

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO A UM  
AMBIENTE ENRIQUECIDO NA MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS: UMA  
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

**BRUNA ZANETTI ROHOR**

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia**

**Universidade Federal do Espírito Santo  
Vitória, dezembro de 2015**

**BRUNA ZANETTI ROHOR**

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO A UM  
AMBIENTE ENRIQUECIDO NA MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS: UMA  
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E MOLECULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva

**Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória, dezembro de 2015**

**ESPAÇO RESERVADO PARA ATA DE DEFESA**

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo

**Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental do Departamento de Fisiologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio das seguintes instituições:**

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
  - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)**
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui, mesmo diante das dificuldades.

À minha mãe Gorete, por sempre ter me apoiado e me incentivado a continuar, por ter me ajudado nos momentos difíceis, e pelo colo de mãe.

Ao meu pai Miguel (*in memoriam*), que enquanto esteve presente, cuidou de mim e me incentivou a estudar.

Ao meu esposo Leonardo, por todo amor, cuidado e dedicação, e pela enorme paciência e compreensão.

À minha orientadora Rita e co-orientadora Cristina, pela confiança em mim depositada para realização deste trabalho, pelos ensinamentos, e pela paciência durante esses anos.

À todos os professores que contibuiram para minha formação.

Aos meus amigos e familiares, que sempre me deram força, mas que muitas vezes tive que abandoná-los por falta de tempo.

Aos camundongos, por terem morrido para que eu pudesse realizar esse estudo.

A todos do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental, pelos dias de convívio, pelas risadas, pela ajuda sempre que necessária. À Lorena e Tamara, pelo ensinamento e suporte em diversos protocolos, e à Alice pela imensa ajuda no Western blotting.

À FAPES e CAPES, pelo apoio financeiro.

A toda equipe do LABIOM, pelo apoio técnico.

A todos que contribuíram para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Alterações cognitivas induzidas pelo AE.....	19
1.1.1	Memória.....	19
1.1.1.1	Classificação dos tipos de memória.....	19
1.1.1.2	Memória x AE.....	21
1.1.2	Interação Social x AE.....	22
1.2	Alterações nos sistemas neurotransmissores induzidas pelo AE.....	22
1.2.1	Sistema colinérgico.....	23
1.2.2	Sistema glutamatérgico.....	24
1.2.3	Sistema endocanabinóide.....	26
1.3	Fatores neurotróficos x AE.....	29
1.3.1	Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).....	29
1.3.2	Fator neurotrófico derivado da glia (GDNF).....	30
1.4	Resultados heterogêneos induzidos pelo AE.....	30
2	JUSTIFICATIVA.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	Objetivo geral.....	34
3.2	Objetivos específicos.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Animais.....	35
4.2	Delineamento experimental.....	35
4.3	Ambiente enriquecido.....	36
4.4	Teste de reconhecimento de objetos (TRO).....	37
4.5	Teste de reconhecimento social (TRS) e Teste de interação Social (TIS) .....	38
4.6	Análise da expressão gênica .....	40

4.7	Análise da expressão protéica.....	42
4.8	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Análise dos parâmetros cognitivos.....	44
5.1.1	Ambiente enriquecido por 30 dias.....	44
5.1.1.1	Teste de reconhecimento de objetos (TRO) – 30.....	44
5.1.1.1.1	Memória de curta duração (TRO MCD 30).....	44
5.1.1.1.2	Memória de longa duração (TRO MLD 30).....	45
5.1.1.2	Teste de reconhecimento social (TRS) – 30.....	46
5.1.1.2.1	Memória de curta duração (TRS MCD 30).....	46
5.1.1.2.2	Memória de longa duração (TRS MLD 30).....	47
5.1.1.3	Teste de interação social (TIS) – 30.....	48
5.1.2	Ambiente enriquecido por 60 dias.....	49
5.1.2.1	Teste de reconhecimento de objetos (TRO) – 60.....	49
5.1.2.1.1	Memória de curta duração (TRO MCD 60).....	49
5.1.2.1.2	Memória de longa duração (TRO MLD 60).....	50
5.1.2.2	Teste de reconhecimento social (TRS) – 60.....	52
5.1.2.2.1	Memória de curta duração (TRS MCD 60).....	52
5.1.2.2.2	Memória de longa duração (TRS MLD 60).....	53
5.1.2.3	Teste de interação social (TIS) – 60.....	53
5.2	Análise da expressão gênica no córtex.....	54
5.2.1	Ambiente enriquecido por 30 dias.....	54
5.2.1.1	Expressão gênica do sistema colinérgico – 30.....	54
5.2.1.2	Expressão gênica do sistema glutamatérgico – 30.....	55
5.2.1.3	Expressão gênica do sistema endocanabinóide – 30.....	56
5.2.2	Ambiente enriquecido por 60 dias.....	57



5.2.2.1	Expressão gênica do sistema colinérgico – 60.....	57
5.2.2.2	Expressão gênica do sistema glutamatérgico – 60.....	58
5.2.2.3	Expressão gênica do sistema endocanabinóide – 60.....	59
5.3	Análise da expressão protéica no córtex.....	60
5.3.1	Ambiente enriquecido por 30 dias.....	60
5.3.2	Ambiente enriquecido por 60 dias.....	61
6	DISCUSSÃO.....	63
7	CONCLUSÕES.....	72
8	REFERÊNCIAS.....	73

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Desenho esquemático do AE e das áreas afetadas pela estimulação sensorial, motora e cognitiva
- Figura 2 - Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica
- Figura 3 - Desenho esquemático da neurotransmissão glutamatérgica
- Figura 4 - Desenho esquemático do sistema endocanabinóide
- Figura 5 - Delineamento experimental
- Figura 6 - Ambiente enriquecido (A) e Ambiente padrão (B)
- Figura 7 - Esquema dos objetos utilizados no TRO (A) e Esquema do TRO (B)
- Figura 8 - Imagem do teste de reconhecimento social (A), aparato cilíndrico transparente com furos utilizado nos testes de reconhecimento social e interação social (B), esquema do TIS (C) e esquema do TRS (D)
- Figura 9 - Teste de reconhecimento de objetos (MCD 30)
- Figura 10 - Teste de reconhecimento de objetos (MLD 30)
- Figura 11 - Teste de reconhecimento social (MCD 30)
- Figura 12 - Teste de reconhecimento social (MLD 30)
- Figura 13 - Teste de interação social (30)
- Figura 14 - Teste de reconhecimento de objetos (MCD 60)
- Figura 15 - Teste de reconhecimento de objetos (MLD 60)
- Figura 16 - Teste de reconhecimento social (MCD 60)
- Figura 17 - Teste de reconhecimento social (MLD 60)
- Figura 18 - Teste de interação social (60)
- Figura 19 - Expressão gênica no sistema colinérgico (30)
- Figura 20 - Expressão gênica no sistema glutamatérgico (30)
- Figura 21 - Expressão gênica no sistema endocanabinóide (30)
- Figura 22 - Expressão gênica no sistema colinérgico (60)
- Figura 23 - Expressão gênica no sistema glutamatérgico (60)
- Figura 24 - Expressão gênica no sistema endocanabinóide (60)
- Figura 25 - Expressão protéica dos fatores neurotróficos (30)
- Figura 26 - Expressão protéica dos fatores neurotróficos (60)

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoil glicerol
AA	Ácido araquidônico
Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AE	Ambiente enriquecido
AE30	Ambiente enriquecido por 30 dias
AE60	Ambiente enriquecido por 60 dias
AEA	Anandamida, N-araquidonoil etanolamina
AMPA	Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico
ANOVA	Análise de variância
AP	Ambiente padrão
AP30	Ambiente padrão por 30 dias
AP60	Ambiente padrão por 60 dias
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CB1 e CB2	Receptores canabinóides 1 e 2
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
ChAT	Colina-O-acetil-transferase
ChT1	Transportador de colina de alta afinidade
DAGL	sn-1-diacilglicerol lípase seletiva
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ET	Etanolamina
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFL	Família de ligantes de GDNF
Glu	Glutamato
GluR2 e GluR4	Subunidades 2 e 4 do receptor AMPA
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IR	Índice de reconhecimento
IS	Isolamento social
K <sup>+</sup>	Íon potássio

KA	Cainato
MAGL	Monoacil glicerol lipase
MCD	Memória de curta duração
mGluR1-8	Subtipos 1 ao 8 de receptores glutamatérgicos metabotrópicos
mGluR5	Subtipo 5 do receptor glutamatérgico metabotrópico
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MLD	Memória de longa duração
MPEP	2-metil-6-(feniletil)-piridina
MPTP	1-metil-4-phenil-1,2,3,6-tetrahidropiridine
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	N-metil-D-aspartato
NAPE-PLD	N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva
OBJ A, A1, A2 e B	Objeto A, A1, A2 e B
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PNU	PNU-282987
PVDF	Fluoreto polivinidileno
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervoso central
TAE	Transportador de aminoácido excitatório
TIS	Teste de interação social
TRO	Teste de reconhecimento de objetos
TRS	Teste de reconhecimento social
TVGlu	Transportador vesicular de glutamato
VACHT	Transportador vesicular de acetilcolina

## RESUMO

O ambiente é formado pelo conjunto de situações que rodeiam o indivíduo e possui influência sobre todos os organismos. Um ambiente estressor possui influências negativas sobre um indivíduo, mas um ambiente enriquecido (AE) possui influências positivas. Em animais, o AE é definido como uma combinação de estímulos complexos inanimados e sociais capazes de melhorar as funções motoras, cognitivas e sensoriais. O AE é composto por diferentes objetos, com diferentes formas, tamanhos, cores, texturas, entre outros. A novidade ambiental, atividade física voluntária e o convívio social também fazem parte do AE. O AE é capaz de promover melhora visual, sensorial, cognitiva e motora. Já foram observados efeitos induzidos pelo AE, como melhora cognitiva, aumento da plasticidade sináptica, neurogênese hipocampal em adultos, modulação da expressão gênica e alterações nos níveis de neurotransmissores e fatores neurotróficos. No entanto, vários paradigmas de AE são encontrados na literatura, e essa variedade de protocolos gera uma série de resultados controversos sobre os efeitos induzidos pelo AE. O tempo é um importante fator que influencia os efeitos que o AE é capaz de causar. Diante deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as alterações cognitivas e moleculares observadas em camundongos expostos ao AE ou ao ambiente padrão (AP) por 30 ou 60 dias, a fim de verificar se o tempo de exposição afeta os parâmetros avaliados. Para isso foram realizados testes cognitivos de reconhecimento de objetos e social, de interação social, e ensaios moleculares de componentes pertencentes a sistemas neurotransmissores e fatores neurotróficos, que participam dos processos de cognição, na região do córtex cerebral, sendo eles os sistemas colinérgico, glutamatérgico e endocanabinóide, e os fatores neurotróficos BDNF e GDNF. O AE de 30 ou 60 dias não induziu efeitos nas memórias avaliadas, porém ambos os tempos de exposição aumentaram a interação social dos camundongos. O AE por 30 dias provocou a diminuição da expressão gênica de  $\alpha 7$ , M1, mGluR5, e o aumento na expressão gênica da MAGL, no córtex total. O AE por 60 dias diminuiu a expressão gênica de M1 e de DAGL, mas aumentou a expressão gênica de CHAT e FAAH. Ambos os tempos de exposição aumentaram a expressão protéica de BDNF. Nesse contexto, o presente estudo demonstra que diferentes tempos de exposição ao AE podem induzir respostas variadas aos parâmetros cognitivos e moleculares avaliados. Estudos mais detalhados como o presente, são importantes na determinação de quais protocolos

de enriquecimento ambiental são ideais para a prevenção e/ou tratamento de vários processos neurodegenerativos como doenças de Parkinson, Huntington, Alzheimer, abuso de drogas entre outros.

Palavras-chave: Ambiente enriquecido; memória; interação social; sistema colinérgico; sistema glutamatérgico; sistema endocanabinóide.

## ABSTRACT

The environment is formed by a set of situations around the individual and has influence on all organisms. A stressor environment has negative influences in a subject, but an enriched environment (EE) has positive influences. In animals, the AE is defined as a combination of inanimate and social complex stimuli that can improve motor, cognitive and sensory functions. The EE is composed of different objects of different shapes, sizes, colors, textures, among others. Environmental novelty, voluntary physical activity and social interaction are also part of EE. The EE is capable of promoting increased visual, sensory, cognitive and motor functions. Cognitive improvement, increased synaptic plasticity, adult hippocampal neurogenesis, modulation of gene expression and changes in levels of neurotransmitters and neurotrophic factors are EE-induced alterations already described. However, several EE paradigms are found in the literature, and this variety of protocols produces a range of controversial results on the effects induced by EE. Time is an important factor that influences the effects induced by the EE. In this context, the aim of this study was to evaluate the cognitive and molecular changes observed in mice exposed to EE or SE (standard environment) for 30 or 60 days, to check if the exposure time affects those parameters. We performed object recognition and social memory tests, social interaction test, and evaluated components belonging to cholinergic and glutamatergic neurotransmitter systems, endocannabinoid system and neurotrophic factors, such as BDNF and GDNF, which are all associated to cognitive processes in the cortex. The EE exposure for 30 or 60 days did not induce effects on object recognition and social memories, but both exposure times increased social interaction in mice. The EE for 30 days causes a decreased gene expression of  $\alpha 7$ , M1, mGluR5 receptors, and an increase in the gene expression of MAGL. The EE for 60 days decreased the gene expression of M1 and DAGL, but increased the gene expression of ChAT and FAAH. Both exposure times increased the protein expression of BDNF. In this context, this study demonstrates that different exposure times to EE can induce different responses to cognitive and molecular parameters evaluated. It also suggests that more studies regarding the different effects of time exposure to EE must be conducted in order to define the different protocols that could be used in the prevention and/or treatment of

neurodegenerative diseases's such as Parkinson's disease, Huntington's disease, Alzheimer disease, drug addiction, among others.

Keywords: Enriched environment; memory; social interaction; cholinergic system; glutamatergic system; endocannabinoid system.



# 1 INTRODUÇÃO

A interação dos organismos com os seus ambientes foi observada, primeiramente em 1802, pelo naturalista Lamarck, o qual verificou que os organismos eram forçados a se adaptarem às mudanças ocorridas no ambiente que viviam, através de alterações comportamentais e estruturais (LAMARCK, 1802, *apud* SOLINAS et al, 2010). Algum tempo depois, em 1859, Charles Darwin mostrou que coelhos selvagens que viviam livres possuíam cérebros maiores que coelhos que viviam em gaiolas, demonstrando, também, que o ambiente tinha consequências diretas na anatomia e comportamento das espécies (DARWIN, 1859, *apud* SOLINAS et al, 2010). A partir da hipótese de que a experiência de vida era capaz de causar modificações no cérebro e a consequente adaptação comportamental, no final do século 19, Santiago Ramon y Cajal formulou a hipótese que o aprendizado obtido pela experiência de vida está relacionado à plasticidade sináptica (RAMON Y CAJAL, 1894, *apud* SOLINAS et al, 2010).

O ambiente inclui todos os fatores que cercam a vida do indivíduo. Em humanos pode-se considerar o local de moradia, lugares que frequentam, condições sócio-econômicas, relações sociais, etc. (JESSOR e JESSOR, 1980; KODJO e KLEIN, 2002). Um ambiente estressor leva a experiências de vida negativas, podendo gerar estresse, depressão, déficit cognitivo e alta vulnerabilidade às drogas. Experiências de vida positivas são proporcionadas pelo ambiente enriquecido (AE) (DE BELLIS, 2002; SINHA, 2001).

Em animais, o AE é considerado o local de habitação que possui uma combinação de estímulos complexos inanimados e sociais (ROSENZWEIG E BENNETT, 1969), que proporcionam uma variedade de estímulos sensoriais, motores e cognitivos (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006) (Figura 1). Em laboratório, o ambiente é considerado enriquecido quando é complexo e variável. Dessa forma, o AE é formado por caixas grandes, contendo diversos objetos, de diferentes cores, formas, texturas e tamanhos, que são trocados periodicamente e mudados de posição, gerando sempre uma novidade ambiental comparado ao ambiente padrão, para estimular a curiosidade e exploração do animal, e permitir a formação de mapas espaciais pelo animal (ROSENZWEIG et al, 1978; ROSENZWEIG e BENNETT, 1996; VAN PRAAG et al, 2000;

NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006; LAVIOLA et al, 2008). Esse ambiente possui túneis, brinquedos, casinhas e rodas giratórias para prática voluntária de exercício físico (VAN PRAAG et al, 2000; NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

O primeiro paradigma experimental do AE foi realizado por Donald Hebb em 1947, onde verificou que ratos que viviam livremente em sua casa possuíam uma memória melhor que ratos que viviam em gaiolas no laboratório (HEBB, 1947). Desde então, vários estudos vem sendo realizados a fim de elucidar os efeitos causados pelo AE em processos cognitivos ou não (RAMPON et al, 2000; VAN PRAAG et al, 2000; BEZARD et al, 2003; NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006; SOLINAS et al, 2008; 2010; VIOLA et al, 2010; EL RAWAS et al, 2011; GUSMÃO et al, 2012; PANG e HANNAN, 2013; LIMA et al, 2014).

Alguns dos efeitos provocados pelo AE em roedores do tipo selvagem incluem a melhora cognitiva, o aumento da plasticidade sináptica, a neurogênese hipocampal em adultos, a modulação da expressão gênica e alterações nos níveis de neurotransmissores e fatores neurotróficos (FALKENBERG et al, 1992; ICKES et al, 2000; PANG e HANNAN, 2013).

Muitos estudos demonstram que o AE pode induzir efeitos diferentes tanto no comportamento, como nos mecanismos moleculares dos roedores (PARK et al, 1992; LU et al, 1997; KEMPERMANN et al. 1998; RAMPON et al. 2000; VAN PRAAG et al., 2000; TANG et al. 2001; MELENDEZ, et al, 2004; BRUEL-JUNGERMAN et al. 2005; MANAHAN-VAUGHAN e BRAUNEWELL, 2005; HATTORI et al. 2007; HUANG, et al. 2007; LLORENS-MARTÍN et al. 2007; XU et al. 2009; MESA-GRESA, et al, 2013). Entretanto, existe uma gama de resultados contraditórios, e isso se deve às variações nos protocolos de enriquecimento (HULLINGER, et al, 2015). Apesar dos vários estudos já realizados com AE, ainda não se tem um consenso sobre qual paradigma experimental é o ideal para atingir os efeitos benéficos do AE no cérebro e no comportamento dos animais (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

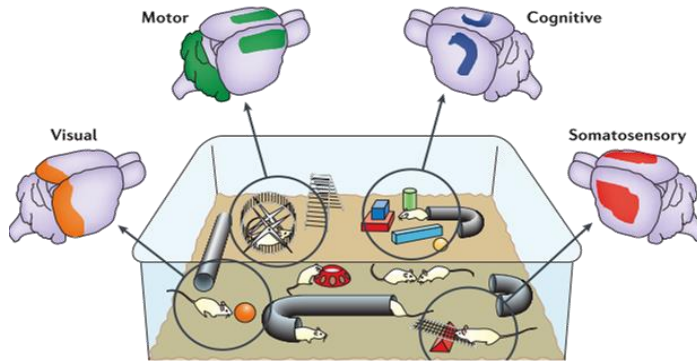


Figura 1 - Desenho esquemático do AE e das áreas afetadas pela estimulação sensorial, motora e cognitiva. O aumento dos estímulos sensoriais e visual ativa as áreas do córtex somatossensorial e visual. O aumento da estimulação cognitiva, com a formação de mapas espaciais e da novidade, ativa as regiões do hipocampo e córtex. O aumento da atividade motora, natural exploratória e através do exercício físico voluntário, ativa a região do córtex motor e cerebelo (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

## 1.1 Alterações cognitivas induzidas pelo AE

Estudos anteriores demonstram as alterações induzidas pelo AE em diversos parâmetros cognitivos, como melhora na memória (KEMPERMANN et al, 1998; RAMPON et al, 2000; TANG et al, 2001; BRUEL-JUNGERMAN et al, 2005, HUANG et al, 2007), efeitos tipo-ansiolítico (BENAROYA-MILSHTEIN et al, 2004; GALANI et al, 2007) e tipo-antidepressivo (HATTORI et al, 2007; LLORENS-MARTÍN et al, 2007; XU et al, 2009), e no aumento da interação social (VAN PRAAG et al, 2000; MESA-GRESA et al, 2013).

### 1.1.1 Memória

#### 1.1.1.1 Classificação dos tipos de memória

Para que uma memória seja formada, primeiro tem-se que aprender a informação.

Aprendizado pode ser considerado o processo de aquisição e elaboração da informação que modificará um comportamento subsequente (COLCIAGO et al, 2015). Só é possível gravar uma informação, se ela for aprendida (IZQUIERDO, 2011). O aprendizado transforma as experiências vividas em memória (KANDEL et al, 2000).

A memória pode ser dita como a habilidade de lembrar experiências passadas (COLCIAGO et al, 2015). Significa a aquisição, consolidação e evocação de informações (IZQUIERDO, 2011).

Existem vários tipos de memória, e distingui-las de acordo com o tempo que duram ou de acordo com o seu conteúdo são exemplos de como podem ser classificadas.

A classificação de acordo com o tempo leva em consideração o tempo que a memória permanece disponível para ser evocada após a aquisição. Observando o tempo de duração, as memórias podem ser divididas em: memória de trabalho, memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD) (IZQUIERDO, 2011; COLCIAGO et al, 2015)

A memória de trabalho é muito breve. É mantida por poucos segundos ou minutos, e serve para processar as informações que são necessárias em um determinado momento, por exemplo, quando conservamos um número de telefone tempo suficiente para discá-lo e logo depois é esquecido. Esse tipo de memória é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal (GOLDMAN-RAKIC, 1996; IZQUIERDO, 2011). A memória de trabalho é considerada um sistema gerenciador central, que vai manter a informação *online*, ou seja, mantém a informação viva por tempo suficiente para poder entrar na memória de curta ou longa duração (GOLDMAN-RAKIC, 1996; IZQUIERDO, 2011).

A memória de curta duração (MCD) pode ser evocada por alguns minutos até aproximadamente 6 horas depois da aquisição. Na MCD não ocorre a síntese de novas proteínas, apenas modificações de proteínas pré-existentes. Ela mantém a informação “viva” até que seja consolidada e formada a memória de longa duração (SQUIRE e KANDEL, 2003; IZQUIERDO, 1998, 2011)

A memória de longa duração (MLD) pode ser denominada como aquela que pode ser evocada por um tempo maior que 6 horas, pois é o tempo que a informação leva para ser consolidada (MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO et al, 2006). Podem durar dias ou anos, até por toda vida. Na formação da MLD, ocorre a síntese de novas proteínas (SQUIRE e KANDEL, 2003; IZQUIERDO, 1998, 2011).

A MCD e a MLD são processadas nas mesmas regiões do hipocampo e córtex, porém através de mecanismos distintos. A MLD não depende da formação da MCD, pois são processos paralelos, e isso pode ser demonstrado através de

estudos que suprimem a MCD sem causar prejuízos na MLD (IZQUIERDO, et al, 1998, 1999; IZQUIERDO, 2011).

As memórias também podem ser divididas em declarativas (explícitas) e não-declarativas (implícitas ou procedurais), de acordo com o seu conteúdo (SQUIRE, 1992; IZQUIERDO, 2011).

As memórias declarativas são as que registram fatos, eventos ou conhecimentos. São as memórias que se pode declarar que existem e como foram adquiridas. Entre elas, as que se referem a eventos são denominadas episódicas, e as de conhecimentos gerais são denominadas semânticas (SQUIRE, 1992; IZQUIERDO, 2011). Pode ser adquirida através de curtos períodos de exposição à informação a ser aprendida (WINTERS et al, 2008).

As memórias não-declarativas são as memórias de habilidades motoras e sensoriais, como andar de bicicleta e nadar, por exemplo. Não é possível declarar a existência da memória, apenas demonstrar que ela existe (SQUIRE, 1992; IZQUIERDO, 2011). Esse tipo de memória requer uma extensiva fase de aquisição (WINTERS et al, 2008).

Ambas as memórias são processadas em regiões do hipocampo e córtex. Podem ser também armazenadas na amígdala, quando possuírem um componente emocional (IZQUIERDO, 2011).

### **1.1.1.2 Memória x AE**

Diversos estudos demonstram os efeitos do AE nos variados tipos de memória de roedores (TANG et al, 2001; PEÑA et al, 2006; KAZLAUCKAS et al, 2011; BIRCH et al, 2013; LEGER et al, 2014; BAYAT et al, 2015; HULLINGER et al, 2015; NOVCOVIK et al, 2015).

O teste do labirinto em Y (*Y-maze*) demonstrou que o AE melhora a memória de trabalho de ratos (BIRCH et al, 2013). A melhora da memória de trabalho também já foi avaliada por Bayat e colaboradores (2015), em que verificaram que o AE melhorou a memória espacial operacional em ratos submetidos a um modelo de isquemia cerebral.

Um estudo prévio verificou que o AE melhora a memória de discriminação social de curta duração em ratos (PEÑA et al, 2006). Kazlauckas e colaboradores (2011) verificaram melhora na memória de reconhecimento de objetos de curta e

longa duração, e na memória aversiva de curta e longa duração em camundongos mantidos no AE.

A melhora nas memórias de reconhecimento de objetos e aversiva de longa duração em camundongos mantidos no AE também já foi observado em outro estudo (LEGER et al, 2014).

Outros trabalhos demonstram a melhora na memória de reconhecimento de objetos de longa duração induzido pelo AE em camundongos (TANG et al, 2001; NOVCOVIK et al, 2015) e em ratos (HULLINGER et al, 2015).

### **1.1.2 Interação Social x AE**

A interação social é a investigação realizada durante um encontro social entre animais co-específicos, e o contato entre os animais pode ser mensurado pelo tempo de investigação social (MESA-GRESA et al, 2013). Durante esse encontro social, os animais podem apresentar um comportamento exploratório, que é dito como comportamento social, que inclui a sociabilidade, definida pela investigação e o contato social entre os animais, ou comportamento agressivo (CHISTYAKOV et al, 2010; MESA-GRESA et al, 2013). O AE é capaz de promover uma maior interação social entre os animais (VAN PRAAG et al, 2000).

Já foi demonstrado que camundongos mantidos no AE apresentaram uma maior interação social que os animais mantidos no AP (MESA-GRESA et al, 2013).

## **1.2 Alterações nos sistemas neurotransmissores induzidas pelo AE**

Tendo como ponto de partida as alterações comportamentais induzidas pelo AE, vários estudos vêm investigando os efeitos do AE nos sistemas neurotransmissores (LU et al, 1997; WARBURTON et al, 2003; MELENDEZ et al, 2004; MANAHAN-VAUGHAN e BRAUNEWELL, 2005; DEL ARCO et al, 2006; RAWAS et al, 2011; LIMA et al, 2014).

As memórias são moduladas por diferentes sistemas neurotransmissores, dentre eles os sistemas colinérgico (PARK et al, 1992; BERARDI et al, 2007; DEL ARCO et al, 2007) e glutamatérgico (FOSTER et al, 1996; RAMPON et al, 2000;

BREDY, 2004; NAKA, 2005; LI et al, 2007; HU, et al, 2013) e pelo sistema neuromodulador endocanabinóide (WILSON e NICOLL, 2001; RAWAS, 2011; KATONA e FREUND, 2012).

### **1.2.1 Sistema colinérgico**

A acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores envolvidos na cognição e memória (WOOLF e BUTCHER, 2010).

A ACh é sintetizada no citoplasma de neurônios colinérgicos, a partir dos precursores acetil coenzima-A e colina, através de uma reação do tipo acetilação catalizada pela enzima Colina-O-Acetil-Transferase (ChAT). Realizada a biossíntese, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Após a exocitose, a ACh pode se ligar à receptores presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos. A ação da ACh é interrompida quando a enzima Acetilcolinesterase (AChE), presente na fenda sináptica, hidrolisa a ACh em acetato e colina. A colina pode ser recaptada para o neurônio pré-sináptico através do transportador de colina de alta afinidade (ChT1) (FUJII et al, 2008; MARTINS-SILVA 2008; VENTURA et al, 2010) (Figura 2).

O neurotransmissor ACh se liga a duas classes de receptores: os receptores nicotínicos, que possuem ação ionotrópica, e os receptores muscarínicos, de ação metabotrópica (KANDEL, et al, 2000). Os receptores nicotínicos são formados por várias subunidades e estão presentes em vários tecidos, como músculos e cérebro. Os receptores nicotínicos presentes no cérebro são formados pelas subunidades  $\alpha 2-10$  e  $\beta 2-4$  (MILLAR e GOTTI, 2009). A subunidade  $\alpha 7$  está presente nas regiões do córtex, hipocampo e tálamo (VENTURA et al, 2010). Os receptores muscarínicos são acoplados à proteína G e possuem cinco subtipos: M1, M2, M3, M4 e M5. O subtipo M1 pode ser encontrado em regiões do córtex, hipocampo e amígdala (LEVEY et al, 1994; VENTURA et al, 2010).

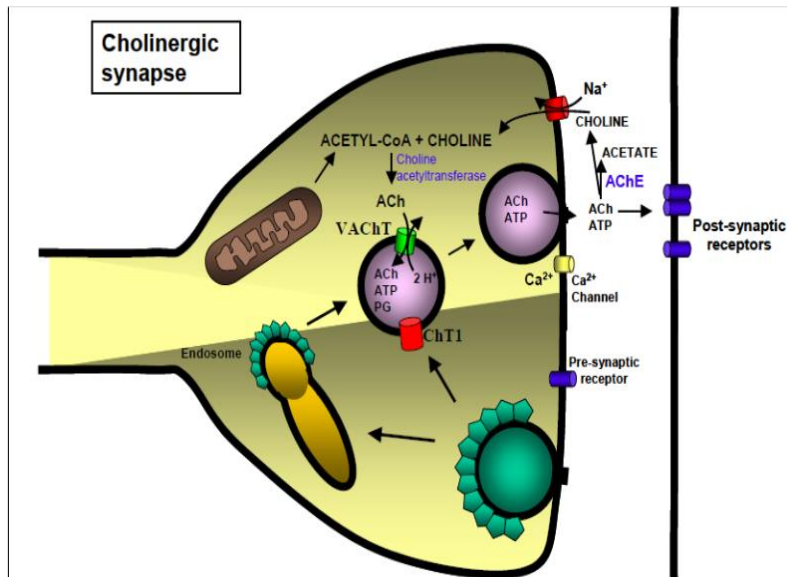


Figura 2 - Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica. A ACh é sintetizada pela ChAT e armazenada em vesículas sinápticas pelo transportador VAcHT. Após a excitação a ACh pode interagir com os receptores pós-sinápticos nicotínicos ou muscarínicos. Após a neurotransmissão, a ACh é degradada pela AChE e a colina é recaptada pelo transportador ChT1 (MARTINS-SILVA, 2008).

Estudos demonstram a participação do sistema colinérgico na memória e a influência do AE.

Animais tratados com escopolamina, um antagonista colinérgico que bloqueia os receptores muscarínicos, demonstram prejuízo na memória espacial e memória de reconhecimento (WARBURTON et al, 2003; LIMA et al, 2014). Quando submetidos ao AE, os efeitos amnésicos da escopolamina são reduzidos na memória espacial de referência (LIMA et al, 2014).

Outro estudo demonstra que animais mantidos no AE apresentaram melhor memória espacial e tiveram a atividade da ChAT aumentada, sugerindo aumento na síntese de ACh nas regiões do córtex e hipocampo (PARK et al, 1992).

Já foi verificado que um estímulo estressor é capaz de aumentar os níveis extracelulares de ACh (DAZZI et al, 2001). Animais submetidos a um modelo de estresse, mantidos no AE, apresentaram uma redução na liberação de ACh no córtex pré-frontal (DEL ARCO et al, 2006).

### 1.2.2 Sistema glutamatérgico

O glutamato (Glu) é um neurotransmissor excitatório e é o mais abundante no sistema nervoso central (SNC). Exerce papel fundamental nos processos



comportamentais como cognição e plasticidade neural (IZQUIERDO, 1994; PRYBYLOWSKI e WENTHOLD, 2004).

O Glu pode ser sintetizado principalmente a partir do precursor glutamina. Ao final da neurotransmissão, o Glu presente na fenda sináptica é captado pelas células da glia através do transportador de aminoácido excitatório (TAE) de alta afinidade. Ainda na glia, ele é convertido em glutamina pela ação da enzima glutamina sintetase. A glutamina liberada para o meio extracelular é transferida por transportadores específicos para o interior do neurônio pré-sináptico, onde é reconvertida em Glu pela ação da enzima glutaminase (MOUSSA et al, 2007). A maior parte do Glu sintetizado é armazenada em vesículas sinápticas através de transportadores vesiculares de Glu, onde pode armazenar concentrações até dez vezes maiores que as encontradas no citosol dos terminais pré-sinápticos (NICHOLS e ATWELL, 1990). Após sua liberação, o Glu pode se ligar no neurônio pós-sináptico através dos receptores ionotrópicos e metabotrópicos. (Figura 3).

Os receptores ionotrópicos (iGluRs) podem ser subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA) (BOWIE, 2008). Os receptores AMPA estão amplamente distribuídos pelo SNC, com predomínio em regiões hipocâmpais. Os receptores NMDA também se encontram presentes em todo SNC (OZAWA et al, 1998).

Os receptores metabotrópicos (mGluRs) estão distribuídos pelo SNC. Os mGluRs são acoplados à proteína G e são constituídos por 8 subtipos: mGluR1-8 (OZAWA et al, 1998). Os receptores mGluR5 desempenham papel importante nos processos de aprendizado e memória (CONN e PIN, 1997).

Estudos prévios demonstram os efeitos do AE sobre genes relacionados a formação de memória, plasticidade sináptica e síntese de proteínas, incluindo os receptores mGluR1-5 (MELENDEZ et al, 2004). O papel do receptor mGluR5 na memória já está bem estabelecido. Camundongos deficientes de mGluR5 mostraram prejuízo na memória espacial (LU et al, 1997) e aplicações diárias do antagonista de mGluR5 2-metil-6-(feniletil)-piridina (MPEP) causaram prejuízos nas memórias de trabalho e referência em ratos (MANAHAN-VAUGHAN e BRAUNEWELL, 2005).

Diversos estudos evidenciam as alterações provocadas pelo AE no sistema glutamatérgico, como, por exemplo, o aumento da ligação do Glu ao receptor AMPA (FOSTER et al, 1996), o aumento da expressão de genes relacionados ao receptor NMDA (RAMPON et al, 2000), o aumento da expressão de subunidades dos

receptores AMPA e NMDA em animais com cuidado maternal reduzido (BREDY, 2004), e aumento da expressão das subunidades GluR2 e GluR4 do receptor AMPA na região do hipocampo (NAKA, 2005).

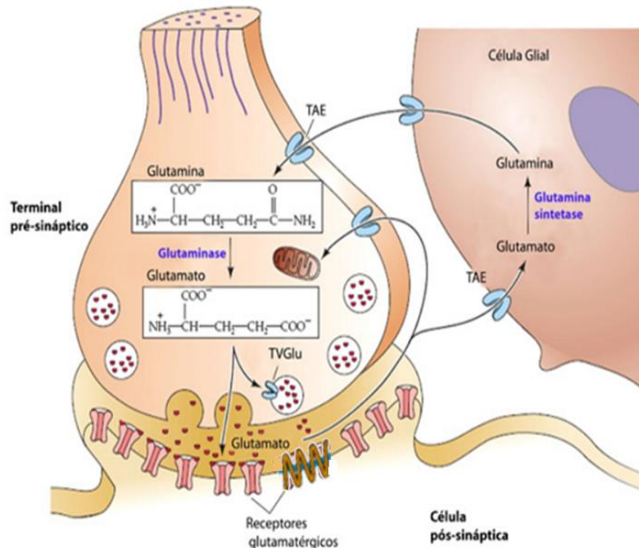


Figura 8 - Desenho esquemático da neurotransmissão glutamatérgica. O Glu é sintetizado pela glutaminase no neurônio pré-sináptico. Após a síntese, pode ser estocado em vesículas sinápticas através do TVGlu, ou liberado na fenda sináptica, podendo interagir com os receptores ionotrópicos e metabótrópicos presentes no neurônio pós-sináptico. Cessada a neurotransmissão, o Glu é captado pelas células da glia através do TAE, e reconvertido a glutamina pela glutamina sintetase (RUGGIERO et al, 2011).

### 1.2.3 Sistema endocanabinóide

O sistema endocanabinóide pode ser dito como um sistema neuromodulatório da liberação e ação dos neurotransmissores (DI MARZO et al, 1998). É formado pelos canabinóides endógenos, receptores canabinóides e pelas enzimas de síntese e degradação (Figura 4). Os canabinóides endógenos exercem, através da ligação com seus receptores, importantes ações sobre o SNC, como a regulação de funções cognitivas e das emoções em circuitos neuronais do córtex, hipocampo e amígdala (DE PETROCELLIS et al, 2004; DI MARZO et al, 2004).

Os principais canabinóides endógenos são a anandamida (*N*-araquidonoil etanolamina, AEA) e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG). Ambos são agonistas dos receptores canabinóides CB1 E CB2 (DE PETROCELLIS et al, 2004).

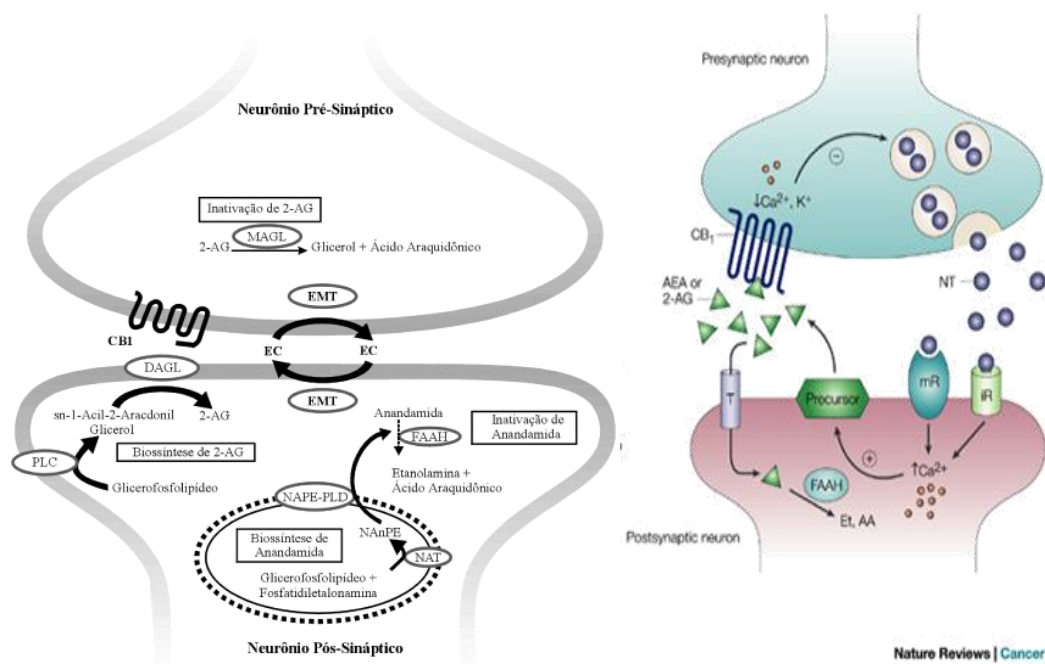
Os receptores CB1 estão entre os receptores acoplados à proteína G mais abundantes do SNC, embora também possam ser encontrados no sistema nervoso

periférico (DI MARZO et al, 2004). Os receptores CB2 se localizam em estruturas relacionadas à modulação do sistema imune e hematopoiese (COTA et al, 2003).

A biossíntese dos endocanabinóides ocorre no terminal pós-sináptico e é derivada do ácido araquidônico. A *N*-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) é a enzima que catalisa a biossíntese da AEA, e a *sn*-1-diacilglicerol lipase seletiva (DAGL) é a enzima que catalisa a biossíntese de 2-AG (BISOGLNO et al, 2003; DI MARZO et al, 2004; OKAMOTO et al, 2004). Após a síntese, os endocanabinóides são liberados dos neurônios para fenda sináptica, podendo se ligar nos receptores CB1 presentes no neurônio pré-sináptico. Os endocanabinóides podem então ser recaptados através de transportadores de membrana, para o interior dos neurônios pós-sinápticos. Uma vez recaptados, ambos endocanabinóides são degradados pela enzima ligada à membrana FAAH (fatty acid amide hydrolase), já a enzima MAGL (monoacyl glicerol lipase) catalisa a degradação de 2-AG. Os produtos gerados pela degradação de AEA e 2-AG são o ácido araquidônico (AA), etanolamina (ET) e glicerol (DE PETROCELLIS et al, 2004; DI MARZO et al, 2004).

No terminal pré-sináptico, a ação dos endocanabinóides sobre os receptores, leva a uma inibição dos canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependente, e uma abertura dos canais de  $K^+$ , levando a inibição da liberação dos neurotransmissores (DI MARZO et al, 2004).

Dessa forma, pode-se dizer que o sistema endocanabinóide age como um mensageiro retrógrado e é biossintetizado sob demanda (CHRISTIE e VAUGHAN, 2001; DI MARZO et al, 2004).



**Figura 4 - Desenho esquemático do sistema endocanabinóide.** No terminal pós-sinápticos, a partir de precursores derivados do ácido araquidônico, as enzima NAPE-PLD e DAGL catalizam a biossíntese dos endocanabinóides AEA e 2-AG, respectivamente. Na fenda sináptica os endocanabinóides se ligam no receptor pré-sináptico CB1. Após a neurotransmissão, a enzima FAAH degrada AEA e 2-AG, e a enzima MAGL degrada 2-AG. A ativação de CB1 ocasiona a inibição da liberação dos neurotransmissores do neurônio pré-sináptico (GUZMÁN, 2003; GODOY-MATOS et al, 2006).

Existem evidências que relacionam prejuízo na memória de trabalho à ativação dos receptores CB1 pela anandamida (MALLET e BENINGER, 1996). A melhora na memória olfativa relacionada ao bloqueio de CB1 pelo antagonista SR141716A também já foi evidenciada (TERRANOVA et al, 1996). O antagonista SR141716A induz o aumento da liberação de ACh, enquanto o agonista WIN55212-2 bloqueia a liberação de ACh no hipocampo, o que sugere que a liberação do neurotransmissor é modulada por canabinóides endógenos (GIFFORD et al 1996).

As ações do sistema endocanabinóide sobre os neurotransmissores são variadas. Na região do hipocampo, onde são encontrados AEA e 2-AG, a ativação dos receptores CB1 podem levar a inibição da liberação de Glu e ACh, e, conseqüentemente, prejuízos nos processos envolvidos no aprendizado e memória.

No córtex, onde também são encontrados AEA e 2-AG, a ativação dos receptores CB1 está relacionada à inibição da ativação dos receptores NMDA pelo Glu, ocasionando prejuízos na formação da memória e motores (DI MARZO et al, 1998).

O efeito do AE já foi verificado no sistema endocanabinóide, onde a animais mantidos no AE, comparados com AP apresentaram maior expressão gênica de CB1 no hipotálamo e amígdala basolateral e uma maior expressão gênica de FAAH (RAWAS et al, 2011).

### **1.3 Fatores neurotróficos x AE**

Durante o desenvolvimento, os fatores de crescimento desempenham papéis importantes na sinalização extracelular, regulando a proliferação e diferenciação celular no SNC (CALOF et al, 1995). Pesquisadores tem visto que, em organismos maduros, esses fatores exercem função sobre a plasticidade sináptica, aprendizado, enriquecimento, exercício e neurogênese (VAN PRAAG et al, 2000).

Estudos demonstram que a exposição ao AE aumenta a expressão gênica do fator de crescimento do nervo (NGF) (PHAM et al, 1999; RASIKA et al, 1999), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (FALKENBERG et al, 1992) e do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (YOUNG et al, 1999).

#### **1.3.1 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)**

BDNF é um fator de crescimento pertencente à família das neurotrofinas e está amplamente distribuído pelo SNC (MERLIO et al., 1993; CONNER et al., 1997). A sua forma madura possui uma massa molecular de aproximadamente 14 KDa (LEE et al, 2001).

Vários estudos têm sugerido a participação do BDNF nos processos de aprendizado e plasticidade sináptica (FISCHER et al, 1987; KANG et al, 1995; FIGUROV et al, 1996). A participação do BDNF em processos envolvidos na formação da memória, nas regiões do córtex cerebral e hipocampo, já foi verificada (KANG et al, 1995; KORTE et al, 1998; HUANG et al, 1999).

O AE é capaz de promover o aumento dos níveis de proteína de NGF (MOHAMMED et al, 1990; 1993; PHAM et al, 1999) e aumento na expressão gênica de BDNF e NGF (FALKENBERG et al, 1992; TORASDOTTER et al, 1996). Essas mudanças induzidas pelo AE podem ser associadas com a melhora na memória

espacial e no comportamento exploratório (FALKENBERG et al, 1992; PHAM et al, 1997).

### **1.3.2 Fator neurotrófico derivado da glia (GDNF)**

GDNF é um potente fator de crescimento para células neuronais e é membro fundador da família de ligantes de GDNF (GFL, GDNF family of ligands) (AIRAKSINEN et al, 2002). O seu monômero possui peso molecular de 16 KDa, porém sua forma biologicamente ativa se apresenta na forma de um homodímero, com peso molecular aproximado de 30 KDa (KASTIN et al, 2003; SAAVEDRA et al 2008). Através de análises de western blotting, a molécula de GDNF pode apresentar bandas de 55 KDa, devido a uma glicosilação na molécula (OKADA et al, 1999; KADDIS et al, 1996) é expresso nas células da glia presentes em regiões do hipocampo, mesencéfalo, cerebelo e córtex (MOGI et al, 2001).

Os efeitos do AE sobre GDNF já foram verificados anteriormente. Animais mantidos no AE apresentam maior expressão gênica de GDNF na região do hipocampo que animais mantidos no AP (YOUNG et al, 1999). Animais com parkinsonismo induzido por 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), que foram mantidos no AE, também apresentaram aumento na expressão gênica de GDNF na região da substância negra *pars compacta* (FAHERTY et al, 2004).

## **1.4 Resultados heterogêneos induzidos pelo AE**

O AE pode induzir resultados controversos principalmente pela variabilidade entre protocolos realizados, diferença no gênero, idade do animal no início da exposição e tempo de duração do AE (HATTORI et al, 2007; NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006). Não existe um consenso sobre qual paradigma do AE é o ideal para atingir os efeitos benéficos no cérebro e no comportamento dos animais (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

Leger e colaboradores, em 2014, demonstraram resultados heterogêneos em animais submetidos ao AE. Camundongos machos de 10 semanas de idade foram mantidos no AP ou AE por 24h, 1, 3, 5 ou 6 semanas. O AE foi formado por uma caixa grande (80 × 60 × 60 cm<sup>3</sup>) com vários objetos e uma roda de corrida, e 12

camundongos por caixa. Foi demonstrado que o AE por 3 semanas teve efeito tipo-ansiolítico, sendo que esse resultado não foi visto na exposição ao AE por 24h e 1 e 5 semanas. Efeitos controversos também foram verificados na memória desses animais. Foi observado a melhora da memória aversiva de longa duração nos animais mantidos no AE por 3 semanas, mas essa melhora não foi observado na exposição ao AE por 24h, 1 e 5 semanas. A exposição ao AE por 1, 3, 5 e 6 semanas induziu a melhora na memória de reconhecimento de objetos de longa duração nos animais avaliados, porém foi observado que o efeito máximo do AE ocorreu durante os tempos de 1 e 3 semanas, e a partir da quinta semana houve um declínio desse efeito (LEGER et al, 2014). Esses resultados demonstram que o tempo de exposição influenciou diretamente os efeitos induzidos pelo AE (LEGER et al, 2014).

Um estudo realizado por Birch et al (2013) também revelou resultados heterogêneos induzidos pelos diferentes tempos de exposição ao AE. Eles utilizaram ratos Wistar, de 3 meses de idade. O AE foi formado por uma caixa grande (59 cm x 31 cm) contendo diversos objetos, mas não roda de exercício. Foi observado uma melhora na memória de reconhecimento de objetos de longa duração nos animais mantidos no AE por 3 e 6 semanas, porém essa melhora não foi visto nos animais expostos ao AE por 2 semanas. A memória espacial também de longa duração melhorou nos animais expostos ao AE por 6 semanas. Também foi verificada melhora na memória de trabalho nos animais mantidos no AE por 7 semanas. A influência do tempo de duração da exposição ao AE pode ser observada na avaliação da memória de reconhecimento de objetos (BIRCH et al, 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos variados estudos realizados sobre os efeitos do AE em animais, existe uma grande heterogeneidade entre os resultados obtidos (REDOLAT e MESA-GRESA, 2011).

Como verificado em estudos anteriores, o tempo de exposição ao AE possui grande influência nos resultados obtidos (LEGER et al, 2014; BIRCH et al, 2015). Essa influência pode ser vista na melhora da memória aversiva em animais mantidos no AE por 3 semanas, mas não é observada nos tempos de 24h, 1 e 5 semanas de exposição (LEGER et al, 2014). Outra evidência da relação do tempo com o efeito induzido pelo AE é o declínio do efeito de melhora na memória de reconhecimento de objetos a partir da quinta semana, considerando o efeito máximo nos tempos de 1 e 3 semanas de exposição ao AE (LEGER et al, 2014). Birch e colaboradores (2015) demonstraram que a memória de reconhecimento de objetos é aumentada em animais expostos ao AE por 3 e 5 semanas, mas não por 2 semanas (BIRCH et al, 2015).

Embora muitos efeitos benéficos do AE já tenham sido relatados, não existe um consenso sobre qual paradigma do AE é o ideal para alcançar tais efeitos (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

Diante do exposto e dos variados tempos de exposição utilizados para acessar os efeitos do AE, encontrados na literatura, no presente estudo nós propusemos verificar se os tempos de 30 ou 60 dias de exposição ao AE têm influência nos efeitos do AE em parâmetros cognitivos e moleculares de camundongos.

O AE é capaz de melhorar prejuízos cognitivos e motores causados por desordens no SNC, como doença de Huntington, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, isquemia cerebral (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006) e adição às drogas (SOLINAS et al., 2010). Compreender as bases dos efeitos do AE é importante para o desenvolvimento de terapias não-farmacológicas e para descoberta de alvos moleculares que possam ser utilizados no desenvolvimento de agentes terapêuticos que mimetizem os efeitos benéficos do AE.

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo contribuir para o esclarecimento sobre os efeitos dos diferentes tempos de exposição ao AE em parâmetros cognitivos e moleculares, e servir como fonte de informação para



estudos posteriores que visem o desenvolvimento de novas terapias, baseadas nos efeitos benéficos do AE, que atenuem os sintomas e melhorem a qualidade de vida de pessoas acometidas por desordens no SNC.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar as alterações cognitivas e moleculares observadas em camundongos expostos ao AE ou ao AP por 30 ou 60 dias, para se verificar se o tempo de exposição afeta os parâmetros avaliados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Em animais expostos ao AE por 30 e 60 dias:

- Verificar se o ambiente enriquecido melhora a memória de reconhecimento de objetos e social, de curta e longa duração;
- Avaliar o perfil da expressão gênica dos componentes  $\alpha 7$ , M1, ChAT e AChE do sistema colinérgico no córtex total;
- Avaliar o perfil da expressão gênica do componente mGluR5 do sistema glutamatérgico no córtex total;
- Avaliar o perfil da expressão gênica dos componentes FAAH, MAGL, NAPE-PLD e DAGL do sistema endocanabinóide no córtex total;
- Avaliar os níveis dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF por western blotting;
- Verificar as diferenças ocorridas entre os diferentes tempos de exposição ao AE;
- Correlacionar estatisticamente a eventual melhora cognitiva com alterações bioquímicas e moleculares nos sistemas avaliados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados 80 camundongos machos da linhagem C57Bl/6, de vinte e um dias de idade, e 40 camundongos suíços, de trinta dias de idade, que foram utilizados como “intrusos” no teste de reconhecimento social (TRS). Todos foram mantidos em gaiolas sobre um ciclo claro-escuro 12:12h, em ambiente climatizado ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ ). Todos os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo número 001/2011).

### 4.2 Delineamento experimental

Os 80 camundongos foram desmamados com 21 dias de idade e mantidos, por 30 ou 60 dias, em ambiente padrão (AP) ou ambiente enriquecido (AE). Os animais foram distribuídos aleatoriamente conforme a seguir (Figura 5):

- Ambiente padrão por 30 dias (AP30) (n=13): Os animais foram colocados no AP logo após o desmame e foram mantidos por 30 dias. No 31<sup>o</sup> dia foram iniciados os testes cognitivos e se estenderam até o 39<sup>o</sup> dia. No 40<sup>o</sup> dia os animais foram eutanasiados por decaptação e foi feita a dissecação do córtex cerebral, e nos dias posteriores foram realizadas as análises de expressão gênica e protéica.
- Ambiente enriquecido por 30 dias (AE30) (n=18): Os animais foram colocados no AE logo após o desmame e foram mantidos por 30 dias. No 31<sup>o</sup> dia foram iniciados os testes cognitivos e se estenderam até o 39<sup>o</sup> dia. No 40<sup>o</sup> os animais foram eutanasiados por decaptação e foi feita a dissecação do córtex cerebral, e nos dias posteriores foram realizadas as análises de expressão gênica e protéica.
- Ambiente padrão por 60 dias (AP60) (n=20): Os animais foram colocados no AP logo após o desmame e foram mantidos por 60 dias. No 61<sup>o</sup> dia foram iniciados os testes cognitivos e se estenderam até o 69<sup>o</sup> dia. No 70<sup>o</sup> dia foi feita a

dissecação do córtex dos animais, e nos dias posteriores foram realizadas as análises de expressão gênica e protéica.

- Ambiente enriquecido por 60 dias (AE60) (n=29): Os animais foram colocados no AE logo após o desmame e foram mantidos por 60 dias. No 61º dia foram iniciados os testes cognitivos e se estenderam até o 69º dia. No 70º dia os animais foram eutanasiados por decaptação e foi feita a dissecação do córtex cerebral, e nos dias posteriores foram realizadas as análises de expressão gênica e protéica.

Experimento com 30 dias de AP ou AE	1º dia	...	30º dia	31º dia	32º dia	33º dia	34º dia	35º dia	36º dia	37º dia	38º dia	39º dia	40º dia	Dias posteriores
Experimento com 60 dias de AP ou AE	1º dia	...	60º dia	61º dia	62º dia	63º dia	64º dia	65º dia	66º dia	67º dia	68º dia	69º dia	70º dia	
Desmame dos animais com 21 dias de idade	AE ou AP	AE ou AP	AE ou AP	TRO	TRO	TRO	IS	IS	IS	IS	TIS e TRS	TRS	Eutanásia	Expressão gênica e expressão protéica

Figura 5 - Delineamento experimental: Os camundongos foram desmamados com 21 dias de idade e colocados no AP ou AE, por 30 ou 60 dias. Foram realizados testes cognitivos e, após a eutanásia por decaptação, foi realizada a expressão gênica e protéica.

### 4.3 Ambiente enriquecido

Os animais foram divididos em dois grupos: em ambiente enriquecido (AE) ou em um ambiente padrão (AP) (Figura 6).

O ambiente padrão consiste em uma gaiola comum (31x20x12cm), forrada com maravalha.

O ambiente enriquecido foi formado por uma gaiola maior (60x50x22cm), contendo de quatro a cinco objetos diferentes, como brinquedos, túneis, rampas, roda giratória e uma casinha. Os objetos foram trocados uma vez por semana, sempre mantendo uma roda giratória, para prática de exercício voluntário, e uma casinha (BEZARD et al, 2003).

Os animais foram desmamados com 21 dias e mantidos no AP ou AE (4-5 por gaiola) por 30 dias ou 60 dias.

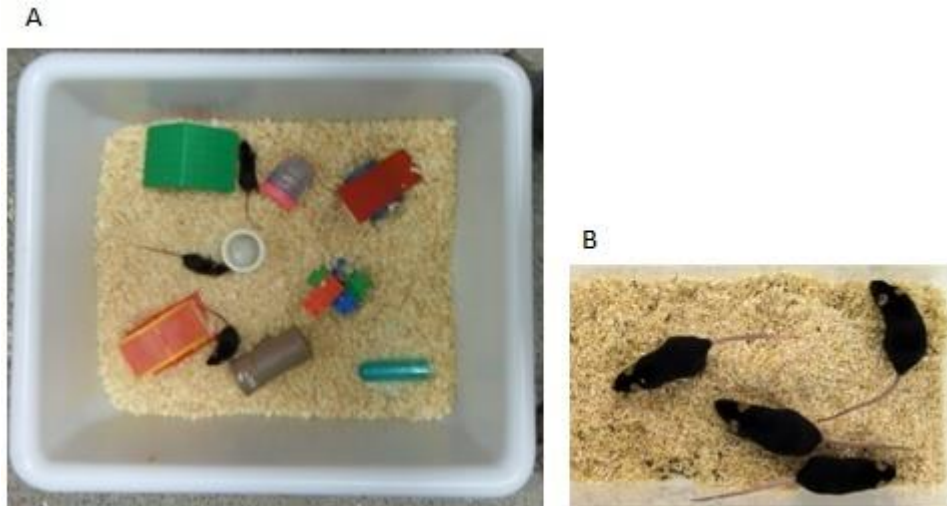


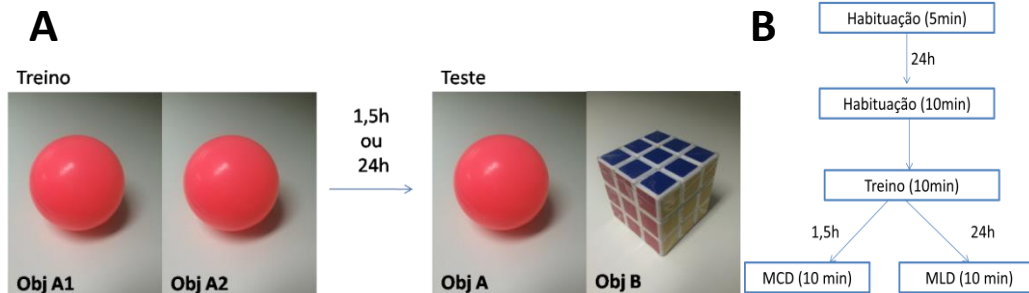
Figura 6 - Ambiente enriquecido (A) e Ambiente padrão (B) (Arquivo próprio).

#### 4.4 Teste de reconhecimento de objetos (TRO):

Em um ambiente familiar, roedores demonstram uma atração instintiva para novidade, preferindo explorar o novo. Com isso, é possível avaliar a memória de reconhecimento de objetos em camundongos, introduzindo um novo objeto em um ambiente familiar para o animal (AKKERMAN et al, 2012). Por se tratar de uma memória declarativa, o animal é capaz de explorar mais a novidade, pelo fato de evocar a memória e se lembrar do objeto familiar. O TRO foi realizado em uma caixa de plástico opaca (41x32x16 cm). Os animais foram habituados à caixa vazia por 5 min. Após 24h foi realizada mais uma habituação de 10 min e em seguida foi realizado o treino. No treino, dois objetos iguais (Bola), A1 e A2, foram colocados distantes um do outro (10 cm) dentro da mesma caixa utilizada para habituação. Os animais puderam explorar livremente os objetos por 10 minutos. Após 1,5h foi realizado o teste para avaliar memória de curta duração (MCD), onde foram utilizados dois objetos diferentes, um familiar (A1) e um novo objeto (Cubo), B, e os animais tiveram 10 min para livre exploração dos objetos (Figura 7). A memória de longa duração (MLD) foi avaliada 24h após o treino e foi realizada da mesma maneira que a MCD. Não foram utilizados os mesmos animais para avaliação das MCD e MLD (GUSMÃO et al, 2012). Os testes foram realizados no final dos períodos de 30 ou 60 dias de exposição ao AE e AP.

O treino e o teste foram gravados e analisados através do software ANY-maze. Foi medido o tempo em que o animal interage com os objetos, considerando

interação quando o animal direcionar o nariz para o objeto a 2 cm ou menos de distância. Foi calculado índice de reconhecimento (IR) utilizando a fórmula  $IR = TN / (TN + TF)$  (TN: tempo de exploração ao objeto novo; TF: tempo de exploração ao objeto familiar).



**Figura 7 – A) Esquema dos objetos utilizados no TRO. Bola (objeto A); cubo (objeto B). Foi feita habituação por 5 min. 24h após, foi feita habituação por 10 min e, em seguida, o treino por 10 min. 1,5h após o treino foi avaliada a MCD, e 24h após o treino foi avaliada a MLD (Arquivo próprio). B) Esquema do TRO**

#### 4.5 Teste de reconhecimento social (TRS) e Teste de interação social (TIS):

Os indivíduos possuem a capacidade de reconhecerem outros indivíduos familiares através da memória social (GUSMÃO et al, 2012). Quando apresentados a um estranho, o instinto de exploração ao novo é observado. Por se tratar de uma memória declarativa, durante a fase do teste, animal é capaz de evocar a memória formada durante a primeira apresentação à novidade e se lembrar do animal, explorando-o por um tempo menor.

A sociabilidade do animal, que tem como base a investigação e o contato social, pode ser avaliada através do teste de interação social (TIS) (MESA-GRESA et al, 2013). A avaliação da memória social pode ser feita através do teste de reconhecimento social (TRS) (GUSMÃO et al, 2012).

Após o TRO, cada animal foi mantido em isolamento social (IS) por 4 dias para que fosse estabelecida a dominância do território e fosse exacerbada a medida de memória de reconhecimento social e o interesse social.

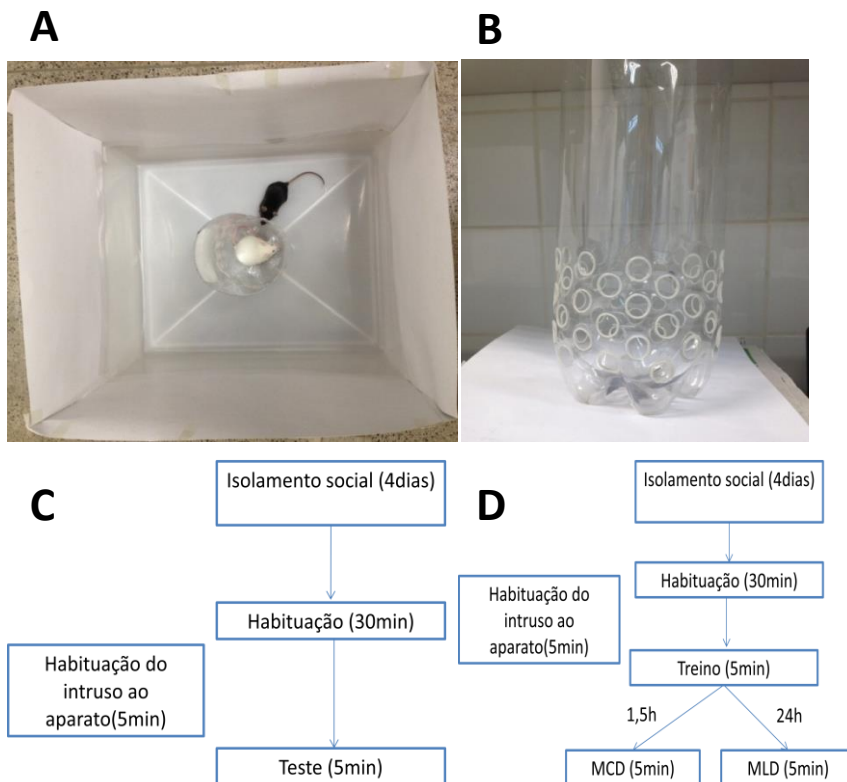
Após o isolamento social, os animais foram habituados numa caixa contendo um aparato cilíndrico transparente com vários furos de 1cm de diâmetro (Figura 8) pelo tempo de 30 minutos antes dos testes TIS e TRS.

Camundongos suíços, de aproximadamente 30 dias, foram utilizados como animais intrusos para os testes de TIS e TRS. Antes do início dos testes, os animais intrusos também foram habituados no aparato utilizado no teste, por um tempo de 5 minutos.

Após a habituação, os camundongos exploraram os animais intrusos, que foram mantidos dentro do aparato, por 5 minutos. Esse primeiro contato dos animais avaliados com os animais intrusos é o TIS, onde foi medido o tempo de exploração através do tempo de investigação social.

Esse primeiro contato social entre os animais também pode ser considerado a fase de treino do TRS. Na fase do teste, os animais avaliados exploraram o mesmo intruso apresentado anteriormente, por 5 minutos. A MCD foi avaliada 1,5h após o treino, e a MLD foi avaliada 24h após o treino.

Para ambos os testes foi medido o tempo de investigação social, considerando investigação quando o animal residente colocou o nariz nos furos presentes no aparato (GUSMÃO et al, 2012). Para o TRS foi calculado o índice de reconhecimento (IR) através da fórmula  $IR = TN / (TN + TF)$  (TN: tempo de exploração ao intruso novo; TF: tempo de exploração ao intruso familiar).



**Figura 8 – A) Imagem do teste de reconhecimento social. B) Aparato cilíndrico transparente com furos utilizado nos testes de reconhecimento social e interação social. C) Esquema do TIS. D) Esquema do TRS (Arquivo próprio).**

#### 4.6 Análise da expressão gênica

Após os testes cognitivos, os animais foram eutanasiados por decaptação, o cérebro foi retirado e então o córtex total foi dissecado. O tecido foi rapidamente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento.

Os genes das proteínas AChE, ChAT,  $\alpha 7\text{NR}$  e M1R do sistema colinérgico; mGluR5 do sistema glutamatérgico; e FAAH, MAGL, DAGL e NAPE-PLD do sistema endocanabinóide foram avaliados. Os primers utilizados foram desenhados utilizando-se a sequência de mRNA para cada gene, obtida através do site do National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). A ferramenta Primer Quest Tool do site DNA Integrated Technologies (IDT, [www.idtdna.com/](http://www.idtdna.com/)) foi utilizada para o desenho dos primers cuja sequência está descrita na tabela 1.

GENE	SEQUÊNCIA 5' – 3'
AChE	F: GCGCCACCGATACTCTGGACG R: GGGTCCCCCAAGGGGTCACA
ChAT	F: CAAATAAGTCATAAAGGCAGAGGC R: CTCAAGGAAGACTGTGCTATGG
$\alpha 7\text{NR}$	F: AAAGAGCCATACCCAGATGTC R: ATGAGCAGATTGAGGCCATAG
M1R	F: GGTTTCCTTCGTTCTCTGG R: GAGGAAGTGGATGTAGCACTG
mGluR5	F: AGTCATTTACCTAAAGCCCGG R: CTTCTCGCTGATACCCATCTG
FAAH	F: GTCTGGGCTCTGTAAGGTTTATC R: GCATAGAAGTAATCGGGAGG
MAGL	F: ACCATCTCAACCACTAAGCCC R: GAGAAAGGGAAGTGTGAGGTG
DAGL	F: GCCGTCTAAAAGTGTTCTCTG R: TCATTGTTTGCCTCGTCCAG
NAPE-PLD	F: TTGGTTTGCTCCTTAGTCTCG R: CGCTTTCTCAGTGTTTCTTTGG

Tabela 1 – Sequência dos *primers* utilizados no PCR quantitativo em tempo real.



- Extração de RNA total:

Os tecidos foram triturados em nitrogênio líquido e o ácido ribonucléico (RNA) total extraído utilizando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico por 30 segundos e o homogenato centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foi adicionado clorofórmio (200µL/100mg tecido), misturado por inversão por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000xg por 20 minutos a 4°C. À fase aquosa foi adicionado isopropanol (500µL/100mg tecido) para a precipitação do RNA. Então esta seguiu para centrifugação 12.000xg por 15 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1mL/100mg tecido) e centrifugado a 7500xg por cinco minutos. O RNA foi ressuscitado em 40 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato. A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA) e por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, respectivamente.

- Síntese de cDNA:

A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min., 42°C por 30min., 85°C por 5 min.

- PCR Quantitativo em tempo real:

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). Em suma, as reações foram preparadas em um volume total de 10µL contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada, 0,5µL de cada iniciador a 10µM e 0,5 µL de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial (95°C, 2 minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30s e 72°C (amplificação) por 30s.

Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata, e para cada experimento foi incluído uma reação sem molde como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de “melting” dos produtos amplificados, que foi feita resfriando-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A especificidade das reações de PCR também pôde ser confirmada pela verificação dos amplicons em gel de acrilamida, além da curva de melting. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  utilizando o gene da  $\beta$ -actina para normalização dos dados.

#### **4.7 Análise da expressão protéica**

A análise da expressão das proteínas BDNF e GDNF foi realizada através do Western blotting, de acordo com Areal e colaboradores (2015).

O córtex dissecado foi homogeneizado em um tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 e um coquetel inibidor de protease), mantido no gelo por 30 min, centrifugado a 10.000g a 4°C, sobrenadante foi coletado e o conteúdo das proteínas foram quantificados pelo método Bradford (BRADFORD, 1976). Cinquenta microgramas de cada proteína foi separada por SDS-PAGE e então transferidas para uma membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF). A expressão protéica de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usada como controle interno. Os anticorpos usados foram anti-BDNF (1:1000, Alomone Labs), anti-GDNF (1:1000, Alomone Labs) e anti-GAPDH (1:5000, Advimmuno). Imagens foram adquiridas usando ChemiDoc (Bio-rad) e analisadas pelo Image Lab Software (Bio-rad).

#### **4.8 Análise estatística**

Para os testes de reconhecimento de objetos e social, foi utilizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, e, quando necessário, foi utilizado teste t de *Student*. No teste de

interação social, expressão gênica e expressão proteica, foi utilizado o teste t de *Student*. Em todas as análises foi empregado um nível de significância para  $p < 0,05$ . O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para realização das análises estatísticas e elaboração dos gráficos.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Análise dos parâmetros cognitivos**

#### **5.1.1 Ambiente enriquecido por 30 dias**

##### **5.1.1.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) - 30**

###### **5.1.1.1.1 Memória de Curta Duração (TRO MCD 30)**

Na avaliação da MCD no TRO (Figura 9), a ANOVA de duas vias demonstrou que os animais dos grupos AP30 e AE30 exploraram os objetos A1 e A2 por tempos estatisticamente iguais ( $F(1;14)=0,5848$ .  $p=0,4571$ ).

Durante o teste, a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças entre a exploração dos objetos A e B (novo) ( $F(1;14)=14,43$ .  $p=0,0020$ ). O teste de Bonferroni revelou que os animais dos grupos AP30 e AE30 exploraram por mais tempo o objeto B (novo) ( $*p<0,05$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP30 e AE30, demonstrando que o ambiente enriquecido por 30 dias não foi capaz de provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,4910$ ).

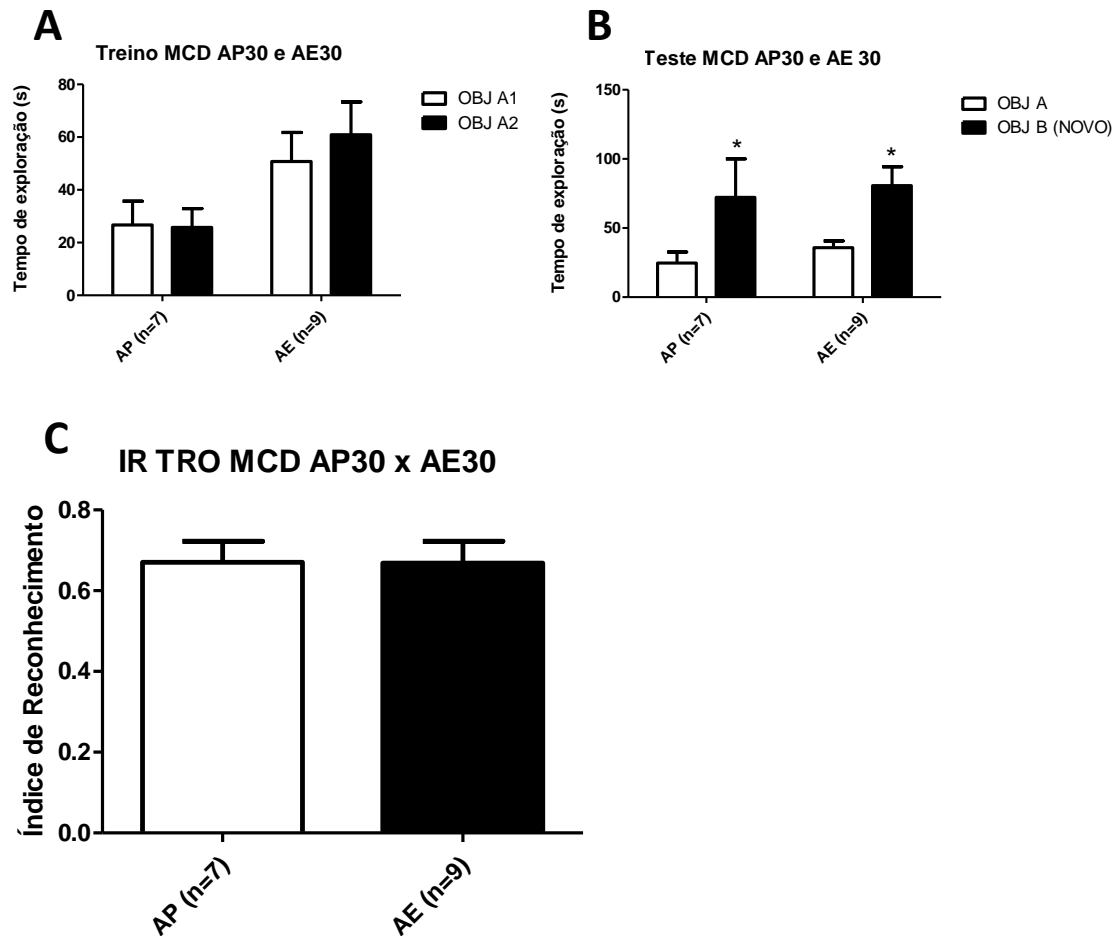


Figura 9 – Teste de reconhecimento de objetos (MCD 30). A) Tempo de exploração aos objetos A1 e A2 durante o treino pelos animais do AP e AE ( $F(1;14)=0,5848$ .  $p=0,4571$ ). B) Tempo de exploração aos objetos A e B durante o teste pelos animais do AP e AE ( $F(1;14)=14,43$ .  $p=0,0020$ ). C) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,4910$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=7); AE (n=9).

### 5.1.1.1.2 Memória de Longa Duração (TRO MLD 30)

Na avaliação da MLD no TRO (Figura 10), a ANOVA de duas vias demonstrou que os animais dos grupos AP30 e AE30 exploraram os objetos A1 e A2 por tempos estatisticamente iguais ( $F(1;13)=0,0373$ .  $p=0,8499$ ).

Durante o teste, a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças entre a exploração dos objetos A e B (novo) ( $F(1;13)=14,51$ .  $p=0,0022$ ). O teste de Bonferroni revelou que apenas os animais do grupo AE30 exploraram por mais tempo o objeto B (novo) (\* $p<0,05$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP30 e AE30, demonstrando que o ambiente enriquecido por 30 dias não foi capaz de

provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,1317$ ).

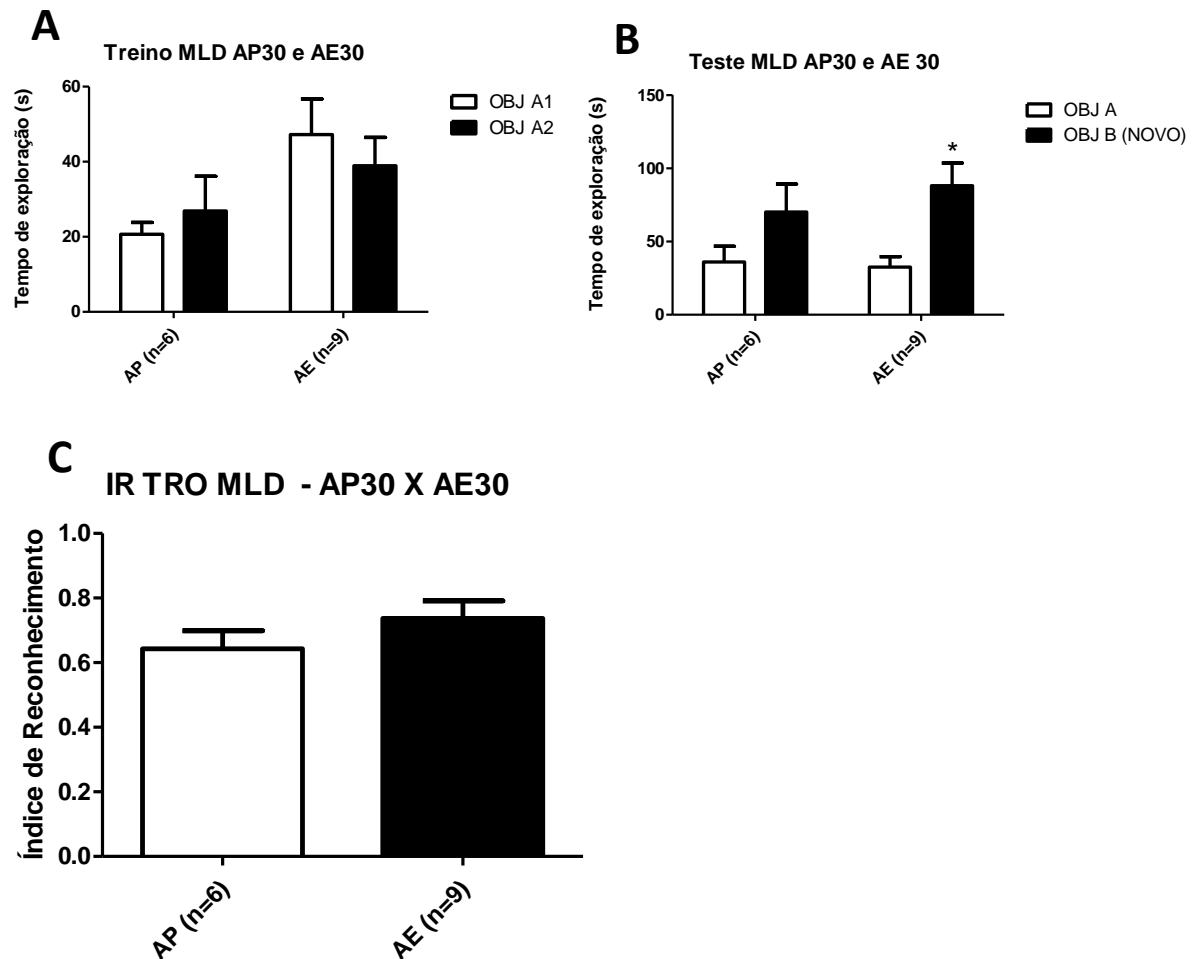


Figura 10 - Teste de reconhecimento de objetos (MLD 30). A) Tempo de exploração aos objetos A1 e A2 durante o treino pelos animais do AP e AE ( $F(1;13)=0,0373$ .  $p=0,8499$ ). B) Tempo de exploração aos objetos A e B durante o teste pelos animais do AP e AE ( $F(1;13)=14,51$ .  $p=0,0022$ ). C) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,1317$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=6); AE (n=9).

### 5.1.1.2 Teste de Reconhecimento Social (TRS)- 30

#### 5.1.1.2.1 Memória de Curta Duração (TRS MCD 30)

Na avaliação da MCD no TRS (Figura 11), a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças no tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste ( $F(1;14)=8,881$ .  $p=0,0099$ ). O teste de Bonferroni revelou que apenas os animais do

grupo AE30 exploraram por menos tempo o intruso durante a fase de teste (\*\* $p < 0,01$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP30 e AE30, demonstrando que o ambiente enriquecido por 30 dias não foi capaz de provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed.  $p = 0,1182$ ).

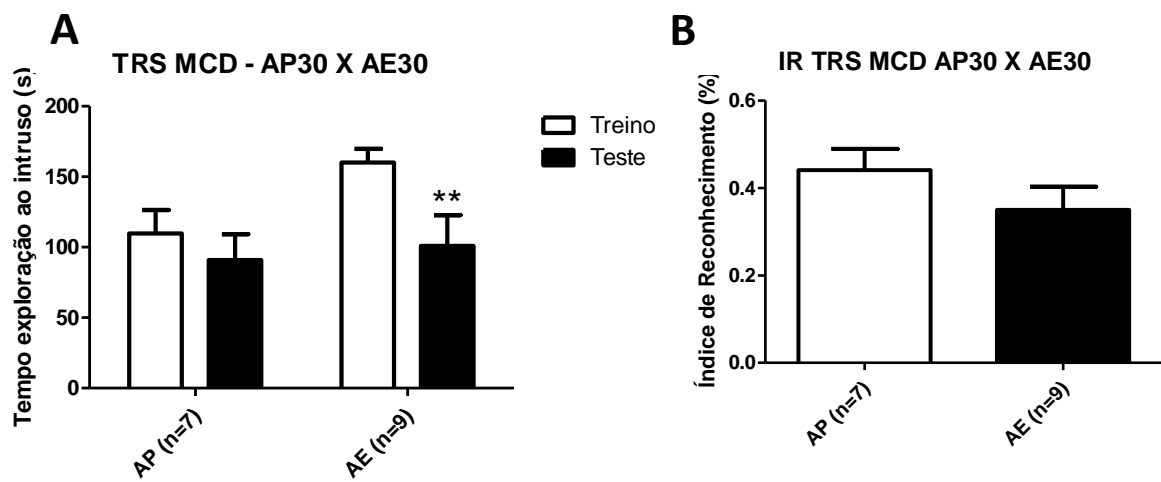


Figura 11– Teste de reconhecimento social (MCD 30). A) Tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste ( $F(1;14)=8,881$ .  $p=0,0099$ ). B) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $p=0,1182$ ). \*\* $p < 0,01$ . AP (n=7). AE (n=9).

### 5.1.1.2.2 Memória de Longa Duração (TRS MLD 30)

Na avaliação da MLD no TRS (Figura 12), realizado 24h após o treino, apesar de ter havido uma tendência dos animais mantidos no AE por 30 dias explorarem por menos tempo o animal intruso, a ANOVA de duas vias ( $F(1;13)= 1,155$ .  $p=0,3020$ ) e também o Teste t de *Student* (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,4077$ ) demonstraram que, ambos os grupos, AP30 e AE30, exploraram o intruso por tempos estatisticamente iguais durante as fases de treino e teste. Como não houve o reconhecimento do intruso na fase do teste, o índice de reconhecimento não foi calculado.

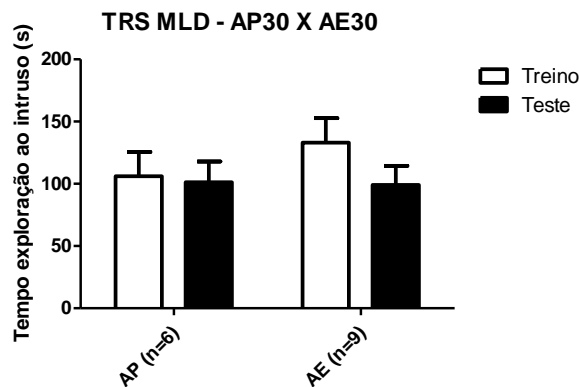


Figura 12 - Teste de reconhecimento social (MLD 30). Tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste ( $F(1;13) = 1,155$ .  $p=0,3020$ ). AP (n=6). AE (n=9).

### 5.1.1.3 Teste de Interação social (TIS) - 30

Como dito anteriormente, a fase do treino do teste de reconhecimento social, pode ser considerada como um teste de interação social. Neste teste, pode-se observar que os animais que passaram 30 dias no AE exploraram por mais tempo o intruso, quando comparado com os animais que passaram 30 dias no AP (Teste t, não pareado.  $P=0,0140$ ). Este resultado indica que os animais do AE30 tiveram maior interesse pela novidade, realizando assim, uma maior interação social (Figura 13).

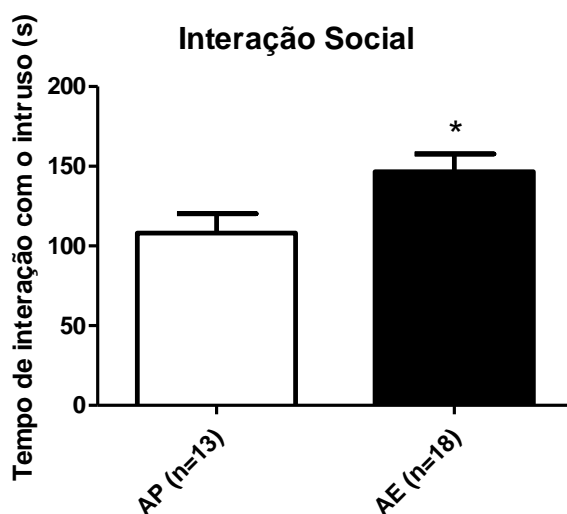


Figura 13 – Teste de interação social (30). Tempo de interação dos animais dos grupos AP e AE com o intruso (Teste t, não pareado.  $P=0,0140$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=13). AE (n=18).



## 5.1.2 Ambiente enriquecido por 60 dias

### 5.1.2.1 Teste de Reconhecimento de Objetos (TRO) - 60

#### 5.1.2.1.1 Memória de Curta Duração (TRO MCD 60)

Na avaliação da MCD no TRO (Figura 14), a ANOVA de duas vias demonstrou que os animais dos grupos AP60 e AE60 exploraram os objetos A1 e A2 por tempos estatisticamente iguais ( $F(1;23)=1,741$ .  $p=0,2000$ ).

Durante o teste, a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças entre a exploração dos objetos A e B (novo) ( $F(1;23)=0,1329$ .  $p=0,0014$ ). O teste de Bonferroni revelou que apenas os animais do grupo AE60 exploraram por mais tempo o objeto B (novo) ( $*p<0,05$ ). O Teste t de *Student* demonstrou que durante o teste os animais do grupo AP60 exploraram por mais tempo o objeto B (novo) (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0378$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP60 e AE60, demonstrando que ambos os grupos aprenderam, porém o ambiente enriquecido por 60 dias não foi capaz de provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed.  $p=0,3848$ ).

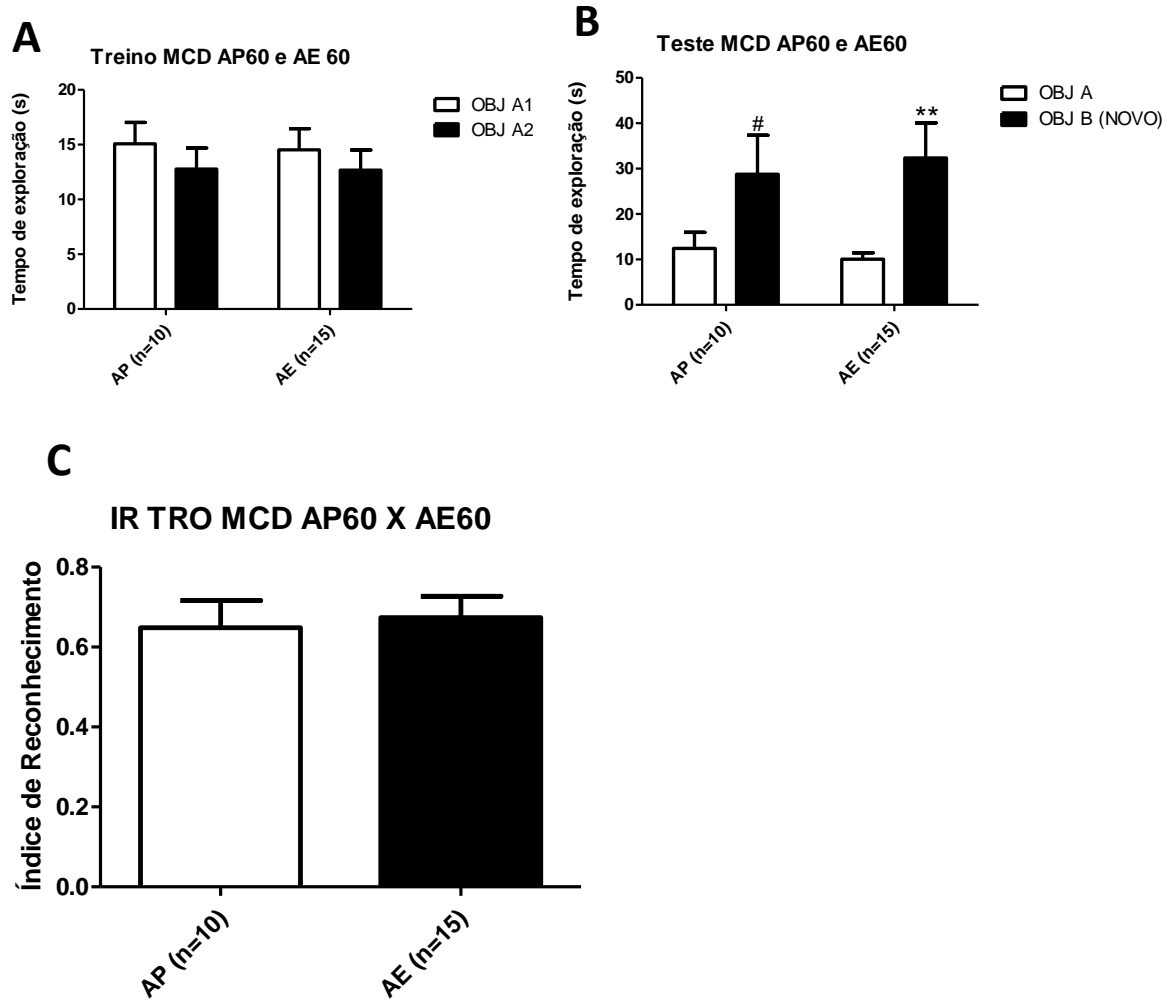


Figura 14 - Teste de reconhecimento de objetos (MCD 60). A) Tempo de exploração aos objetos A1 e A2 durante o treino pelos animais do AP e AE ( $F(1;23)=1,741$ .  $p=0,2000$ ). B) Tempo de exploração aos objetos A e B durante o teste pelos animais do AP e AE  $** (F(1;23)=0,1329$ .  $p=0,0014$ ) e # (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0378$ ). C) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $p=0,3848$ ). \* $p<0,05$ . \*\* $p<0,01$ . # $p<0,05$ . AP (n=10); AE (n=15).

### 5.1.2.1.2 Memória de Longa Duração (TRO MLD 60)

Na avaliação da MLD no TRO (Figura 15), a ANOVA de duas vias demonstrou que os animais dos grupos AP60 e AE60 exploraram os objetos A1 e A2 por tempos iguais ( $F(1;22)=0,1440$ .  $p=0,7080$ ).

Durante o teste, a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças entre a exploração dos objetos A e B (novo) ( $F(1;22)=9,584$ .  $p=0,0053$ ). O teste de Bonferroni revelou que apenas os animais do grupo AE60 exploraram por mais tempo o objeto B (novo) (\* $p<0,05$ ). Apesar de uma grande tendência, o Teste t de

*Student* demonstrou que os animais do grupo AP60 exploraram igualmente os objetos A e B (novo) (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0817$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP60 e AE60, demonstrando que o ambiente enriquecido por 60 dias não foi capaz de provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,3760$ ).

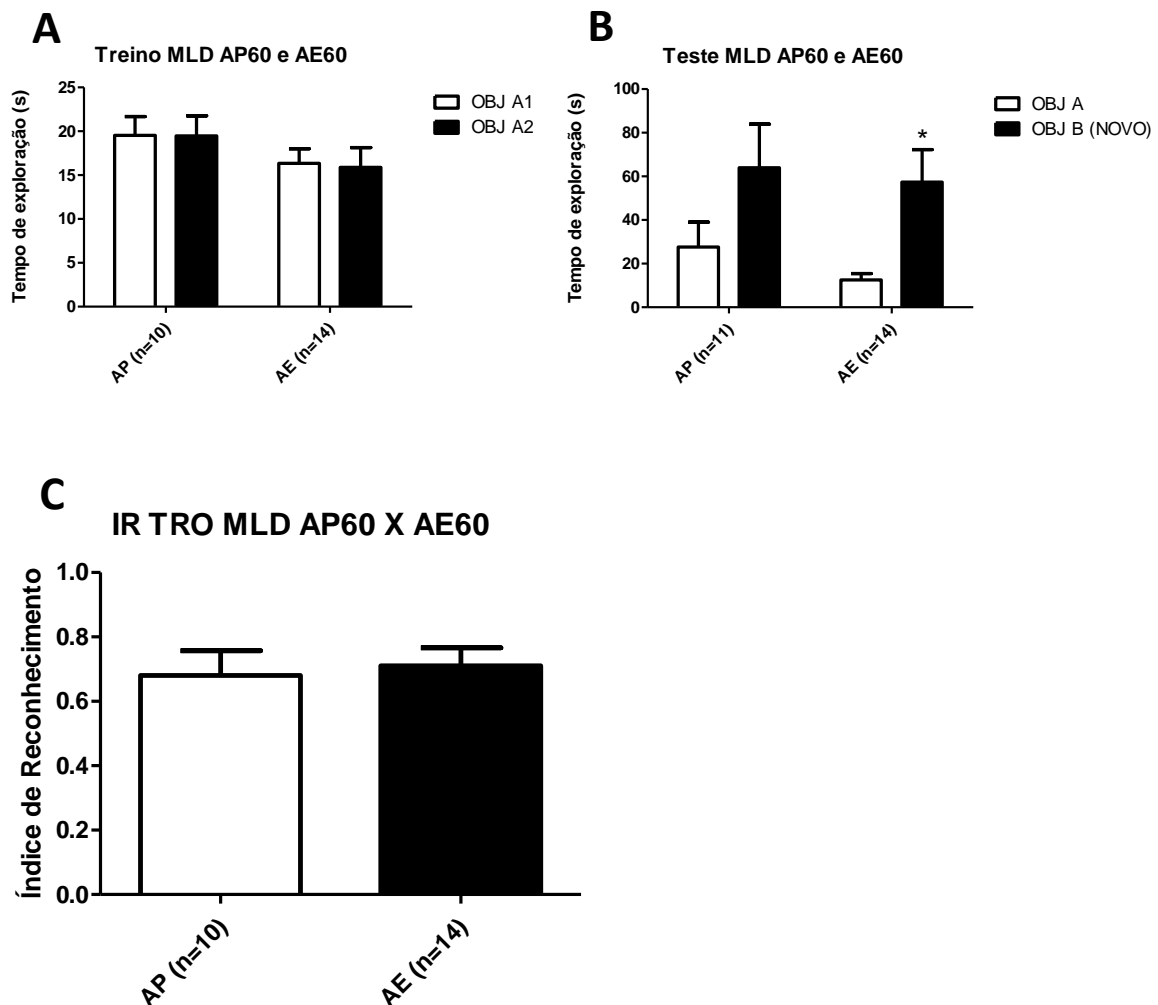


Figura 15 - Teste de reconhecimento de objetos (MLD 60). A) Tempo de exploração aos objetos A1 e A2 durante o treino pelos animais do AP e AE ( $F(1;22)=0,1440$ .  $p=0,7080$ ). B) Tempo de exploração aos objetos A e B durante o teste pelos animais do AP e AE ( $F(1;22)=9,584$ .  $p=0,0053$ ). C) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,3760$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=10); AE (n=14).

## 5.1.2.2. Teste de reconhecimento social (TRS) – 60

### 5.1.2.2.1 Memória de curta duração (TRS MCD 60)

Na avaliação da MCD no TRS (Figura 16), a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças no tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste ( $F(1;18)=15,70$ .  $p=0,0009$ ). O teste de Bonferroni revelou que os animais do grupo AE60 exploraram por menos tempo o intruso durante a fase de teste (\*\* $p<0,01$ ). O Teste t de *Student* revelou que os animais do grupo AP60 exploraram por menos tempo o intruso durante a fase de teste (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0011$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP60 e AE60, demonstrando que o ambiente enriquecido por 60 dias não foi capaz de provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed.  $p=0,1747$ ).

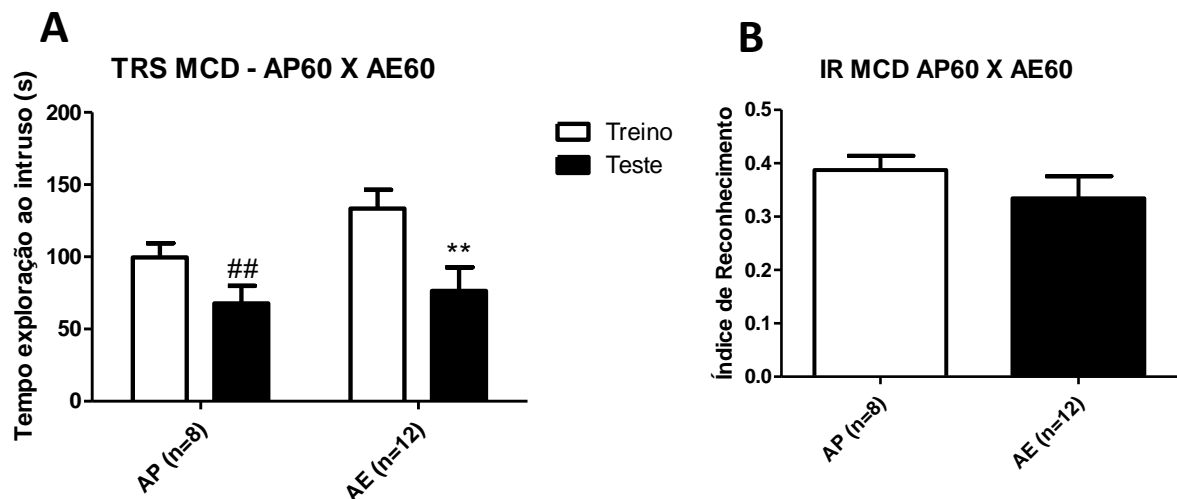


Figura 16 - Teste de reconhecimento social (MCD 60). A) Tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste (\*\*( $F(1;18)=15,70$ .  $p=0,0009$ ) e ##(Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0011$ ). B) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $p=0,1747$ ). \*\* $p<0,01$ . ## $p<0,01$ . AP (n=8). AE (n=12).

### 5.1.2.2.2 Memória de Longa Duração (TRS MLD 60)

Na avaliação da MLD no TRS (Figura 17), a ANOVA de duas vias demonstrou diferenças no tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste ( $F(1;23)=25,19$ .  $p<0,0001$ ). O teste de Bonferroni revelou que os animais do grupo AE60 exploraram por menos tempo o intruso durante a fase de teste (\*\* $p<0,001$ ). O Teste t de *Student* revelou que os animais do grupo AP60 exploraram por menos tempo o intruso durante a fase de teste (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0195$ ).

Não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos AP60 e AE60, demonstrando que o ambiente enriquecido por 60 dias não foi capaz de provocar melhora na memória dos animais testados (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,1701$ ).

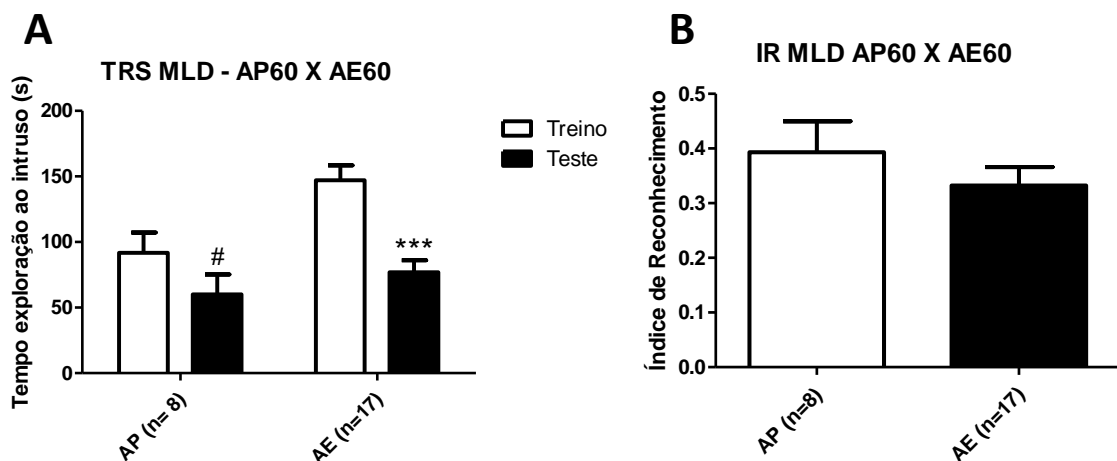


Figura 17 – Teste de reconhecimento social (MLD 60). A) Tempo de exploração ao intruso durante o treino e o teste \*\*\*( $F(1;23)=25,19$ .  $p<0,0001$ ) e # (Teste t, pareado. One-tailed.  $p=0,0195$ ). B) Índice de reconhecimento dos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed .  $p=0,1701$ ). \*\* $p<0,001$ . # $p<0,05$ . AP (n=8). AE (n=17).

### 5.1.2.3 Teste de Interação social (TIS) - 60

A fase do treino do teste de reconhecimento social pode ser considerada como um teste de interação social, onde se avalia o nível de interesse que o animal tem por um novo animal, que nunca teve contato.

Neste teste, pode-se observar que todos os animais que foram mantidos no AE por 60 dias apresentaram maior interesse ao intruso, em relação aos animais

mantidos no AP, e essa diferença foi significativa (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0006$ ), demonstrando maior interação social (Figura 18).

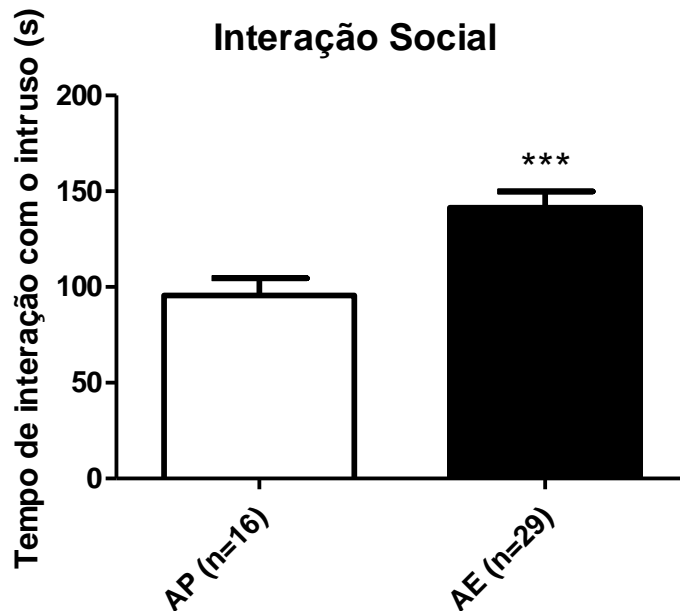


Figura 18 - Teste de interação social (60). Tempo de interação dos animais dos grupos AP e AE com o intruso (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0006$ ). \*\*\* $p<0,001$ . AP (n=16). AE (n=29).

## 5.2 Análise da expressão gênica no córtex

### 5.2.1 Ambiente enriquecido por 30 dias

#### 5.2.1.1 Expressão gênica do sistema colinérgico – 30

A análise da expressão gênica dos componentes do sistema colinérgico (Figura 19) mostrou que o AE por 30 dias promoveu uma redução significativa na expressão dos genes  $\alpha 7NR$  (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0014$ ) e M1R (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0017$ ), em relação ao AP.

A análise da expressão dos genes AChE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,2765$ ) e ChAT (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3643$ ), não apresentou diferenças significantes entre os grupos AP e AE.

Os resultados foram expressos em relação a expressão gênica dos genes do grupo AP.

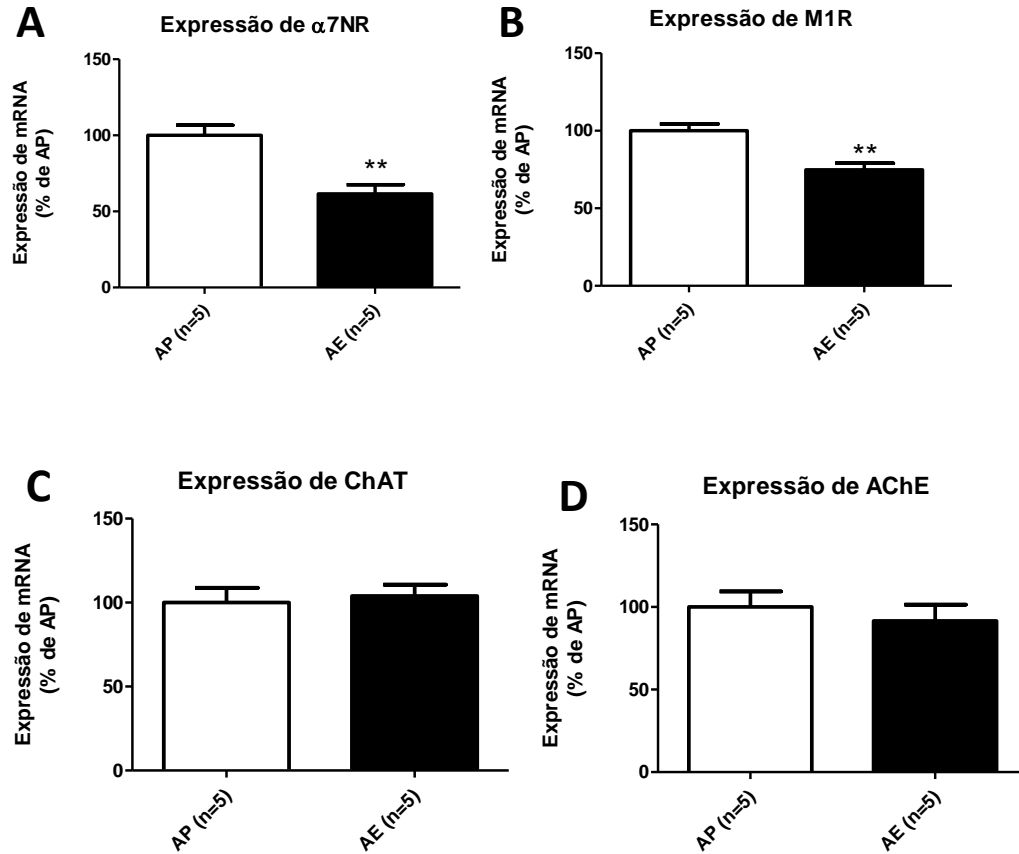


Figura 19 – Expressão gênica no sistema colinérgico (30). Expressão gênica de A)  $\alpha$ 7NR (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0014$ ), B) M1R (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0017$ ), C) ChAT (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3643$ ) e D) AChE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,2765$ ). \*\* $p<0,01$ . AP (n=5). AE (n=5).

### 5.2.1.2 Expressão gênica no sistema glutamatérgico – 30

Houve uma redução significativa na expressão do gene mGluR5 (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0075$ ) nos animais que passaram 30 dias no AE, em relação aos do grupo AP (Figura 20).

Os resultados foram expressos em relação a expressão gênica dos genes do grupo AP.

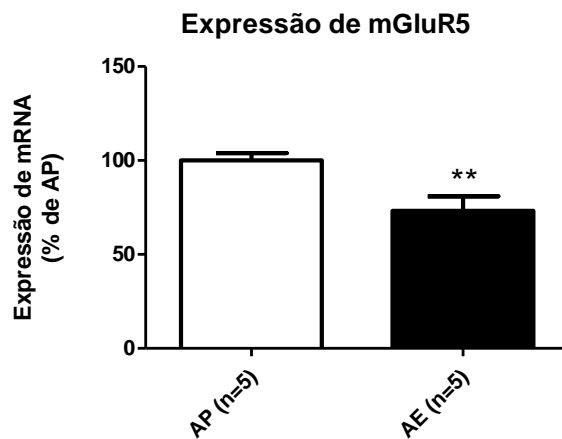


Figura 20 - Expressão gênica no sistema glutamatérgico (30). Expressão gênica de mGluR5 (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P=0,0075$ ) . \*\* $p<0,01$ . AP (n=5). AE (n=5).

### 5.2.1.3 Expressão gênica do sistema endocanabinóide – 30

As análises da expressão gênica do sistema endocanabinóide (Figura 21) revelaram que os animais mantidos no AE tiveram um aumento significativo na expressão do gene MAGL (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0263$ ), quando comparados ao grupo AP.

Não houve diferenças significantes, entre os grupos AP e AE, na expressão gênica de FAAH (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P=0,0860$ ), NAPE-PLD (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P=0,0730$ ) e DAGL (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P=0,1656$ ).

Os resultados foram expressos em relação a expressão gênica dos genes do grupo AP.



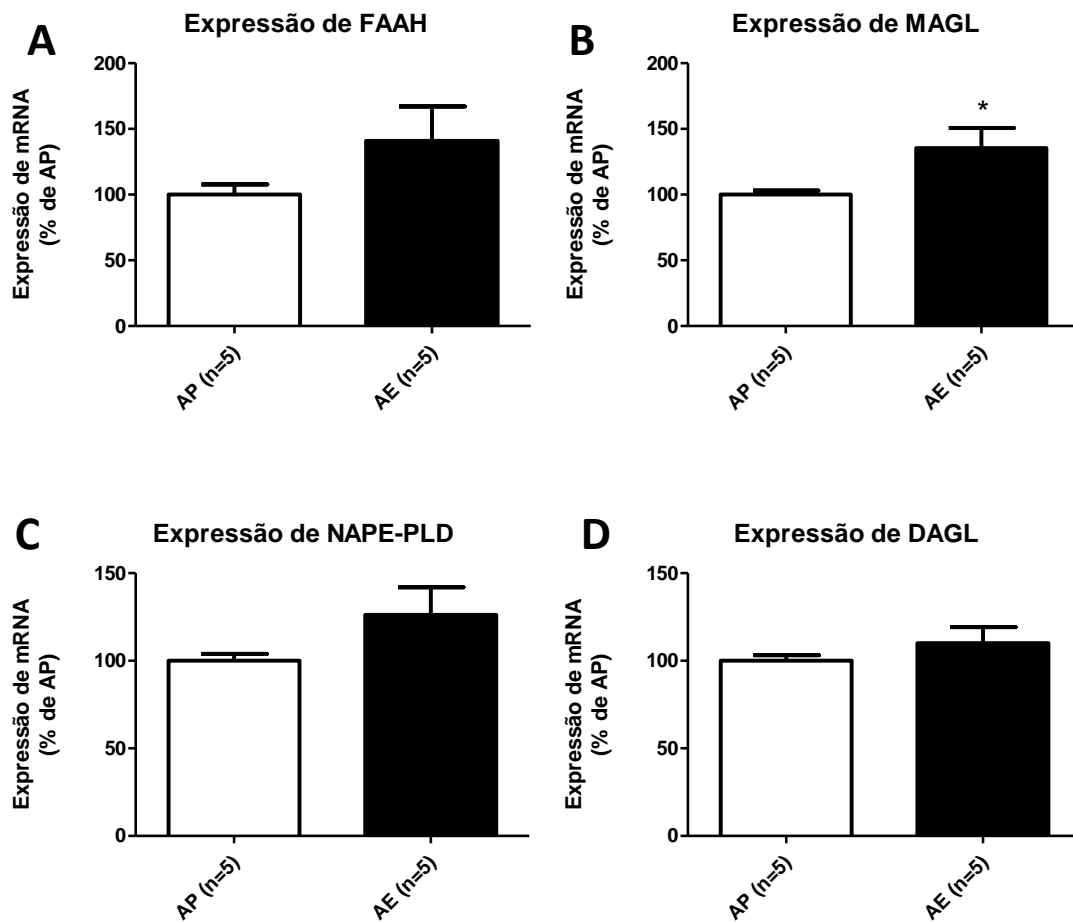


Figura 21 – Expressão gênica no sistema endocanabinóide (30). Expressão gênica de A) FAAH (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0860$ ), (B) MAGL (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0263$ ), (C) NAPE-PLD (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0730$ ) e (D) DAGL (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,1656$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=5). AE (n=5).

## 5.2.2 Ambiente enriquecido por 60 dias

### 5.2.2.1 Expressão gênica do sistema colinérgico – 60

Os animais que foram mantidos 60 dias no AE, apresentaram um aumento significativo na expressão do gene ChAT (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0109$ ), em relação aos animais que foram mantidos no AP. Além disso, o AE promoveu a diminuição na expressão gênica de M1R (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0318$ ), comparado ao grupo AP.

A expressão dos genes AChE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,2403$ ) e  $\alpha 7NR$  (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3988$ ) não apresentaram diferenças significantes entre os grupos AP e AE (Figura 22).

Os resultados foram expressos em relação a expressão gênica dos genes do grupo AP.

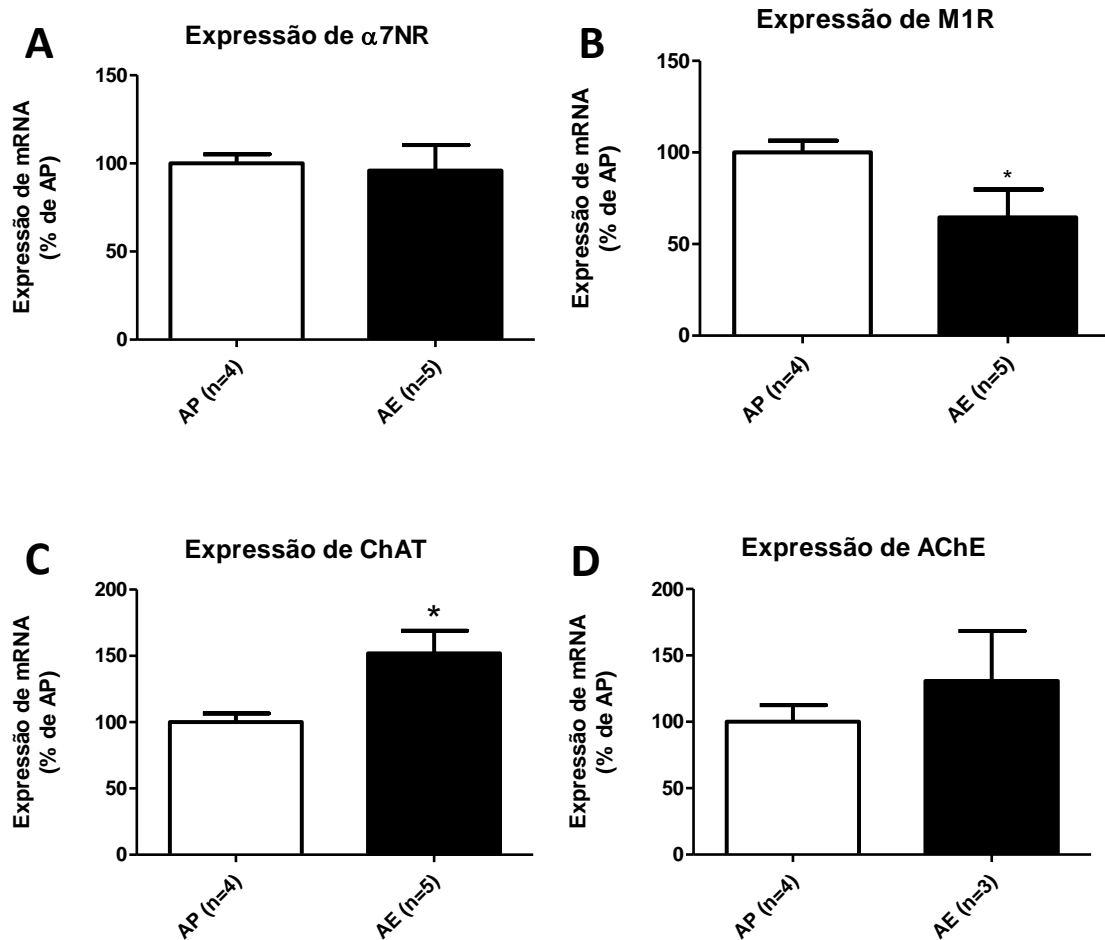


Figura 22 - Expressão gênica no sistema colinérgico (60). Expressão gênica de A)  $\alpha 7NR$  (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3988$ ), (B) M1R (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0318$ ), (C) ChAT (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0109$ ) e (D) AChE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,2403$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=4). AE (n=5).

### 5.2.2.2 Expressão gênica do sistema glutamatérgico – 60

A análise da expressão gênica de mGluR5 não apresentou diferenças significantes entre os grupos AP e AE de 60 dias (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,2028$ ) (Figura 23).

Os resultados foram expressos em relação a expressão gênica dos genes do grupo AP.

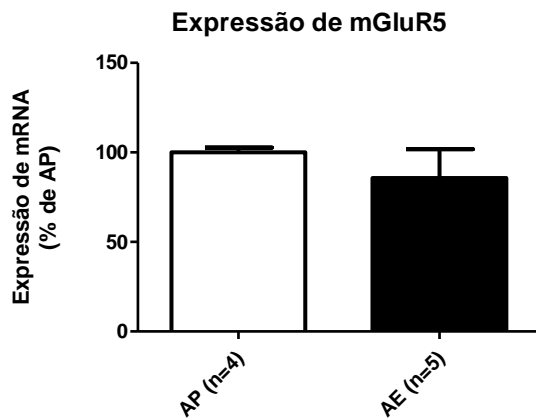


Figura 23 - Expressão gênica no sistema glutamatérgico (60). Expressão gênica de mGluR5 (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P=0,2028$ ). AP (n=5). AE (n=5).

### 5.2.2.3 Expressão gênica do sistema endocanabinóide – 60

A análise da expressão gênica do sistema endocanabinóide (Figura 24) revelou que os animais do AE, quando comparados ao grupo AP, apresentaram maior expressão do gene FAAH (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P<0,0001$ ) e uma menor expressão do gene DAGL (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P<0,0001$ ), e essas diferenças foram significantes.

A expressão dos genes MAGL (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3551$ ) e NAPE-PLD (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P=0,2578$ ) não apresentou diferença entre os grupos AP e AE.

Os resultados foram expressos em relação a expressão gênica dos genes do grupo AP.

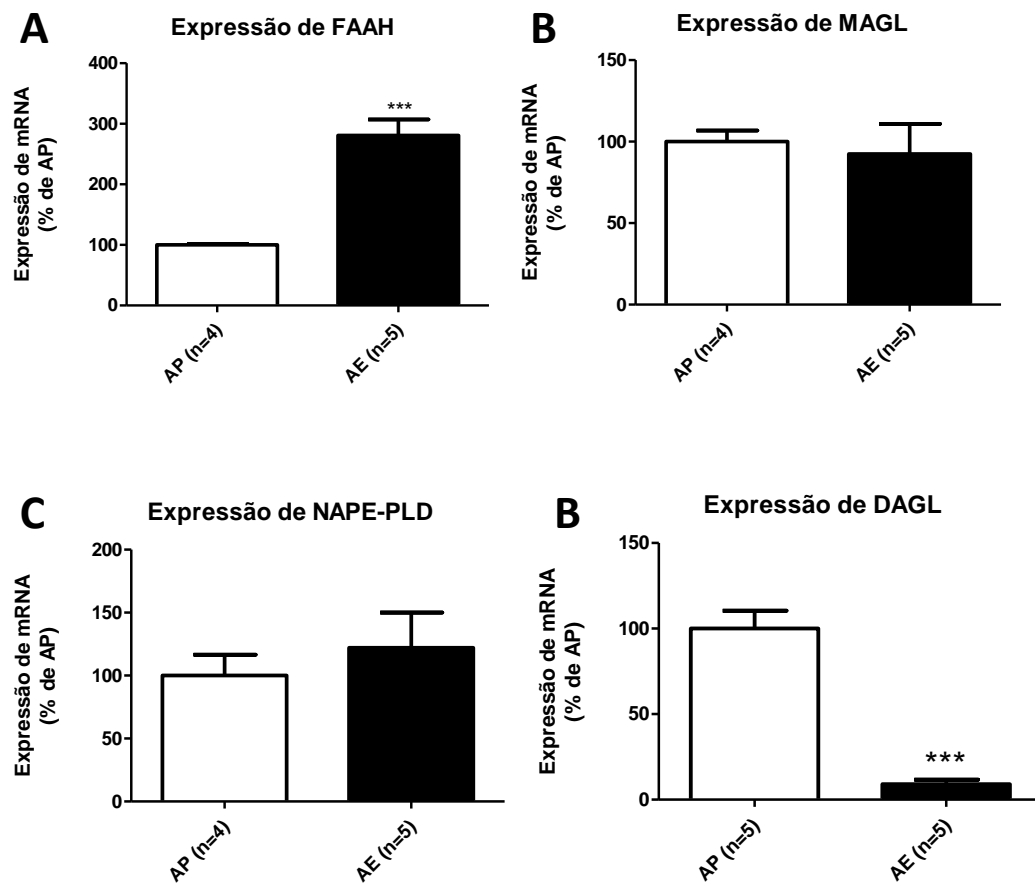


Figura 24 - Expressão gênica no sistema endocanabinóide (60). Expressão gênica de A) FAAH (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P < 0,0001$ ), (B) MAGL (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P = 0,3551$ ), (C) NAPE-PLD (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P = 0,2578$ ) e (D) DAGL (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P < 0,0001$ ). \*\*\* $p < 0,0001$ . AP (n=4). AE (n=5).

### 5.3 Análise da expressão protéica no córtex

#### 5.3.1 Ambiente enriquecido por 30 dias

A análise do western blotting (Figura 25) revelou as bandas de BDNF (14KDa), GDNF (55 KDa) e GAPDH (37KDa). Os animais mantidos no AE por 30 dias apresentaram um aumento significativo na expressão de BDNF (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P = 0,0087$ ), quando comparado com o grupo AP.

Não houve diferença significativa na expressão de GDNF (Teste t, não pareado. One-tailed .  $P = 0,3242$ ) entre os grupos AP e AE.

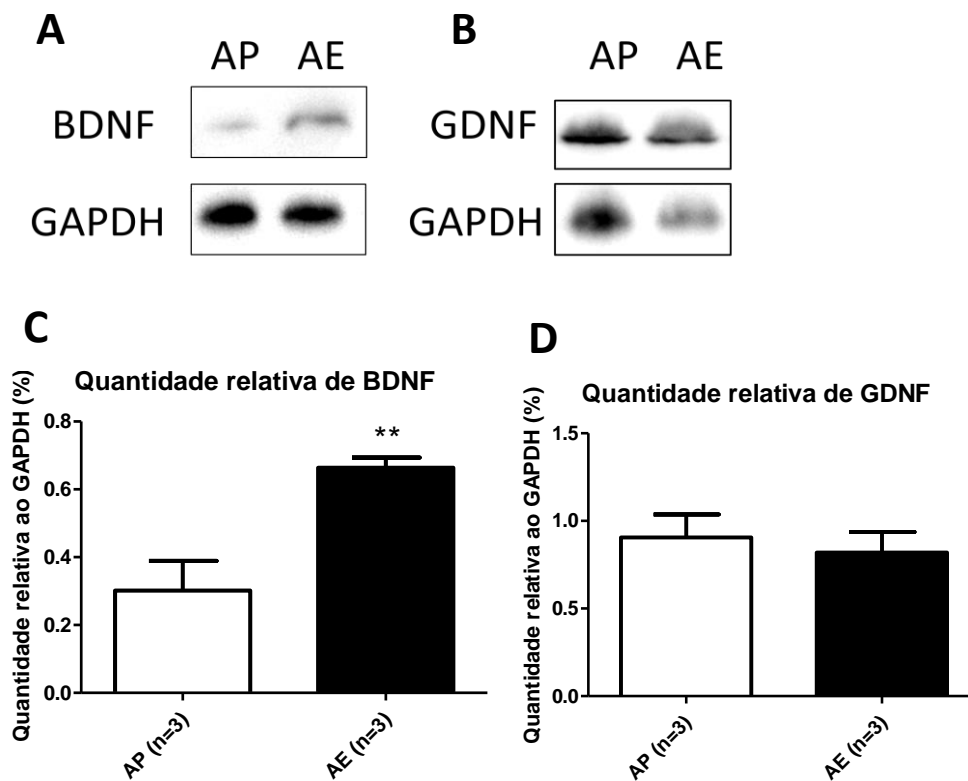


Figura 25 – Expressão protéica dos fatores neurotróficos (30). Bandas de (A) BDNF (14KDa) e (B) GDNF (55KDa) reveladas por western blotting. C) Quantidade relativa ao GAPDH de BDNF nos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0087$ ). D) Quantidade relativa ao GAPDH de GDNF nos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3242$ ). \*\* $p<0,01$ . AP (n=3). AE (n=3).

### 5.3.2 Ambiente enriquecido por 60 dias

A análise do western blot (Figura 26) revelou as bandas de BDNF (14KDa), GDNF (55KDa) e GAPDH (37KDa). Os animais mantidos no AE por 60 dias apresentaram um aumento significativo na expressão de BDNF (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0260$ ), quando comparado com o grupo AP.

Não houve diferença significativa na expressão de GDNF (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3828$ ) entre os grupos AP e AE.

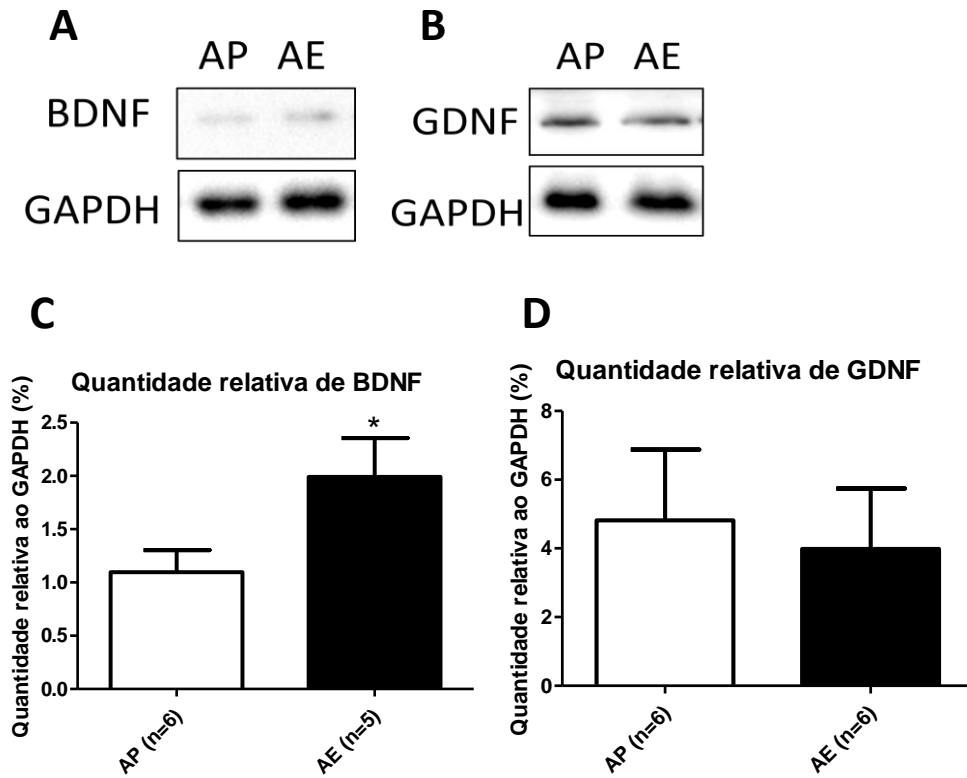


Figura 26 - Expressão protéica dos fatores neurotróficos (60). Bandas de (A) BDNF (14KDa) e (B) GDNF (55KDa) reveladas por western blotting. C) Quantidade relativa ao GAPDH de BDNF nos animais do AP e AE (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,0260$ ). D) Quantidade relativa ao GAPDH de GDNF nos animais do AP e AE GDNF (Teste t, não pareado. One-tailed.  $P=0,3828$ ). \* $p<0,05$ . AP (n=6). AE (n=6).

## 6 DISCUSSÃO

Ambiente enriquecido é um paradigma formado por estímulos complexos inanimados e sociais (ROSENZWEIG e BENNETT, 1969). Essa combinação de fatores é capaz de estimular áreas sensoriais, motoras e cognitivas em animais (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006)

Animais mantidos em um ambiente enriquecido apresentam várias alterações comportamentais e moleculares (FALKENBERG et al, 1992; PARK et al, 1992; KEMPERMANN et al. 1998; ICKES et al, 2000; RAMPON et al. 2000; TANG et al. 2001; MELENDEZ et al, 2004; BRUEL-JUNGERMAN et al. 2005; DEL ARCO et al, 2006; HUANG et al. 2007; MESA-GRESA et al, 2013; PANG e HANNAN, 2013)

Assim como revisado por Redolat e Mesa-Gresa em 2012, diferentes paradigmas de AE são avaliados na literatura e apresentam uma alta heterogeneidade de resultados. Apesar de efeitos benéficos induzidos pelo AE terem sido apontados, não se tem um consenso sobre qual dos paradigmas do AE é o ideal para ser utilizado (NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

Um estudo realizado por Leger e colaboradores em 2014 demonstrou essa heterogeneidade de resultados frente aos tempos variados de exposição ao AE. Os animais foram mantidos no AP ou AE por 24h, 1, 3 ou 5 semanas, e foram verificados resultados contraditórios entre os diferentes tempos de exposição. O comportamento tipo-ansiedade foi reduzido nos animais que passaram 3 semanas no AE, enquanto os que foram mantidos por 24h, 1 e 5 semanas não apresentaram diferença em relação aos animais mantidos no AP. Diferenças também foram verificadas em relação a memória desses animais. No teste da esQUIVA passiva, onde se avalia a memória baseada no estímulo aversivo, os animais mantidos no AE por 3 semanas tiveram melhor desempenho que os mantidos no AP, e os que passaram 24h, 1 ou 5 semanas no AE não apresentaram diferença em relação aos animais do AP. A memória de reconhecimento de objetos também foi analisada, e, diferente dos resultados já apresentados, o efeito do AE foi presente nos tempos de 1, 3, 5 e 6 semanas, onde ocorreu a melhora da memória nos animais mantidos no AE em relação aos animais mantidos no AP (LEGER et al, 2014).

O presente estudo avaliou se o tempo de exposição afeta os parâmetros cognitivos e moleculares em camundongos expostos ao AP ou ao AE por 30 ou 60 dias.

No TRO, na avaliação da MCD, os quatro grupos AP30, AE30, AP60 e AE60 exploraram o objeto novo por mais tempo, e durante a avaliação da MLD, os grupos AE30 e AE60 também exploraram o objeto novo por mais tempo, inferindo que ocorreu a formação da memória durante o treino e, então, foram capazes de se lembrar do objeto familiar, dando preferência à novidade, que é uma tendência natural dos camundongos. Na avaliação da MLD do TRO, apesar dos animais do grupo AP30 e AP60 terem apresentado uma grande tendência de maior exploração ao objeto novo, não houve diferença estatística. O estudo realizado por Winters e colaboradores em 2008 concorda que animais exploram preferencialmente o objeto novo durante a fase de teste e esse comportamento se deve ao reconhecimento do objeto familiar, no entanto, um estudo prévio demonstrou que os animais mantidos no AP por 24h, 1, 3, 5 e 6 semanas não discriminam o objeto novo comparado ao objeto familiar no TRO de MLD (LEGER et al, 2014), indo de acordo com os resultados obtidos no nosso estudo.

Os diferentes tempos de exposição ao AE avaliados neste estudo não tiveram influência sobre a memória de reconhecimento de objetos dos animais. Ambos os grupos, AE30 e AE60, não apresentaram diferenças na memória em relação aos animais mantidos no AP, mostrando que o paradigma de AE utilizado não foi capaz de melhorar a memória de reconhecimento de objetos desses animais. Estudos anteriores demonstram que o AE é capaz de melhorar a memória de reconhecimento de objetos dos animais submetidos a ele (VIOLA et al, 2009; KAZLAUCKAS et al, 2010; MESA-GRESA et al, 2013; LEGER et al, 2014; NOVKOVIC et al, 2015), contradizendo os resultados obtidos no presente trabalho, porém, como dito anteriormente, muitos paradigmas de AE são utilizados, tendo resultados heterogêneos (REDOLAT e MESA-GRESA, 2012; NITHIANANTHARAJAH e HANNAN, 2006).

No estudo realizado por Leger e colaboradores em 2014 foi verificada a melhora na memória de reconhecimento de objetos, porém o protocolo do AE possui algumas diferenças do protocolo aqui utilizado. Em comparação com nosso estudo, eles utilizaram uma caixa de AE maior (80x60x60 cm<sup>3</sup>), com uma maior interação social (12 animais por caixa) e o tempo de renovação dos objetos na caixa também foi maior (duas vezes por semana), e o tempo de exposição ao AE também foi variado (24h, 1, 3, 5 ou 6 semanas). Ainda no estudo realizado por Leger, et al (2008), essa heterogeneidade de resultados pode ser verificada na avaliação da



memória aversiva, onde, assim como no nosso estudo, o AE não teve efeito na memória durante os tempos de exposição de 24h, 1 e 5 semanas.

Viola e colaboradores (2009) também verificaram uma melhora na memória de reconhecimento de objetos induzida pelo AE, porém o paradigma por eles utilizado também difere do nosso. A caixa utilizada por eles possui duas partes conectadas, sendo uma parte de 27x16x12 cm<sup>3</sup> e a outra de 38x32x16 cm<sup>3</sup>. O número de animais por caixa foi maior que o utilizado nesse estudo (10 animais).

No TRS realizado neste estudo, durante a avaliação da MCD, os animais dos grupos AE30, AP60 e AE60 exploraram o animal intruso por menos tempo na fase do teste, e esse resultado também foi verificado na avaliação da MLD dos grupos AP60 e AE60. Essa diminuição na exploração na fase do teste demonstra que ocorreu a formação da memória durante o treino e, então, foram capazes de se lembrar do intruso. Durante o treino o intruso é uma novidade e durante o teste passa a ser familiar para o animal avaliado, e esse comportamento de maior tempo de exploração a novidade é natural em camundongos (DANTZER et al, 1987, PENÃ et al, 2006). Apesar de terem demonstrado uma tendência, os animais dos grupos AP30 e AE30 não apresentaram diferenças no tempo de exploração ao intruso entre as fases de treino e teste na avaliação da MLD, e essa diferença também não foi vista no grupo AP30 na avaliação da MCD.

Os diferentes tempos de exposição ao AE utilizados no presente trabalho não tiveram influência sobre a memória de reconhecimento social dos animais avaliados. Ambos os grupos, AE30 e AE60, não apresentaram diferenças na memória em relação aos animais mantidos no AP, mostrando que o paradigma de AE utilizado não foi capaz de melhorar a memória de reconhecimento social desses animais. O estudo de Monteiro e colaboradores (2014) concorda com os resultados obtidos no nosso estudo, onde animais mantidos em grupo no AE não apresentavam diferença na memória de reconhecimento social, quando comparados aos animais mantidos em grupo no AP. Apesar do resultado ter corroborado o nosso estudo, o AE utilizado por eles foi diferente do nosso. Eles utilizaram uma caixa de 40x33x16 cm<sup>3</sup> e os animais foram mantidos em grupo por 7 dias nesse ambiente (MONTEIRO et al, 2014).

Outro trabalho que verificou os efeitos do AE na memória social apresentou resultado que corrobora os resultados obtidos no nosso trabalho, demonstrando que

os animais mantidos por 8 semanas no AE não tiveram uma melhora na memória social (PEÑA et al, 2006).

Um estudo recente demonstra que animais com privação materna possuem prejuízos na memória espacial, e quando submetidos ao AE não apresentam melhora na memória, concordando com o nosso estudo, que o paradigma de AE utilizado não produziu efeito sobre a memória dos animais. O AE que esses animais foram mantidos possui 45x25x25 cm<sup>3</sup> e 5-6 camundongos por caixa (AKILLIOGLU et al, 2015).

Diante dessa variedade de protocolos de AE e resultados heterogêneos, podemos sugerir que a ausência de efeitos na memória dos animais avaliados no presente estudo esteja relacionada ao paradigma ambiental utilizado, que não foi ideal para verificar as alterações nos testes de TRO e TRS avaliados.

Sabendo que os camundongos possuem um comportamento natural de investigação à novidade e são capazes de reconhecerem seus co-específicos (DANTZER et al, 1987; PENÃ et al, 2006; GUSMÃO et al, 2012; MESA-GRESA et al, 2013), o presente estudo analisou a interação social entre os camundongos avaliados e camundongos desconhecidos, ditos como intrusos, através do TIS. Neste teste, pode-se notar claramente que os animais mantidos no AE por 30 e 60 dias apresentaram um aumento na interação social em relação aos animais dos grupos AP30 e AP60. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos em um estudo prévio, que também constatou que os animais mantidos no AE apresentaram uma maior interação social que os animais do AP (MESA-GRESA et al, 2013).

Esse aumento da interação social reflete o aumento no tempo que o animal avaliado explorou o animal desconhecido durante o encontro social, e esse tempo de exploração é modulado de acordo com o interesse social do animal avaliado e pode ser estimado pela investigação e contato social (MESA-GRESA et al, 2013). O contato social entre os animais pode acontecer através do comportamento social exploratório, que pode ser dito como a sociabilidade, e através de episódios de ameaça entre os animais, que é chamado de comportamento agonístico (MESA-GRESA et al, 2013). Estudos anteriores têm interpretado o aumento da sociabilidade como um sinal de diminuição da ansiedade (FILE e SETH, 2003; NAVARRO et al, 2004). Já foi demonstrado que o AE é capaz de induzir efeitos tipo-ansiolítico (BENAROYA-MILSHTEIN et al. 2004; GALANI et al. 2007; HUGES et al, 2010).

Neste contexto, podemos sugerir que o aumento na interação social, induzido pelo AE, nos animais avaliados no nosso trabalho se deve a uma possível diminuição na ansiedade desses animais, provocada pela exposição desses animais ao AE, e o tempo de exposição a esse ambiente não interfere no resultado, visto que ambos os tempos de 30 e 60 dias induziram esse efeito.

Os efeitos do AE em sistemas neurotransmissores envolvidos em processos cognitivos também já foram avaliados por estudos anteriores (PARK et al, 1992; LU et al, 1997; WARBURTON et al, 2003; MELENDEZ et al, 2004; MANAHAN-VAUGHAN e BRAUNEWELL, 2005; DEL ARCO et al, 2006; RAWAS et al, 2011; LIMA et al, 2014).

No presente estudo foi avaliado o efeito dos diferentes tempos (30 e 60 dias) de exposição ao AE na expressão gênica cortical de alguns componentes dos sistemas colinérgico, glutamatérgico e endocanabinóide, que são sistemas envolvidos em processos importantes na modulação das memórias (PARK et al, 1992; FOSTER et al, 1996; RAMPON et al, 2000; WILSON e NICOLL, 2001; BREDY 2004; NAKA 2005; BERARDI et al, 2007; DEL ARCO et al, 2007; LI et al, 2007; RAWAS, 2011; KATONA e FREUND, 2012; HU et al, 2013).

Os resultados alcançados no nosso trabalho através da avaliação da expressão gênica apresentaram bastantes diferenças entre os tempos de AE de 30 e 60 dias.

Nosso estudo demonstrou que ocorreu uma diminuição da expressão gênica dos receptores  $\alpha 7$  no córtex dos animais mantidos no AE por 30 dias. Também foi encontrada uma diminuição da expressão gênica dos receptores M1 no córtex dos animais mantidos no AE por 30 e 60 dias. A enzima ChAT, que catalisa a biossíntese da ACh, teve sua expressão gênica aumentada no córtex dos animais mantidos no AE por 60 dias.

Podemos sugerir que ocorreu uma *downregulation* nos receptores  $\alpha 7$  dos animais do grupo AE30, e nos receptores M1 dos animais dos grupos AE30 e AE60, a partir de um suposto aumento da liberação de ACh e a consequente alta ativação desses receptores. Estudos anteriores indicam que no processo de *downregulation*, altos níveis extracelulares de neurotransmissores podem levar a uma alta ativação dos receptores correspondentes, levando a redução do número desses receptores (TSAO et al, 2000; BERNARD et al, 2006).

Já foi demonstrado que a ativação dos receptores  $\alpha 7$  e M1 está relacionada com a melhora da memória (SCHREIBER et al, 2002; JONES et al, 2005; CHAN et al, 2007; GRAY and ROTH, 2007; LANGMEAD et al, 2008, BARAK e WEINER, 2011; MCLEAN et al, 2015), porém essa melhora na memória não foi verificada nos grupos avaliados no presente trabalho.

Pandya e Yakel em 2013 demonstraram que os efeitos tipo-ansiedade induzidos pela ativação dos receptores  $\alpha 7$  são dose-dependentes. Altas doses de nicotina e PNU-282987 (PNU), que são agonistas de  $\alpha 7$ , induzem efeito tipo-ansiosogênico em ratos, porém baixas doses de nicotina induzem efeito tipo ansiolítico, e baixas doses de PNU não apresentam resultados conclusivos sobre os efeitos tipo-ansiedade (PANDYA e YAKEL, 2013).

Com isso, podemos sugerir que a melhora da memória induzida pela ativação de  $\alpha 7$  também seja dose-dependente, assim como o comportamento tipo-ansiedade verificado por Pandya e Yakel em 2013, e que a suposta alta ativação dos receptores  $\alpha 7$  induzida pelo AE por 30 dias, que poderia resultar numa diminuição da sua expressão gênica, como verificada no nosso estudo, não apresenta efeito na melhora da memória. Outra hipótese seria que a melhora da memória induzida pela ativação de  $\alpha 7$  não pôde ser verificada através dos testes realizados no nosso estudo, mas não exclui a possibilidade dessa melhora na memória ser vista em outros tipos de testes que acessam a memória dos animais, como labirinto aquático de Morris, que avalia memória espacial.

Já foi relatado que o AE reverte o prejuízo na memória causado pela escopolamina demonstrando o envolvimento dos receptores M1 na melhora da memória (LIMA et al, 2014), porém no nosso trabalho não foi observado que os efeitos do AE nos receptores M1 tenha causado melhora nas memórias avaliadas. Para o presente trabalho, podemos especular que a suposta alta ativação dos receptores M1, provocada pelos tempos de 30 e 60 dias de AE, e relacionadas a um suposto aumento da liberação de ACh, possa induzir efeitos em outros tipos de testes que acessam a memória dos animais, como o labirinto aquático de Morris, que avalia memória espacial ou memória aversiva.

Nosso estudo revelou um aumento na expressão gênica da enzima ChAT, que catalisa a biossíntese de ACh, nos animais mantidos no AE por 60 dias, mas esse aumento não foi observado no grupo AE30. O estudo realizado por Dhanushkodi et al (2007) revelou que ratos com lesão no hipocampo apresentam

prejuízo na memória espacial e a exposição ao AE por 10 dias reverte esse prejuízo, porém não apresenta efeitos sobre a atividade da ChAT. Outro estudo verificou um aumento na atividade da ChAT nas regiões do hipocampo e córtex de ratos expostos ao AE por 50 dias, seguido de melhora na memória espacial. Essa melhora da memória espacial foi atribuída ao aumento na atividade da enzima ChAT (PARK et al, 1992). Foi relatado que o AE teve efeito sobre a ChAT apenas no maior tempo de exposição, 50 dias (PARK et al, 1992) e não apresentou efeito no menor tempo de exposição, 10 dias (DHANUSHKODI et al, 2007), podendo sugerir que os efeitos do AE sobre a enzima ChAT são tempo-dependente, e por isso o aumento da expressão gênica desta enzima, encontrado no nosso trabalho, foi verificado apenas no tempo de 60 dias de exposição ao AE. Apesar do aumento da atividade da ChAT ter sido acompanhado pela melhora na memória espacial no trabalho realizado por Park e colaboradores (1992), nosso estudo não relatou melhora na memória acompanhada da elevada expressão gênica de ChAT, porém esses resultados não excluem a possibilidade de outros testes de memória revelarem esses resultados.

Embora não tenha sido observado o aumento na expressão gênica da ChAT no grupo AE30, podemos sugerir que a diminuição da expressão dos receptores M1 poderia estar relacionada com o aumento na expressão gênica da ChAT no grupo AE60, de maneira que tenha ocorrido o aumento da biossíntese de ACh, um aumento na ativação dos receptores M1 levando a sua *downregulation*.

No sistema glutamatérgico, foi verificado, em nosso estudo, que a expressão dos receptores mGluR5 foi reduzida nos animais mantidos no AE por 30 dias em relação ao grupo AP30, mas não houve alteração no grupo AP60. Um estudo anterior revelou que os animais que ficaram em AE apresentaram uma na memória, e o bloqueio de mGluR5, através do antagonista MPEP (2-metil-6-(feniletil)piridina), teve efeito negativo em processos envolvidos na formação da memória (HULLINGER et al, 2015). O aumento da expressão protéica do dímero ativo de mGluR5 foi induzido pelo AE na região do córtex pré-frontal (MELENDEZ et al, 2004). Por outro lado, uma relação entre melhora cognitiva e diminuição da expressão de mGluR5 foi observada em modelo animal da doença de Alzheimer (HAMILTON et al, 2014). Da mesma forma, a inibição crônica desse receptor melhora o desempenho cognitivo em camundongo X fragile (MICHALON et al, 2014).

Rawas e colaboradores (2011) avaliaram os efeitos do AE na expressão gênica do sistema endocanabinóide. Eles verificaram que houve um aumento na expressão gênica da FAAH, nas regiões do hipotálamo e amígdala, em animais expostos ao AE, enquanto a expressão de MAGL não foi afetada pelo AE (RAWAS et al, 2011). FAAH é a enzima que catalisa a degradação de AEA e 2-AG, enquanto MAGL degrada apenas 2-AG (DE PETROCELLIS et al, 2004; DI MARZO et al, 2004). DAGL é a enzima que catalisa a biossíntese de 2-AG (DI MARZO et al, 2004). Em relação à expressão gênica da FAAH, o estudo de Rawas et al (2011) concorda com o nosso, pois também verificamos um aumento na expressão nos animais mantidos no AE por 60 dias, porém esse aumento não foi verificado no grupo AE30. Acompanhado ao aumento da expressão gênica de FAAH, o presente estudo verificou a diminuição da enzima de síntese DAGL nos animais expostos ao AE por 60 dias, mas não no grupo AE30. No nosso estudo, os animais mantidos no AE por 30 dias apresentaram um aumento na expressão gênica da enzima MAGL, contrariando o resultado obtido por Rawas et al (2011). Esses resultados sugerem que os níveis dos endocanabinóides no córtex total dos animais aqui avaliados poderiam estar reduzidos, devido à diminuição da enzima de síntese e ao aumento das enzimas de degradação, ocasionando uma baixa ativação dos receptores CB1.

Estudos anteriores já demonstraram que a alta ativação de CB1 está relacionada a déficits cognitivos (MALLET e BENINGER, 1996) e que seu bloqueio está relacionado à melhora da memória (TERRANOVA et al, 1996). Quando os receptores CB1 do neurônio pré-sináptico são ativados, ocorre a inibição da liberação dos neurotransmissores (DI MARZO et al, 2004).

Baseado nos fatos já discutidos no presente trabalho, nós sugerimos que o AE pode ter levado a uma diminuição dos níveis dos endocanabinóides nos neurônios pós-sinápticos e uma baixa ativação dos receptores CB1, não inibindo a liberação dos neurotransmissores ACh e Glu, permitindo assim a alta ativação dos receptores  $\alpha 7$ , M1 e mGluR5, levando ao processo de *downregulation* desses receptores pelo mecanismo de diminuição da sua expressão gênica. Embora não tenham sido verificados os efeitos do AE nas memórias avaliadas nos TRO e TRS, não podemos excluir a possibilidade dessa melhora ser verificada em outros testes que avaliam a memória. No entanto, os verdadeiros mecanismos moleculares que levaram a essas alterações verificadas no presente trabalho permanecem desconhecidos.

Estudos anteriores vêm relatando que AE é capaz de promover alterações nos fatores neurotróficos BDNF (FALKENBERG et al, 1992; PHAM et al, 1997) e GDNF (FAHERTY et al, 2004). Nosso estudo concorda em parte com essa afirmação, pois verificou que o AE por 30 e 60 dias induziu aumento apenas nos níveis de BDNF, enquanto os níveis de GDNF não tiveram diferença em relação ao AP. Ickes e colaboradores (2000) também demonstraram que o AE altera os níveis de BDNF. Os animais passaram um ano no AE e tiveram os níveis hipocâmpais de BDNF aumentados (ICKES et al, 2000). Outro estudo demonstrou um aumento na expressão proteica de BDNF em animais selvagens mantidos no AE comparados aos mantidos no AP, e em animais heterozigotos BDNF<sup>+/-</sup> mantidos no AE em relação aos heterozigotos BDNF<sup>+/-</sup> mantidos no AP, sendo que nos heterozigotos esse aumento de BDNF induzido pelo AE foi acompanhado da melhora na memória, mas essa melhora de memória não foi verificada nos animais selvagens (NOVKOVIC et al, 2015), assim como os resultados obtidos no presente estudo.

Os resultados obtidos no nosso estudo demonstram que diferentes tempos de exposição ao AE podem induzir respostas variadas aos parâmetros cognitivos e moleculares avaliados. A ausência de efeitos induzidos pelo AE nos parâmetros cognitivos não excluem a possibilidade de serem vistos quando analisados por outro paradigma.

Nossos resultados mostram, claramente, que há alterações moleculares induzidas pelos dois tempos de exposição e que muitas das alterações que ocorrem no tempo de exposição por 30 dias, são perdidas quando os animais são expostos a 60 dias de AE e vice-versa (Tabela 2). Baseado nos dados moleculares desse trabalho, a exposição ao ambiente enriquecido causou alterações moleculares plásticas que, certamente, influenciam de alguma maneira a memória dos camundongos. A avaliação desses efeitos, em outros tipos de memória pode ser importante para se esclarecer quais seriam as alterações comportamentais resultantes das alterações moleculares observadas.

Gene	AE por 30 dias	AE por 60 dias
$\alpha 7R$	↓	-
M1R	↓	↓
ChAT	-	↑
AChE	-	-
mGluR5	↓	-
FAAH	-	↑
MAGL	↑	-
NPLD	-	-
DAGL	-	↓

**Tabela 2 – Alterações moleculares induzidas pelos tempos de 30 e 60 dias de exposição ao AE. Seta para cima: aumento da expressão gênica. Seta para baixo: diminuição da expressão gênica.**



## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- O AE não melhora as memórias de reconhecimento de objetos e social em camundongos expostos a ele por 30 e 60 dias;
- O AE por 30 ou 60 dias promove o aumento da interação social nos camundongos avaliados;
- O AE por 30 dias induz a diminuição da expressão gênica dos receptores  $\alpha 7$ , M1 e mGluR5 na região córtex total;
- O AE por 60 dias promove a diminuição da expressão gênica do receptor M1 e o aumento da enzima ChAT na região do córtex total;
- O AE por 30 dias aumenta a expressão gênica da enzima MAGL na região do córtex total;
- O AE por 60 dias induz o aumento da expressão gênica da enzima FAAH, e provoca a diminuição na expressão gênica da enzima DAGL na região do córtex total;
- O AE por 30 ou 60 dias provoca o aumento da expressão protéica de BDNF na região do córtex total.

Assim, demonstramos nesse trabalho que o AE causa modificações moleculares nos sistemas colinérgico, glutamatérgico e endocanabinóide, assim como aumento da expressão de BDNF. Esses resultados mostram que a exposição ao AE, independente do tempo, leva a eventos que estão relacionados à plasticidade sináptica e que esses mecanismos envolvem os três sistemas estudados, assim como a expressão de outros genes induzidos pelo BDNF.

## 8 REFERÊNCIAS

- AIRAKSINEN, M.S., Saarma, M., The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Review Neuroscience*, 3, 383–394. 2002.
- AKILLIOGLU, K., Yilmaz, M.B., Boga, A., Binokay, S., Kocaturk-Sel, S. Environmental enrichment does not reverse the effects of maternal deprivation on NMDAR and Balb/c mice behaviors. *Brain Research*, 1624, 479-88. 2015.
- AKKERMAN, S., Blokland, A., Reneerkens, O., van Goethem, N. P., Bollen, E., Gijsselaers, H. J. M., ... Prickaerts, J. Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 335–47. 2012.
- AREAL, L.B., Rodrigues, L.C., Andrich, F., Moraes, L.S., Cicilini, M.A., Mendonça, J.B., Pelição, F.S., Nakamura-Palacios, E.M., Martins-Silva, C., Pires, R.G. Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. *Behavioral Brain Research*, 290, 8-16. 2015.
- BARAK, S. and Weiner, I. The M1/M 4 preferring agonist xanomeline reverses amphetamine-, MK801- and scopolamine-induced abnormalities of latent inhibition: putative efficacy against positive, negative and cognitive symptoms in schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14, 1233-1246. 2011.
- BAYAT, M., Sharifi, M.D., Haghani, M., Shabani, M. Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. *Brain Research Bulletin*, 119 (A), 34–40. 2015.
- BENAROYA-MILSHTEIN, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., ... Pick, C. G. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *The European Journal of Neuroscience*, 20(5), 1341–1347. 2004.
- BERARDI, N., Braschi, C., Capsoni, S., Cattaneo, A., Maffei, L. Environmental enrichment delays the onset of memory deficits and reduces neuropathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer-like neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 11(3), 359-70. 2007.
- BERNARD, V., Décossas, M., Liste, I., Bloch, B. Intraneuronal trafficking of G-protein-coupled receptors in vivo. *Trends and Neurosciences*, 29(3), 140-7. 2006.
- BEZARD, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-lewis, V., Przedborski, S., ... Segalen, V. Enriched Environment Confers Resistance to 1-Methyl-4- Involvement of Dopamine Transporter and Trophic Factors, *The Journal of Neuroscience*, 23(35): 10999-11007. 2003.
- BIRCH, A.M., McGarry, N.B., Kelly, A.M. Short-term environmental enrichment, in the absence of exercise, improves memory, and increases NGF concentration, early

neuronal survival, and synaptogenesis in the dentate gyrus in a time-dependent manner. *Hippocampus*, 23, 437–450. 2013.

BISOGNO, T., Howell, F., Williams, G., et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *Journal of Cell Biology*, 163, 463-468. 2003.

BOWIE, D. Ionotropic Glutamate Receptors and CNS disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7, 129-43. 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54. 1976.

BREDY, T.W., Zhang, T.Y., Grant, R.J, Diorio, J., Meaney, M.J. Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. *European Journal of Neuroscience*, 20, 1355–1362, 2004.

BRUEL-JUNGERMAN, E., Laroche, S., Rampon, C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*. 21:513–521. 2005.

CALOF, A.L. Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 19–27. 1995.

CHAN, W.K., Wong, P.T-H., Sheu, F-S. Frontal cortical  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors in working and reference memory. *Neuropharmacology*, 52, 1641- 1649. 2007.

CHISTYAKOV, V., Patkina, N., Tammimaki, A., Talka, R., Salminen, O., Belozertseva, I., ... Zvartau, E. Nicotine exposure throughout early development promotes nicotine self-administration in adolescent mice and induces long-lasting behavioural changes. *European Journal of Pharmacology* 640(1–3), 87–93. 2010.

CHRISTIE, M.J., Vaughan, C., Cannabinoids act backwards. *Nature*, 410, 527-530. 2001

COLCIAGO, A., Casati, L., Negri-Cesia, P., Celottia, F. Learning and memory: Steroids and epigenetics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 150, 64–85. 2015.

CONN, P.J., Pin, J.P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 37, 205-37. 1997.

CONNER, J.M., et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *Journal of Neuroscience*, 17, 2295–2313. 1997.

COTA, D., Marsicano, G., Tschop, M., et al. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 423-431. 2003.

DANTZER, R., Bluthé, R.M., Koob, G.F., LeMoal, M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology (Berl)*, 91, 363–8. 1987.

DAZZI, L., Vacca, G., Ladu, S., Pisu, M.G., Serra, M., Biggio, G. Long-term treatment with antidepressant drugs reduces the sensitivity of cortical cholinergic neurons to the activating actions of stress and the anxiogenic drug FG 7142. *Neuropharmacology*, 41, 229–37. 2001.

DE BELLIS, M.D. Developmental traumatology: a contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 155–170. 2002.

DE PETROCELLIS, L., Cascio, M.G., & Di Marzo, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *British Journal of Pharmacology*, 141, 765–774. 2004.

DEL ARCO, A., Segovia, G., Garrido, P., de Blas, M., Mora, F. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: Studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behavioural Brain Research*, 176, 267–273. 2007.

DHANUSHKODI, A., Bindu, B., Raju, T.R., Kutty, B.M. Exposure to enriched environment improves spatial learning performances and enhances cell density but not choline acetyltransferase activity in the hippocampus of ventral subicular-lesioned rats. *Behavioural Neuroscience*, 121(3),491-500. 2007.

DI MARZO, V., Bifulco, M., & De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(9), 771–84. 2004.

DI MARZO, V., Bisogno, T., Sugiura, T., Melck, D., De Petrocellis, L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochemical Journal*, 331, 15–19. 1998.

EL RAWAS, R., Thiriet, N., Nader, J., Lardeux, V., Jaber, M., & Solinas, M. Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system. *Brain Research*, 1390, 80–9. 2011.

FAHERTY, C.J. et al. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Molecular Brain Research*, 134, 170 – 179. 2004.

FALKENBERG, T. Mohammed, A.K, Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B., Lindfors, N. Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neuroscience Letters*, 138, 153–156. 1992.

FALSAFI, S.K., Deli, A., Hoger, H., Pollak, A., Lubec, G. Scopolamine administration modulates muscarinic, nicotinic and NMDA receptor systems. *PLoS ONE*, 7(2), e32082. 2012.

FIGUROV, A., Pozzo-Miller, L.D., Olafsson, P., Wang, T. & Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*, 381, 706–709. 1996.

FILE, S.E., & Seth, P. A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 35–53. 2003.

FISCHER, W. et al. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature*, 329, 65–68, 1987.

FOSTER, T.C., Gagne, J., Massicotte, G. Mechanism of altered synaptic strength due to experience: relation to long-term potentiation. *Brain Research*, 736, 243-250. 1996.

FUJII, T., Takada-Takatori, Y., Kawashima, K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *Journal Pharmacology Science*, 106(2), 186-92. 2008.

GALANI, R., Berthel, M-C., Lazarus, C., Majchrzak, M., Barbelivien, A., Kelche, C., Cassel, J-C. The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiology of Learning and Memory*. 88:1–10. 2007.

GIFFORD, A.N., Ashby, C.R. Electrically-evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR-141716A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277, 1431–1436. 1996.

GODOY-MATOS, A., Guedes, E.P., Souza, L.L., Valério, C.M. The endocannabinoid system: a new paradigm in the metabolic syndrome treatment. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 50-2. 2006.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Cellular Basis of Working Memory Review. *Neuron*, 14, 477–485. 1995.

GRAY, J.A, Roth, B.L. Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 33, 1100-1119. 2007.

GUSMÃO, I. D., Monteiro, B. M. M., Cornélio, G. O. S., Fonseca, C. S., Moraes, M. F. D., & Pereira, G. S. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behavioural Brain Research*, 228(2), 440–6. 2012.

GUZMÁN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 3, 745-755. 2003.

HAMILTON, A., Esseltine, J.L., DeVries, R.A., Cregan, S.P., Ferguson, S.S. Metabotropic glutamate receptor 5 knockout reduces cognitive impairment and pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Brain*. 7, 40. 2014.

HATTORI, S., Hashimoto, R., Miyakawa, T., Yamanaka, H., Maeno, H., Wada, K., Kunugi, H. Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behavioural Brain Research*, 180(1-4), 69–76. 2007.

HU, Y-S., Long, N., Pigino, G., Brady, S.T., Lazarov, O. Molecular Mechanisms of Environmental Enrichment: Impairments in Akt/GSK3b, Neurotrophin-3 and CREB Signaling. *PLoS ONE*, 8(5), e64460. 2013.

HUANG, Z. J., A. Kirkwood, T. Pizzorusso, V. Porciatti, B. Morales, M. F. Bear, L. Maffei, and S. Tonegawa. BDNF regulates the maturation of inhibition and the critical period of plasticity in mouse visual cortex. *Cell*, 98: 739–755. 1999.

HUGHES, R.N., & Collins, M.A. Enhanced habituation and decreased anxiety by environmental enrichment and possible attenuation of these effects by chronic alpha-tocopherol (vitamin E) in aging male and female rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 94 (4), 534–542. 2010.

HULLINGER, R., O’Riordan, K., Burger, C. Environmental enrichment improves learning and memory and long-term potentiation in young adult rats through a mechanism requiring mGluR5 signaling and sustained activation of p70s6k. *Neurobiology of Learning and Memory*, 125, 126–134. 2015.

ICKES, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., Granholm, A.C. Long-Term Environmental Enrichment Leads to Regional Increases in Neurotrophin Levels in Rat Brain. *Experimental Neurology*, 164, 45–52. 2000.

IZQUIERDO, I., Barros, D.M., Souza, T.M., Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393, 635-636. 1998.

IZQUIERDO, I., Bevilaqua, L.R.M., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Medina, J.H., Cammarota, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends and Neuroscience*, 29, 496-505. 2006.

IZQUIERDO, I., Medina, J.H., Vianna, M.R.M, Izquierdo, L.A, Barros, D.M., Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 1-11. 1999.

IZQUIERDO, I. *Memória* . Artmed. 2. ed. Rev. e ampl. Porto Alegre. 133p. 2011.

IZQUIERDO, I. Pre- and postsynaptic events em long-term potentiation in memory. *FASEB Journal*, 8, 1139-1145. 1984.

JESSOR, R., Jessor, S. A social-psychological framework for studying drug use. *NIDA Research Monograph*, 30, 102–109. 1980.

- JONES, C.K., Eberle, E.L., Shaw, D.B., McKinzie, D.L., and Shannon, H.E. Pharmacologic interactions between the muscarinic cholinergic and dopaminergic systems in the modulation of prepulse inhibition in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 312, 1055-1063. 2005.
- KADDIS, F.G., Zawada, W.M., Schaack, J. and Freed, C.R. Conditioned medium from aged monkey fibroblasts stably expressing GDNF and BDNF improves survival of embryonic dopamine neurons in vitro. *Cell Tissue Research*, 286, 241–247. 1996.
- KANDEL, E. R., Kupfermann, I., & Iversen, S. Learning and memory. In E. R. Kandel, J. H. Schwartz & T. M. Jessell (Eds.), *Principles of neural science* (4th ed.). New York: McGraw-Hill. 2000.
- KANG, H. & Schuman, E.M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, 267, 1658–1662. 1995.
- KATONA, I., Freund, T.F. Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual Review Neuroscience*, 35, 529–558. 2012.
- KASTIN, A.J., Akerstrom, V., Pan, W. Glial cell line-derived neurotrophic factor does not enter normal mouse brain. *Neuroscience Letters*, 340, 239–241. 2003.
- KAZLAUCKAS, V., Pagnussat, N., Mioranza, S., Kalinine, E., Nunes, F., et al. Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiology & Behavior*, 102, 475–480. 2011.
- KEMPERMANN, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *Journal Neuroscience*, 18, 3206–3212. 1998.
- KODJO, C.M., Klein, J.D. Prevention and risk of adolescent substance abuse. The role of adolescents, families, and communities. *Pediatric Clinics of North America*, 49, 257– 268. 2002.
- KORTE, M., H. Kang, T. Bonhoeffer, and E. Schuman. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology*, 37, 553–559. 1998.
- LANGMEAD, C.J., Watson, J., and Reavill, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*, 117, 232-243. 2008.
- LAVIOLA, G., Hannan, A.J., Macri, S., Solinas, M., Jaber, M. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiology Disease*, 31, 159–168. 2008.
- LEE, R., et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548), 1945-8. 2001.

LEGER, M.; PAIZANIS, E.; DZAHINI, K.; et al. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cerebral Cortex*, 24 (7), 1–8. 2014.

LEVEY, A.I., Edmunds, S.M., Heilman, C.J., Desmond, T.J., Frey, K.A. Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain. *Neuroscience*, 63(1), 207-21. 1994.

LI, C., Niu, W., Jiang, C.H., Hu, Y. Effects of enriched environment on gene expression and signal pathways in cortex of hippocampal CA1 specific NMDAR1 knockout mice. *Brain Research Bulletin*, 71, 568–577. 2007.

LIMA, A. P. a S., Silva, K., Padovan, C. M., Almeida, S. S., & Fukuda, M. T. H. Memory, learning, and participation of the cholinergic system in young rats exposed to environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, 259, 247–52. 2014.

LLORENS-MARTÍN, M.V., Rueda, N., Martínez-Cué, C., Torres-Alemán, I., Flórez, J., Trejo, J.L. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience*, 147, 631–638. 2007.

LU, Y. M., Jia, Z., Janus, C., Henderson, J. T., Gerlai, R., Wojtowicz, J. M., & Roder, J. C. Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *Journal of Neuroscience*, 17(13), 5196–5205. 1997.

MALLET, P.E., Beninger, R.J. The endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide impairs memory in rats. *Behavioral Pharmacology*, 7, 276–284. 1996.

MANAHAN-VAUGHAN, D., & Braunewell, K. H. The metabotropic glutamate receptor, mGluR5, is a key determinant of good and bad spatial learning performance and hippocampal synaptic plasticity. *Cerebral Cortex*, 15(11), 1703–1713. 2005.

MARTINS-SILVA, C. Avaliação neuroquímica do sistema colinérgico de camundongos com o gene do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) modificado geneticamente. 202f. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. 2008.

MCLEAN, S.L., Grayson, B., Marsh, S., Zarroug, S.H.O., Harte, M.K., Neill, J.C. Nicotinic  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  agonists enhance the formation and retrieval of recognition memory: potential mechanisms for cognitive performance enhancement in neurological and psychiatric disorders. *Behavioural Brain Research*, S0166-4328(15), 30167-4. 2015.

MCNAMARA, R.K., Skelton, R.W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Research*, 18(1), 33–49. 1993.



- MELENDEZ, R.I., Gregory, M.L., Bardo, M.T., Kalivas, P.W. Impoverished rearing environment alters metabotropic glutamate receptor expression and function in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1980–1987. 2004.
- MESA-GRESA, P., Pérez-Martínez, A., and Redolat, R. Environmental Enrichment Improves Novel Object Recognition and Enhances Agonistic Behavior in Male Mice. *Aggressive behavior*, 39, 269–279. 2013.
- MERLIO, J.P., et al. Increased production of the trkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron*, 10, 151–164. 1993.
- MCGAUGH, J.L. Memory – A century of consolidation. *Science*, 287, 248-251. 2000.
- MICHALON, A., Bruns, A., Risterucci, C., Honer, M., Ballard, T.M., Ozmen, L., Jaeschke, G., Wettstein, J.G., von Kienlin, M., Künnecke, B., Lindemann, L. Chronic metabotropic glutamate receptor 5 inhibition corrects local alterations of brain activity and improves cognitive performance in fragile X mice. *Biological Psychiatry*, 75(3), 189-97. 2014.
- MILLAR, N.S., Gotti, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56(1), 237-46. 2009.
- MOGI, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Kogure, O., Kuno, S., Ichinose, H., Nagatsu, T. Glial cell line-derived neurotrophic factor in the substantia nigra from control and parkinsonian brains. *Neuroscience Letters*, 300, 179–181. 2001.
- MOHAMMED, A. H., Henriksson, B. G., Soderstrom, S., Ebendal, T., Olsson, T., and Seckl, J. R. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behavioral Brain Research*, 57, 183–191. 1993.
- MOHAMMED, A. H., Winblad, B., Ebendal, T., and Larkfors, L. Environmental influence on behaviour and nerve growth factor. *Brain Research*, 528, 62–72. 1990.
- MONTEIRO, B.M.M, Moreira, F.A., Massensini, A.R., Moraes, M.F.D., and Pereira, G.S. Enriched Environment Increases Neurogenesis and Improves Social Memory Persistence in Socially Isolated Adult Mice. *Hippocampus*, 24, 239–248. 2014.
- MOUSSA, C.E.H., Rae, C., Bubb, W.A., Griffin, J.L. Inhibitors of glutamate transport modulate distinct patterns in brain metabolism. *Journal Neuroscience Research*, 85, 342-50. 2007.
- NAKA, F., Narita, N., Okado, N., Narita, M. Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. *Brain & Development*, 27, 275–278. 2005.
- NAVARRO, J.F., Ibanez, M., & Luna, G. Behavioral profile of SB 269970, a selective 5-HT(7) serotonin receptor antagonist, in social encounters between male mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 26(7), 515–518. 2004.
- NICHOLS, D.G., Atwell, D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in Neurosciences*, 11, 462-468. 1990.

NITHIANANTHARAJAH, J., & Hannan, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(9), 697–709. 2006.

NOVKOVIC, T., Mittmann, T., and Manahan-Vaughan, D. BDNF Contributes to the Facilitation of Hippocampal Synaptic Plasticity and Learning Enabled by Environmental Enrichment. *Hippocampus*, 25, 1–15. 2015.

OKADA, Y., et al. Experimental implication of celiac ganglionotropic invasion of pancreatic-cancer cells bearing c-ret proto-oncogene with reference to glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF). *International Journal of Cancer*, 81, 67–73. 1999.

OKAMOTO, Y., Morishita, J., Tsuboi, K., Tonai, T., Ueda, N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamine and its congeners. *Journal Biological Chemistry*, 279, 5298-5305. 2004.

OZAWA, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 54(5), 581-618. 1998.

PANDYA, A.A., Yakel, J.L., Activation of the alpha7 nicotinic ACh receptor induces anxiogenic effects in rats which is blocked by a 5-HT(1a) receptor antagonist. *Neuropharmacology*, 70C, 35–42. 2013.

PANG, T.Y.C., & Hannan, A.J. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology*, 64, 515–28. 2013.

PARK, G.A., Pappas, B.A., Murtha, S.M., Ally, A. Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neuroscience Letters*, 143, 259–262. 1992.

PEÑA, Y., Prunell, M., Dimitsantos, V., Nadal, R., Escorihuela, R.M. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. *Behavioural Brain Research*, 174, 181–187. 2006.

PHAM, T.M. et al. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience*, 94, 279–286. 1999.

PHAM, T.M. et al. Effects of neonatal stimulation on later cognitive function and hippocampal nerve growth factor. *Behavioral Brain Research*, 86, 113–120. 1997.

PRYBYLOWSKI, K., Wenthold, R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. *Journal Biological Chemistry*, 279, 9673-6. 2004.

RAMPON, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y. P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., ... Hu, Y. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(23), 12880–4. 2000.

REDOLAT, R., & Mesa-Gresa, P. Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 10, 293–316. 2012.

RASIKA, S., Alvarez-Buylla, A. & Nottebohm, F. BDNF mediates the effects of testosterone on the survival of new neurons in an adult brain. *Neuron*, 22, 53–62. 1999.

RAWAS, E.R., El Rawas, R., Thiriet, N., Nader, J., Lardeux, V., Jaber, M., Solinas, M. Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system. *Brain Research*, 1390, 80-9. 2011.

ROSENZWEIG, M.R., Bennett, E.L. Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice. *Developmental Psychobiology*, 2, 87–95. 1969.

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

SAAVEDRA, A., Baltazar, G. & Duarte, E. Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights. *Progress in Neurobiology*, 86(3), 186-215. 2008.

SCHREIBER, R., Dalmus, M., De Vry, J. Effects of alpha 4/beta 2- and alpha 7-nicotine acetylcholine receptor agonists on prepulse inhibition of the acoustic startle response in rats and mice. *Psychopharmacology*, 159, 248-257. 2002.

SINHA, R. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl.)*, 158, 343–359. 2001.

SOLINAS, M., Chauvet, C., Thiriet, N., El Rawas, R., & Jaber, M. Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(44), 17145–50. 2008.

SOLINAS, M., Thiriet, N., Chauvet, C., & Jaber, M. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Progress in Neurobiology*, 92(4), 572–92. 2010.

SQUIRE LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychology*, 99, 195–231. 1992.

SQUIRE, LR. e Kandel, ER. *Memória: da mente às moléculas*. Artmed. Porto Alegre. 251p. 2003.

TANG, Y.-P, Wang, H., Feng, R., Kyin, M., Tsien, J.Z. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 41, 779–790. 2001.

- TERRANOVA, J-P. et al. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716A. *Psychopharmacology*, 126, 165–172. 1996.
- TORASDOTTER, M., Metsis, M., Henriksson, B. G., Winblad, B., and Mohammed. A. H. Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions. *Neuroscience Letters*, 218, 107–110. 1996.
- TSAO, P. and von Zastrow, M. Downregulation of G proteincoupled receptors. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 365–369. 2000.
- VAN PRAAG, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews. Neuroscience*, 1(3), 191–8. 2000.
- VENTURA, A.L.M, Abreu, P.A., Freitas, R.C.C, Sathler, P.C., Loureiro, N., Castro, H.C. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 37(2), 66-72. 2010.
- VIOLA, G. G., Botton, P. H., Moreira, J. D., Ardais, A. P., Oses, J. P., & Souza, D. O. Influence of environmental enrichment on an object recognition task in CF1 mice. *Physiology & Behavior*, 99(1), 17–21. 2010.
- WARBURTON, E.C., Koder, T., Cho, K., Massey, P.V., Duguid, G., Barker, G.R., et al. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron*, 38, 987–96. 2003.
- WILSON, R.I., Nicoll, R.A. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*, 410, 588–592. 2001.
- WOOLF, N.J., Butcher, L.L., Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioral Brain Research*, 221(2), 488-98. 2010.
- WINTERS, B.D., Saksida, L.M., Bussey, T.J. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 32, 1055–1070. 2008.
- XU, Z., Hou, B., Zhang, Y., Gao, Y., Wu, Y., Zhao, S., Zhang, C. Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. *European Neuropsychopharmacology*, 19, 868–875. 2009.
- YOUNG, D. Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., During, M.J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine*, 5, 448–453. 1999.