

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

Ana Paula Crestani

**PRECISÃO E SUSCETIBILIDADE DA MEMÓRIA
A INCORPORAÇÃO DE INFORMAÇÕES
EM DIFERENTES IDADES**

Porto Alegre, 2011

Ana Paula Crestani

**PRECISÃO E SUSCETIBILIDADE DA MEMÓRIA
A INCORPORAÇÃO DE INFORMAÇÕES
EM DIFERENTES IDADES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Co-orientador: Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre, 2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o incentivo e por me fazerem acreditar que os sonhos podem se tornar realidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt, por ser um grande instigador na busca pelo conhecimento.

Ao meu co-orientador, Dr. Lucas de Oliveira Alvares, por toda a ajuda e atenção dedicada.

Aos colegas do LPBNC, com os quais aprendi e cresci muito.

À Dona Zelma, por toda a atenção e carinho que sempre dedica à nós e aos ratinhos.

Aos grandes amigos que fiz aqui, que me proporcionaram grandes momentos e com os quais compartilho muitos desejos e inquietações.

Nem todo refinamento humano...jamais será capaz de produzir um invento mais belo, mais simples ou mais exato do que a natureza.

Leonardo da Vinci

Não só a vida neste planeta é abundante, e profundamente satisfatória, para todos aqueles que os sentidos não foram embotados pela familiaridade, mas o próprio fato de que evoluiu em nós a capacidade cerebral de compreender a nossa gênese evolutiva redobra o deslumbramento e intensifica a satisfação.

Richard Dawkins

RESUMO

Memórias são adquiridas e requerem um processo de estabilização (consolidação) para posterior armazenamento. Uma memória já consolidada pode ser novamente desestabilizada quando evocada/reactivada. Dependendo de algumas variáveis da reativação podemos fazer com que a memória original seja mantida/fortalecida ou modificada, através da incorporação de novas informações. Com o passar do tempo as memórias podem deixar de depender do hipocampo para sua evocação, perdendo seu detalhamento, tornando-se mais genéricas; esse processo coincide muitas vezes com sua relocação definitiva em regiões neocorticais e esta migração é chamada de “Consolidação Sistêmica”.

Ao longo do desenvolvimento e posterior envelhecimento são encontradas várias diferenças (anatômicas, fisiológicas, moleculares, etc), por esse motivo resolvemos analisar as diferenças da memória, quanto a sua precisão e suscetibilidade à incorporação de informações em animais de diferentes idades.

A observação principal foi que os ratos adolescentes generalizam mais rapidamente do que animais adultos, e o mesmo parece acontecer com os animais de meia- idade e idosos. Uma possível explicação seria que na adolescência a circuitaria encefálica ainda não está totalmente estabilizada. Já nos animais de meia-idade e nos velhos a memória pode ser menos específica devido aos déficits cognitivos observados com o avanço da idade.

Palavras-chave: memória, precisão, reativação, incorporação de informações, idade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	página 10
1.1. Definição de memória	página 10
1.2. Classificação das memórias.....	página 11
1.3. Estruturas relacionadas à formação de memória	página 13
1.4. Esquecimento	página 14
1.5. Amnésias	página 14
1.6. Consolidação x reconsolidação	página 15
1.7. Precisão x generalização.....	página 15
1.8. Idade e memória	página 16
1.8.1. Desenvolvimento encefálico durante a adolescência	página 16
1.8.2. Alterações encefálicas durante o envelhecimento	página 18
2. JUSTIFICATIVA	página 20
3. OBJETIVOS GERAIS	página 21
3.1. Objetivos específicos.....	página 21
4. METODOLOGIA.....	página 22
4.1. Animais.....	página 22
4.2. Procedimentos comportamentais.....	página 22
4.3. Grupos experimentais.....	página 26
4.4. Escolha das idades	página 27
4.5. Aparatos que serão utilizados nos experimentos.....	página 28
5. RESULTADOS	página 29
6. DISCUSSÃO	página 38
7. CONCLUSÕES	página 41
8. PERSPECTIVAS	página 43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fases da memória..... página 11
- Figura 2. Memória de curta e de longa duração página 12
- Figura 3. Desenho esquemático do encéfalo humano representando algumas áreas importantes para formação de memórias..... página 14
- Figura 4. Estado ativo e Inativo da memória..... página 15
- Figura 5. Curva de dependência hipocampal da memória contextual..... página 15
- Figura 6. Curva de perda da precisão com o passar do tempo após a aquisição de uma memória contextual página 16
- Figura 7. Protocolo de precisão da memória página 24
- Figura 8. Protocolo de Incorporação de Informações..... Página 25
- Figura 9. Comparação de faixas etárias entre ratos e humanos..... página 27
- Figura 10. Correlação peso x idade em ratos de diferentes idades..... página 27
- Figura 11 - Tarefa de campo aberto com rato na posição típica de exploração página 28
- Figura 12 – Caixa de condicionamento aversivo com rato na posição típica de congelamento página 28
- Figura 13 – Caixa experiemetal de transição claro-escuro..... página 28
- Figura 14. Precisão da memória em ratos de 47-49 dias (adolescentes) 2, 5 e 14 dias após o treino..... página 30

Figura 15. Precisão da memória em ratos de 80-90 dias (adultos) 2 e 28 dias após o treino	página 31
Figura 16. Precisão da memória em ratos com ~360 dias (meia-idade) 2 dias após o treino	página 32
Figura 17. Incorporação de informações em ratos de 47-49 dias (adolescentes).....	página 33
Figura 18. Incorporação de informações em ratos de 80-90 dias (meia-idade)	página 34
Figura 19. Incorporação de informações em ratos com idade superior a 700 dias (velhos)	página 35
Figura 20. Controle Motor observado na tarefa de Campo Aberto.....	página 36
Figura 21. Controle de Ansiedade observado na Tarefa de Transição Claro-Escuro	página 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	página 26
----------------	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mPFC – córtex medial pré-frontal

LTP – long term potencial - potenciação de longa duração

LTD – long term depression – potenciação de curta duração

CA1 – corno de Amon subregião 1

HPA – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

GABA – gama amino butiric acid – ácido gama amino butirico

mRNA – messenger ribonucleic acid – ácido ribonucleico mensageiro

NGF – neural grown factor – fator de crescimento neural

P acompanhado de alguma numeração (ex: P46) – data pós-natal

CAC – condicionamento aversivo contextual

1. INTRODUÇÃO

Dentre todas as funções exercidas pelo encéfalo a mais deslumbrante é a capacidade de reter informações. E graças à essa capacidade, e as informações genótípicas, que podemos nos considerar indivíduos únicos. É a memória que garante nossa individualidade e personalidade, é através dela que cada experiência modifica de alguma forma nosso comportamento, de maneira que nossas decisões sempre são influenciadas pelos acontecimentos anteriores.

1.1. Definição de memória

Não há tempo sem um conceito de memória; não há presente sem um conceito do tempo; não há realidade sem memória e sem uma noção de presente, passado e futuro. Memórias são as ruínas de Roma e as ruínas de nosso passado; memória temos nós, o sistema imunológico, um computador. Memória é nosso senso histórico e nosso senso de identidade pessoal. Há algo em comum entre todas essas memórias: a conservação do passado através de imagens ou representações que podem ser evocadas. Representações, mas não realidades. Quando se diz a palavra memória, a primeira coisa que salta à evocação não é a memória dos discos ou dos computadores; é a memória das experiências individuais dos homens e dos animais, aquela que de alguma maneira se armazena no encéfalo. Desde um ponto de vista prático, a memória dos homens e dos animais é o armazenamento e evocação de informação adquirida através de experiências; a aquisição de memórias denomina-se aprendizado. Como disse Aristóteles, 2.000 anos atrás: "Nada há nada no intelecto que não tenha estado antes nos sentidos". Não inventamos memórias. As memórias são fruto do que alguma vez percebemos ou sentimos.

O aprendizado e a memória são propriedades básicas do sistema nervoso; não existe atividade nervosa que não inclua ou não seja afetada de alguma forma pelo aprendizado e pela memória. Aprendemos a caminhar, estudar, fazer atos-motores ou ideativos simples e complexos, etc.; e nossa vida depende de que nos lembremos de tudo isso. (IZQUIERDO, 1998).

Então, pode-se definir memória como a capacidade de armazenar informações adquiridas através de experiências.

1.2. Classificação das Memórias

Devido a complexidade e a dificuldade de interpretar os fenômenos mnemônicos, costuma-se dividir a memória em fases, e classificá-la de acordo com o tempo que duram e de acordo com seu conteúdo.

As duas grandes fases são: *formação* e *evocação*, podendo ser subdivididas (Fig. 1):

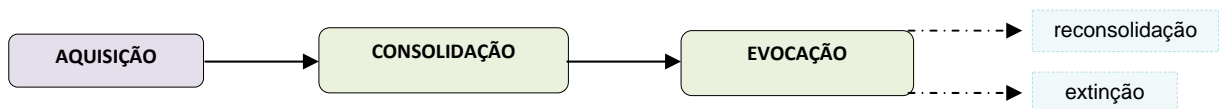


Figura 1. Fases da memória.

A formação da memória incluiria: a *aquisição*, período que se dá durante a exposição à experiência; e a *consolidação*, período em que a memória encontra-se relativamente instável e, portanto, sujeita à modificações.

A evocação corresponde ao processo que nos permite avaliar a memória; nos animais ela é observada de duas maneiras: pela supressão de um comportamento inato (como deixar de explorar um ambiente devido a um estímulo encontrado nesse ambiente – demonstrando resposta comportamental de medo [congelamento]) ou aquisição de um comportamento não natural (como acionar uma alavanca diversas vezes mediante estímulos apetitivos); no homem pode se estender ao reconhecimento de locais, palavras, pessoas, etc. Durante a evocação dois processos antagônicos podem ocorrer: a *reconsolidação* e a *extinção*. Com a reconsolidação a memória se torna lábil novamente e pode ser fortalecida ou alterada. Já com a extinção, uma nova memória (com significado distinto) é formada e se sobrepõem à primeira.

1.2.1. Quanto a duração, as memórias podem ser classificadas em: Memória De Curta Duração, Memória de Longa Duração e Memória Remota

As memórias também podem ser classificadas pelo tempo que duram (Fig. 2). Com excessão da memória de trabalho, as memórias explícitas podem durar algumas horas, dias ou meses, ou ainda muitas décadas.

A memória de curta duração, é aquela que dura entre uma e seis horas, justamente o tempo necessário para que as memórias de longa duração se consolidem. A memória de curta

duração requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos.

As memórias de longa duração levam um tempo para serem consolidadas. Nas primeiras horas são lábeis e suscetíveis à interferências, sendo que após uma janela temporal de cerca de seis horas elas se estabilizam, se consolidam.

Por último, as memórias de longa duração, que duram muitos meses ou anos, costumam ser denominadas memórias remotas.

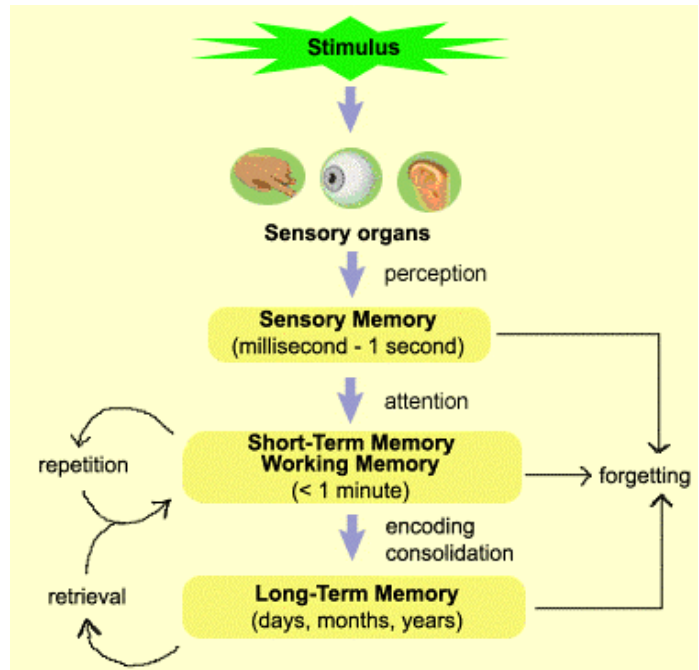


Figura 2 – Memória de curta e longa duração

1.2.2. Com base no conteúdo, as Memórias de Longa Duração se dividem em memórias declarativas e implícitas.

As memórias adquiridas sem a percepção do processo denominam-se implícitas (andar de bicicleta; algumas memórias semânticas, como a língua materna). As memórias adquiridas com plena intervenção da consciência se chamam explícitas ou declarativas.

Dentre as implícitas, denominam-se memórias procedurais ou de procedimentos as memórias de capacidades ou de habilidades motoras e sensoriais, é o que comumente chamamos de hábitos.

As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimento se chamam declarativas, porque nós, seres humanos, podemos declarar que existem e podemos relatar como as adquirimos. Entre elas, as referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos denominam-se episódicas ou autobiográficas; as de conhecimento gerais, semânticas.

1.3. Estruturas relacionadas à formação de memórias

A variedade de memórias possíveis é tão grande, que é evidente que a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações é inerente a muitas áreas ou subsistemas cerebrais, e não é função exclusiva de nenhuma delas. Há, não obstante, certas estruturas e vias (Fig. 3) -

o hipocampo, a amígdala, e suas conexões com o hipotálamo e o tálamo - que regulam a gravação e evocação de todas, de muitas, ou pelo menos da maioria das memórias. Este conjunto de estruturas constitui um sistema modulador que influi na decisão, pelo sistema nervoso, ante cada experiência, de que deve ser gravado e de que deve ou pode ser evocado. O hipocampo e a amígdala estão interligados entre si e recebem

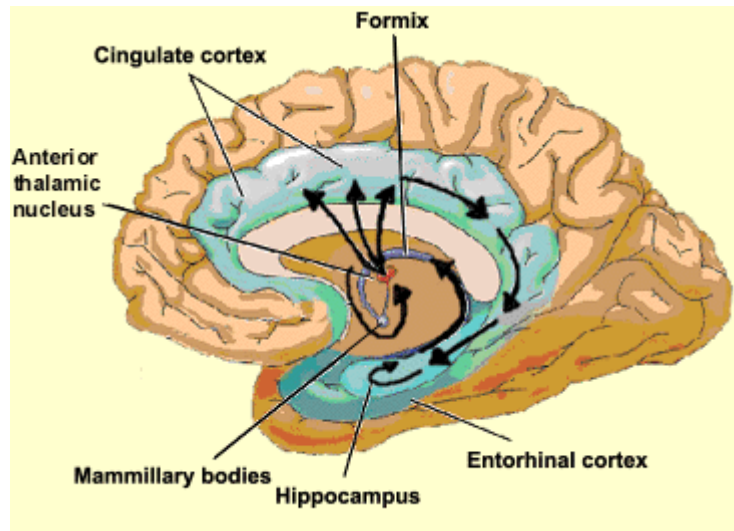


Figura 3. Desenho esquemático do encéfalo humano representando algumas áreas importantes para formação de memórias.

informação de todos os sistemas sensoriais: em parte provenientes do córtex, e, em parte, de forma inespecífica quanto à modalidade sensorial, desde a formação reticular mesencefálica. O hipocampo e a amígdala projetam ao hipotálamo, e, através deste, ao tálamo e, finalmente, ao córtex (GREEN, 1964, p. 561-608; GRAY, 1982). Estas estruturas e suas conexões estão, portanto, estrategicamente localizadas para modular o processamento de informações baseadas na experiência.

A amígdala participa dos processos de seleção como consequência de sua função moduladora da consolidação (Mc-GAUGH, 1988, p. 33-64). O hipocampo recebe projeções das diversas vias sensoriais através de vias secundárias originadas na formação reticular mesencefálica, septum, amígdala, e córtex. As vias provenientes da reticular, septum e amígdala contêm informação inespecífica, não identificada ainda pelo animal como pertencentes a tal ou qual modalidade sensorial (GREEN, 1964, p. 561-608; GRAY, 1982); as fibras provenientes do córtex, por outro lado, podem informar ao hipocampo se a ativação pertence a uma determinada modalidade sensorial, ou a várias. O hipocampo responde a ambientes, eventos ou estímulos novos com uma dessincronização de sua atividade eletroencefalográfica, e a ambientes, eventos ou estímulos já conhecidos com um ritmo lento chamado theta: de 4 a 7 Hz no homem, e de 4 a 10 Hz no rato (GRAY, 1982).

1.4. Esquecimento

O esquecimento é normal e vários fatores podem causá-lo. Segundo Iván Antonio Izquierdo, no livro *A arte de esquecer*, existem quatro formas básicas de esquecimento. Duas

delas consistem em tornar as memórias menos acessíveis, mas em geral sem perdê-las por completo: a extinção e a repressão e as outras duas consistem em perdas reais de informação; uma delas por bloqueio de sua aquisição, e a outra por deterioração e perda de informação, o esquecimento propriamente dito.

1.5. Amnésias

O excesso de esquecimento, a perda real de memórias que não queremos perder, é patológico, denomina-se amnésia, dividindo-se em amnésia retrógrada (perda de memórias preexistentes), ou amnésia anterógrada (a incapacidade de formar memórias novas). A perda total de memórias, anterógrada e retrógrada, se denomina amnésia global, esta é, geralmente, transitória e reversível, e se observa após grandes traumatismos cranianos ou acidentes vasculares cerebrais com edema cerebral (SQUIRE, 1987).

A lesão bilateral da amígdala e do hipocampo provoca amnésia anterógrada pura, explicável pela supressão do principal núcleo modulador e do principal mecanismo seletor, respectivamente. Esta amnésia foi descrita pela primeira vez, e posteriormente estudada em detalhe, no paciente H. M., a quem foram extirpados, em 1953, bilateralmente, a amígdala, o hipocampo e o córtex temporal adjacente, para o tratamento de epilepsia temporal. H. M. lembra bem fatos e experiências remotas; mas desde a cirurgia não conseguiu adquirir mais memórias declarativas (MARKOWITSCH e PRITZEL, 1985, p. 189-287). Pacientes com lesões bilaterais da amígdala e do hipocampo, ou de seus sítios de projeção diencefálicos, apresentam graus variáveis de amnésia anterógrada (WEISKRANTZ, 1985, p. 380-415; SQUIRE, 1987). A amnésia retrógrada ocorre quase que invariavelmente associada com outros múltiplos déficits cognitivos (desorientação, alterações da percepção e da inteligência, diversos graus de amnésia anterógrada, etc.) em quadros com lesões cerebrais múltiplas e difusas: as demências. Denomina-se demência justamente a perda global, geralmente irreversível, das faculdades cognitivas em humanos. Dos casos de demência, 50% são devidos à Doença de Alzheimer.

1.6. Consolidação x Reconsolidação

Os primeiros neurobiólogos experimentalistas postulavam que para uma nova informação se transformar em uma memória de longa duração, deveria passar por um processo de *estabilização*, sendo que após esse processo ser finalizado não seria mais possível alterar aquela memória, ela permaneceria imutável, sólida. Foi daí que surgiu o termo

consolidação da memória, cunhado por MÜLLER e PILZECKER no ano de 1900. Por outro lado, os psicólogos cognitivistas acreditavam que as memórias poderiam ser reconstruídas quando evocadas, de maneira que poderiam ser alteradas tanto em conteúdo quanto em força. Somente em 1968, com os experimentos de MISANIN que essas duas linhas de pesquisa começaram a se aproximar; ele demonstrou que a memória poderia sim ser alterada após a consolidação, apesar de seu trabalho não ter o reconhecimento merecido; então, no ano de 2000 com o trabalho de LeDOUX que a linha da reconsolidação começou a tomar força e, desde então, tem sido uma das fases do processamento mnemônico mais estudada. A figura 4 demonstra a dinamicidade da memória, alternando entre estados inativos ou estáveis e estados ativos onde podem ser incorporadas informações.



Figura 4. Estado ativo e Inativo da memória.

1.7. Precisão x Generalização

Segundo a teoria dos múltiplos traços, memórias contextualmente ricas e eventos detalhados serão sempre dependentes do hipocampo; independente do tempo da memória. Algumas memórias episódicas, entretanto, são transformadas com o tempo. Nesse processo, o seu conteúdo torna-se mais genérico (uma espécie de semantização), perdendo seu detalhamento, e não requerendo mais o hipocampo para ser evocado. (KIM e FASELOW, 1992 – Fig. 5). WILTGEN e SILVA demonstraram que após 28 dias a memória também deixa de ser precisa (Fig. 6). Em nosso laboratório foi demonstrado (DE OLIVEIRA ALVARES et. al 2011) que em ratos adultos, a memória torna-se independente do hipocampo 28 dias após ser adquirida (consolidação sistêmica), e concomitante a essa independência hipocampal ocorre a perda de detalhes, passando então a ser uma memória genérica.

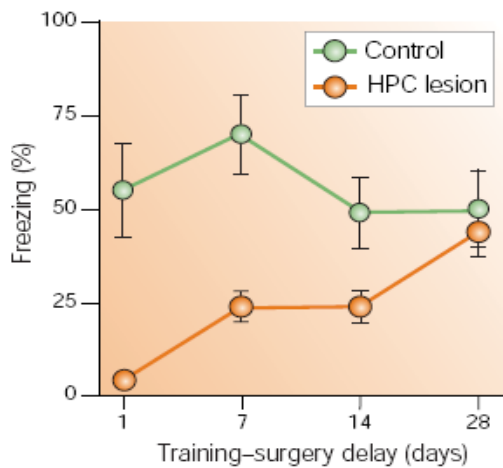


Figura 5. Adaptado de Kim e Fanselow 1992 – Science - Lesões hipocámpais feitas um, 7 ou 14 dias, depois do treino, prejudicam a memória. Porém, 28 dias depois da lesão, não tem mais efeito.

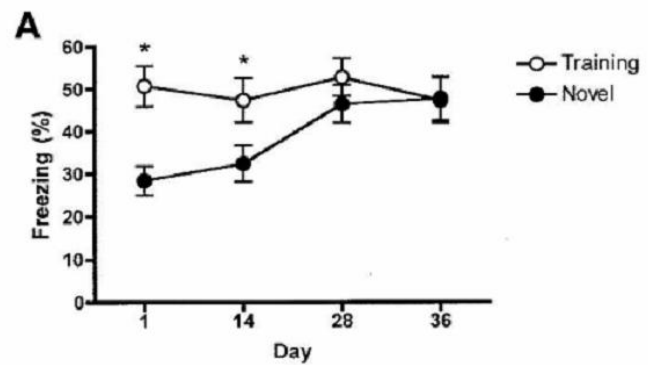


Figura 6. Perda do detalhamento contextual conforme aumenta o tempo desde a aquisição da memória. Adaptado de Wiltgen, B.J. e Silva, A., 2007.

1.8. Idade e Memória

A habilidade de intergrar características individuais de um evento em uma memória coerente é essencial para o funcionamento da memória episódica. Ao longo da vida, as funções da memória passam por mudanças profundas e contínuas. Em estudos com humanos tem sido demonstrado que a performance da memória aumenta rapidamente durante a infância, e diminui durante a idade adulta, com acelerado declínio na idade avançada. Ao mesmo tempo, as circuitarias encefálicas que suportam as memórias episódicas sofrem profundas reorganizações da infância até a senescência (SHING, 2010).

1.8. 1. Desenvolvimento encefálico durante a adolescência

A formação hipocámpal participa no aprendizado e na memória, particularmente nos de natureza espacial. Em ratos adultos, neurônios piramidais individuais de CA1 disparam somente quando o animal está em um local específico do ambiente. Trabalhos prévios mostram que a formação hipocámpal do rato só matura por volta do segundo mês de vida e que ratos com menos de 40 dias possuem déficits em testes de navegação espacial. No estudo de MARTIN PD e BERTHOZ A (2002) foi demonstrado que os neurônios de disparo de CA1 possuem um padrão menos específico e menos estável em animais com idade inferior a 50 dias. O que pode sugerir que a memória nessa idade seja menos precisa. Nesse período os sistemas sensoriais e motores já estão completamente desenvolvidos, no entanto, o hipocampo ainda está passando por mudanças fisiológicas e anatômicas.

Outro estudo demonstra que uma potenciação de longa duração pode ser induzida nas sinapses de CA1 em animais jovens (P15-P60) com um disparo de 100Hz, enquanto que esse mesmo estímulo em animais mais velhos produz apenas um aumento temporário na eficácia sináptica – sugerindo que a indução de LTP em animais adultos é mais difícil do que em animais jovens (HARRIS & TAYLER, 1984; IZUMI & ZORUMSKI, 1995).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que possui um grande papel na regulação de eventos estressores, termina sua maturação por volta dos 45 dias após o nascimento (PIGNATELLI et al., 2006). Em um trabalho realizado por McCORNICK et al. 2008 foi observado que as concentrações de corticosterona, logo após o evento estressor, eram menores em ratos com 46 dias de idade do que em adultos, mas os níveis mantiveram-se elevados por mais tempo quando comparado com adultos; isso demonstra um efeito prolongado da corticosterona em animais que estão na adolescência tardia.

Regiões encefálicas que estão criticamente envolvidas no aprendizado e na memória, incluindo o córtex medial pré-frontal, o hipocampo e a amígdala, tem alta expressão de receptores corticosteróides, que estão envolvidos na regulação do eixo HPA. Essas regiões do encéfalo de roedores passam por remodelamento morfológico e funcional na adolescência, com a maturação límbica subcortical ocorrendo antes das regiões corticais pré-frontais. São observadas mudanças na complexidade sináptica e na reorganização das projeções que desencadeiam o controle emocional e cognitivo no mPFC.

No mPFC ventral, o volume da substância branca aumenta entre nos P30 e P90, com redução do número de neurônios. Projeções glutamatérgicas da amígdala basolateral, e, tanto projeções dopaminérgicas quanto glutamatérgicas do mPFC, continuam a aumentar continuamente ao longo da adolescência até a idade adulta. No mPFC a superexpressão dos receptores D2 (inibitório) chega a níveis estáveis aos P80 e dos receptores D1 (excitatórios) continua a diminuir até P100. (Andersen et al., 2000). Além disso, ocorre um aumento na quantidade de receptores para serotonina até P90, em contraste com os níveis estáveis no estriado que é atingido por volta do P50 (Moll et al., 2000).

Quanto ao volume das estruturas, há um aumento na amígdala (KOSHIBU et al, 2004; RUBINOW et al, 2009a) e no hipocampo (KOSHIBU et al, 2004). A composição das proteínas hipocampais também é alterada no decorrer do desenvolvimento indicando que as cascatas de sinalização na adolescência podem ser diferentes das que ocorrem na idade adulta (WEITZDÖRFER R, 2008).

Como na adolescência algumas estruturas neurais de grande importância ainda não estão completamente formadas, o indivíduo nessa idade fica muito vulnerável a desregulações e ao desenvolvimento de patologias, principalmente as relacionadas a eventos estressores. (Adaptado de McCORMICK C. M. & MATHEWS I.Z., 2011).

Quanto aos testes comportamentais em roedores observa-se aumento de comportamento social, novidade e sensação de procura, tendência a situações de risco, instabilidade emocional e

impulsividade; por esses motivos animais adolescentes permanecem mais tempo nos braços abertos no labirinto em cruz elevado do que adultos. Também é observado aumento de locomoção induzida por novidade (STURMAN DA, 2011).

Análises estruturais em humanos demonstram que há redução de substância cinzenta nas porções do lobo temporal e PFC dorsolateral durante adolescência tardia, ocorrendo concomitantemente aumento de substância branca, aumento da mielinização e calibre dos axônios. Desenvolvimento de substância branca está diretamente relacionado com o aumento na integração funcional de regiões de substância cinzenta, sugerindo atividade de redes mais distribuídas através do desenvolvimento. Adolescentes geralmente ativam estruturas cognitivas e afetivas similares, no entanto, com diferentes magnitudes ou padrões espaciais e temporais, ou níveis de interconectividade funcional (STURMAN DA, 2011).

Em resumo, os trabalhos mostram algumas mudanças que ocorrem durante a adolescência nas principais estruturas neurais relacionadas ao aprendizado e a memória, as quais podem fundamentar as diferenças de desempenho cognitivo ao longo da ontogenia.

1.8.2. Alterações encefálicas durante o envelhecimento

O avançar da idade normalmente vem acompanhado de diminuição no aprendizado e na memória, mesmo em condições não patológicas. Com o advento de técnicas estereológicas, evidências de perda de neurônios no hipocampo foram invalidadas. Resultados de estudos em humanos e roedores documentaram estabilidade no número de neurônios piramidais hipocampais ao longo da vida (RAPP & GALLAGHER 1996). Os déficits podem ser devido a desregulação na função sináptica e a inefetividade da neurotransmissão. Alterações na atividade hipocampal relacionadas a idade coincidem com déficits no aprendizado e memória que refletem desregulação na neurotransmissão e na neuromodulação. Existe uma clara correlação entre a diminuição nas tarefas comportamentais dependentes do hipocampo em ratos velhos e atividade anômala das assembléias/conjuntos de neurônios hipocampais. Esses déficits relacionados com a idade incluem retardo na formação e diminuição na estabilidade dos mapas cognitivos (BARNES *et al* 1997).

Os mecanismos envolvidos na diminuição do processamento neural não estão completamente determinados, mas envolvem mudanças moleculares, celulares e/ou em níveis estruturais. Em modelos animais de envelhecimento, vários aspectos da morfologia sináptica e dendrítica (incluindo as densidades pós-sinápticas e os botões dos espinhos dendríticos) encontram-se alterados, e diminui a razão do número de sinapses por neurônio em distintas regiões hipocampais (SHI *et al.* 2007), sugerindo um declínio na atividade sináptica.

Estudos eletrofisiológicos *ex vivo* proporcionam evidências adicionais dos distúrbios relacionados com a idade na plasticidade envolvendo múltiplos tipos de neurônios e vias. Por

exemplo, camundongos velhos exibem diminuição na transmissão sináptica basal e facilitação por pulso pareado nas sinapses da via perfurante - giro denteado (GERRARD *et al.* 2008). Além disso, LTP é mais difícil de estabilizar em ratos velhos que em jovens ou adultos (NORRIS *et al.* 1996) e ocorre via mecanismos alternativos (Boric *et al.* 2008), persistindo por menos tempo (SIERRA-MERCADO *et al.* 2008). LTD hipocampal e depotenciação são mais facilmente facilitadas nessa idade (NORRIS *et al.* 1996; ROSENZWEIG & BARNES 2003).

Declínio na neurogênese (BONDOLFI *et al.*, 2004) tem sido observado, sendo que ela segue um padrão topográfico, é mais rápida no hipocampo ventral, podendo implicar em diminuições na memória e prejuízos afetivos (JINNO S., 2010).

É observado também a diminuição da expressão de neurotrofinas com o avanço da idade em áreas particularmente relacionadas com a memória como o hipocampo. Déficits na expressão de NGF (NGF - do inglês: *neural grown factor*) e na sua subsequente sinalização (fosforilação do receptor tirosina cinase) contribuem para déficits na LTP (diminuição na performance do labirinto aquático de Morris foi correlacionado com diminuição na expressão de NGF - enquanto administração crônica intraventricular reverteu).

Estudos proteômicos revelam desregulação de múltiplos processos incluindo metabolismo, processamento do glutamato e síntese protéica, dobramento e acumulação protéica, e citoproteção. Pesquisas adicionais tem avaliado função mitocondrial, estresse oxidativo, e proteólise com a idade. Há também numerosas mudanças na expressão hipocampal de mRNAs com o aumento da idade. O estudo de FREEMAN *et al* 2009 sugere anormalidade na glicólise/glicogenólise hipocampal e no processamento protéico. Somadas essas pesquisas demonstram mudanças importantes na expressão de genes e proteínas com aumento da idade que contribuem para disfunções sinápticas e nas capacidades cognitivas.

2. JUSTIFICATIVA

Partindo dos seguintes pressupostos:

1. Existem claras diferenças anatômicas e fisiológicas tanto durante o desenvolvimento quanto durante o envelhecimento dos indivíduos;
2. Memórias tendem a perder detalhes com o passar do tempo, tornam-se genéricas;
3. Reativação é um processo que pode manter, fortificar ou modificar uma memória.

Resolvemos avaliar a *precisão* da memória e capacidade de *incorporar informações* (através da reativação) em ratos de diferentes idades (adolescentes, adultos e idosos).

Devido as diferenças presentes entre as faixas etárias nos perguntamos se o padrão de generalização e de incorporação também seriam diferentes. Será que adolescentes e idosos tornariam a memória inespecífica mais rapidamente? Seriam mais ou menos suscetíveis à incorporação de informações?

Sabendo que a reativação, além de manter a memória precisa, pode modificá-la foi desenvolvido um protocolo onde os animais adultos que passam pela reativação incorporavam informação a uma memória já estabelecida, demonstrando medo em um contexto diferente do qual foram treinados; sugerindo a formação de uma falsa memória (detalhes do protocolo nos materiais e métodos). Através desse protocolo investigamos qual a suscetibilidade da memória a incorporação de informações nos animais adolescentes e idosos.

Quanto a precisão, começamos analisando se as memórias recentes (alguns dias) são precisas e quando elas tornar-se generalizadas. Isso foi avaliado através da tarefa de condicionamento aversivo contextual onde os ratos foram testados diferentes tempos após o treino (2, 5, 14, 21 e 28 dias) no mesmo contexto onde foram treinados ou em um contexto novo.

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a precisão da memória em ratos adolescentes, adultos e velhos, bem como a capacidade de incorporar informações em uma memória já estabelecida nas diferentes idades citadas anteriormente.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a resposta de congelamento em um contexto A (mesmo do treino) ou em um contexto B (contexto novo/alternativo), de ratos de 47 a 49 dias de vida (considerado “adolescente”), testados, em diferentes intervalos de tempo (2, 5, 14, 21 e 28 dias) após o treino, avaliando a *precisão* de sua resposta ao reconhecer mais ou menos o novo contexto (Figura 14);
2. Verificar a resposta de congelamento em um contexto A (mesmo do treino) ou em um contexto B (contexto novo/alternativo), de ratos de 80 a 90 dias de vida (considerado “adultos”), testados, em diferentes intervalos de tempo (2, 5, 14, 21 e 28 dias) após o treino, avaliando a *precisão* de sua resposta ao reconhecer mais ou menos o novo contexto (Figura 15);
3. Verificar a resposta de congelamento em um contexto A (mesmo do treino) ou em um contexto B (contexto novo/alternativo), de ratos de mais de um ano de vida (considerados de “meia-idade” ou “velhos”), testados, em diferentes intervalos de tempo (2, 5, 14, 21 e 28 dias) após o treino, avaliando a *precisão* de sua resposta ao reconhecer mais ou menos o novo contexto (Figura 16);
4. Verificar a resposta de congelamento em um contexto B, de um rato de 47 a 49 dias de vida (considerado “adolescente”), treinado 5 dias antes em um contexto mais ou menos similar A, e reativado, no meio deste período em um contexto híbrido AB (ver detalhamento no M&M), avaliando se essa *incorporação de informações* modificou a resposta, comparado a um animal não-reativado (Figura 17);
5. Verificar a resposta de congelamento em um contexto B, de um rato de 80 a 90 dias de vida (considerado “adulto”), treinado 5 dias antes em um contexto mais ou menos similar A, e reativado, no meio deste período em um contexto híbrido AB (ver detalhamento no M&M), avaliando se essa *incorporação de informações* modificou a resposta, comparado a um animal não-reativado (Figura 18);
6. Verificar a resposta de congelamento em um contexto B, de um rato de mais de 1 ano de vida (considerado de “meia-idade” ou “velho”), treinado 5 dias antes em um contexto mais ou menos similar A, e reativado, no meio deste período em um

contexto híbrido AB (ver detalhamento no M&M), avaliando se essa *incorporação de informações* modificou a resposta, comparado a um animal não-reativado (Figura 19);

7. Avaliar, para fins de controle, se animais de cada uma dessas três idades, exibem nível basal de motricidade diferenciado – mediante a exploração de um campo aberto, o que poderia prejudicar a interpretação dos achados apenas em termos cognitivos (Figura 20);
8. Avaliar, para fins de controle, se animais de cada uma dessas três idades, exibem nível basal de ansiedade – mediante a tarefa de transição claro-escuro, o que poderia prejudicar a interpretação dos achados apenas em termos cognitivos (Figura 21).

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

- Ratos Wistar machos de diferentes idades:
- 47-49 dias (adolescentes tardios) pesando entre 160-210 gramas;
- 80-90 dias (adultos) pesando 270-320 gramas, e,
- aproximadamente 360 dias (meia-idade) e idade superior a 700 dias (velhos) pesando entre 450-600g.

Foram mantidos em caixas de plástico, 4 ou 5 animais por caixa, com ciclo 12horas dia/12horas noite, a uma temperatura constante de 24° C, com água e comida *ad libitum*.

4.2. Procedimentos comportamentais:

Foram utilizadas as tarefas de (i) condicionamento aversivo contextual (CAC), (ii) teste de transição claro-escuro e (iii) campo aberto.

O CAC é a principal tarefa comportamental em nosso desenho experimental visando aferir precisão e/ou incorporação de informação, sendo que a reativação e o teste ocorreram (dependendo do experimento) em três contextos relativamente similares, porém com variados grau de semelhança entre si (A, AB e B), ou em um contexto considerado diferente (contexto alternativo/novo).

(i) CAC e desenho experimental básico:

TREINO: Os animais eram colocados em uma caixa (contexto A) onde após exploração livre por 3 minutos, recebem 2 choques de 0,7mA de 2s de duração cada, separados por 30s de intervalo permanecendo até 4 minutos; eles permaneciam 30s adicionais no ambiente após o ultimo choque.

Todos os animais passaram pelo aprendizado da tarefa de CAC. Após isso, diferentes protocolos foram utilizados para avaliar a precisão ou a incorporação de informações na memória da seguinte forma:

PRECISÃO DA EVOCAÇÃO: Os animais treinados no contexto A eram testados 2, 5, 14, 21 ou 28 dias após, no mesmo contexto (A) ou num contexto alternativo (novo), e as respostas de medo eram quantificadas mediante o percentual de tempo em congelamento.

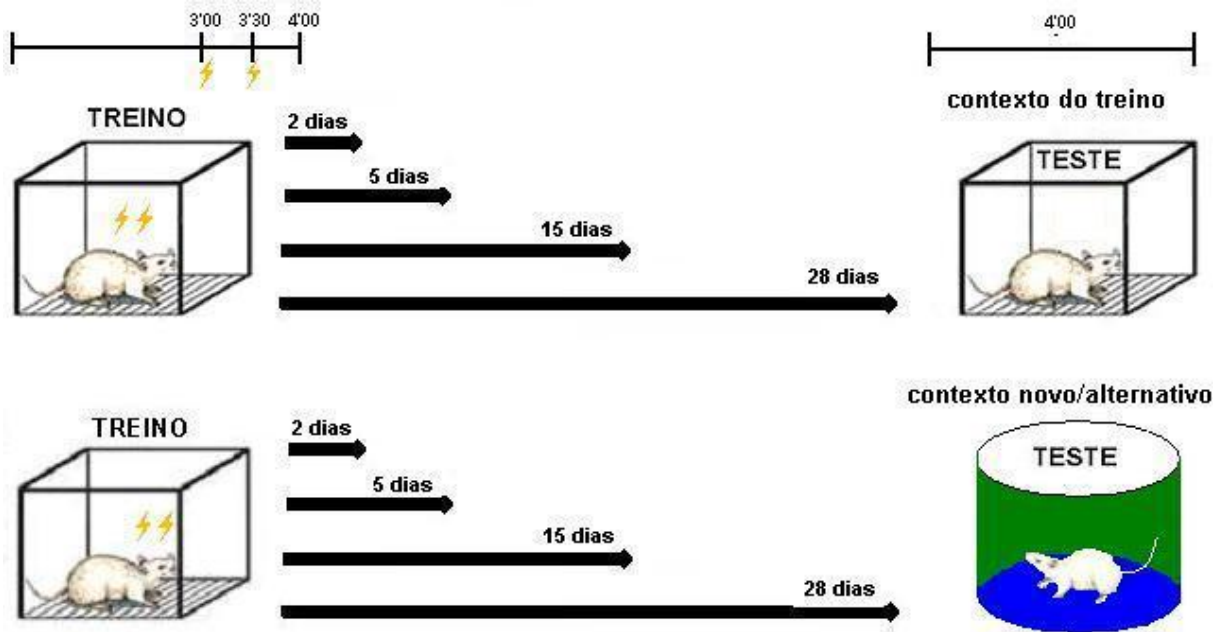


Figura 7. Desenho esquemático do protocolo para avaliar a precisão da memória

INCORPORAÇÃO DE INFORMAÇÕES:

REATIVAÇÃO (quando havia): era feita no ambiente dito "híbrido" (AB), que possuía características dos dois outros, A (treino) e B (teste).

TESTE: era feito no contexto B (algo similar ao AB) e ocorria 5 dias após o treino, com ou sem a interposição de uma exposição a um ambiente híbrido.

2 dias após o treino no CAC no contexto A os animais passaram, ou não, por um sessão de reexposição de 90s de duração à um contexto levemente modificado com relação ao A (e também ao B), o contexto "híbrido" AB; o teste era feito 5 dias depois do treino em um contexto B. Nossa hipótese era a de que apenas os animais que passassem pelo contexto AB - que foram "reativados" - poderiam reconhecer o B como familiar, ou seja, a reativação ajudaria a generalizar a experiência e A e reconhecer também o B, denotando perda de precisão na identificação do contexto.

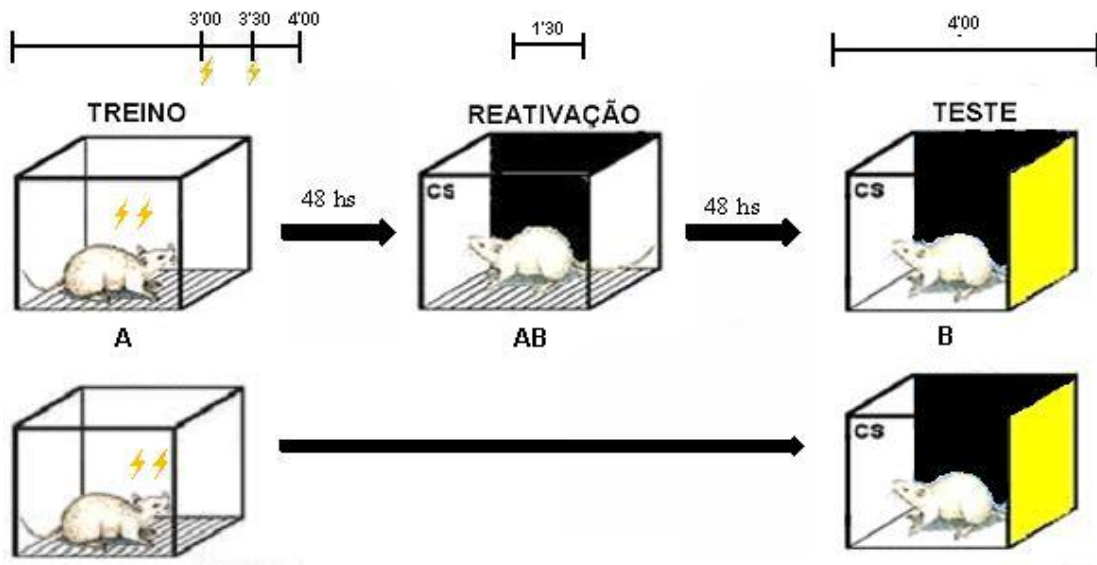


Figura 8. Desenho esquemático do protocolo para avaliar a incorporação de informações na memória.

Descrição dos contextos:

Contexto treino (A): caixa bege com dimensões (20x25x22cm), paredes laterais e posterior de fórmica e parede frontal de acrílico onde fica uma luminária externa; com ruído de fundo (ar condicionado)

Contexto híbrido (AB) – com características semelhantes ao contexto A e ao contexto B: caixa branca com dimensões (20x25x22cm), paredes semelhantes as anteriores com luminária externa e luz interna; 20 gotas de essência de banana e ruído de fundo.

Contexto B – caixa branca com dimensões (20x25x22cm) apenas a luz interna permanece ligada e a luminária é retirada; parede lateral direita modificada; 40 gotas de essência de banana e sem ruído de fundo.

Contexto novo: Caixa branca com 2/3 das dimensões do contexto treino, com assoalho de fórmica, sem luz, sem cheiro, sem ruído de fundo e em outra parte da sala de comportamento (com dicas espaciais diferentes).

(ii) **Tarefa de claro-escuro** – foram avaliados os níveis de ansiedade nessa tarefa; que consiste de um aparato com dimensões de 60x40cm dividido em dois compartimentos, sendo um deles iluminado e outro não. Diante da aversão natural dos animais a ambientes iluminados, este modelo permite avaliar os níveis de ansiedade pela frequência de transições e tempo de permanência no ambiente iluminado. Assim, se um animal apresentar pouca

permanência no ambiente iluminado diz-se que este animal está com altos níveis de ansiedade.

(iii) também foi avaliada a atividade locomotora no **Campo Aberto** - uma caixa com dimensões de 60x40centímetros dividida em quadrantes de igual tamanho, onde o rato permanecerá por 5 minutos, sendo avaliado o número de cruzamentos pelos quadrantes.

4.3. Grupos experimentais

<u>Experimento</u>	Idade	Grupos	Após término do experimento comportamental
Precisão	Adolescentes Adultos Meia-idade	Controle (teste no ctx A – 2, 5, 14, 21 e 28 dias pós-treino) Contexto novo (teste no contexto novo 2, 5, 14, 21 e 28 dias pós-treino)	Avaliação da atividade locomotora (campo aberto) e da ansiedade (tarefa de claro-escuro)
Incorporação de informações	Adolescentes Adultos Idosos	Controle (teste no ctx A – 5 dias pós-treino) Reativado (reativação ctx AB e teste ctx B)	Avaliação da atividade locomotora (campo aberto) e da ansiedade (tarefa de claro-escuro)

1 – Programação dos experimentos * Entre 5 e 9 animais por grupo experimental.

4.4. Escolha das idades

É difícil fazer uma comparação segura entre a idade em humanos e roedores, e devido a isso existe uma certa divergência quanto a equivalência etária entre essas espécies. Segundo Tirelli et al., 2003 são classificados como pré adolescentes animais com idade pós-natal entre 21-34 dias, como adolescentes animais com 34-46 dias e como adolescentes tardios entre 46-59 dias. Tornando-se adultos com 70-75 dias. Roedores com 12 meses são considerados de meia-idade e com idade superior as 18 meses animais idosos. Como já se observam diminuição na neurogênese em hipocampo de camundongos com 10 meses (Jinno, S. 2010) (e eles tem um padrão muito semelhante a ratos), passamos a utilizar ratos com ~360 dias (1 ano) ao invés de ~700 (2 anos).

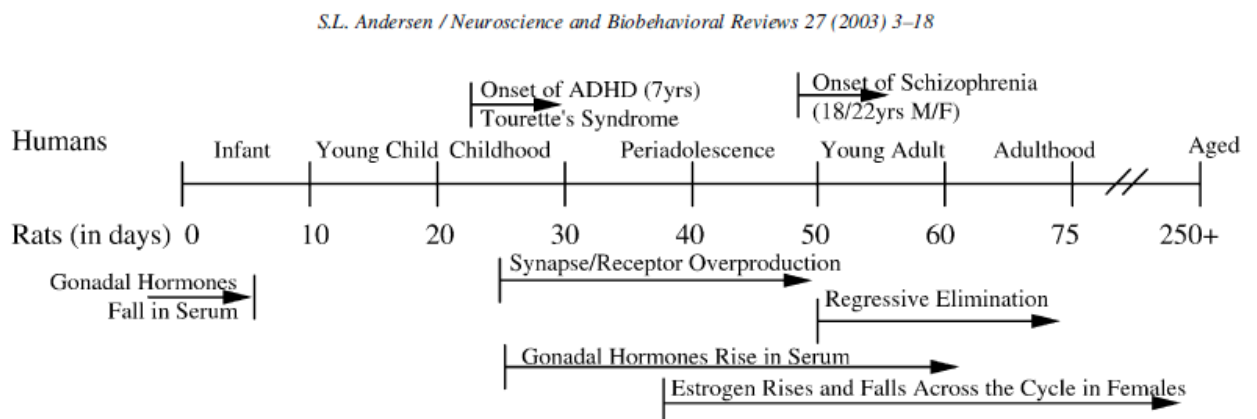


Figura 9. Comparação de faixas etárias entre ratos e humanos. S.L. Anderson - Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and biobehavioral reviews - Neuroscience and Behavioral*, 2003.

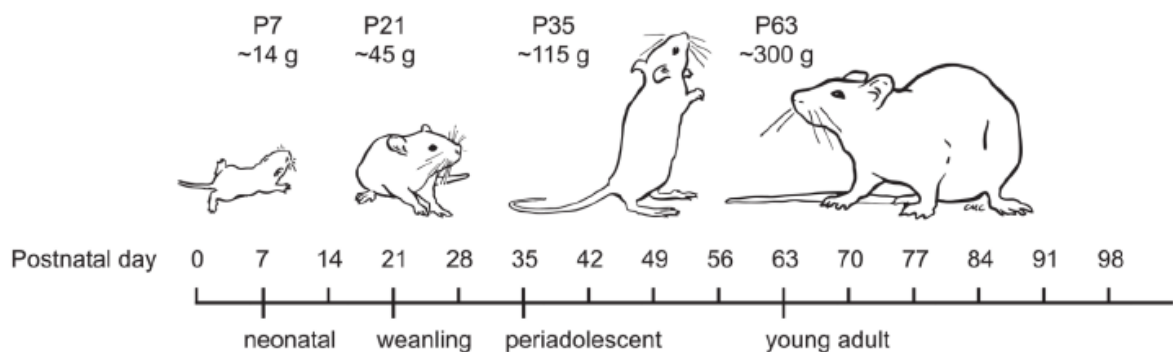


Figura 10. Correlação idade X peso ao longo do desenvolvimento de ratos. Adaptado de James Edgar McCutcheon and Michela Marinelli - Age Matters – *Eur J Neuroscience* (2009)

4.5. Aparatos que serão utilizados nos experimentos



Figura 11 - Tarefa de campo aberto com rato na posição típica de exploração.



Figura 12 – (A) Caixa de condicionamento aversivo com rato na posição típica de congelamento (do inglês *freezing*).



Figura 13 – Caixa experiemntal de claro-escuro.

5. RESULTADOS

A estatística usada em todos os testes é do tipo paramétrica, pois os dados se distribuem normalmente. Em todos os gráficos, com exceção do controle motor e de ansiedade, o eixo y representa a porcentagem de congelamento (medida comportamental de memória aversiva) e o eixo x representa os grupos. No gráfico de controle motor o eixo y representa o número de cruzamentos e no controle de ansiedade o eixo y representa o tempo de permanência no compartimento claro, sendo que o eixo x representa os grupos. Os dados gráficos são apresentados com média e erro padrão.

Constatada a existência de dados paramétricos, as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t de Student ou por ANOVA (controle motor e ansiedade) de uma via, sendo considerados valores de $p < 0,05$.

As figuras 14, 15 e 16 apresentam os resultados obtidos com o protocolo de precisão da memória com animais com 47-49 dias (adolescentes), 80-90 dias (adultos) e ~360 dias (meia-idade), respectivamente.

As figuras 17, 18 e 19 apresentam os resultados obtidos com o protocolo de incorporação de informações nas três idades escolhidas (adolescentes, adultos e idosos).

O controle motor e o controle de ansiedade estão representados nas figuras 20 e 21, respectivamente.

Precisão da memória em ratos de 47-49 dias em diferentes tempos após o treino

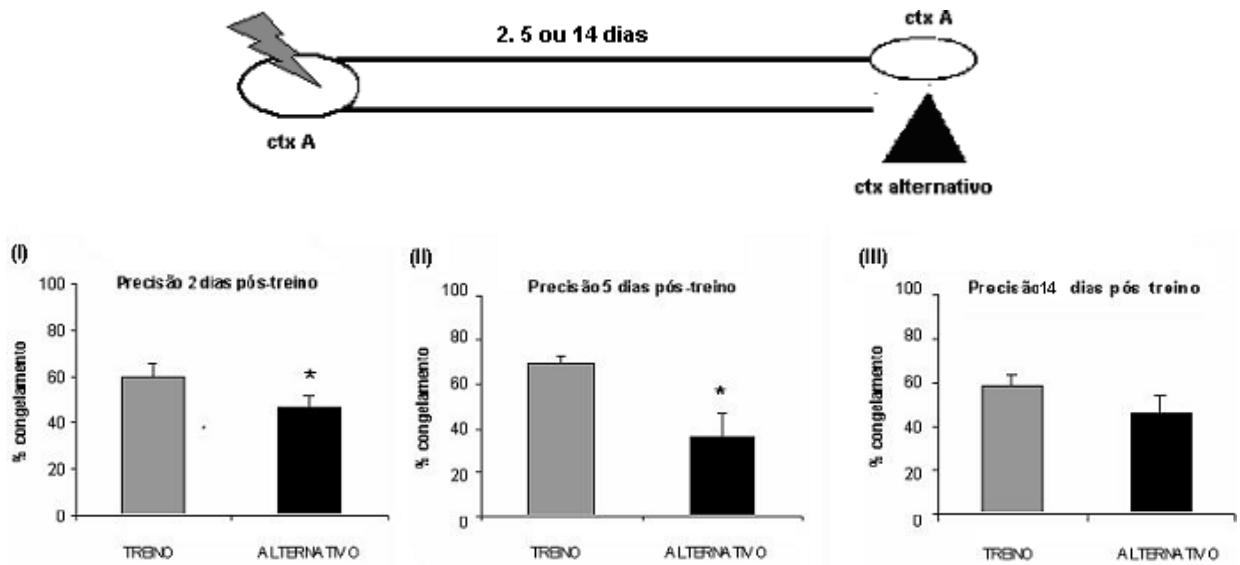


Figura 14. Tempo percentual de congelamento para ratos de 47-49 dias de vida (adolescentes) na tarefa de CAC (ver M&M) quando testados no contexto treino (A) ou alternativo (novo). O teste foi 2, 5 ou 14 dias após o treino. Dados expressos como [média \pm E.P.M. do % de tempo. **(I)** Teste dois dias após o condicionamento: grupo testado no contexto treino N=8 e no contexto alternativo N=9; há diferença significativa entre os grupos ($P=0,038622$ - teste t de Student para amostras independentes). **(II)** Ratos testados 5 dias após o treino no contexto treino (N=6) e no contexto alternativo (N=5); há diferença significativa entre os grupos ($P=0,031213$ teste t de Student para amostras independentes). **(III)** Animais testados 14 dias após o treino no contexto treino (A) N=6 e no contexto alternativo N=6. ($P=0,248494$ teste t de Student para amostras independentes).

Esses gráficos demonstram que com 2 e 5 dias os ratos de 47-49 dias de idade distinguem os contextos treino e alternativo, porém 14 dias após o treino a memória torna-se generalizada.

Obs.: não foram feitos os tempos posteriores a 14 dias (21, 28) após o treino porque consideramos que após a memória torna-se genérica ela continuaria genérica com o avançar do tempo.

Precisão da memória em ratos com 80-90 dias de vida 2 e 28 dias após o treino

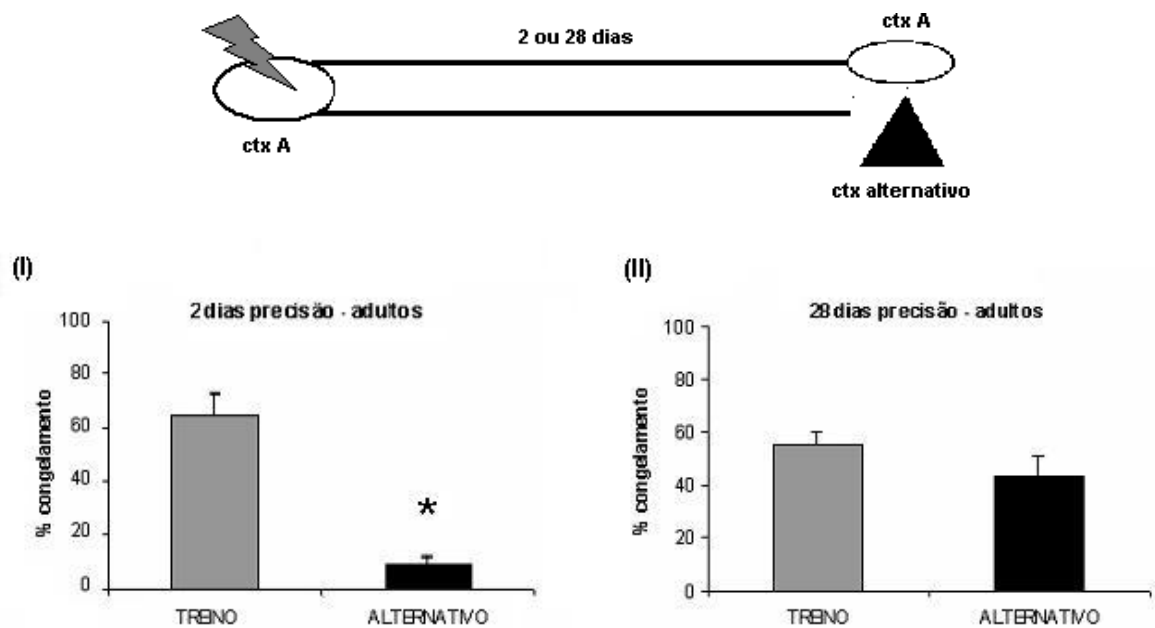
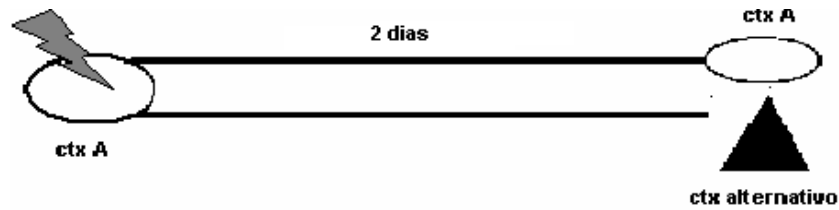


Figura 15. Tempo percentual de congelamento para ratos de 80-90 dias de vida (adultos) na tarefa de CAC (ver M&M) quando testados no contexto treino (A) ou alternativo (novo). O teste foi 2 ou 28 dias após o treino. Dados expressos como [média \pm E.P.M. do % de tempo. **(I)** Teste dois dias após o condicionamento; grupo testado no contexto treino N=6 e no contexto alternativo N=7; há diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$ - teste t de Student para amostras independentes). **(II)** Ratos testados 28 dias após o treino no contexto alternativo (N=6) e no contexto treino (N=8); não há diferença significativa entre os grupos ($P = 0,23163636$ teste t de Student para amostras independentes). Esses gráficos demonstram que com 2 dias os ratos de 80-90 dias distinguem entre os contextos (memória precisa), enquanto que com 28 dias perdem a capacidade de distinção contextual.

Obs.: não foram feitos os tempos intermediários entre 2 e 28 porque nos baseamos no trabalho de Kim e Fanselow (ver), onde foi demonstrado que animais adultos generalizam apenas com 28 dias.

Precisão da memória 2 dias após o treino em ratos com idade superior à 360 dias



Precisão 2 dias pós-treino

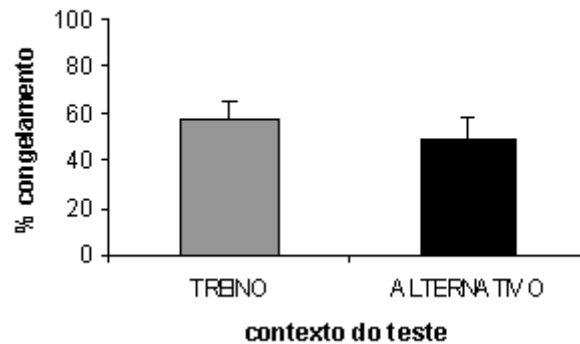


Figura 16. Tempo percentual de congelamento para ratos de ~360 dias de vida (meia-idade) na tarefa de CAC (ver M&M) quando testados no contexto treino (A) ou alternativo (novo). O teste foi realizado 2 dias após o treino. Dados expressos como [média ± E.P.M. do % de tempo. Grupo testado no contexto treino N=7 e no contexto alternativo N=7; não há diferença significativa entre os grupos ($P < 0,001$ - teste t de Student para amostras independentes. Os resultados sugerem que 2 dias os ratos de ~360 dias não distinguem entre os contextos (memória imprecisa).

Obs.: não foram feitos os tempos posteriores a 2 dias (5, 14, 21, 28) após o treino porque consideramos que após a memória torna-se genérica ela continuaria genérica com o avançar do tempo.

Incorporação de informações em ratos de 47-49 dias

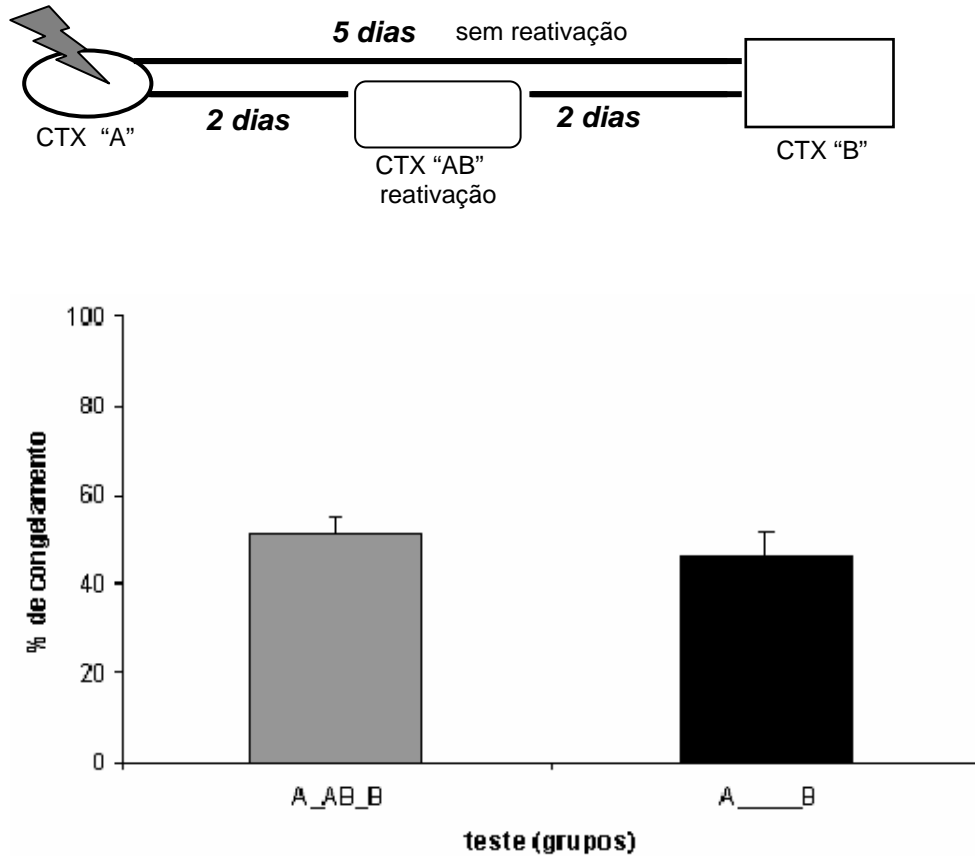
5

Figura 17. Tempo percentual de congelamento para ratos de 47-49 dias de vida (adolescentes) na tarefa de CAC quando testados no contexto B. O teste (contexto B) foi realizado 5 dias após o treino no contexto A, sendo que um grupo passou pela reativação no contexto AB e o outro não. Dados expressos como [média ± E.P.M. do % de tempo]. Não foi encontrada diferença significativa entre os animais reativados (N=13) e os não reativados (N=15). $P=0,442976$; Teste t de student para amostras independentes.

Incorporação de informações em ratos de 80-90 dias de idade

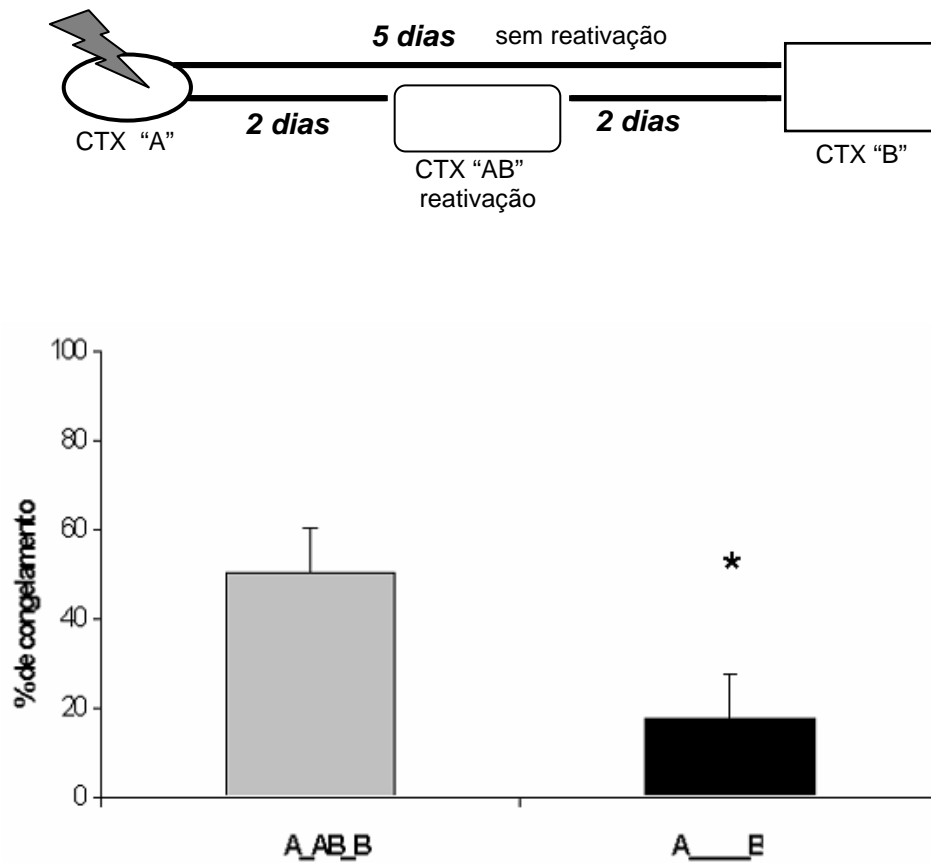


Figura 18. Tempo percentual de congelamento para ratos de 80-90 dias de idade (adultos) na tarefa de CAC de idade quando testados no contexto B. O teste (contexto B) foi realizado 5 dias após o treino no contexto A, sendo que um grupo passou pela reativação no contexto AB e o outro não. Dados expressos como [média + E.P.M. do % de tempo]. Não foi encontrada diferença significativa entre os animais reativados (N=15) e os não reativados (N=11). $P < 0,001$; Teste t de student para amostras independentes.

Incorporação de informações em ratos com idade superior a 700 dias

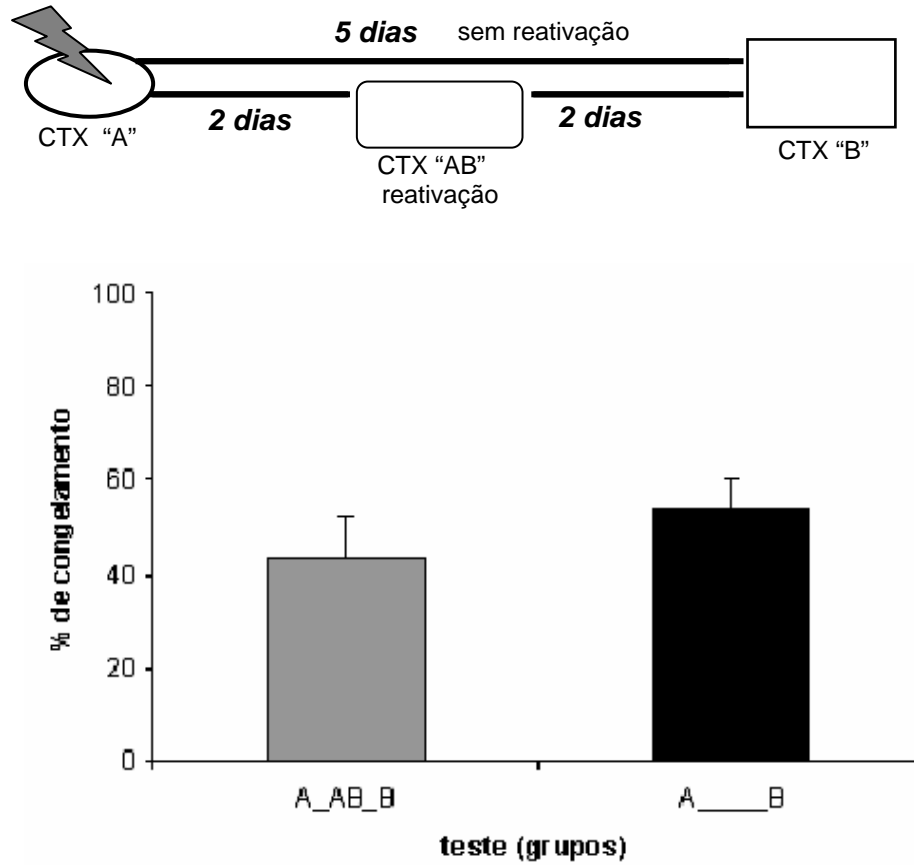


Figura 19. Tempo percentual de congelamento para ratos de ~700 dias de idade (idosos) na tarefa de CAC de idade quando testados no contexto B. O teste (contexto B) foi realizado 5 dias após o treino no contexto A, sendo que um grupo passou pela reativação no contexto AB e o outro não. Dados expressos como [média + E.P.M. do % de tempo]. Não foi encontrada diferença significativa entre os animais reativados (N=6) e os não reativados (N=6). $P=0,381$; Teste t de student para amostras independentes.

Controle Motor

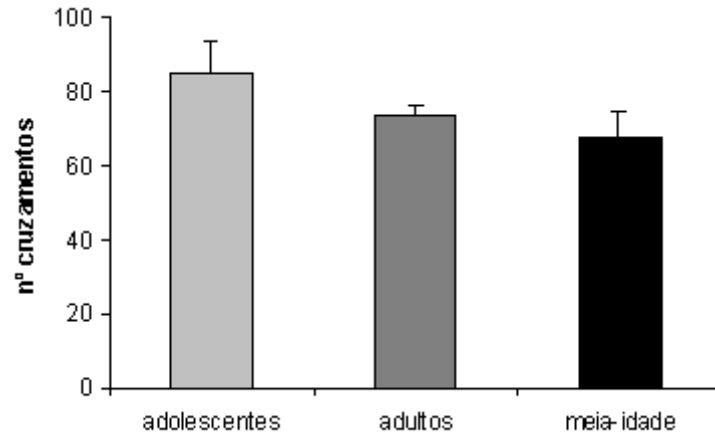


Figura 20. Número de cruzamentos na tarefa de campo aberto com animais de 47-49 dias (N=9), 80-90 dias (N=5) e ~360 dias (N=6). Dados expressos como [média ± E.P.M. do % de tempo] Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via, $P=0,321$.

Controle de Ansiedade

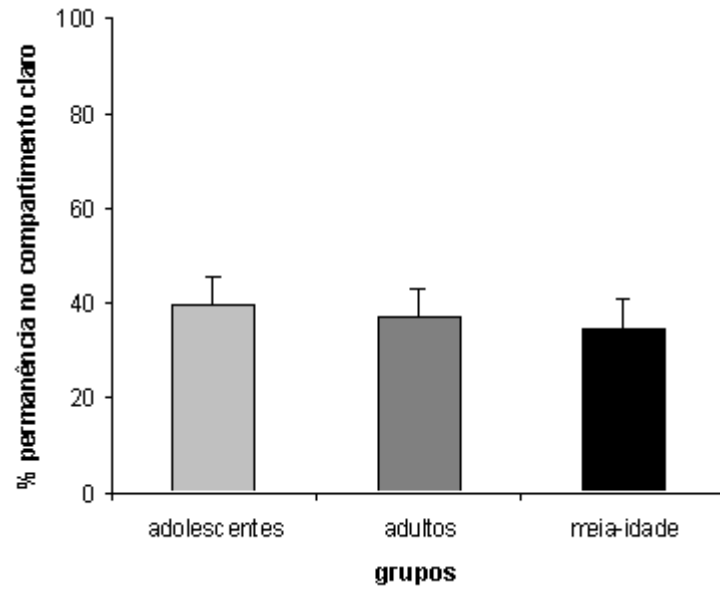


Figura 21. Tempo percentual de permanência no quadrante claro durante a tarefa de transição claro-escuro. Foram utilizados ratos de 47-49 dias (N=5), 80-90 dias (N=6) e ratos com idade superior a 360 dias (N=6). Dados expressos como [média ± E.P.M. do % de tempo. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. ANOVA de uma via, P=0,864]

6. DISCUSSÃO

Os experimentos desse projeto foram divididos em 3 grupos, com os seguintes achados:

- 1) *Precisão da memória*: os resultados demonstram que a curva de precisão da memória em animais adolescentes (Fig. 14) e de meia-idade (Fig. 16) é bastante diferente da curva em adultos (Fig. 15): tanto os ratos adolescentes quanto os de meia-idade responderam “reconhecendo” razoavelmente bem o ambiente B do teste, que era, porém, distinto daquele do treino. Ou seja, parece que, nessas duas faixas etárias, e possivelmente devido a causas / mecanismos diferentes, a evocação da memória contextual se faz naturalmente com menor precisão: somente os adultos respondem pobremente ao contexto (com baixo % de congelamento – ver Fig. 15), exceto quando forem reativados em um contexto híbrido (AB) entre o treino (A) e o teste (B).
- 2) *Incorporação de informações na memória*: os resultados mostram que apenas os animais adultos (Fig. 18) conseguem incorporar informações na memória pré-estabelecida (protocolo A_AB_B), demonstrando medo em um contexto diferente. A sessão de reativação no contexto híbrido (AB), em animais adolescentes (Fig. 17) ou velhos (Fig. 18), não causou nenhuma alteração na memória original, de modo que todos os ratos demonstraram medo no contexto B (tendo ou não passado pela reativação). Esse resultado pode ser outro indício de que as memórias, nestes animais, são basicamente menos precisas. Apesar desse protocolo não ser o ideal para se avaliar precisão, podemos ainda assim inferir que a memória é menos precisa nos animais adolescentes e nos animais idosos, já que o grupo controle dessas idades (que não passou pela sessão de reativação), reconheceu o contexto B como familiar.
- 3) *Controles de ansiedade e motor*: nenhuma diferença no desempenho basal motor/exploratório nem na expressão da ansiedade foi encontrada entre as três faixas etárias estudadas, excluindo qualquer possibilidade de interferência desses fatores, e reforçando a interpretação de que os efeitos observados são essencialmente de natureza cognitiva.

O estudo das variações de precisão na evocação de memórias é bastante recente. KIM & FANSELOW (1992), por exemplo, descobriram esse importante fenômeno quando demonstraram que a consolidação de memórias de longo prazo segue uma dinâmica temporal na qual, após 28 dias, deixam de ser dependentes do hipocampo (Fig. 5) e, ao mesmo tempo,

tornam-se mais genéricas (WILTGEN & SILVA, 2007) (Fig. 6). Trata-se em parte do fenômeno da *Consolidação Sistêmica* – memórias consolidadas que, com o tempo, parecem transferir-se de um sítio “provisório”, como o hipocampo, para outro mais “definitivo”, como as regiões corticais, deixando de ser influenciável por fármacos infundidos no hipocampo (DUDAI & MORRIS, 2000; DE OLIVEIRA ALVARES, et al. 2011) – mas envolve, simultaneamente, a chamada “generalização”, que nada mais é que a perda de precisão da memória. Nossos resultados mostram que os animais adolescentes generalizam a memória com apenas 14 dias, e os animais de meia-idade também o fazem, só que mais cedo, aos 2 dias.

Nossos resultados sugerem que a memória nos animais adolescentes torna-se genérica mais rapidamente. Outros trabalhos realizados com animais dessa idade podem nos ajudar a entender os motivos dessa generalização acelerada. Uma possível explicação para esse achado, é que os animais adolescentes tenham um déficit na aquisição ou na evocação de memórias precisas. Essa hipótese é embasada em estudos eletrofisiológicos que demonstram um padrão de disparo menos específico em neurônios hipocampais de ratos com idade inferior à 50 dias (MARTIN PD, BERTHOZ A., 2002), o que pode estar relacionado à um menor padrão de separação contextual; além de que uma potenciação de longa duração nas sinapses de CA1 em animais jovens (P15-P60) é mais fácil de ser induzida do que em animais adultos (HARRIS & TAYLER, 1984; IZUMI & ZORUMSKI, 1995).

Quanto a maturação das estruturas encefálicas, a formação hipocampal estaria madura por volta do segundo mês de vida (MARTIN PD et al., 2002), mas o córtex pré-frontal somente estabilizaria sua maturação em períodos posteriores (SHING, Y.L., et al. 2010).

Modelos de memória postulam que o componente estratégico da memória episódica depende primariamente do córtex pré-frontal, enquanto os componentes associativos dependem mais da região temporal medial (especialmente do hipocampo). Como é requerida a comunicação entre essas estruturas para a aquisição ocorrer de maneira adequada, se elas não estiverem completamente estabelecidas podem ocorrer déficits na ‘qualidade’ da memória (SHING, Y.L., et al. 2010), o que poderia ser uma possível explicação para os nossos resultados.

Análises estruturais em humanos demonstram que há redução de substância cinzenta nas porções do lobo temporal e CPF dorsolateral durante adolescência tardia, ocorrendo concomitantemente ao aumento de substância branca, aumento da mielinização e calibre dos axônios. Desenvolvimento de substância branca está diretamente relacionado com o aumento

na integração funcional de regiões de substância cinzenta, sugerindo atividade de redes mais distribuídas através do desenvolvimento. Adolescentes geralmente ativam estruturas cognitivas e afetivas similares, no entanto, com diferentes magnitudes ou padrões espaciais e temporais, ou níveis de interconectividade funcional (STURMAN DA, 2011).

Quanto aos déficits encontrados na distinção contextual nos animais de meia-idade e idosos, alguns trabalhos podem nos ajudar a entender o porquê desse resultado. Como sabemos, o avançar da idade normalmente vem acompanhado de diminuição no aprendizado e na memória, mesmo em condições não patológicas. Existe uma clara correlação entre a diminuição nas tarefas comportamentais dependentes do hipocampo em ratos idosos e atividade anômala das assembléias/conjuntos de neurônios hipocampais. Esses déficits relacionados com a idade incluem retardo na formação e diminuição na estabilidade dos mapas cognitivos (BARNES *et al* 1997). Estudos eletrofisiológicos *ex vivo* proporcionam evidências adicionais dos distúrbios relacionados com a idade na plasticidade envolvendo múltiplos tipos de neurônios e vias. Por exemplo, camundongos velhos exibem diminuição na transmissão sináptica basal (GERRARD *et al.* 2008). Também ocorrem alterações nas proteínas relacionadas à neurotransmissão (VANGUILDER HD 2011 e 2010). Além disso, LTP é mais difícil de estabilizar em ratos velhos que em jovens ou adultos (NORRIS *et al.* 1996) e ocorre via mecanismos alternativos (Boric *et al.* 2008), persistindo por menos tempo (SIERRA-MERCADO *et al.* 2008). LTD hipocampal e depotenciação são mais facilmente facilitadas nessa idade (NORRIS *et al.* 1996; Rosenzweig & Barnes 2003). Esses trabalhos de eletrofisiologia nos sugerem que a comunicação sináptica vai enfraquecendo com o avançar da idade. Além disso, são observados declínio na neurogênese (BONDOLFI *et al.*, 2004) e diminuição da expressão de neurotrofinas. Segundo CLAYTON DA, 2001; 2002 e GUILARTE TR, 1998 animais idosos apresentam uma diminuição na subunidade NR2b do receptor NMDA, subunidade que estaria envolvida nos processos de memória e aprendizagem, podendo ser uma alteração molecular responsável pelos déficits na precisão da memória.

O mais interessante dos nossos resultados é que a precisão parece seguir uma curva em U invertido através das idades, tendo o pico de detalhamento/distinção contextual na idade adulta, sendo inferior nos animais adolescentes e nos animais velhos. Mas esses resultados ainda são preliminares e não queremos tirar conclusões precipitadas. Para poder discutir

melhor o que ocorre na ontogenia da formação mnemônica realizaremos mais experimentos (detalhes encontram-se nas perspectivas).

7. CONCLUSÕES

1. Foi observado que ratos de 47 a 49 dias de vida (considerados “adolescentes”), testados em diferentes intervalos de tempo (2, 5 e 14 dias) após o treino, tinham a memória precisa com 2 e 5 dias, sendo que aos 14 dias a memória tornava-se genérica.(Figura 14); não foram feitos experimentos em tempos posteriores a 14 dias porque consideramos que quando a memória torna-se genérica ela continua genérica com o avançar do tempo.
2. Foi observado que ratos de 80 a 90 dias de vida (considerados “adultos”), testados em diferentes intervalos de tempo (2 e 28 dias) após o treino, mantinham a memória precisa aos 2 dias, porém aos 28 ela tornava-se genérica (Figura 15); não foram feitos experimentos em tempos intermediários porque consideramos trabalhos anteriores que mostram que a memória em animais adultos tornam-se genéricas apenas com 28 dias.
3. Foi observado que ratos de mais de um ano de vida (considerados de “meia-idade”), testados 2 dias após o treino já tinham sua memória genérica (Figura 16); não foram realizados experimentos em tempos posteriores (5, 14, 21, 28) porque consideramos que quando a memória torna-se genérica ela continua genérica com o avançar do tempo.
4. Foi verificado que ratos de 47 a 49 dias de vida (considerados “adolescentes”), treinado 5 dias antes em um contexto mais ou menos similar A, e reativados, no meio deste período em um contexto híbrido AB, não demonstravam diferença significativa quando comparados aos um animais não-reativados (Figura 17).
5. Foi verificado que ratos de 80 a 90 dias de vida (considerados “adultos”), treinado 5 dias antes em um contexto mais ou menos similar A, e reativados, no meio deste período em um contexto híbrido AB, demonstravam diferença significativa no reconhecimento do contexto B quando comparados com os animais não reativados; sendo que os reativados reconheceram o contexto B como familiar enquanto os outros não (Figura 18).
6. Foi verificado que ratos de ~2 anos de vida (considerados “velhos”), treinado 5 dias antes em um contexto mais ou menos similar A, e reativados, no meio deste período em um contexto híbrido AB, não demonstravam diferença significativa quando comparados aos um animais não-reativados (Figura 19).

7. Para fins de controle, foi avaliada a motricidade dos animais dessas três idades, mediante a exploração de um campo aberto, não sendo encontrada diferença significativa entre os grupos (Figura 20).
8. Para fins de controle, foi avaliada a resposta de ansiedade das três idades mediante a tarefa de transição claro-escuro, não sendo encontrada diferença significativa entre os grupos (Figura 21).

8. PERSPECTIVAS

1. Avaliar o comportamento em tarefas menos aversivas que também tenham o componente espacial (labirinto aquático de Morris);
2. Inativar farmacologicamente o hipocampo (2, 5, 14, 28 dias após o treino) para demonstrar se está ocorrendo, e, em que período está ocorrendo, a consolidação sistêmica, e se ela está relacionada com a generalização;
3. Quantificar receptores e proteínas que possam estar envolvidas nos déficits;
4. Observar as diferenças na indução de LTP;

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN S.L. - Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 2003
- ANDERSEN SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH., - Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse*, 2000
- BARNES CA, Suster MS, Shen J, McNaughton BL., - Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature*, 1997
- BONDOLFI L, Ermini F, Long JM, Ingram DK, Jucker M. - Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiol Aging*, 2004
- CLAYTON DA, Browning MD. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. *Neurobiol Aging*. 2001
- CLAYTON DA, Mesches MH, Alvarez E, Bickford PC, Browning MD. - A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat. *J Neurosci*. 2002
- DUDAI, Y. and Morris, R.G.M. 2000. To consolidate or not to consolidate: What are the questions? *Brain, perception, memory. Advances in cognitive sciences* (ed. J. J. Bulhuis), pp. 149–162. Oxford University Press, Oxford, UK
- DE OLIVEIRA ALVARES, Santana F, Cassini L, Haubrich J, Crestani AP, Quillfeldt, JA Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus - *Hippocampus*, 2011
- FREEMAN WM, VanGuilder HD, Bennett C, Sonntag WE. - Cognitive performance and age-related changes in the hippocampal proteome. *Neuroscience*, 2009
- GERRARD JL, Burke SN, McNaughton BL, Barnes CA. - Sequence reactivation in the hippocampus is impaired in aged rats. - *J Neurosci*, 2008
- HARRIS & Tayler. - Developmental onset of long-term potentiation in area CA1 of the rat hippocampus. - *J Physiol*, 1984.
- GRAY, J. A. 1982. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. Oxford, Clarendon.
- GREEN, J. D. 1964. The hippocampus. *Physiol. Rev.*, 44: 561-608.
- GUILARTE TR, McGlothan JL. - Hippocampal NMDA receptor mRNA undergoes subunit specific changes during developmental lead exposure. *Brain Res*. 1998
- ITSKOV, V; Hansel, D; Tsodyks, M - Short-term facilitation may stabilize parametric working memory trace. – - *Front Comput Neurosci*. 2011

IZQUIERDO, Iván Antonio – Estudos Avançados – FINEP, 1998

IZQUIERDO, Iván Antonio – Memória – Editora Artmed, 2010 (livro)

IZQUIERDO, Iván Antonio – Questões sobre memória – Editora Unisinos, 2009 (livro)

IZUMI & Zorumski - Developmental changes in long-term potentiation in CA1 rats hippocampus slices. *Synapse*, 1995.

JINNO, S - Decline in adult neurogenesis during aging follows a topographic pattern in the mouse hippocampus - *J Comp Neurol.*, 2011.

KENNARD JA, Woodruff-Pak DS- Age sensitivity of behavioral tests and brain substrates of normal aging mice – *Frontiers in aging neuroscience*, 2011.

KIM JJ and Fanselow MS - Modality-specific retrograde amnesia of fear – *Science*, 1992

KOSHIBU K, Levitt P, Ahrens ET., - Sex-specific, postpuberty changes in mouse brain structures revealed by three-dimensional magnetic resonance microscopy. *Neuroimage*, 2004

KUMAR, A. - Long-term potentiation at CA3-CA1 hippocampal synapses with special emphasis on aging, disease and stress. - *Front Aging Neurosci.* , 2011

MARKHAM JA, Morris JR, Juraska JM. - Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. – *Neuroscience*, 2007

MARKOWITSCH, H. J. & PRITZEL, M.. The neuropathology of amnesia. *Progr. Neurobiol.*, 25: 189-287. 1985

MARTIN PD, Berthoz A. - Development of spatial firing in the hippocampus of young rats. - *Hippocampus.* , 2002

MCGAUGH, J. L.. Modulation of memory storage processes. In: SOLOMON, P. R. et al. *Perspectives of memory research*. New York, Springer Verlag. p. 33-64. 1988

MISANIN JR, Miller RR, Lewis DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace.- *Science*. 1968

MCCORMICK CM, Smith C, Mathews IZ., - Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. - *Behav Brain Res*, 2008

MCCORNICK C. M. and Mathews I.Z.,– Adolescent development, hypothalamic-pituitary-adrenal function, and programming of adult learning and memory. - *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* , 2011

McCUTCHEON J.E. and Marinelli M. – Age matters, *Eur J Neurosci*. 2009

MOLL GH, Mehnert C, Wicker M, Bock N, Rothenberger A, Rütther E, Huether G.- Age-associated changes in the densities of presynaptic monoamine transporters in different regions of the rat brain from early juvenile life to late adulthood. - *Brain Res Dev Brain Res.* , 2000

NORRIS CM, Korol DL, Foster TC., - Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. - *J Neurosci*, 1996

PIGNATELLI D, Xiao F, Gouveia AM, Ferreira JG, Vinson GP. - Adrenarche in the rat. - *J Endocrinol.*, 2006

RAPP PR, Gallagher M. - Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc Natl Acad Sci.*, 1996

ROSENZWEIG ES, Redish AD, McNaughton BL, Barnes CA., - Hippocampal map realignment and spatial learning. *Nat Neurosci*, 2003

ROSENZWEIG ES, Barnes CA. - Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog Neurobiol*, 2003

RUBINOW MJ, Juraska JM., - Neuron and glia numbers in the basolateral nucleus of the amygdala from preweaning through old age in male and female rats: a stereological study. *Journal of Comparative Neurology*, 2009

SHI L, Adams M, Brunso-Bechtold JK. - Subtle Alterations in Glutamatergic Synapses Underlie the Aging-Related Decline in Hippocampal Function. - *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms* (book), 2007

SHING YE, Werkle-Bergner M, Brehmer Y, Müller V, Li S, Lindenberger U – Episodic memory across the lifespan: the contributions of associative and strategic components – *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 2010.

STURMAN DA, Moghaddam B – *The Neurobiology of adolescence: Changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies*, 2011.

SQUIRE, L.R.. *Memory and brain*. Oxford, Oxford University Press. 1987

TERRY Jr A., Kutiyawalla A, Pillai A - Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory rats - *Physiology & Behavior*, 2011

VANGUILDER HD and Freeman WF - The hippocampal neuroproteome with aging and cognitive decline: past progress and future directions – *Frontiers in aging neuroscience*, 2011

VANGUILDER HD, Yan H, Farley JA, Sonntag WE and Freeman WM- Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome - *J Neurochem.*, 2010

WEITZDÖRFER R, Höger H, Shim KS, Cekici L, Pollak A, Lubec G. - Changes of hippocampal signaling protein levels during postnatal brain development in the rat. *Hippocampus*, 2008

WEISKRANTZ, L. On issues and theories of the human amnesic syndrome. In: Weinberger, N. M. et al. Memory systems of the brain. New York, Guilford. p. 380-415. 1985

WILTGEN BJ, Silva AJ. Memory for context becomes less specific with time. Learn Mem., 2007