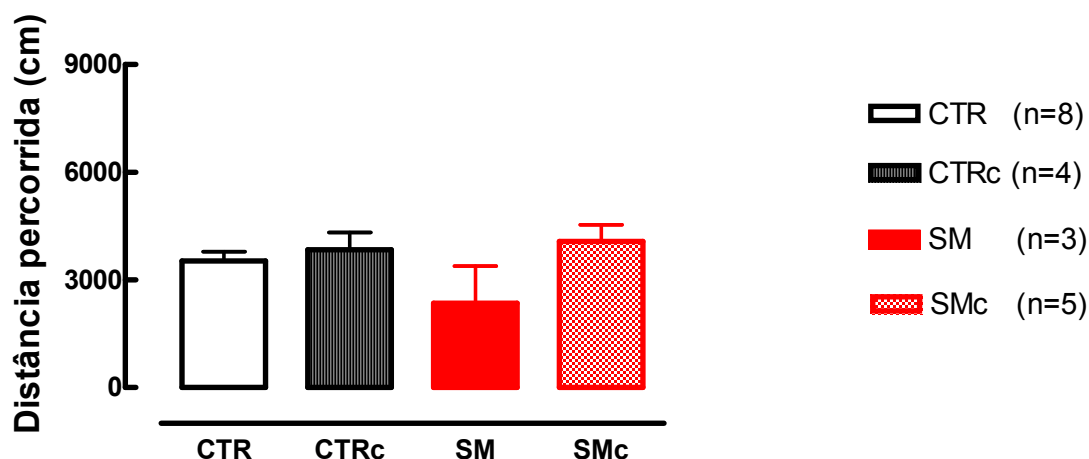


Figura 17.1 - Distância percorrida, medida em cm, pelos ratos do grupo controlo (CTR; n=8), grupo controlo com tratamento de cafeína (CTRc; n=4), grupo de separação maternal (SM; n=3) e grupo de separação maternal com tratamento de cafeína (SMc; n=5), respectivamente, em ratos jovens-adultos. Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

A velocidade média não apresenta diferenças significativas entre os quatro grupos analisados. Os animais que foram sujeitos ao tratamento de cafeína, tanto o grupo CTRc ($12,8 \pm 1,6$ cm/s; n=4) como o grupo SMc ($13,6 \pm 1,5$ cm/s; n=5), apresentam valores semelhantes de velocidade média, comparativamente com o grupo CTR ($11,8 \pm 0,9$ cm/s; n=8) e o grupo SM ($10,9 \pm 0,8$ cm/s; n=3) (Figura 17.2).

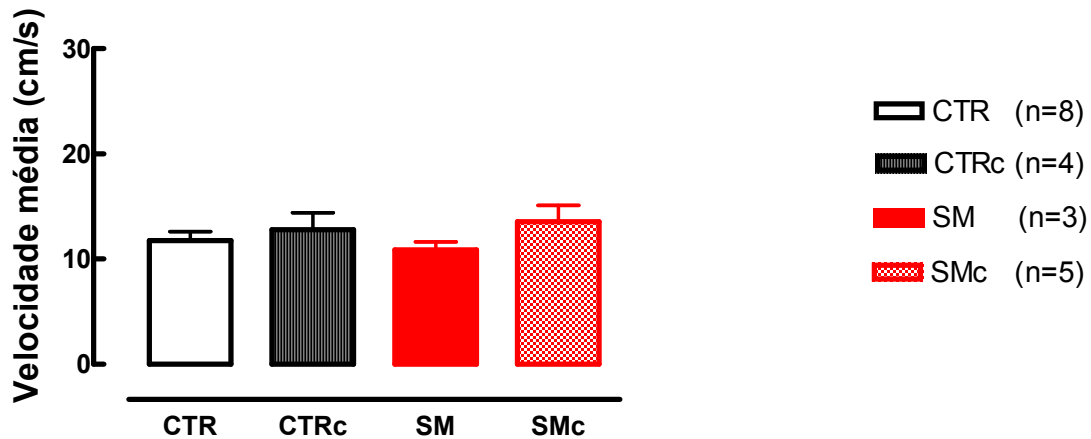
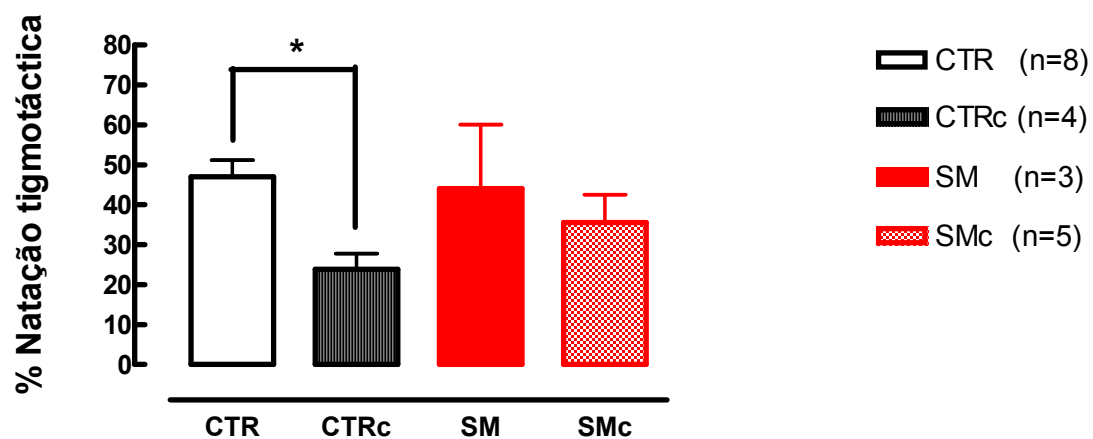


Figura 17.2 - Velocidade média, medida em cm/s, dos ratos do grupo controlo (CTR; n=8), grupo controlo com tratamento de cafeína (CTRc; n=4), grupo de separação maternal (SM; n=3) e grupo de separação maternal com tratamento de cafeína (SMc; n=5), respectivamente, em ratos jovens-adultos. Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de posição tigmotáctica apresenta diferenças significativas entre o grupo CTR e o grupo CTRc ($P < 0.05$). Os restantes grupos analisados não apresentam diferenças estatisticamente significativas. Os animais que foram sujeitos ao tratamento de cafeína, tanto o grupo CTRc ($23,9 \pm 3,9$ %; n=4) como o grupo SMc ($35,6 \pm 7,0$ %; n=5), apresentam valores inferiores de percentagem de posição tigmotáctica, comparativamente com o grupo CTR ($47,0 \pm 4,2$ %; n=8) e o grupo SM ($44,0 \pm 16,1$ %; n=3). Estes resultados revelam que os dois grupos sujeitos ao tratamento de cafeína, CTRc e SMc, passaram menos tempo na periferia da arena do teste do campo aberto, do que os outros dois grupos, CTR e SM.



* $P < 0.05$

Figura 17.3 – Percentagem da posição tigmotáctica nos ratos do grupo controlo (CTR; n=8), grupo controlo com tratamento de cafeína (CTRc; n=4), grupo de separação maternal (SM; n=3) e grupo de separação maternal com tratamento de cafeína (SMc; n=5), respectivamente, em ratos jovens-adultos. Verificam-se diferenças significativas entre o grupo CTR e o grupo CTRc ($P < 0.05$). Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

Quadro 6 – Outros parâmetros de comportamento analisados no decurso do teste do campo aberto, em animais jovens-adultos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média. Verificam-se diferenças significativas no parâmetro *grooming*, entre o grupo CTR e CTRc e o grupo CTRc e o SMc ($P < 0.05$). Os restantes parâmetros analisados não apresentam diferenças estatisticamente significativas. A unidade ocorr/min significa ocorrências por minuto.

Média \pm Erro padrão	CTR (n=8)	CTRc (n=4)	SM (n=3)	SMc (n=5)
<i>Rearing</i>	3,0 \pm 0,4 ocorr/min	2,8 \pm 0,1 ocorr/min	1,9 \pm 0,3 ocorr/min	3,3 \pm 0,7 ocorr/min
<i>Grooming</i>	1,4 \pm 0,1 ocorr/min ($P < 0.05$)	0,7 \pm 0,2 ocorr/min ($P < 0.05$)	0,9 \pm 0,2 ocorr/min	1,5 \pm 0,2 ocorr/min ($P < 0.05$)
<i>Freezing</i>	0,2 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min
<i>Defecação</i>	0,6 \pm 0,2 ocorr/min	0,7 \pm 0,2 ocorr/min	0,2 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min
<i>Urina</i>	0,2 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min	0,1 \pm 0,1 ocorr/min	0,0 \pm 0,0 ocorr/min

4.3.2. Labirinto elevado

O número de entradas totais apresenta valores semelhantes entre os quatro grupos. O grupo CTR (3,4 \pm 1,3; n=8) tem valores semelhantes ao grupo CTRc (5,0 \pm 1,6; n=4). O grupo SM (4,3 \pm 1,8; n=3) apresenta também valores semelhantes ao grupo SMc (3,0 \pm 0,9; n=5) (Figura 18.1).

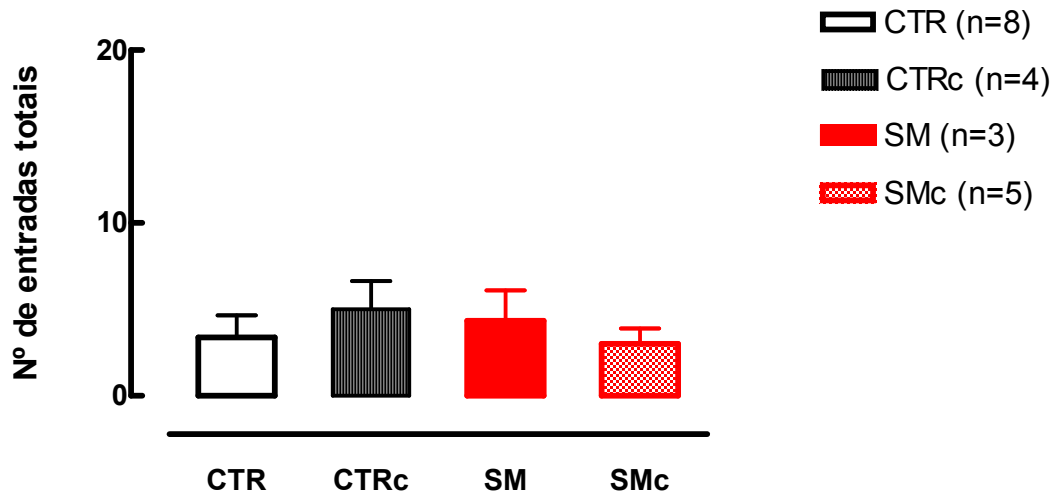


Figura 18.1 – O número total de entradas nos braços do labirinto elevado resulta da soma das entradas nos braços abertos e nos braços fechados e respectivos valores médios \pm padrão da média. Número total de entradas no grupo controlo (CTR; n=8), no grupo controlo sujeito ao tratamento de cafeína (CTRc; n=4), no grupo de separação maternal (SM; n=3) e no grupo de separação maternal sujeito ao tratamento de cafeína (SMc; n=5), respectivamente.

Na percentagem de tempo dispendido nos braços abertos verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo SM e o grupo SMc ($P < 0.05$). O grupo SM ($2,7 \pm 0,6$ %; n=3) passou menos tempo nos braços abertos do labirinto do que o grupo SMc ($9,3 \pm 3,4$ %; n=5). O grupo CTR ($3,9 \pm 1,3$ %; n=8) tem valores inferiores ao grupo CTRc ($10,9 \pm 4,5$ %; n=4), o que significa que aquele passou menos tempo nos braços abertos (Figura 18.2).

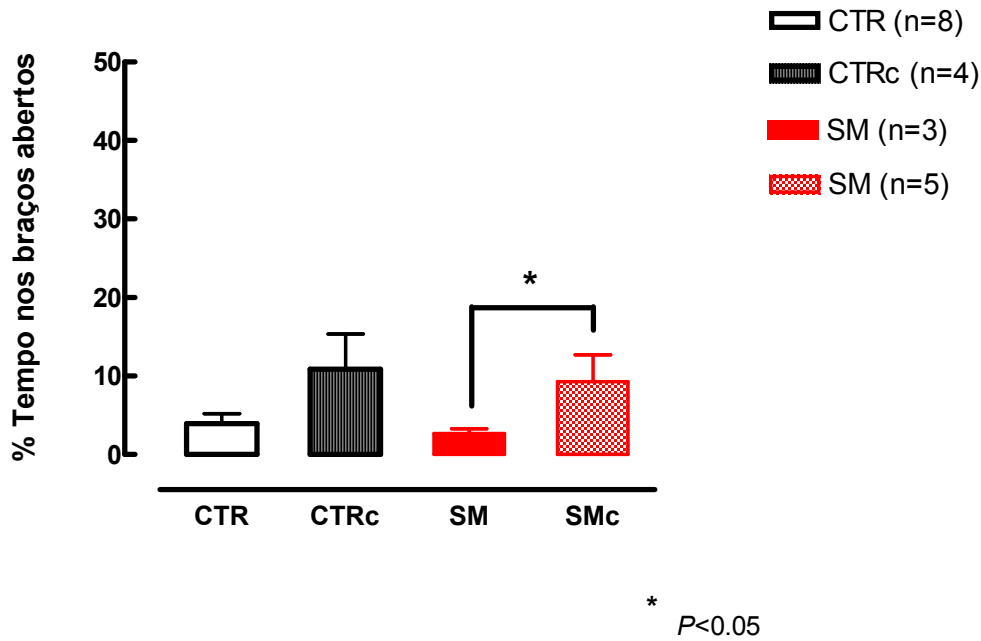


Figura 18.2 – Percentagem de tempo dispendido nos braços abertos no grupo controlo (CTR; n=8), no grupo controlo sujeito ao tratamento de cafeína (CTRc; n=4), no grupo de separação maternal (SM; n=3) e no grupo de separação maternal sujeito ao tratamento de cafeína (SMc; n=5), respectivamente. Verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo SM e o grupo SMc. ($P < 0.05$). Os resultados estão representados como valores médios \pm erro padrão da média.

4.3.3. Labirinto de Morris

Se analisarmos os valores da latência em separado, ou seja, comparando os grupos sem tratamento de cafeína e os grupos com o respectivo tratamento, constatamos que os valores são semelhantes e não se tornaram menores com o aumento de dias de treino, ao contrário dos animais analisados previamente. Nos animais sem cafeína, o grupo SM apresenta valores médios de latência de $12,1 \pm 1,1$ s (n=3), o grupo CTR de $10,4 \pm 1,9$ s (n=3). Nos animais que receberam o tratamento de cafeína, o grupo SMc apresenta valores médios de latência de $11,4 \pm 1,1$ s (n=4), enquanto o grupo CTRc apresenta valores de $10,9 \pm 0,8$ s (n=4). (Figura 19.1).

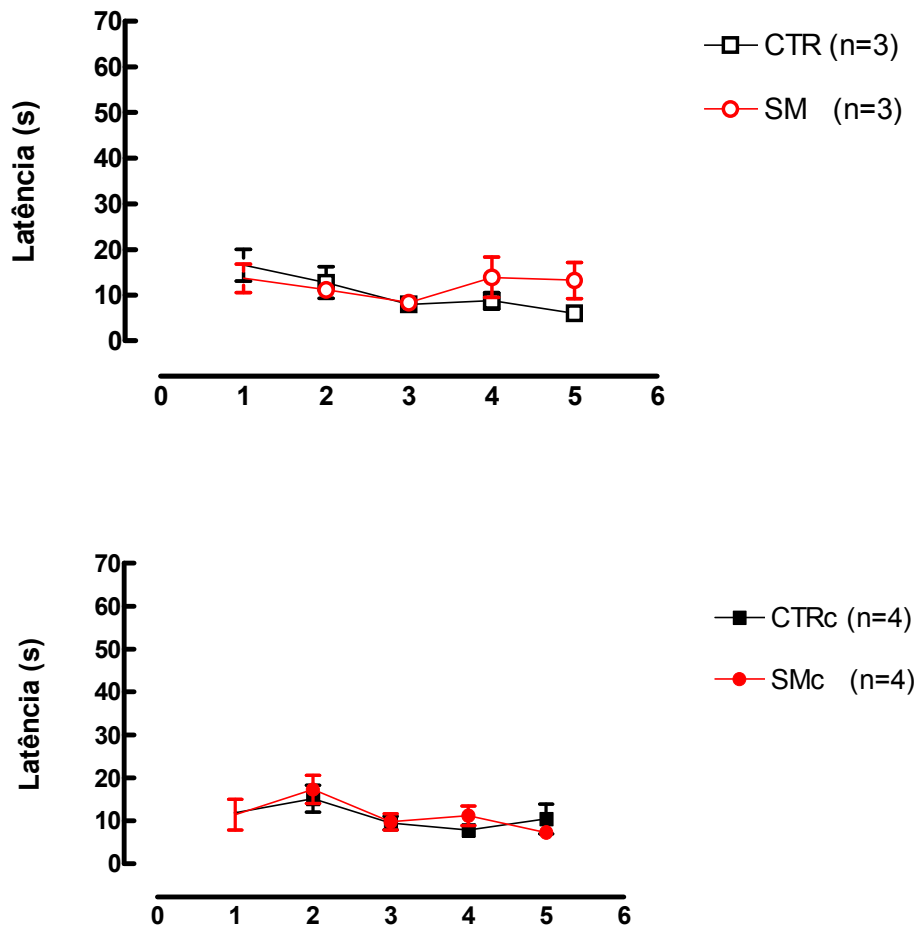


Figura 19.1 – Latência, medida em s, do grupo controlo (CTR; n=3) e do grupo de separação maternal (SM; n=3) nos 5 dias de treino do labirinto de Morris, em ratos jovens-adultos sem tratamento de cafeína, (CTR; n=3) e (SM; n=3), e com tratamento de cafeína, (CT Rc; n=4) e (SMc; n=4), respectivamente, nos 5 dias de treino do labirinto de Morris. Os quatro grupos foram analisados em paralelo, mas para aumentar a clareza de leitura, apresentam-se agrupados dois a dois. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de natação tigmotáctica não apresenta diferenças significativas entre os grupos. O grupo CTR ($3,4 \pm 0,8$ %; n=3) apresenta valores semelhantes ao grupo SM ($2,2 \pm 0,6$ %; n=3). O grupo CT Rc ($5,5 \pm 1,2$ %; n=4) passou aproximadamente o mesmo tempo a nadar na periferia da piscina que o grupo SMc ($6,7 \pm 0,8$ %; n=4) (Figura 19.2).

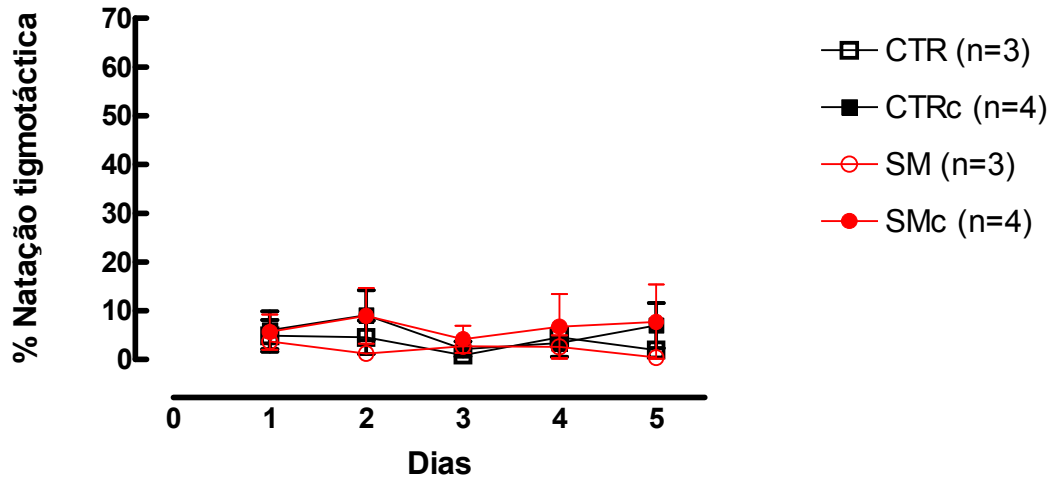


Figura 19.2 – Percentagem de tempo de natação tigmotáctica no grupo controlo (CTR; n=3), no grupo controlo com cafeína (CTRc; n=4), no grupo de separação maternal (SM; n=3) e no grupo de separação maternal com cafeína (SMc; n=4), nos 5 dias de treino do labirinto de Morris, em ratos jovens-adultos. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

A percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no 3º dia, apresentou diferenças significativas entre os grupos analisados. O grupo CTR ($53,6 \pm 19,1$ %; n=4) apresenta valores superiores ao grupo SM ($36,4 \pm 6,2$ %; n=3; $P < 0.05$). O tratamento com cafeína CTRc ($63,6 \pm 15,0$ %; n=4) evidenciou uma ligeira tendência para um aumento em relação ao CTR. Interessante é o facto da cafeína atenuar o efeito da separação maternal, isto é, o grupo SMc ($50,4 \pm 6,3$ %; n=4) apresentou valores semelhantes ao controlo, significativamente mais elevados do que os SM ($P < 0.05$) (Figura 19.3).

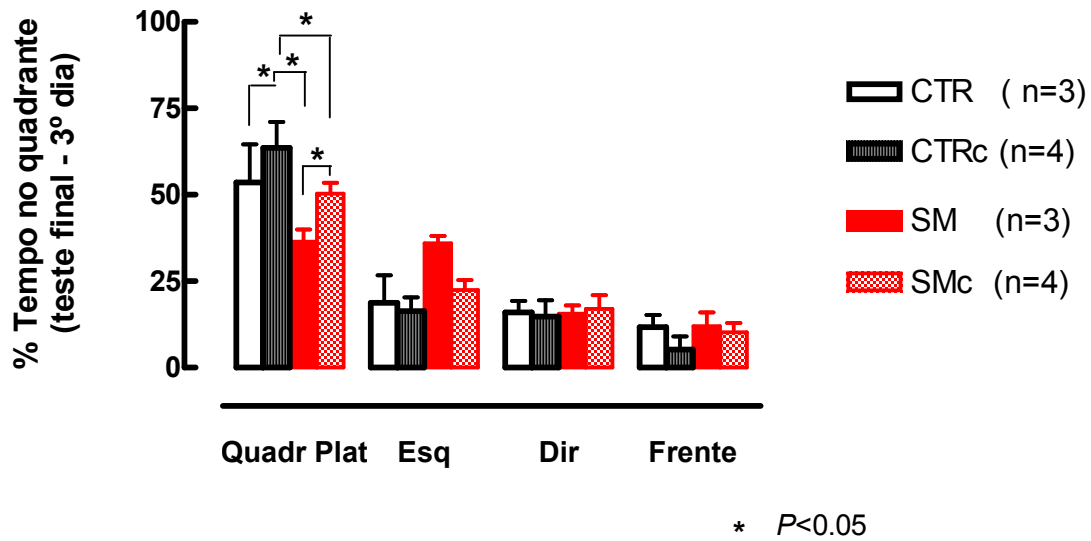


Figura 19.3 – Percentagem de tempo dispendida no quadrante da plataforma no 3º dia de treino - teste final – no grupo controlo (CTR; n=3), no grupo controlo com cafeína (CTRc; n=4), no grupo de separação maternal (SM; n=3) e no grupo de separação maternal com cafeína (SMc; n=4), em ratos jovens-adultos. As quatro colunas da esquerda representam a percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no teste final do 3º dia. As colunas seguintes são do quadrante à esquerda, à direita e em frente, respectivamente, do quadrante correspondente à plataforma. Existem diferenças significativas no quadrante da plataforma entre o grupo CTR e CTRc, entre o grupo SM e SMc, entre o grupo CTR e SM e entre o grupo CTRc e o SMc ($P < 0.05$). Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

Os valores de percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no 5º dia, são semelhantes para os quatro grupos. O grupo CTR ($52,5 \pm 7,5$ %; n=3) apresenta valores semelhantes ao grupo SM ($49,7 \pm 3,7$ %; n=3). Se compararmos os grupos com o tratamento de cafeína, o grupo CTRc ($56,7 \pm 7,3$ %; n=4) e o grupo SMc ($50,5 \pm 11,5$ %; n=4) passaram tempo semelhante no quadrante da plataforma (Figura 19.4).

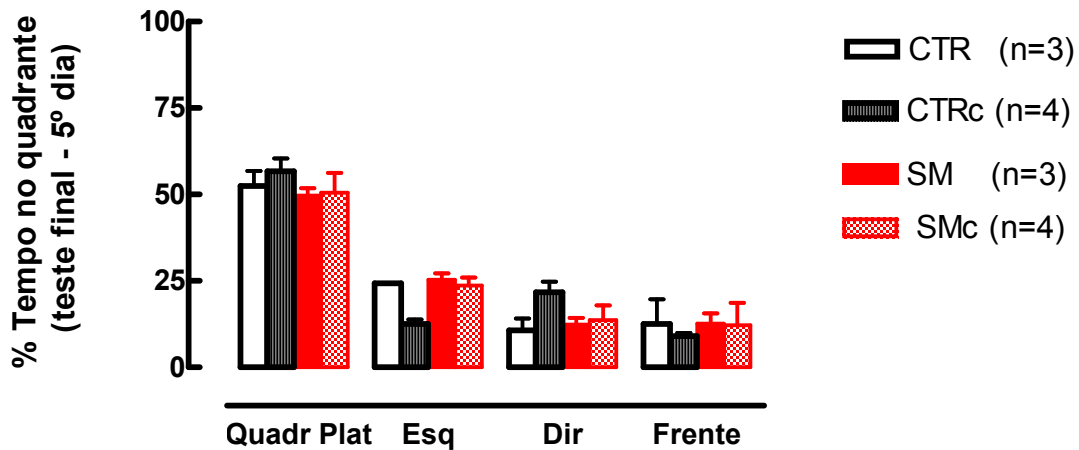


Figura 19.4 – Percentagem de tempo dispendida no quadrante da plataforma no 5º dia de treino - teste final – no grupo controlo (CTR; n=3), no grupo controlo com cafeína (CTRc; n=4), no grupo de separação maternal (SM; n=3) e no grupo de separação maternal com cafeína (SMc; n=4), em ratos jovens-adultos. As quatro colunas da esquerda representam a percentagem de tempo no quadrante da plataforma, no teste final do 3º dia. As colunas seguintes são do quadrante à esquerda, à direita e em frente, respectivamente, do quadrante correspondente à plataforma. Os resultados apresentados são valores médios \pm erro padrão da média.

5. Discussão

O hipocampo, área do cérebro crucial na aprendizagem e memória, é rica em receptores de glucocorticóides, desempenhando assim, um importante papel na regulação negativa do eixo HPA (Jacobson & Sapolsky, 1991). É uma área particularmente susceptível a dano provocado pelos níveis elevados de corticosteróides circulantes. O estudo aqui apresentado analisou o efeito do *stress* neonatal – usando como paradigma a separação maternal – na memória dependente do hipocampo em animais idosos. Utilizaram-se dois grupos de ratos Wistar machos divididos em controlo (CTR) e separação maternal (SM). O grupo SM foi separado da mãe durante 3 horas diárias entre os dias 2-14 pós-natal, enquanto o grupo CTR não foi manipulado. O impacto da separação maternal foi avaliado em testes comportamentais para avaliação de actividade motora e exploração (teste do campo aberto), ansiedade (teste do labirinto elevado) e memória espacial (labirinto de Morris) às 6-8 semanas de vida (jovens-adultos, fase de validação) e posteriormente às 70 semanas (idosos).

Os resultados aqui apresentados revelam que animais sujeitos a separação maternal (SM), um paradigma de *stress* neonatal, manifestam na idade adulta, um comportamento mais ansioso comparativamente a animais controlo: os animais jovens SM permaneceram cerca de metade do tempo total nos braços abertos, relativamente aos animais jovens CTR. Estas diferenças não foram consequência de alterações na actividade motora, já que o número total de entradas não sofreu variações com o *stress*. No protocolo de memória espacial do labirinto de Morris, os animais jovens SM exibiram um desempenho reduzido. Apresentaram uma curva de aprendizagem mais lenta: os animais CTR encontraram a plataforma mais rapidamente que os animais SM, durante os cinco dias de treino e passaram mais tempo no quadrante da plataforma, no teste final, comparativamente aos animais SM.

Efeito da separação maternal em animais idosos

As observações mais relevantes são as obtidas em animais idosos. O impacto da separação maternal induzida nas duas primeiras semanas de vida, não só perdura ao longo da vida no hipocampo, como é ainda observável no envelhecimento. Os animais SM idosos manifestam um comportamento mais ansioso, avaliado usando o labirinto

elevado, teste padrão correntemente utilizado para medir a ansiedade (Pellow *et al.* 1985) do que os respectivos animais CTR. Este efeito não se deve a diferenças na capacidade motora dos animais já que ambos, CTR e SM, apresentam o mesmo número total de entradas no labirinto (ver Figura 15.1). Este controlo motor é crucial, já que possíveis diferenças comprometeriam a subsequente utilização do labirinto de Morris. A ausência de diferenças na locomoção é também reforçada pelo facto da velocidade e distância percorrida no campo aberto (Figuras 14.1 e 14.2), pelos animais idosos, não apresentarem diferenças com a separação maternal. A curva de aprendizagem em idosos no protocolo do labirinto de Morris não sofreu alterações com a indução de *stress*, contudo, o tempo passado na plataforma no teste final foi significativamente reduzido em animais idosos sujeitos a *stress* neonatal. Este teste final é uma medida, não da aprendizagem, mas da capacidade de retenção da localização da plataforma usando as pistas visuais em redor da piscina (Vorhees & Williams, 2006). Os resultados parecem indicar que embora nos animais idosos não se demonstre um impacto na aprendizagem, observado em animais jovens (Figura 12.1), a capacidade de retenção de memória está afectada pela separação maternal. Talvez o facto da curva de aprendizagem já ser mais lenta em idosos do que em jovens controlo (comparar figuras 12.1 e 16.1) encubra um possível efeito do *stress* nesta idade. Sendo que o efeito do envelhecimento não era o objectivo principal deste trabalho, evitámos fazer análises deste tipo. Além disso, ocorreu um espaçamento temporal importante na análise dos dois grupos etários, o que pode comprometer comparações directas. A estratégia seguida pelos animais para encontrar a plataforma foi dependente do hipocampo já que a administração de um antagonista NMDA (Hagan, 1983), meia hora antes das tarefas no labirinto de Morris, bloqueou a aprendizagem e a retenção da memória espacial (Figuras 13.1 e 13.2).

Este estudo é o primeiro que mostra impacto efectivo na função do hipocampo no envelhecimento, como consequência de *stress* induzido numa fase precoce da vida. Estudos prévios focaram-se na idade adulta como ponto culminante da avaliação. Sabe-se que a exposição a glucocorticóides reduz a potenciação de longo-termo (LTP) no hipocampo (McEwen, 1999), um paradigma experimental utilizado para medir a plasticidade sináptica, mecanismo molecular potencialmente subjacente aos fenómenos de aprendizagem e memória (Bliss & Collingridge, 1993). Por outro lado, a expressão do factor neutrófico, BDNF, assim como das subunidades NR-2A e NR-2B dos receptores de glutamato do subtipo NMDA, cruciais no processo de LTP na sinapse CA1 do hipocampo, estão diminuídos no hipocampo usando este paradigma de *stress*

(Roceri *et al.*, 2002). Estas evidências experimentais já anteviam um possível efeito em animais idosos, mas o impacto deste paradigma de *stress* nesta idade avançada (70-80 semanas) não tinha ainda sido explorado. Lehamn e colaboradores (2002) afluíram este aspecto, ao testarem os efeitos da manipulação numa fase precoce da vida, medidos tardiamente. O seu estudo mostra que animais idosos, com um ano e meio de vida, manipulados durante 15 minutos, entre os dias 1-21 pós-natal (PND), encontram a plataforma do labirinto de Morris mais rapidamente do que animais sujeitos a um tipo de separação maternal particular, durante 6H/dia em quatro dias não consecutivos (12, 14, 18 e 21 PND). No entanto, neste estudo, o grupo controlo (não-manipulado) evidenciou um desempenho superior no labirinto de Morris quando comparado com o grupo sujeito a separação maternal, o que é controverso, tendo em conta que os efeitos prejudiciais da separação maternal nesta tarefa já se encontram bem estabelecidos por vários outros autores (Pardon & Rattay, 2008).

Possível mecanismo de acção

A hipótese da cascata de glucocorticóides proposta por Sapolsky e colaboradores (1986) sugere que níveis elevados destes causam perda neuronal no hipocampo e de receptores de glucocorticóides. Uma vez que estes receptores medeiam a retroalimentação negativa dos efeitos dos glucocorticóides, controlando as suas acções, a sua perda tem como consequência um aumento dos níveis dos glucocorticóides. No nosso laboratório, utilizando o mesmo paradigma de separação maternal, já tinha sido demonstrado que estes animais têm os níveis plasmáticos de corticosterona elevados na idade adulta (Lopes *et al.*, 2008), embora não sejam ainda conhecidos os efeitos em animais idosos. Sabe-se que animais idosos sem patologia específica têm níveis elevados de corticosterona no plasma (Landfield *et al.*, 1978), sendo assim, seria importante quantificar estes níveis em animais sujeitos a SM. A hipótese dos glucocorticóides serem os principais responsáveis pelas alterações cognitivas e nomeadamente pela morte neuronal no hipocampo é a mais aceite na comunidade científica (e.g. McEwen, 1999). No entanto, usando métodos de esterologia, mais rigorosos para a contagem celular, não se observam alterações significativas no número de neurónios (Rasmussen *et al.*, 1996). Há contudo evidências que o hipocampo de animais idosos apresenta alterações na homeostase do cálcio, com um aumento da actividade dos canais de cálcio do tipo L (Landfield & Eldridge, 1994). Por outro lado, os glucocorticóides aumentam a actividade dos canais de cálcio (Chameau *et al.*, 2007) e a capacidade de regulação da

expressão dos receptores de glucocorticóides por retroalimentação negativa está comprometida com o envelhecimento. Enquanto em animais jovens, o *stress* crônico induz uma diminuição dos receptores de glucocorticóides, tendo como consequência uma limitação da acção dos glucocorticóides nas células alvo, esta regulação é perdida com a idade, sendo que as acções dos glucocorticóides são mais intensificadas (Kerr *et al.*, 1991). Sendo assim, há um mecanismo natural de regulação da amplitude das acções dos glucocorticóides em animais jovens, que parece ser protector da sua acção nos canais de cálcio. Este mecanismo encontra-se comprometido com o envelhecimento, e as acções excitotóxicas do cálcio ampliadas (McEwen, 1999), o que poderá explicar a pior capacidade de retenção de memória espacial descrita no presente trabalho. Uma das experiências em curso neste momento, no nosso laboratório, é a de avaliar de que modo a LTP e a transmissão sináptica basal estão alteradas nestes animais idosos quando sujeitos a separação maternal, e a quantificação dos níveis de subunidades de receptores de subtipo NMDA, de BDNF e de marcadores de neurogénese no hipocampo, que possamos correlacionar com os resultados comportamentais.

Efeito da cafeína na separação maternal

Os resultados obtidos após administração de cafeína podem indicar um potencial efeito benéfico da sua administração para reverter os efeitos na memória espacial, sobretudo na capacidade de retenção no terceiro dia do protocolo do labirinto de Morris (Figura 19.3). Contudo, o facto da cafeína parecer aumentar este parâmetro já em animais CTR, aconselha a alguma cautela na interpretação dos resultados. Neste trabalho, a administração de cafeína não foi interrompida antes dos testes comportamentais, no intuito de evitar que efeitos de abstinência interferissem nos mesmos. Sendo assim, pode ser difícil distinguir possíveis efeitos agudos da cafeína dos efeitos mais crónicos. Seria útil repetir a mesma administração durante um mês, e interrompê-la durante um intervalo de segurança até não haver sintomas de abstinência, e só nessa altura testar os animais. De qualquer modo, é importante salientar que todos os resultados apresentados com tratamento com cafeína são apenas indicativos, uma vez que o número reduzido de animais compromete qualquer análise estatística fidedigna. Outra observação curiosa é a de que a latência no labirinto de Morris destes animais já era bastante baixa desde o início do treino, provavelmente consequência da exposição prévia ao teste e a uma estratégia já mais consolidada, muito embora a localização da plataforma fosse

diferente. Isto é corroborado por estudos recentes que descrevem diferenças no comportamento quando os roedores são expostos aos testes em mais do que uma ocasião (Walf *et al.*, 2007), sendo no entanto possível testar os roedores mais do que uma vez, se houver um período de três semanas entre os testes, o que tivemos o cuidado de fazer neste trabalho.

Conclusão

O *stress* induzido numa fase neonatal, em ratos, induz um comportamento mais ansioso e um desempenho inferior no labirinto de Morris na idade adulta. A separação maternal tem um impacto duradouro na memória espacial, sendo observável mesmo em animais com 70 semanas de idade. Estes exibem um comportamento mais ansioso e défices na memória dependente do hipocampo. O mecanismo de acção responsável por estes efeitos não foi explorado no âmbito deste trabalho e merece uma análise mais detalhada. Estes resultados sugerem que a exposição a *stress* numa fase precoce da vida poderá contribuir e exacerbar os défices na função cognitiva característicos do envelhecimento.

Agradecimentos:

Antes de mais, gostaria de agradecer aos meus pais e à minha irmã que sempre me apoiaram e continuam a incentivar-me no meu percurso. À minha família pela preocupação e interesse. Ao Rui, por todo o apoio e carinho.

Aos meus queridos amigos da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, nomeadamente à Di, à Ginja, à Sónia, à J.B., à Leonor, à Beatriz, ao Garcia e ao Carraça e a todos os outros que a falta de espaço não me deixa mencionar. A eles o meu agradecimento e amizade pelos anos de partilha, companheirismo e força.

Aos meus queridos amigos do Pavilhão do Conhecimento e do Laboratório de Neurociências pela amizade e boa disposição.

Às minhas colegas de mestrado, Rosa e Carina.

À Luísa pelo apoio, motivação e rigor em todo o trabalho efectuado durante o mestrado. Pela enorme capacidade de acolher e conter todas as minhas angústias. Pela sua disponibilidade permanente e entusiasmo contagiante pela ciência.

Ao Professor Alexandre Ribeiro pela oportunidade concedida de um mestrado cativante e enriquecedor.

À Alexandra, ao Sr. João Baião, à Elvira e à Cristina pelo apoio técnico e pela simpatia.

Bibliografia:

- Aisa, B.; Tordera, R.; Lasheras, B.; Del Río, J. & Ramírez, M.J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, **32**, 256-266.
- Bakshi, V. & Kalin, H. (2000). Corticotropin-Releasing Hormone and Animal Models of Anxiety: Gene-Environment Interactions. *Bioll Psychiatry*, **48**, 1175-1198.
- Belanoff, J.K.; Gross, K.; Yager, A. & Schatzberg, A.F. (2001).; Corticosteroids and cognition. *J Psychiatr Res.*, **35**, 127-45.
- Belzung, C. (1999). Measuring rodent exploratory behavior. Em Crusio, W, E., & Gerlai, R.T. (eds.), *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*, Elsevier, Amsterdam, pp. 738-749. Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31-9.
- Bronikowski, A.; Carter, P.; Swallow, J.; Girard, I.; Rhodes, J. & Garland, T. (2001). Open-Field Behavior of House Mice Selectively Bred for High Voluntary Wheel-Running. *Behavior Genetics*, **31**, 309-316.
- Caldji, C.; Diorio, J. & Meaney, M.J. (2000). Variations in Maternal Care in Infancy Regulate the Development of Stress Reactivity. *Society of Biological Psychiatry*, **48**, 1164-1174.
- Carobrez, A.P. & Bertoglio, L.J. (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.*, **29**, 1193-205.
- Chameau P., Qin Y., Spijker S., Smit G. & Joëls, M. (2007). Glucocorticoids specifically enhance L-type calcium current amplitude and affect calcium channel subunit expression in the mouse hippocampus. *J Neurophysiol.*, **1**, 5-14.
- Crawley, J.N. & Paylor, R. (1997). A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav.*, **3**, 197-211.
- Cunha, G.M:A.; Canas, P.M.; Melo, C.S.; Hockemeyer, J.; Muller, C.E.; Oliveira, C.R. & Cunha, R.A. (2007). Adenosine A_{2A} receptor blockade prevents memory dysfunction caused by B-amyloid peptides but not by scopolamine or MK-801. *Experimental Neurology*, **210**, 776-781.

- Dall'Igna, O.P.; Fett, P.; Gomes, M.W.; Souza, D.O.; Cunha, R.A. & Lara, D.R. (2006). Caffeine and adenosine A_{2a} receptor antagonists prevent B-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Experimental Neurology*, **203**, 241-245.
- Daniels, W.; Pietersen, C.; Carstens, M. & Stein, D. (2003). Maternal Separation in Rats Leads to Anxiety-Like Behavior and a Blunted ACTH Response and Altered Neurotransmitter Levels in Response to a Subsequent *Stressor*. *Metabolic Brain Disease*, **19**, 3-14.
- Dawson, G.R. & Tricklebank, M.D. (1995). Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol Sci.*, **16**, 33-6.
- de Quervain, D.J.; Roozendaal, B. & McGaugh, J.L. (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, **394**, 787-90.
- D'Hooge, R. & De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev.*, **36**, 60-90.
- Dudek, S.M. & Bear, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **89**, 4363-7.
- Eichenbaum, H.; Stewart, C. & Morris, R.G. (1990). Hippocampal representation in place learning. *J Neurosci.*, **10**, 3531-42.
- Estanislau, C. & Morato, S. (2005). Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behavioural Brain Research*, **163**, 70-77.
- Faure, J.; Uys, J.; Marais, L.; Stein, D. & Daniels, W. (2007). Early maternal separation alters the response to traumatization: resulting in increased levels of hippocampal neurotrophic factors. *Metab Brain Dis*, 17468977 / DOI 10.1007/s11011-007-9048-3.
- Fredholm, B.B.; Bättig, K.; Holmén, J.; Nehlig, A. & Zwartau, E.E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.*, **51**, 83-133.
- Hagan, J.J.; Alpert, J.E.; Morris, R.G. & Iversen, S.D. (1983). The effects of central catecholamine depletions on spatial learning in rats. *Behav Brain Res.*, **9**, 83-104.

- Handley, S.L. & Mithani, S. (1984). Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear' – motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **1**, 1-5.
- Handley, S.L. & Mithani, S. (1984). Effects of α -adrenoreceptor agonists and anatagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behavior. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.*, **327**, 1-5.
- Heim, C. & Nemeroff, C.B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders preclinical studies. *Biol Psychiatry.*, **49**, 1023-39.
- Heim, C.; Owens, M.J.; Plotsky, P.M. & Nemeroff, C.B. (1997). Persistent changes in corticotrophin-releasing factor systems due to early life stress: relationship to the pathophysiology of major depression and post-traumatic stress disorder. *Psychopharmacol Bull.*, **33**, 185-92.
- Huot, R.L.; Plotsky, P.M.; Lenox, R.H. & McNamara, R.K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.*, **950**, 52-63.
- Jacobson L, Sapolsky R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev.*, **12**, 118-34.
- Kalueff, A.V. & Tuohimaa, P. (2004). Experimental modeling of anxiety and depression. *Acta Neurobiol Exp (Wars).*, **64**, 439-48.
- Kaplan, N.M. (1992). Anxiety disorders and hyperventilation. *Arch Intern Med.*, **152**, 413.
- Kerr, S.M.; Johnston, L.H.; Odell, M.; Duncan, S.A.; Law, K.M. & Smith, G.L. (1991). Vaccinia DNA ligase complements *Saccharomyces cerevisiae* cdc9, localizes in cytoplasmic factories and affects virulence and virus sensitivity to DNA damaging agents. *EMBO J.*, **10**, 4343-50.
- Kim, J.J. & Diamond, D.M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci.*, **3**, 453-62.
- Kim, J.J.; Foy, M.R. & Thompson, R.F. (1996). Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **93**, 4750-4753.

- Ladd, C.O.; Huot, R.L.; Thirivikraman, K.V.; Nemeroff, C.B.; Meaney, M.J. & Plotsky, P.M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res*, **122**, 81-103.
- Ladd, C.O.; Huot, R.L.; Thirivikraman, K.V.; Nemeroff, C.B.; Meaney, M.J. & Plotsky, P.M. (2000). Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. Em: Progress in brain research: the biological basis for mind body interactions. Elsevier, Amsterdam.
- Lamprea, M.R.; Cardenas, F.P.; Setem, J. & Morato S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **41**, 135-140.
- Landfield, P.W. & Eldridge, J.C. (1994). Evolving aspects of the glucocorticoid hypothesis of brain aging: hormonal modulation of neuronal calcium homeostasis. *Neurobiol Aging*. **15**, 579-88.
- Landfield, P.W.; Waymire, J.C. & Lynch, G. (1978). Hippocampal aging and adrenocorticoids: quantitative correlations. *Science*, **202**, 1098-102.
- Lehmann, J.; Pryce, C.R.; Jongen-Relo, A.L.; Stohr, T.; Pothuizen, H.H. & Feldon, J. (2002). Comparison of maternal separation and early handling in terms of their neurobehavioral effects in aged rats. *Neurobiol. Aging.*, **23**, 457-466.
- Logue, S.F.; Paylor, R. & Wehner, J.M. (1997). Hippocampal lesions cause learning in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci.*, **111**, 104-13.
- Lopes, L.V.; Fontinha, B.M.; Costenla, A.R.; Sousa, V. & Sebastião, A.M. (2008). Adenosine A2A receptors and chronic *stress* in the hippocampus of the rat. *Purinergic signalling*, **4**, S42.
- Maia, L. & de Mendonça, A. (2002). Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? *Eur J Neurol.*, **9**, 377-82.
- Markel, A.L.; Galaktionov, YuK. & Efimov, V.M. (1989). Factor analysis of rat behavior in na open field test. *Neurosci Behav Physiol.*, **19**, 279-86.
- McEwen, B. (1999). *Stress* and the Aging Hippocampus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **20**, 49-70.
- McEwen, B.; Leon, M.; Lupien, S. & Meaney, M. (1999). Corticosteroids, the Aging Brain and Cognition. *Elsevier Science*, **10**, 92-96.

- McEwen, B.S.; De Kloet, E.R. & Rostene, W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev.*, **66**, 1121-88.
- McKinney, W.T. (1984). Animals models of depression: an overview. *Psychiatr Dev.*, **2**, 77-96.
- Mechiel, K.S. & De Boer, S.F. (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behavior in the elevated plus maze. *Eur. J. Pharmacol.*, **463**, 163-175
- Montgomery, K.C. (1958). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **48**, 254-260.
- Morris, R.G.; Garrud, P.; Rawlins, J.N. & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature.*, **297**, 681- 683.
- Morris, R.G.M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues, *Learn. Motiv.*, **12**, 239-260.
- Morris, R.G.M.; Hagan, J.J. & Rawlins, J.N.P. (1986). Allocentric spatial learning by hippocampectomized rats: A further test of the 'spatial mapping' and 'working memory' theories of hippocampal function. *Quart. J. Exp. Psychol.*, **38B**, 365-395.
- Pardon, M. & Rattay, I. (2008). What do we know about the long-term consequences of *stress* on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **32**, 1103-1120.
- Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E. & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* **14**, 149–167.
- Poo, MM. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Rev Neurosci*, **2**, 24-32.
- Rapp, P.R. & Gallagher, M. (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 9926-30.
- Rasmussen, T.; Schliemann, T.; Sørensen, J.C.; Zimmer, J. & West, M.J. (1996). Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol Aging.*, **17**, 143-7.

- Ritchie, K.; Carrière, I.; Portet, F.; de Mendonça, A.; Dartigues, J.F.; Rouaud, O.; Barberger-Gateau, P. & Ancelin, M.L. (2007). The neuro-protective effects of caffeine: a prospective population study (the Three City Study). *Neurology.*, **69**, 536-545.
- Roceri, M.; Hendriks, W; Racagni, G.; Ellenbroek, BA. & Riva, MA. (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry*, **7**, 609-16.
- Sapolsky, R.M.; Krey, L.C. & McEwen, B.S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev.*, **7**, 284-301.
- Svenningsson, P.; Nomikos, G.G.; Fredholm, B.B. (1997). Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience.*, **79**, 753-764.
- Tremml, P.; Lipp, H.P.; Müller, U.; Ricceri, L. & Wolfer, D.P. (1998). Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Behav Brain Res.*, **95**, 65-76.
- Vales, K.; Bubenikova-Valesova, V.; Klement, D. & Stuchlik, A. (2006). Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neuroscience Research*, **55**, 383-388.
- van Gaalen, M.M. & Steckler, T. (2000). Behavioural analysis of four mouse strains in na anxiety battery. *Behav Brain Res.*, **115**, 95-106.
- Vorhees, C.V. & Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols.*, **1**, 848-854.
- Wahlsten, D.; Metten, P.; Phillips, T.J.; Boehm, S.L. 2nd; Burkhart-Kasch, S.; Dorow, J.; Doerksen, S.; Downing, C.; Fogarty, J.; Rodd-Henricks, K.; Hen, R.; McKinnon, C.S.; Merrill, C.M.; Nolte, C.; Schalomon, M.; Schlumbohm, J.P.; Sibert, J.R.; Wenger, C.D.; Dudek, B.C. & Crabbe, J.C. (2003). Different dat

- from different Labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol.*, **54**, 283-311.
- Walf, A.A. & Frye, C.A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols*, **2**, 322-328.
 - Wenk, G.L. (1998). Assessment of spatial memory using radial arm and Morris water mazes, em: J. Crawley, C. Gerfen, R. McKay, M. Rogawski, D. Sibley, P. Skolnick (Eds.), *Current Protocols in Neuroscience*, Wiley, New York.
 - Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10 year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl.)*, **134**, 319-29.
 - Yang, J.; Han, H.; Cao, J.; Li, L. & Xu L. (2006). Prenatal Stress Modifies Hippocampal Synaptic Plasticity and Spatial Learning in Young Rat Offspring. *Hippocampus*, **16**, 431-436.