

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA

ISABELA DINIZ GUSMÃO DE OLIVEIRA

**MEMÓRIA SOCIAL DE LONGA DURAÇÃO EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A DIFERENTES
ESTÍMULOS AMBIENTAIS**

Belo Horizonte
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ISABELA DINIZ GUSMÃO DE OLIVEIRA

**MEMÓRIA SOCIAL DE LONGA DURAÇÃO EM
CAMUNDONGOS EXPOSTOS A DIFERENTES
ESTÍMULOS AMBIENTAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Orientadora: Prof.^a Dra Grace Schenatto Pereira

Belo Horizonte
2010

Dedico este trabalho a
minha família :

“Minha querida mãe Ana
Lúcia, minhas irmãs Amanda e
Ana Patrícia e meu marido
Fabiano”

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelos meus momentos de oração, solicitando forças, atitudes, paciência para não desistir de continuar lutando por meus sonhos. E por permitir que os acontecimentos tomassem os rumos que tomaram.

A minha querida orientadora **Grace Schenatto Pereira**, pela confiança a mim depositada, pelos ensinamentos que tem transmitido e que ainda continua a transmitir, e por propiciar meu amadurecimento pessoal e científico nesta grande jornada da pesquisa.

A minha amada mamãe **Ana Lúcia Diniz Gusmão**, por sua força, dedicação e superação nos momentos difíceis da nossa vida. Por ser minha torcedora número 1, me confortar nas minhas derrotas e vibrar com minhas vitórias

Ao meu paizinho lindo, **José Adair Gusmão** (*sempre presente*), por ter me amado bastante e me proporcionado momentos inesquecíveis de carinho, atenção, cuidado e apoio. Tenho certeza que onde estiver estará vibrando com esta vitória!

A meu marido **Fabiano Gomes de Oliveira**, pelo companheirismo, pelo sofrimento conjunto de um grande trabalho, pelo apoio e por palavras certas nos momentos certos. Agradeço todo o seu amor, carinho, paciência e pela presença incansável com que me apoiou ao longo do período desta dissertação. Sempre te amarei !

As minhas queridas irmãs **Amanda Diniz Gusmão** e **Ana Patrícia Gusmão** cujo apoio imprescindível já vem de longa data

Aos meus sobrinhos **Felipe Augusto Gusmão Wedling Henriques** e **Mariana Gusmão de Oliveira**, por trazer mais alegria, risadas e descontração na nossa família.

As **Ladies** do laboratório, **Cristina, Daniela Fontes, Luciana, Iva, Maira, Ana Cláudia, Onésia, Danielle Bernardes, Natália, Grace, Juliana, Aila, Suellem Batista Capettini** (*sempre presente*) e **Mariele de Oliveira Andrade**(*sempre presente*).

Aos meus amigos do NNC, **Daniel, Hércules, Gabriel, Flávio, Gustavo Lopes, Gustavo Rezende, João e Guilherme**, pelos excelentes momentos.

Um abraço especial pelo companheirismo dos amigos **Thiago Luiz do Nascimento Lazoni** e **Cristina dos Santos Fonseca**

As minhas queridas amigas “*morcegas*” **Fernanda Rachel Moura, Lilian Costa Ferreira, Thalita Campos Macedo** e **Luciana Mol Santos** pelos agradáveis encontros para minizar a ansiedade deste trabalho

Ao almoço de domingo na casa da **Vovó Joanita** com a minha família, meus tios, primos e agregados.

Aos professores **André Ricardo Massensini, Márcio Flávio Dutra Moraes** e **Juliana Carvalho Tavares** pela contribuição científica valiosa de vocês

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1- INTRODUÇÃO.....	14
1.1- Aprendizado e memória.....	14
1.2 -Classificação das memórias.....	15
1.3- Memória olfativa.....	19
1.3.1- Processamento da memória social.....	23
1.3.2- Condições ambientais e comportamento social.....	28
2- OBJETIVOS.....	32
2.1-Objetivos específicos.....	32
3- JUSTIFICATIVA.....	33
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1- Animais.....	35
4.2- Condições ambientais.....	35
4.2.1- Isolamento social.....	35
4.2.2- Estímulo olfativo social e não social.....	36
4.2.3- Enriquecimento do ambiente.....	37
4.3- Protocolos comportamentais.....	37
4.3.1-Reconhecimento social.....	38
4.3.2- Memória de Reconhecimento de Objetos.....	40
4.3.3- Esquiva inibitória.....	41
4.3.4- Avaliação do padrão tipo ansiedade.....	41
4.4- Delineamento experimental.....	43

4.5- Análise estatística.....	50
5- RESULTADOS.....	51
5.1 – Memória de reconhecimento social.....	51
5.1.1- Memória de curta duração.....	51
5.1.2- Memória de longa duração.....	52
5.2- Memória de Reconhecimento de Objetos	53
5.3- Esquiva inibitória	54
5.4-Labirinto em cruz Elevado.....	55
5.5- Estímulo olfativo social e não social.....	56
5.6 – Enriquecimento do ambiente.....	58
6- DISCUSSÃO.....	59
7- CONCLUSÃO.....	66
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURA

AMPA -*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*- ácido α-amino 3-hidroxi-5 metil-4- isoxazolepropionico

AOB – *accessory olfactory bulb* – bulbo olfatório acessório

AP5 - ácido 5-amino- fosfonoaléxico

DNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalina- 2,3- diona

LTD – *long term depression* – depressão de longa duração

LTP- *long term potentiation* – potenciação de longa duração

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases* - proteína quinase ativada por mitógeno

MCD- memória de curta duração

MLD- memória de longa duração

MOB – *main olfactory bulb* – bulbo olfatório principal

MOE- *main olfactory epithelium* – epitélio olfatório principal

NMDA – N-metil-D- aspartado

RNA_m- ácido ribonucléico mensageiro

VNO – *vomeronasal organ* – órgão vomeronasal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes paradigmas utilizados para avaliar o reconhecimento social	22
Figura 2: Diagrama esquemático do sistema olfatório do roedor.....	24
Figura 3: Figura esquemática mostrando o processamento da informação olfativa	27
Figura 4: Foto mostrando um animal em ambiente enriquecido.....	37
Figura 5: Foto mostrando o animal residente à esquerda, explorando o animal intruso, no interior da gaiola plástica, durante a tarefa de reconhecimento social	39
Figura 6: Desenho experimental: avaliação da memória social de curta duração de animais agrupados e isolados.....	43
Figura 7: Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração de animais agrupados e isolados.....	44
Figura 8: Desenho experimental: avaliação da memória declarativa através da tarefa de reconhecimento de objetos	45
Figura 9: Desenho experimental: avaliação da memória associativa através da tarefa de esquiva inibitória.....	46
Figura 10: Desenho experimental: avaliação do padrão tipo ansiedade após animais serem submetidos a memória social de longa duração.....	47
Figura 11: Desenho experimental: avaliação da inclusão de estímulos olfatórios sociais e não sociais na memória social de longa duração de animais isolados...	48
Figura 12 Desenho experimental: avaliação da inclusão do ambiente enriquecido na memória social de longa duração de animais isolados.....	49
Figura 13: Memória social de curta duração não é prejudicada por 7 dias de isolamento social.....	51

Figura 14: Memória social de longa duração é prejudicada por 7 dias de isolamento social.....	52
Figura 15: A memória declarativa, avaliada na tarefa de reconhecimento de objetos, não foi prejudicada pelas condições de isolamento.....	53
Figura 16: A memória associativa, avaliada na tarefa de esquiva inibitória, não foi prejudicada pelas condições de isolamento.....	55
Figura 17:. O comportamento do tipo-ansiedade, avaliado no labirinto em cruz elevado, não foi alterado pelas condições de isolamento.....	56
Figura 18: Inclusão de componentes olfatórios de origem social e não social reverte o déficit de memória social de longa duração induzido pelo isolamento.	57
Figura 19: O enriquecimento do ambiente reverte o déficit de memória social induzida pelo isolamento.....	58

RESUMO

Estudos têm demonstrado que o isolamento social agudo, de 24h, ou crônico, de mais de quatro semanas, iniciado na vida adulta, prejudica o armazenamento da memória social de longa duração. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito do isolamento social de uma semana na memória de longa-duração, avaliada pelos paradigmas de reconhecimento social e de objetos e esQUIVA INIBITÓRIA, além de verificar os efeitos do isolamento sobre comportamentos do tipo-ansiedade, avaliados no labirinto em cruz elevado. Nossos resultados demonstraram que animais isolados apresentam especificamente déficit de memória social de longa duração. Assim como as demais memórias de longa duração avaliadas, a memória social de curta duração não foi afetada pelo isolamento social de sete dias. Além disso, não houve diferença entre animais agrupados e isolados quanto ao desempenho na tarefa de labirinto em cruz elevado. Diante destes resultados, estabelecemos a hipótese de que o isolamento social, por proporcionar ao animal uma “monotonia olfativa”, estaria afetando o processamento específico da memória social de longa duração (MSLD), por ser este tipo de memória, dentre as demais avaliadas neste trabalho, o mais dependente do olfato. Sendo assim, testamos se a inclusão de estímulo olfatório durante o isolamento social seria capaz de bloquear o efeito amnésico do isolamento. Nossos resultados demonstraram que animais isolados, mas com constante estímulo olfatório de origem social e não-social foram capazes de reter MSLD. Também verificamos se a inclusão de outros estímulos sensoriais, através da exposição dos animais à condição de ambiente enriquecido, seria suficiente para bloquear o efeito amnésico do isolamento social. Nossos resultados demonstraram que animais isolados, mas em ambiente enriquecido, são capazes de reter MSLD. Nossos resultados em conjunto permitem sugerir que o isolamento social impõe ao animal uma “monotonia olfativa” que afeta especificamente a MSLD que é mais dependente de olfato. No entanto, a inclusão de estímulos sensoriais olfativos ou não, parece compensar a ausência de estímulos sociais bloqueando o déficit de MSLD imposto pelo isolamento.

Palavras-chave: memória social, isolamento social, ambiente enriquecido, reconhecimento de objetos, esQUIVA INIBITÓRIA.

ABSTRACT

It has been demonstrated that acute (24h) and chronic (more than 4 weeks) social isolation, when initiated during the adult life, impaired the storage of social long-term memory (SLTM). Our aim was investigate the effect of 1 week of social isolation on long-term memory, evaluated in the following paradigms: social and object recognition and inhibitory avoidance. Furthermore, we analyzed the effect of social isolation on anxiety-like behaviors through plus maze paradigm. Our results demonstrated that animals under social isolation present specifically deficits on SLTM, while the other types of memory evaluated here were unaltered. We also evaluated social short-term memory and did not find differences between grouped and isolated animals. Finally, social isolation did not increase anxiety-like behaviors. Based on these results we established the hypothesis the social isolation induces an “olfactory monotony” which impaired specifically SLTM because is the type of memory, between all tested here, with higher degree of olfaction dependence. Thus, to address this question we include social or non-social odor cues as long as the isolation last. Our results demonstrated that the presence of odor cues blockade the SLTM impairment promoted by the social isolation. We also verified if other sensory stimulus, through exposure of animals to enriched environment (EE), will be able to blockade memory deficits promoted by social isolation. We found that EE was able to blockade the amnesic effect of social isolation. Taken together, our results suggest that social isolation impose an “olfactory monotony” which affects specific SLTM. However, the inclusion of sensory stimulus compensates the absence of social stimulus, blocking the memory deficit social isolation-dependent.

Key-words: social memory, social isolation, enriched environment, object recognition, inhibitory avoidance.

1- INTRODUÇÃO

1.1 – APRENDIZADO E MEMÓRIA

“Memória são as ruínas de Roma e as ruínas de nosso passado; memória tem o sistema imunológico, uma mola e um computador. Memória é o nosso senso histórico e nosso senso de identidade pessoal (Izquierdo, 2002)”. Esta frase exemplifica o quanto é difícil conceituar memória como sendo algo único. Em neurobiologia, consideramos que memória é um evento fisiológico constituído pelas etapas de aprendizagem, formação, conservação e evocação de informações sensoriais (Izquierdo, 2002).

O processo de formação de memórias tem início com a aprendizagem ou aquisição de informações recebidas por intermédio de estímulos que são detectados pelos sistemas sensoriais (Baddeley, 1998). A formação de memórias envolve síntese de proteínas, que pode ser requerida para transformar informações recém aprendidas em modificações sinápticas estáveis (Davis e Squire, 1984; Dudai, 1996; McGaugh, 2000). Desta forma, as memórias lábeis são transformadas em memórias mais estáveis, em um processo denominado consolidação (Bliss e Collingridge, 1993; Izquierdo, 2006; McGaugh, 2000). Um possível mecanismo bioquímico para explicar a consolidação da memória é conhecido como potenciação de longo prazo ou *long-term potentiation* (LTP). Assim, a LTP, como também a LTD, depressão de longo prazo (*long term depression*), é considerada o principal mecanismo neural subjacente à formação de memórias (Bliss e Collingridge, 1993; Jedlicka et al., 2008; Blundon et al., 2008).

O processo de evocação da memória é a etapa através da qual é possível ter acesso à informação armazenada para utilizá-la mentalmente na cognição e na emoção (Abbel e Latal, 2001). Estudos têm mostrado que, logo após a evocação da informação já consolidada (lembrança), ocorre um novo processo de consolidação, chamado de reconsolidação. Portanto, pode-se tanto fortalecer as conexões neurais existentes, beneficiando a memória, como também desfazer e refazer novos circuitos neurais, gerando amnésia, novo aprendizado ou extinção da memória anterior (Przybyslawski e Sara, 1997; Abel e Lattal, 2001; Schafe et al., 2001).

1.2- CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS

Memórias podem ser classificadas de acordo com sua duração em memória de curta (MCD) e de longa duração (MLD) (Gold, 1975; McGauch, 1966 e 1968) sendo opostas à memória transiente, de momento a momento, denominada memória de trabalho (Gold, 1975; Goldman-Rakic, 1996).

A memória de trabalho (MT) é a capacidade de associar uma nova informação e compará-la a uma já existente (Goldman-Rakic, 1996; revisado por Baddley, 1998), não deixa traços e grande parte se perde por completo. Este tipo de memória é processado fundamentalmente pelo córtex pré-frontal, que age em conjunto com outras regiões cerebrais, como por exemplo, o córtex entorrinal, córtex parietal superior, córtex cingulado anterior e hipocampo (Izquierdo e Medina, 1998).

As memórias de curta e longa duração podem ser diferenciadas usando o critério síntese protéica.

A memória de curta duração (MCD) independe de síntese de RNA mensageiro (RNAm) e proteínas, perdura por 1-3 horas, e pode ser acessada durante este período; enquanto a memória de longa duração (MLD) é dependente de RNAm e proteínas, pode durar por horas, dias, semanas ou até mesmo por períodos mais longos (Davis e Squire, 1984; Emptage e Carew, 1993; Izquierdo e Medina, 1998; MacGaugh, 2000). Em 1890, Willian James propôs que a MCD seria responsável pela formação da MLD (James, 1890), porém posteriormente estudos mostraram que se trata de mecanismos distintos.

De fato, estudos farmacológicos mostraram diferentes respostas da MCD e MLD em estruturas cerebrais tais como a região CA1 do hipocampo (Ardenghi et al., 1997; Bevilaquia et al., 1997; Cammarota et al., 1997; Izquierdo et al., 1992, 1995, 1997a, 1998, 1999; Jerusalinky et al., 1992, 1994; Wolfaman et al., 1994), córtex entorrinal (Ardenghi et al., 1997; Ferreira et al., 1992; Izquierdo et al., 1992, 1995, 1998, 1999; Jerusalinky et al., 1992, 1994), córtex parietal posterior (Ardenghi et al., 1997, Izquierdo et al., 1997a, 1997c), córtex préfrontal anterolateral (Goldman-Rakic P, 1992) e amígdala (Ardenghi et al., 1997; Bevilaquia et al., 1997; Cahill et al., 1998; Izquierdo et al., 1999; Jerusalinky et al., 1992; Wolfaman et al., 1994). Os resultados evidenciaram que no hipocampo a administração de substâncias, tais como DNQX (bloqueador do receptor AMPA) e AP5 (antagonista do receptor NMDA) bloqueiam tanto a MCD quanto MLD enquanto outras, tais como a noradrenalina, que afetam seletivamente a MLD. Além disso, três substâncias SKF 38393 (agonista do receptor D1 de dopamina), 8-HO-DPAT (agonista do receptor 5HT1a) e PD098059 (inibidor seletivo da MAPK) afetaram seletivamente a MCD sem alterar a MLD.

As memórias também podem ser classificadas em relação ao seu conteúdo, em memórias declarativas ou explícitas e não-declarativas ou implícitas.

A memória não-declarativa inclui habilidades motoras e sensoriais, hábitos e aprendizado emocional, assim como formas elementares de aprendizado reflexo. Assim, a memória não-declarativa envolve tipicamente um conhecimento que é de natureza reflexa, mas que não exige reflexão (Squire, 2003). Esta memória está sob o controle do estriado e suas conexões (revisado por Rossato, 2007), além do núcleo caudato e do cerebelo (Packard et al., 1994) e fazem parte deste grande grupo as memórias associativas que são avaliadas, principalmente, por paradigmas relacionados ao medo (Izquierdo et al., 1999).

Entre os paradigmas utilizados para se estudar este tipo de memória em animais estão o condicionamento ao medo e a esQUIVA inibitória ou passiva. Na esQUIVA inibitória, os animais aprendem a não descer de uma plataforma ou não atravessar uma porta a fim de evitar entrar em um local onde receberão um estímulo aversivo, ou seja, um choque nas patas. Esta tarefa recruta essencialmente hipocampo dorsal (Lorenzini et al., 1996; Izquierdo e Medina, 1997); mas também depende do córtex entorrinal e parietal sendo intensamente modulada pelo núcleo basolateral da amígdala (Izquierdo et al., 1992, Lorenzini, 1996; Bonini et al., 2003; Rossato et al., 2007).

As memórias declarativas são as memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos. É possível declarar conscientemente que elas existem e relatar como são adquiridas, já que são feitas com plena intervenção da consciência (Squire, 2003).

As principais estruturas cerebrais responsáveis pelas memórias explícitas são o hipocampo e o córtex entorrinal, tais regiões trabalham associadas e em comunicação com outras regiões como o córtex cingulado e o córtex parietal (Izquierdo et al., 1998).

Memórias explícitas têm sido estudadas em animais através de uma grande variedade de protocolos comportamentais, tais como reconhecimento de objetos e reconhecimento social.

O aprendizado na tarefa de reconhecimento de objetos é quantificado pela diferença entre o tempo de exploração de um objeto familiar e um objeto novo. Quando os animais são expostos concomitantemente a objetos familiares e objetos novos, tendem a passar mais tempo explorando o novo objeto em detrimento do objeto antigo. Esta aparente “preferência incondicionada” para o objeto novo é considerada como um indicativo de que a representação do objeto familiar existe na memória; sendo esta a base para a tarefa de reconhecimento de objetos no estudo da memória declarativa em roedores (Ennaceur et al., 1988, 1996, 2005, 2009, 2010, Tulving et al., 1972).

O reconhecimento de objetos também é estudado como um componente crítico da memória declarativa em humanos (revisado por Winter, 2008), principalmente devido este comportamento ser comumente prejudicado em pacientes afetados por doenças neurodegenerativas ou que sofreram dano cerebral (Buffalo et al., 1998; Hajilou e Done, 2007; Holdstock, 2005; Irle et al., 1987; Laatu et al., 2003; Lee et al, 2003; Manns e Squire, 1999; Purdy et al., 2002; Reed e Squire, 1997).

Muitos estudos têm indicado o papel do córtex perrinal na discriminação de objetos (Brown et al., 1987; Gaffan e Murray, 1994; Fahy et al., 1993; Meunier et al., 1993; Susuki et al., 1993; Ennaceur et al., 1996; Ringo, 1996; Xiang e Brown, 1998; Murray e Bussey, 1999; Brown e Aggleton, 2001), além de outras estruturas como o hipocampo (Rossato et al., 2007).

Outro tipo de memória considerada declarativa é a memória olfativa. Este fato ocorre devido sua semelhança com o sistema de memória declarativa em humanos – aprendizagem e codificações rápidas, memórias duradouras e uma alta capacidade de armazenamento de informações (revisado por Wislow, 2003).

1.3- MEMÓRIA OLFATIVA

Sabe-se que vários comportamentos são dependentes do sistema olfativo, logo é possível distinguir diferentes tipos de memória olfativa. Em geral, aprendizagem olfativa pode ser avaliada em tarefas com ou sem motivação social (Ferguson et al., 2000, 2002; Sanchez-Andrade et al., 2005).

Considerada como uma memória olfativa sem motivação social, o reconhecimento de odores utiliza-se de dicas de odores oriundos de componentes da natureza, como alimentos, por exemplo, mas não oriundos de outros animais (Hunter et al., 1989; Abraham et al., 2010).

Já na memória olfativa motivada socialmente, por exemplo, o estímulo olfativo é um animal co-específico sendo o armazenamento de informações referentes a este indivíduo denominado memória social (Axelson et al., 1999; Bluthe et al., 1990; De Gasperin-Estrada et al., 2008).

Além disso, outros comportamentos como a formação de pares, reconhecimento familiar, gestação seletiva e dominância hierárquica dependem da capacidade de memorização social de cada indivíduo (Ferguson, 2000, 2002; Moura, 2008). Ambas as memórias, social e de reconhecimento de odores, são fundamentais para a sobrevivência do animal desde que desta forma o mesmo possa obter informações sobre o meio ambiente (Wislow e Insel, 1989; Wislow, 2003; Sanchez-Andrade et al., 2005). Em especial, a habilidade para reconhecer um indivíduo é importante para vários comportamentos animais, pois sem esta capacidade o animal não consegue distinguir um familiar de um potencial competidor ou predador e desta forma não consegue demonstrar um comportamento responsivo apropriado (Caldwell, 2008).

A memória social pode ser estudada através de diferentes paradigmas. Em 1982, Thor e Holloway propuseram um simples teste para avaliar a memória social e denominaram de reconhecimento social de curta duração. Os autores mensuraram a quantidade de comportamentos exibidos por roedores em explorar seus co-específicos. Os comportamentos sociais de exploração incluem aqueles no qual o animal investiga o outro cheirando e lambendo ou mesmo utilizando suas vibrissas, ou ainda através da investigação anogenital, que parece ser extremamente importante para a aquisição de informações (Popik e Van Ree, 1998). O método desenvolvido pelos pesquisadores baseia-se na seguinte premissa: quando um co-específico não familiar, chamado intruso, é introduzido pela primeira vez na caixa do animal residente, esse investiga vigorosamente o novo animal.

Animais adultos ditos residentes foram expostos a animais juvenis por intervalos de tempo de 10, 20, 40 ou 80 minutos. Os resultados mostraram que após o intervalo de tempo de 10, 20 e 40 minutos, quando o animal juvenil familiar é reintroduzido, este recebeu menor investigação olfatória durante o segundo encontro (Figura 1a). Porém, se o intervalo entre a remoção do novo animal e a reintrodução do mesmo na caixa do animal residente for maior de 80 minutos não ocorrerá diminuição da investigação olfatória no segundo encontro. Os autores acreditam que a memória social do animal residente perdura por um curto período de tempo. Ressaltaram também que a duração da memória social pode ser prolongada indefinidamente se ocorrerem várias apresentações do mesmo animal juvenil e pode ser prejudicada se durante os intervalos ocorrerem apresentações de um animal juvenil diferente.

Em 1995, Engelman e colaboradores, propuseram um método alternativo para avaliar o reconhecimento social, denominado paradigma de discriminação social. De acordo com os autores, resultados avaliados por meio da tarefa de reconhecimento de objetos evidenciaram que os animais são capazes de discriminar dois objetos diferentes através do reconhecimento olfatório. Desta forma, os animais podem discriminar entre um animal juvenil familiar e não familiar quando ambos são apresentados concomitantemente na segunda sessão. O reconhecimento social seria mensurado através da contabilização do tempo de exploração do animal juvenil familiar e do animal juvenil não familiar, conforme mostrado na Figura 1b.

Também em 1995, Wislow e Camacho propuseram o paradigma habituação/desabituação. Este teste baseia-se nas diferentes respostas a um odor familiar em relação a um novo odor (Halpin, 1974).

Neste método o animal residente é exposto por 4 sessões de 10 minutos a um odor particular individual, o primeiro animal juvenil, que resulta em habituação. Em seguida o animal residente é exposto a um odor de um novo animal, que pode levar a desabituação. Após a quarta sessão, com um animal juvenil novo, espera-se que exploração do animal residente seja maior se a diminuição da investigação olfatória não for devido a um processo de fadiga (Figura 1c).

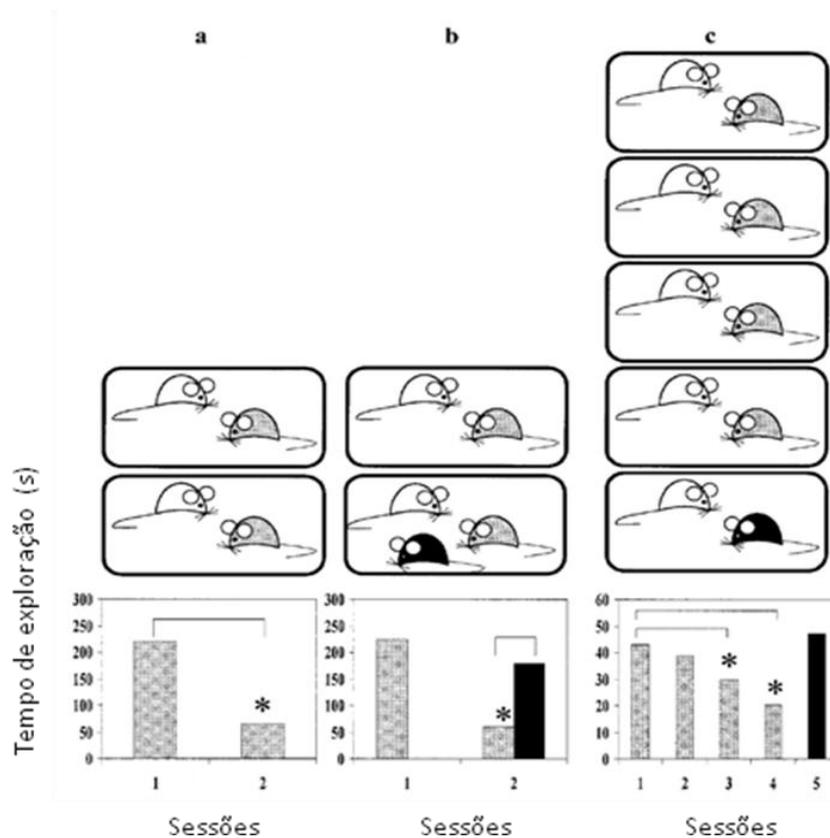


Figura 1: Diferentes paradigmas utilizados para avaliar o reconhecimento social. (a) Paradigma de reconhecimento social originalmente descrito por Thor e Holloway, 1982. (b) Paradigma de discriminação social descrito por Engelman et al., 1995. (c) Paradigma de habituação/desabituação descrito por Wislow e Camacho, 1995 (modificada de Ferguson, 2002).

Todas as três metodologias avaliam memória social e podem ser consideradas como variantes da tarefa de reconhecimento social.

1.3.1- PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA OLFATIVA

Em roedores, a olfação representa a principal via sensorial pela qual os animais adquirem informações críticas com relação ao ambiente em que se encontram, influenciando profundamente vários de seus comportamentos (Brown, 1987). Estas informações vão desde a sinalização da presença de alimento ou de algum predador no ambiente, passando pela percepção de uma fêmea “receptiva”, motivando, respectivamente, comportamentos alimentares, defensivos e reprodutivos. Além destas funções, a olfação apresenta um papel importantíssimo no reconhecimento e na comunicação entre co-específicos (Carleton et al., 1959).

A informação olfativa pode ser de dois tipos: feromônios e outros odorantes. Os feromônios são substâncias secretadas por indivíduos de uma mesma espécie, que geram reações específicas, quase estereotipadas em co-específicos (Karlson e Luscher, 1959, Wilson, 2006).

Para o processamento de informações olfativas advindas dos dois tipos de odorantes, roedores exibem dois sistemas: o sistema olfatório principal e o sistema olfatório acessório. Na Figura 2 estão representados o epitélio olfatório principal (MOE – *main olfactory epithelium*), bulbo olfatório principal (MOB – *main olfactory bulb*), bulbo olfatório acessório (AOB – *accessory olfactory bulb*) e o órgão vomeronasal (VNO - *vomeronasal organ*).

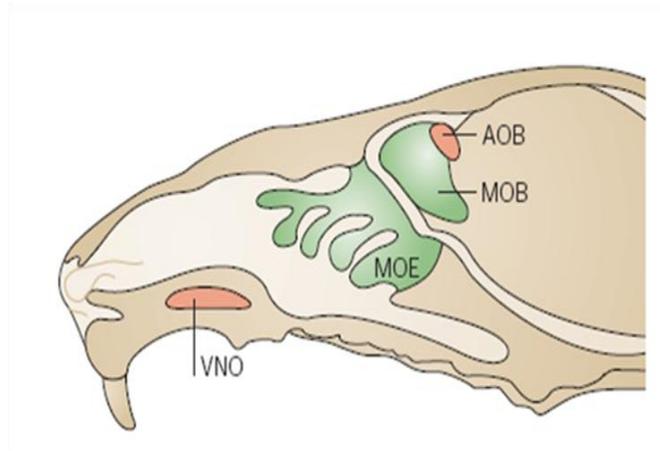


Figura 2: Diagrama esquemático do sistema olfatório do roedor. VNO (órgão vomeronasal) e AOB (bulbo olfatório acessório) compreendem o sistema olfatório acessório. MOE (epitélio olfativo) e MOB (bulbo olfatório principal) compreendem o sistema olfatório principal (retirado de Mombaerts, 2004).

No sistema olfatório principal, odores são detectados pelos quimiorreceptores localizados em neurônios olfatórios sensoriais bipolares no epitélio da cavidade mucosa nasal (Buck, 1991; Malnic, 1999). Estes neurônios expressam aproximadamente 1000 tipos diferentes de receptores de odorantes e projetam seus longos axônios até o bulbo olfatório principal no cérebro, onde realizam sinapses glutamatérgicas com neurônios de segunda ordem (células mitrais e tufoosas) dentro de estruturas histológicas especializadas chamadas glomérulos. Cada glomérulo recebe projeções de vários neurônios olfatórios sensoriais que são especializados na detecção de um odor específico.

Desta forma, os glomérulos têm sido interpretados como estruturas funcionais especializadas para a informação de odores específicos, o que permitiria a distinção dos diferentes odores (Buck, 1991; Carleton et al., 1959).

As células mitrais e tufoas, por sua vez, enviam projeções para áreas corticais, como o córtex olfatório primário que inclui o córtex piriforme, córtex entorrinal, núcleo olfatório anterior, tubérculo olfatório e amígdala cortical anterior (revisado por Sanchez-Andrade, 2009) (Figura 3).

O córtex piriforme, que é o maior componente do córtex olfatório, pode ser dividido em regiões posteriores e anteriores, baseado nos padrões de laminação e características do circuito local (Neville et al, 2004). O córtex orbitofrontal tem conexões recíprocas diretas com o córtex piriforme (Price, 1987, Illig et al., 2003) e também recebe entradas indiretas via núcleo dorsomedial do tálamo. O núcleo dorsomedial do tálamo além de possuir aferências da amígdala recebe informação olfatória de mais de um tipo antes de retransmiti-la para o córtex orbitofrontal (Wilson, 2006).

Portanto, as estruturas do córtex olfatório primário estão conectadas a regiões do hipotálamo, sistema límbico e neocórtex, que estão envolvidos em uma variedade de comportamentos de motivação como também de respostas emocionais e cognitivas (Figura 3). Desta forma, o sistema olfatório principal é potencialmente envolvido na regulação olfativa de um grande número de comportamentos, dentre eles o social (Dulac, 2006).

A memória para odorantes, além de envolver o sistema olfatório principal, também envolve o sistema olfatório acessório (Figura 2). Os quimiorreceptores do sistema olfatório acessório, especializado na detecção dos feromônios, estão localizados no órgão vômeronasal, uma estrutura tubular situada na camada mucosa que recobre o vômer (um dos folhetos ósseos que formam o septo nasal).

Ao contrário do epitélio olfativo, o órgão vômeronasal não apresenta comunicação direta com odores voláteis inspirados através das vias aéreas, por esta razão, os feromônios dependem de um mecanismo de transporte (uma espécie de bomba de muco), controlado autonomicamente e ativado em situação de novidade, para que atinjam o órgão vômeronasal (Meredith, 1998; Tirindelli et al., 1998). As projeções do órgão vômeronasal seguem caminhos distintos do sistema olfatório principal, realizando sinapses com neurônios de segunda ordem (células mitrais e tufoosas) no bulbo olfatório acessório, localizado na região dorsocaudal do bulbo olfatório principal. Do bulbo olfatório acessório, partem projeções subcorticais, via amígdala medial e núcleo do leito da estria terminal para o núcleo ventromedial e área preóptica medial do hipotálamo, e desta para o núcleo arqueado do hipotálamo (MacLeok e Reinhardt, 1983; Li et al., 1990; Brennan e Keverne, 1997) (Figura 3).

Sendo assim, a formação da memória social pode envolver uma extensa rede incluindo o bulbo olfatório, córtex piriforme, amígdala medial, córtex entorrinal e hipocampo, enquanto a manutenção desta memória parece residir primariamente no bulbo olfatório e córtex piriforme (Sanchez-Andrade, 2009).

Em resposta ao contato com substâncias odorantes, o circuito olfatório pode apresentar plasticidade de curta e longa duração (Richter, 2005). Estudos mostraram que oito horas após a consolidação da memória, somente o bulbo olfatório e o córtex piriforme parecem ser importantes para a evocação.

Em roedores, lesões do córtex entorrinal resultam em déficit na memória odorante de curta duração (Staubli et al., 1984; Kaut et al., 2001, 2003), contudo, lesões no hipocampo não alteram a memória de reconhecimento de curta duração (Petruilis, 2003).

A consolidação da memória de reconhecimento social de longa duração requer dois estágios de síntese de proteína. A memória de reconhecimento olfatório foi bloqueada quando o inibidor da síntese protéica, anisomicina, foi administrado 20 min antes, imediatamente depois ou 6 horas após o treino. Nenhum efeito foi observado quando a anisomicina foi administrada 3 horas ou 18 horas após o treino. Estes resultados mostram que a primeira fase é dependente de síntese protéica começando imediatamente após o aprendizado e persistindo por até 3 horas. Além disso, durante a primeira fase ocorre a ativação do bulbo olfatório principal, córtex piriforme e área pré-óptica medial. A segunda fase dependente de síntese de proteína é duradoura, iniciando 6 horas após o aprendizado e perdura por aproximadamente 12 horas (Richter, 2005).

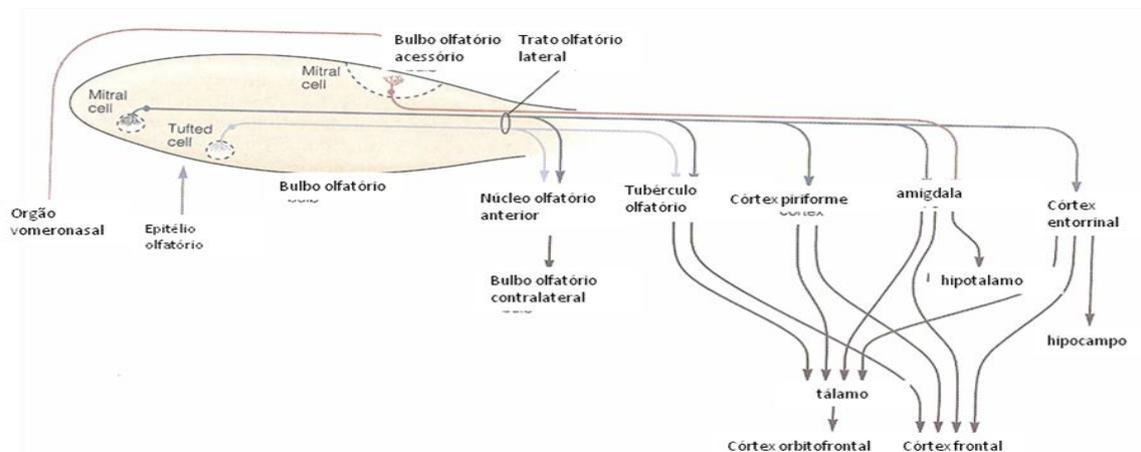


Figura 3: Figura esquemática mostrando o processamento da informação olfativa. (Adaptado de Kandel, 2000).

1.3.2- CONDIÇÕES AMBIENTAIS E MEMÓRIA SOCIAL

Sabe-se que fatores ambientais podem influenciar a capacidade cognitiva de animais (Kwak, et al., 2009; Wurbel, 2001). Especificamente o armazenamento de informação social parece ser bastante sensível às condições ambientais, sendo o isolamento social um dos fatores mais determinantes (Cilia, 2000, 2005; Kokare, 2010).

O efeito comportamental do isolamento social é tempo- e idade-dependente. Os modelos que avaliam comportamentos em adultos, após o isolamento iniciado na vida jovem do animal, evocam respostas comportamentais de ansiedade, estresse e depressão (Voikar, 2005) o que é muito diferente de modelos que avaliam respostas comportamentais após o isolamento social iniciado na vida adulta (revisado por Hall, 1998).

Além disso, a duração do isolamento social também parece ser de fundamental importância. Enquanto períodos curtos (minutos até duas semanas) não afetam os níveis de marcadores de estresse e ansiedade (Ferdman et al, 2007), o isolamento social crônico (acima de três semanas), iniciado na vida adulta, aumenta a agressividade, induz comportamentos do tipo ansiedade e promove prejuízos no aprendizado e memória (Essman, 1966; Morrison, 1969; Valzelli e Garattini, 1972; Valzelli, 1973; Brain, 1975; O'Donnell et al., 1981; Wallace et al., 2009), podendo, inclusive, ser considerado um modelo de estresse e ansiedade (Ferdman et al, 2007).

Os estudos de reconhecimento social utilizam protocolos onde os animais são previamente isolados por períodos curtos, que variam de minutos até 7 dias (Thor e Holloway, 1982; Engelman, 1995) para que possa ocorrer o estabelecimento de comportamento de hierarquia de dominância, exacerbando

assim os comportamentos sociais (Thor e Holloway 1982; Ferguson, 2002). Quando o animal é isolado por 24h ou 3 semanas, ele é capaz de lembrar um co-específico por no máximo 3h, mas não depois disso. No entanto, se o mesmo teste for realizado com um animal que não foi previamente isolado, ele é capaz de armazenar esta informação por até sete dias (Kogan et al., 2000). Além disso, os mesmos autores demonstraram que esta memória social de longa duração depende de síntese protéica no hipocampo. Estes resultados mostram claramente que até mesmo o curto período de isolamento social prejudica a retenção de memória social de longa duração por mecanismos, aparentemente não relacionados ao estresse ou ansiedade.

Enquanto alguns fatores, como o isolamento social, podem prejudicar o desempenho cognitivo de animais, outros, como a exposição ao ambiente enriquecido, pode melhorar o desempenho em experimentos de aprendizado e memória.

Enriquecimento do ambiente envolve condições de habitação onde são adicionados elementos, como por exemplo, objetos, que estimulam cognitivamente e fisicamente os animais (Gresak, 2007). Uma definição mais abrangente de enriquecimento do ambiente foi dada por Leach e colaboradores (2000) que sugeriu que este termo se refere a qualquer alteração na habitação que aumente a frequência e diversidade dos comportamentos positivos naturais, diminui a ocorrência de comportamento anormal, maximiza a utilização do ambiente e aumenta a capacidade do animal de lidar com os desafios do cativeiro.

Ambientes enriquecidos promovem uma série de alterações plásticas no cérebro dos animais como aumento do número de neurônios, aumento do número de sinapses e de emaranhados dendríticos especialmente no córtex e hipocampo, além de efeitos positivos sobre aprendizado e memória (van Praag et al., 2000; Cao et al., 2004; Sale et al., 2007; Tashiro et al., 2007; Wright e Conrad, 2008; Würbel, 2001).

Uma das características do ambiente enriquecido que tem despertado interesse é sua capacidade de induzir neurogênese em cérebro adulto (Lu et al., 2003). No cérebro adulto, a neurogênese persiste em pelo menos dois lugares: na zona subventricular do ventrículo lateral, cujas novas células migram para o bulbo olfatório, e na zona subgranular do hipocampo, cujas novas células migram para a camada granular interna do giro denteado (Williams et al., 2001). Os novos neurônios que migram para o bulbo olfatório são essenciais para a manutenção desta estrutura. Por exemplo, quando a neurogênese é bloqueada, ocorre extensa depleção das células granulares do bulbo olfatório (Okuda, 2009). Em contrapartida, os neurônios que migram para o giro denteado parecem contribuir para o crescimento tecidual, já que quando a neurogênese é bloqueada ocorre uma diminuição no crescimento do giro denteado (Ibi et al., 2008).

Avaliando o aumento da plasticidade neural através do enriquecimento do ambiente, estudos mostraram o efeito contrário em animais submetidos ao isolamento social. Animais juvenis submetidos ao isolamento social possuem reduzida neurogênese hipocampal na idade adulta (Lu et al., 2003, Ibi et al., 2008).

Diante deste cenário, nossa hipótese é de que o isolamento social de sete dias prejudica a memória social de longa duração por privar o animal de estímulos sensoriais, em especial o olfativo, e que alterações nas condições ambientais, como inclusão de estímulo olfativo ou ambiente enriquecido, são capazes de restabelecer a estimulação sensorial e por isso bloquear o efeito amnésico do isolamento social. Além disso, acreditamos que o isolamento social de sete dias não é capaz de alterar comportamentos do tipo ansiedade ou promover efeitos amnésicos em outros tipos de memória de longa duração.

2- OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos do isolamento social nas memórias social, de reconhecimento de objetos e esQUIVA INIBITÓRIA, bem como no comportamento tipo-ansiedade. Além disso, verificamos o efeito do enriquecimento sensorial, através do ambiente enriquecido ou inclusão de estímulos olfatórios, sobre o armazenamento da memória social de camundongos socialmente isolados.

2.1 - Objetivos específicos

- Avaliar a memória social de curta e longa duração em animais isolados e agrupados;
- Avaliar a memória do tipo declarativa de longa duração, avaliada na tarefa de reconhecimento de objetos, em animais isolados e agrupados;
- Avaliar a memória associativa de longa duração, avaliada na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA, em animais isolados e agrupados;
- Verificar o comportamento do tipo ansiedade, avaliado no labirinto em cruz elevado, em animais isolados e agrupados;
- Verificar se animais isolados, mas com constante estímulo olfativo, são capazes de reter memória social de longa duração;
- Investigar se animais isolados, mas submetidos a ambiente enriquecido, são capazes de reter memória social de longa duração;

3 – JUSTIFICATIVA

Relações sociais saudáveis são essenciais para a saúde mental de um indivíduo. Além disso, muitas desordens psiquiátricas estão associadas à ausência de motivação social e inabilidade em manter relações sociais (Critchley et al., 2000; Dalton et al., 2005). Apesar da evidente importância do relacionamento social nas mais diferentes culturas, os mecanismos neurobiológicos que compreendem o desenvolvimento e a manutenção de tais relacionamentos humanos permanecem praticamente desconhecidos.

A neurobiologia do comportamento social humano é de difícil estudo, sendo mais comuns os estudos pós-mortem e, mais recentemente, os de neuroimagem (Gobbini et al., 2004; Briton et al., 2006). Dados provenientes de estudos em modelos animais complementam dados existentes sobre o comportamento social humano normal e possibilitam que a neurobiologia da sociabilidade patológica, como desordens de espectro do autista, seja investigada (Bartz e Hollander, 2006).

Os primeiros experimentos realizados através do paradigma de residente-intruso evidenciaram que a memória social é perdida quando o intervalo entre o primeiro e o segundo encontro é superior a 40 minutos. Neste experimento Thor e Holloway mantiveram os animais em isolamento por 7 dias antes dos protocolos comportamentais. Posteriormente, resultados mostraram que o isolamento é responsável pelo déficit de memória social de longa duração, já que animais agrupados retêm esta memória por até 7 dias (Kogan et al., 2000).

Vários estudos têm se dedicado a compreender os mecanismos envolvidos nos efeitos do isolamento social, mas a grande maioria usa modelos de isolamento crônico onde fatores, de estresse e ansiedade, sobressaem os mnemônicos (Lister 1990). Alguns estudos têm demonstrado que a memória social de longa duração é uma memória hipocampo-dependente (Kogan et al., 2000) e que depende de síntese protéica (Richter, 2005), porém estes protocolos utilizam animais agrupados. Logo, ainda restam perguntas a serem respondidas com relação ao processamento desta memória social de longa duração em animais isolados por curtos períodos. Teriam estes animais especificamente déficit de memória social ou os déficits seriam globais, ou seja, outros tipos de memória estariam prejudicados? Assumindo que o isolamento social impõe ao animal uma “monotonia olfativa”, e que esta seria a razão do déficit cognitivo, a inclusão de estímulos olfativos durante o isolamento poderia reverter este déficit de memória social? Ou ainda, a inclusão de outros estímulos sensoriais, como no ambiente enriquecido, poderia compensar a ausência de estímulos sociais, revertendo o déficit de memória imposto pelo isolamento?

Sendo assim, as respostas para estas questões possibilitam a ampliação dos conhecimentos sobre a influência das condições ambientais da memória social e sua modulação por estímulos ambientais.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Os experimentos foram realizados com camundongos machos da linhagem C57BL/6 com idade entre 8 e 12 semanas. Estes animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG).

Uma vez no laboratório, todos os animais foram mantidos em estante ventilada com temperatura constante de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade 40-70%. A sala onde se localizava esta estante possuía controle do ciclo claro-escuro 12/12 horas. Em cada gaiola foram mantidos de 3 a 5 camundongos (exceto na condição de isolamento descrita posteriormente) com alimento e água *ad libitum*. Todos os protocolos comportamentais foram realizados na mesma sala de experimentação onde se localiza a estante dos animais.

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA 168/2008.

4.2 – Condições ambientais

4.2.1- Isolamento social

Em todos os protocolos que envolveram isolamento social, os animais foram colocados individualmente em caixas de polipropileno (28x17x12cm) por um período de 7 dias, onde receberam água e alimentação *ad libitum*.

Não houve manipulação dos animais durante este período, nem mesmo troca de maravalha, exceto quando mencionado.

4.2.2- Estímulo olfativo social e não social

Todos os animais submetidos ao protocolo de estímulo olfativo foram isolados socialmente durante o período de 7 dias e antes do início do isolamento foram divididos em 4 grupos. O grupo ST, cujos animais foram mantidos em condições idênticas às do item 4.2.1, ou seja, sem troca de maravalha ou manipulação durante todo o período de isolamento. O grupo TL, cujos animais tiveram a maravalha de suas caixas trocada diariamente por maravalha limpa. O grupo TE, cujos animais tiveram troca diária da maravalha de suas caixas, porém à maravalha foram adicionados 1mL de essência de morango ou maracujá ou tuti-fruti. E por fim o grupo TA, cujas caixas tinham sua maravalha trocada diariamente por uma mistura feita de partes iguais de maravalha limpa e usada por animais agrupados (4-5 camundongos de mesma idade e linhagem). Esta maravalha apresentava um odor característico devido à presença de urina e fezes de animais agrupados.

Os resultados foram expressos em dois gráficos: um que avalia o tempo de exploração entre o treino e o teste; e outro que avalia o índice de reconhecimento, que é calculado pela seguinte fórmula: tempo de exploração durante o teste/tempo de exploração durante o treino + teste. Desta forma, um índice inferior a 0.5 demonstra um melhor desempenho do animal, visto que o mesmo explorou menos na sessão teste em relação a sessão treino.

4.2.3- Enriquecimento do ambiente

Os animais do grupo do ambiente enriquecido foram isolados por 7 dias em suas caixas, porém com a inclusão de 02 objetos de formato iguais com dimensões 06x03x02 cm colocados em paralelo e eqüidistantes no interior da caixa. Na outra extremidade foi colocado um cilindro de papel (substituído diariamente), além da inclusão de fitas adicionadas aleatoriamente junto à maravalha, para criar um ambiente rico em estímulos diferentes.

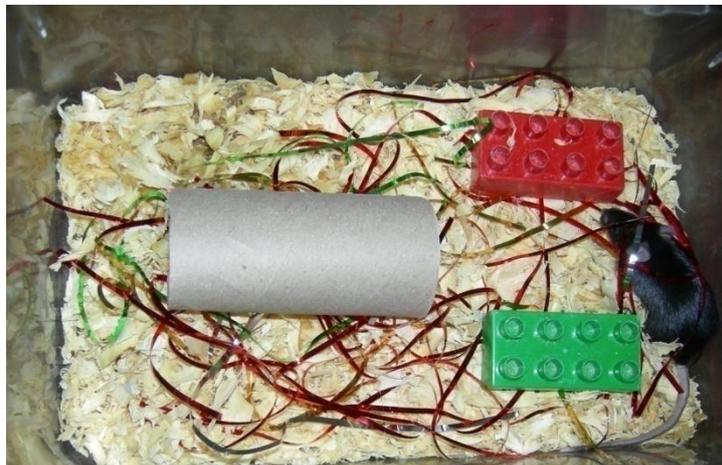


Figura 4: Foto mostrando um animal em ambiente enriquecido

4.3- Protocolos comportamentais

Todos os animais eram retirados da estante climatizada e permaneciam na sala onde os experimentos comportamentais eram realizados, por pelo menos 30 min antes do início dos experimentos, para habituarem-se às condições da sala.

Todos os protocolos comportamentais foram realizados após as diferentes condições ambientais, ou seja, isolamento social, estímulo olfativo ou enriquecimento do ambiente.

4.3.1- Reconhecimento social

O protocolo de memória social utilizado foi uma modificação do paradigma intruso-residente proposto por Thor e Holloway (1982).

O animal intruso foi sempre um camundongo juvenil da linhagem Swiss (25-30dias) e não foi utilizado mais do que 4 vezes. A linhagem de camundongos utilizadas neste trabalho, C57BL/6, apresenta excessivo comportamento agressivo em comparação com outras linhagens, quando submetido ao isolamento social (Voikar et al., 2005). Portanto, os animais intrusos foram sempre apresentados aos residentes no interior de gaiolas plásticas (10 cm de diâmetro contendo 60 orifícios de 1 cm de diâmetro distribuídos igualmente) para evitar comportamentos agressivos (Prado et al., 2006).

Consideramos como exploração olfatória toda vez que o animal residente introduzia seu focinho e/ou vibrissas no interior dos orifícios da gaiola plástica.

Inicialmente, todos os animais eram colocados em caixas, idênticas às quais eles eram normalmente mantidos, contendo maravalha limpa e lá eram mantidos por 30 min. Durante todo esse período, era colocada uma gaiola, idêntica a qual o animal intruso seria colocado, para que o animal habituas-se a mesma.

Além disso, durante 5 min, o animal intruso era colocado no interior de outra gaiola, porém idêntica à primeira, para que o mesmo habituas-se à gaiola evitando estresse desse animal.

Após os 30 minutos de habituação, era iniciada a sessão de treino pela introdução da gaiola agora contendo o animal intruso. Durante 5 minutos o tempo de exploração social foi contabilizado. Após o término da sessão treino, a gaiola contendo o animal intruso era substituída pela gaiola vazia novamente.

Na sessão denominada teste repetia-se o mesmo procedimento da sessão treino, contabilizando o tempo de exploração do animal residente sobre o animal estímulo durante 5 minutos.

Para avaliar a memória social de curta e de longa duração, a sessão de teste ocorria 30 minutos e 24 horas pós-treino, respectivamente.

Não foram utilizados os mesmo animais para os protocolos de memória social de curta e longa duração.



Figura 5: Foto mostrando o animal residente à esquerda, explorando o animal intruso, no interior da gaiola plástica, durante a tarefa de reconhecimento social.

4.3.2- Memória de Reconhecimento de objetos (RO)

No primeiro dia, cada animal foi exposto durante 20 minutos a uma caixa plástica retangular (50 cm x 40 cm x 15 cm), na cor preta para se habituarem ao aparato.

Na sessão denominada treino os animais foram expostos a dois objetos idênticos colocados equidistantes na caixa durante 10 min. Na sessão teste, realizada 24 horas pós-treino, os animais foram expostos a dois objetos sendo um objeto igual ao anterior e outro diferente durante 10 min.

Ambas as sessões de treino e teste foram filmadas e as imagens analisadas pelo software Debut Video Caputra® para posterior contabilização do tempo de exploração dos objetos.

Cada sessão teve duração de 10 minutos. Objetos e caixa foram limpos com álcool 70% entre uma sessão e outra.

Os resultados foram expressos como Índice de Reconhecimento (IR) calculado segundo a fórmula:

$\text{IR} = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo (s)}}{\text{Tempo total de exploração (s)}}$
--

O IR pode alcançar valores dentro do intervalo de 0 até 1.0. Um IR igual a 0.5 indica que o tempo de exploração dos dois objetos foi o mesmo e um IR significativamente maior que 0.5 indica que houve uma maior exploração do objeto novo, evidenciando assim a preservação da memória.

4.3.3- Esquiva inibitória

Na sessão de treino, o animal foi colocado sobre uma plataforma (8 cm X 21cm e 2 cm de altura) que encontra-se numa das extremidades de uma caixa de acrílico (21cm X 22.5cm X 22.5cm). O assoalho da caixa contém barras metálicas paralelas de 0.1cm de diâmetro espaçadas por 1 cm (Insight Ltda®). Durante a sessão treino, o animal era colocado sobre a plataforma e após a descida da mesma com as 4 patas, o animal recebia um choque de 0.3mA por 2s e então era imediatamente removido da caixa. Caso o animal não descesse da plataforma em um período o máximo de 600s na sessão treino, este era excluído do experimento.

Na sessão teste, realizada 24 horas pós-treino, o animal era colocado novamente sobre a plataforma e media-se o tempo para descida da plataforma, porém o animal não recebia choque.

4.3.4– Avaliação do comportamento tipo ansiedade

O labirinto em cruz elevado (*elevated plus-maze*, EPM), é considerado um instrumento de medida confiável do comportamento associado à ansiedade em animais (Pinheiro, 2007).

O labirinto em cruz elevado consiste de um aparato de 4 braços elevados a 30 cm do chão, com cada braço posicionado a 90° relativo ao braço adjacente. Dois dos braços são fechados por uma parede e os outros braços sem parede, denominados abertos, são conectados na área central formando um sinal de cruz.

Os animais foram colocados no centro do labirinto e durante 5 min foi contabilizado número de entradas nos braços abertos, braços fechados e o tempo permanecido nos braços abertos e nos braços fechados. Os roedores em geral tendem a ficar mais tempo nos braços fechados, por se tratar de um ambiente menos aversivo. Porém, animais que apresentam um comportamento do tipo ansioso, tendem a permanecer muito pouco tempo ou até mesmo tempo algum nos braços abertos. Esta inferência é baseada em estudos farmacológicos que mostraram que drogas ansiogênicas induzem este tipo de comportamento enquanto drogas ansiolíticas o previnem (Tinsley et al., 2009). Além disso, a frequência de entrada nos braços abertos e fechados indica o comportamento exploratório dos animais (Pinheiro, 2007).

4.4 – Delineamento experimental

Protocolo 1- Avaliação da Memória social de curta duração

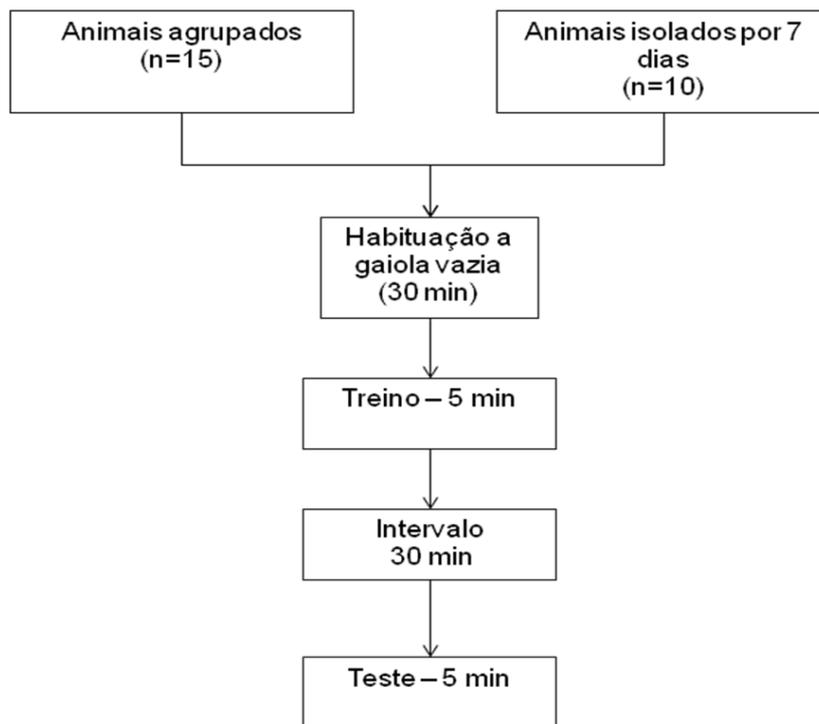


Figura 6: Desenho experimental: avaliação da memória social de curta duração em animais agrupados e isolados.

Protocolo 2- Avaliação da memória social de longa duração

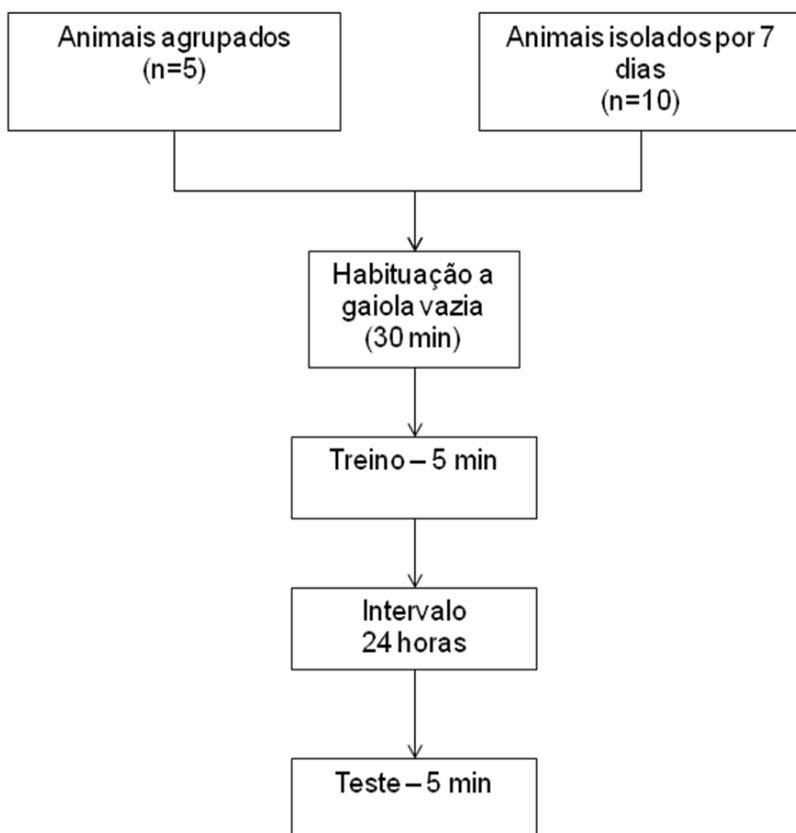


Figura 7: Desenho experimental: avaliação da memória social de longa duração em animais agrupados e isolados

Protocolo 3- Avaliação da memória declarativa em animais isolados

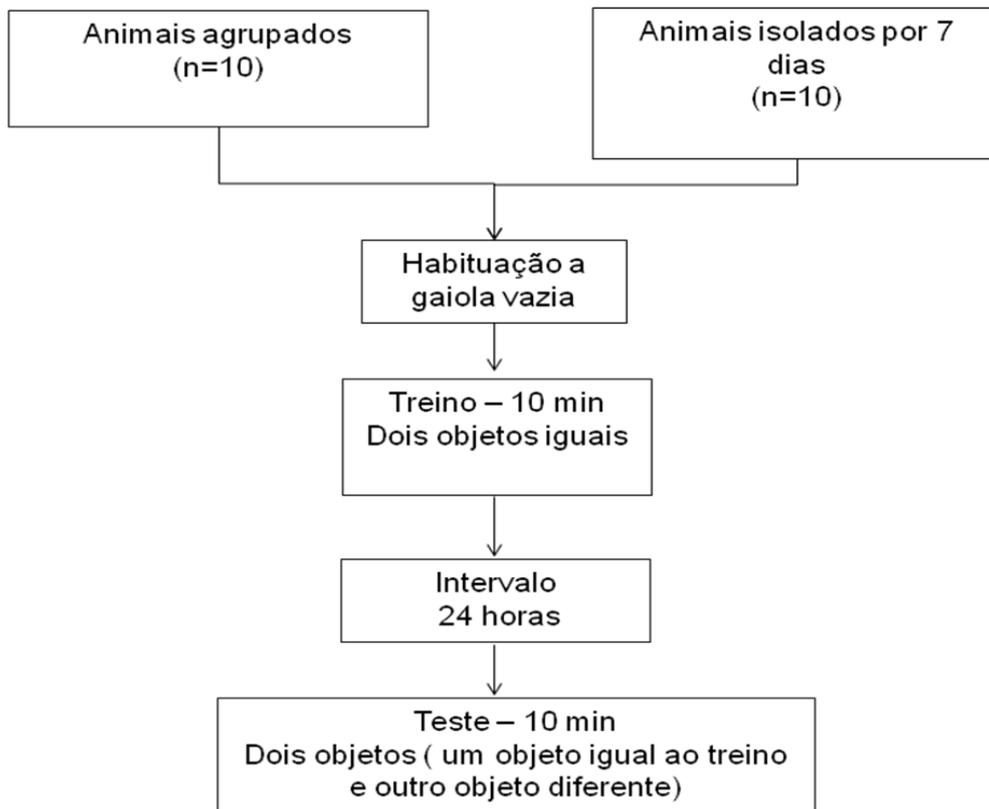


Figura 8: Desenho experimental: avaliação da memória declarativa através da tarefa de reconhecimento de objetos.

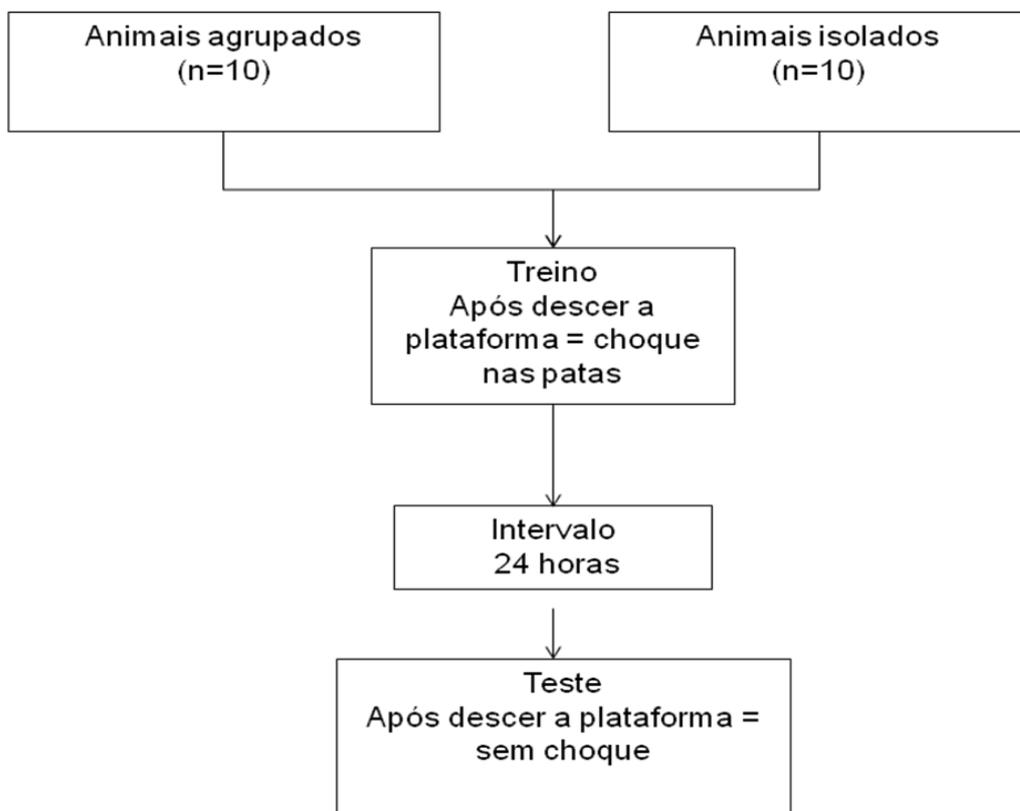
Protocolo 4- Avaliação da memória associativa em animais isolados

Figura 9: Desenho experimental: avaliação da memória associativa através da tarefa de esquiva inibitória.

Protocolo 5- Avaliação do comportamento tipo ansiedade em animais isolados e agrupados

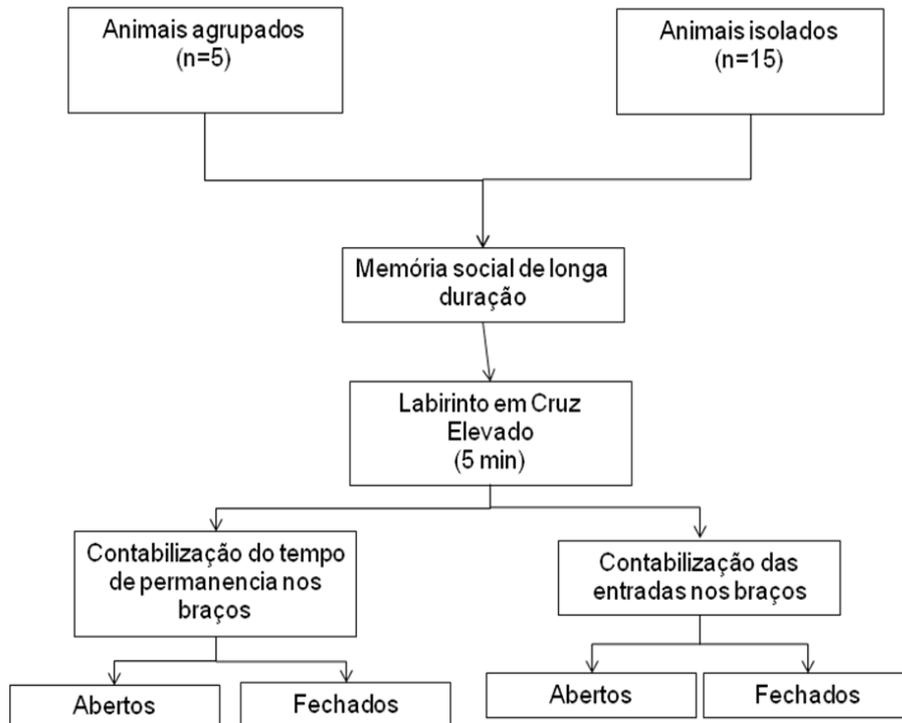


Figura 10: Desenho experimental: avaliação do padrão tipo ansiedade após animais serem submetidos a memória social de longa duração.

Protocolo 6- Avaliação do efeito do estímulo olfativo na memória social de longa duração

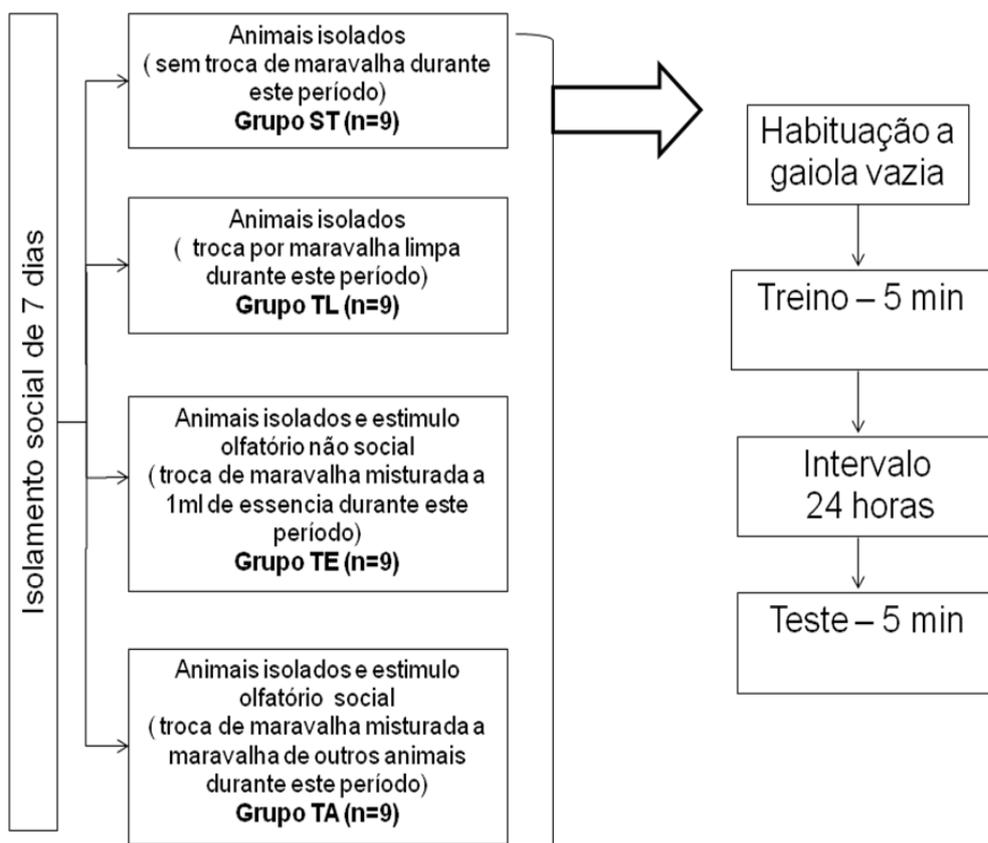


Figura 11: Desenho experimental: avaliação da inclusão de estímulos olfatórios sociais e não sociais na memória social de longa duração de animais isolados.

Protocolo 7- Avaliação do efeito do ambiente enriquecido na memória social de longa duração

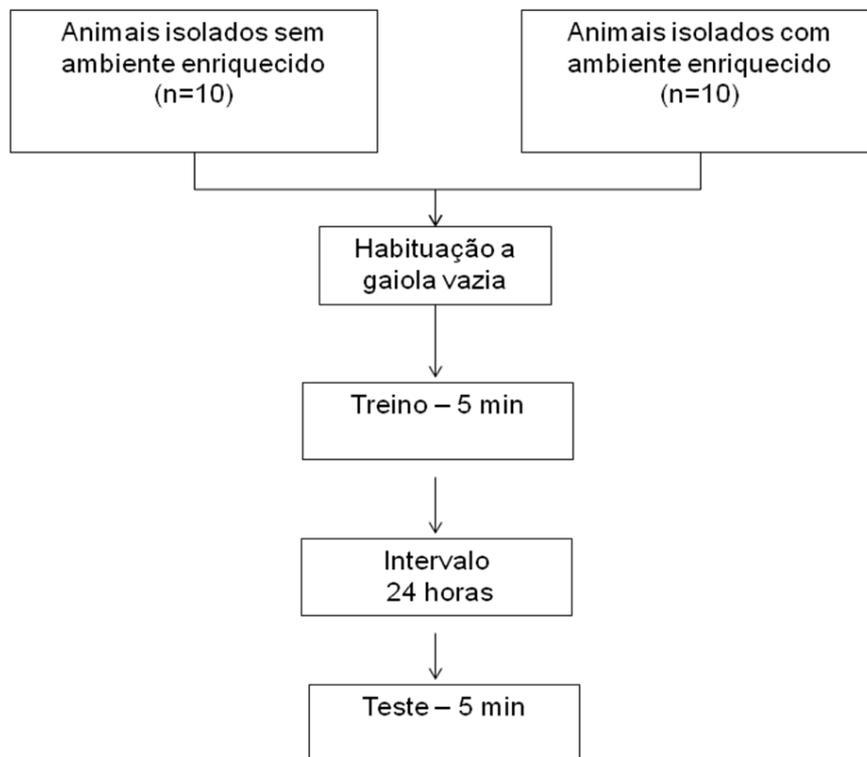


Figura 12: Desenho experimental: avaliação da inclusão do ambiente enriquecido na memória social de longa duração de animais isolados.

4.5- Análise estatística

Para verificar a distribuição de normalidade dos dados, foi utilizado o coeficiente de correlação de D'Agostino e Pearson.

Os dados referentes aos experimentos de memória social, memória de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória foram analisados pelo Teste $-t$ de *Student* pareado.

Usamos análise de variância (ANOVA) de 1 via, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni, quando foram presentes mais de dois grupos.

5- RESULTADOS

5.1- Memória de reconhecimento social

5.1.1- Memória de curta duração

Primeiramente verificamos se o isolamento de 7 dias afetaria a memória social de curta duração. Nossos resultados confirmaram dados da literatura (Thor e Holloway, 1982; Camacho et al., 1995; Engelman et al., 1995; Moura, 2008) já que o tempo de exploração durante o teste foi significativamente menor em relação ao tempo de exploração durante o treino, tanto nos animais agrupados ($n=15$, $P= 0.0147$) quanto nos isolados ($n=10$, $P=0.0280$) (Figura 13). Nossos resultados mostraram que o isolamento social de 7 dias não prejudica a memória social de curta duração.

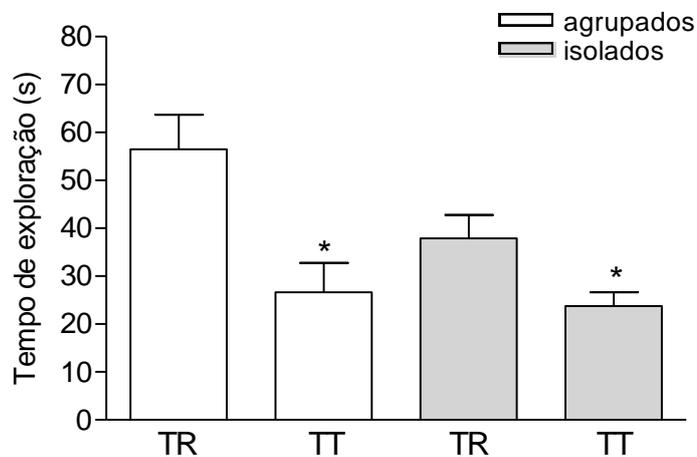


Figura 13: Memória social de curta duração não é prejudicada por 7 dias de isolamento social. Os dados são expressos como média \pm EPM do tempo de exploração. * $P < 0.05$ quando comparado a tempo de exploração na sessão treino, dentro do grupo.

5.1.2- Memória de longa duração

Dados da literatura mostram que 4 e 30 dias de isolamento social comprometem a retenção da memória social de longa duração (Kogan, 2000). Testamos, então, se 7 dias de isolamento teria efeito amnésico sobre a memória social de longa duração. Nossos resultados mostraram que o tempo de exploração durante o teste foi significativamente menor em relação ao tempo de exploração durante o treino nos animais agrupados ($n=5$, $P<0.0001$). Porém, este fato não foi observado no grupo de animais isolados ($n=10$, $P=0.1184$) (Figura 14). Demonstramos, então, que o isolamento social de 7 dias é suficiente para prejudicar a memória social de longa duração.

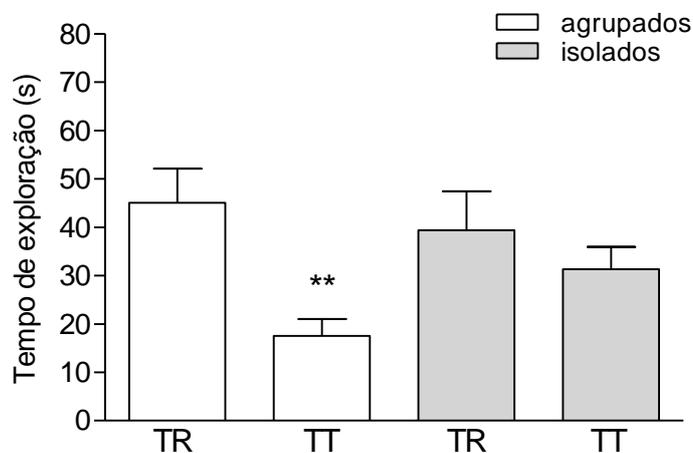


Figura 14: Memória social de longa duração é prejudicada por 7 dias de isolamento social. Os dados são expressos como média \pm EPM do tempo de exploração.** $P<0.001$ quando comparado a tempo de exploração na sessão treino, dentro do grupo.

5.2- Memória de Reconhecimento de objetos

Dados da literatura apontam que o isolamento de 4 semanas, iniciado na vida adulta, prejudica a consolidação da memória declarativa avaliada através da tarefa de reconhecimento de objetos (Voikar, 2005). Sabendo que o isolamento social de 7 dias prejudica a consolidação da memória social de longa duração, decidimos avaliar se esta condição alteraria a memória declarativa.

Nossos resultados mostraram que os animais isolados ($n=10$, $P=0.0022$) e os animais agrupados ($n=10$, $P=0.0210$) apresentam a memória de reconhecimento de objetos intacta (Figura 18), logo, o isolamento de 7 dias não prejudicou a retenção da memória declarativa de longa duração.

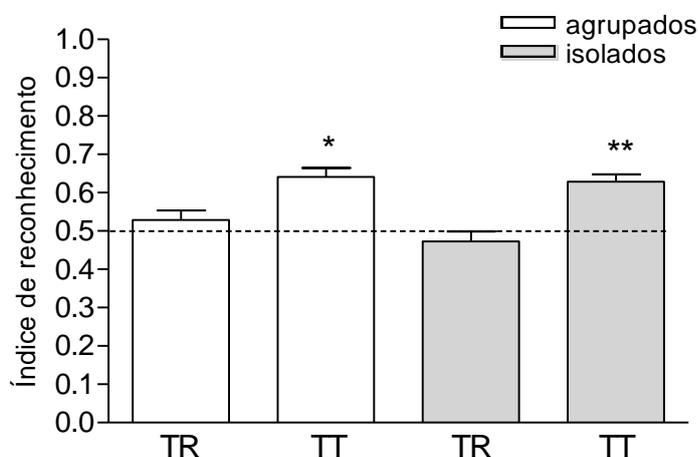


Figura 15: A memória declarativa, avaliada na tarefa de reconhecimento de objetos, não foi prejudicada pelas condições de isolamento. Os dados são expressos como média ± EPM do índice de reconhecimento. * indica $P < 0.05$ e ** indica $P < 0.001$ quando comparado com o índice de reconhecimento na sessão de treino, dentro do mesmo grupo.

5.3- Esquiva inibitória

Decidimos avaliar, também, se o isolamento social prejudicaria a memória do tipo associativa. Utilizamos como paradigma a esquiva inibitória.

Nossos resultados mostraram que os animais agrupados ($n=15$, $P=0.0069$) e os animais isolados ($n=19$, $P=0.0002$) tiveram desempenho semelhante na tarefa de esquiva inibitória (Figura 19). Logo, o isolamento social de 7 dias não prejudicou a memória associativa de longa-duração.

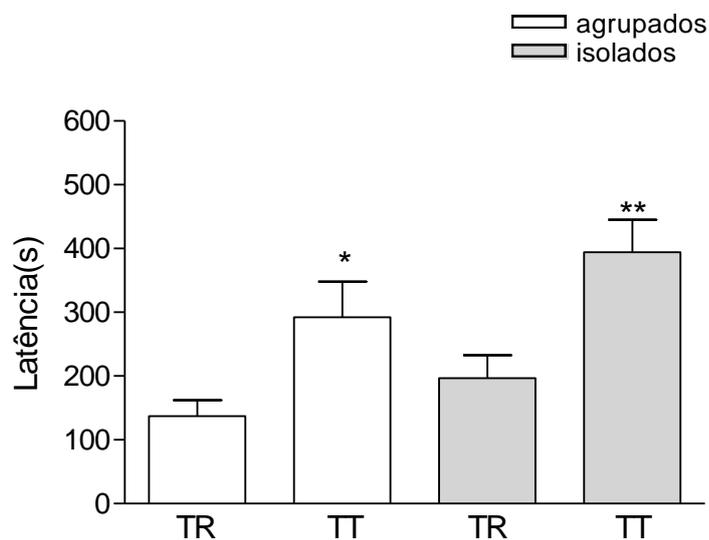


Figura 16: A memória associativa, avaliada na tarefa de esquiva inibitória, não foi prejudicada pelas condições de isolamento. Os dados são expressos como média \pm EPM da latência para descida da plataforma. * indica $P < 0,05$ e ** $P < 0.001$ quando comparado a tempo de latência da descida da plataforma na sessão treino, dentro do grupo.

5.4- Labirinto em Cruz Elevado

Dados da literatura mostram que o isolamento crônico pode propiciar comportamentos do tipo-ansiedade, o que levaria ao comprometimento cognitivo nestes animais (Voikar, 2000). Decidimos avaliar se o prejuízo na retenção da memória social de longa duração imposto pelo isolamento seria em decorrência de um efeito ansiogênico do próprio isolamento.

Nossos resultados mostraram que, em relação ao comportamento tipo ansiedade, não houve diferença entre os animais agrupados ($n=5$) e isolados ($n=10$) com relação à porcentagem de tempo nos braços abertos (Figura 19A; $p=0.7288$) e porcentagem de entrada nos braços abertos (Figura 19B; $p=0.3996$). Logo, os efeitos cognitivos do isolamento social de 7 dias parecem não ser proveniente de efeitos ansiogênicos do mesmo.

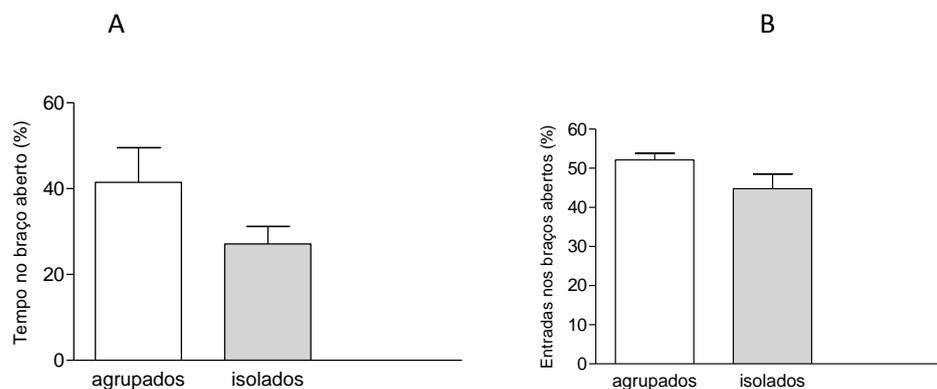


Figura 17: O comportamento do tipo-ansiedade, avaliado no labirinto em cruz elevado, não foi alterado pelas condições de isolamento. Os dados são expressos como média \pm EPM da (A) porcentagem de tempo nos braços aberto e da (B) porcentagem de entradas nos braços abertos.

5.5- Estímulo olfativo social e não social

Considerando que o processamento da memória social de longa duração parece depender de uma constante estimulação olfatória, submetemos os animais isolados a estímulos sociais, representado pela maravalha de outros animais, e estímulos não sociais, representado pela maravalha com essência; além de mais dois outros grupos sem estimulação olfatória.

Demonstramos que no grupo de animais em que não houve troca de maravalha (ST; n=9, P=0.6193) e no grupo de animais onde a maravalha foi trocada todos os dias (TL; n=9, P=0.2170) não houve diferença estatística entre as sessões de treino e teste (Figura 15A).

Já no grupo de animais que recebeu 1mL de essência na maravalha (TE; n=9, P=0.0040) e no grupo de animais que receberam maravalha de outros animais (TA; n=9, P=0.0007) o tempo de exploração no teste foi significativamente menor do que no treino (Figura 16A).

Nossos resultados demonstraram que tanto o estímulo não social, representado pela essência, quanto o estímulo social, representado pela maravalha advinda de outros animais, foi capaz de bloquear o prejuízo na memória social de longa duração imposto pelo isolamento.

Outra forma de avaliar estes resultados é através do índice de reconhecimento, que é calculado pela fórmula: tempo de exploração durante o teste/tempo de exploração durante o treino + teste. Nossos resultados mostraram que os grupos ST e TL não diferem entre si e que os grupos TE e TA igualmente não diferem entre si.

No entanto, os grupos TE e TA foram estatisticamente diferentes dos grupos ST e TL (Figura 15B; $F(3,30)= 15.13$, $P<0.001$). Esta análise confirma os resultados apresentados na figura 15A.

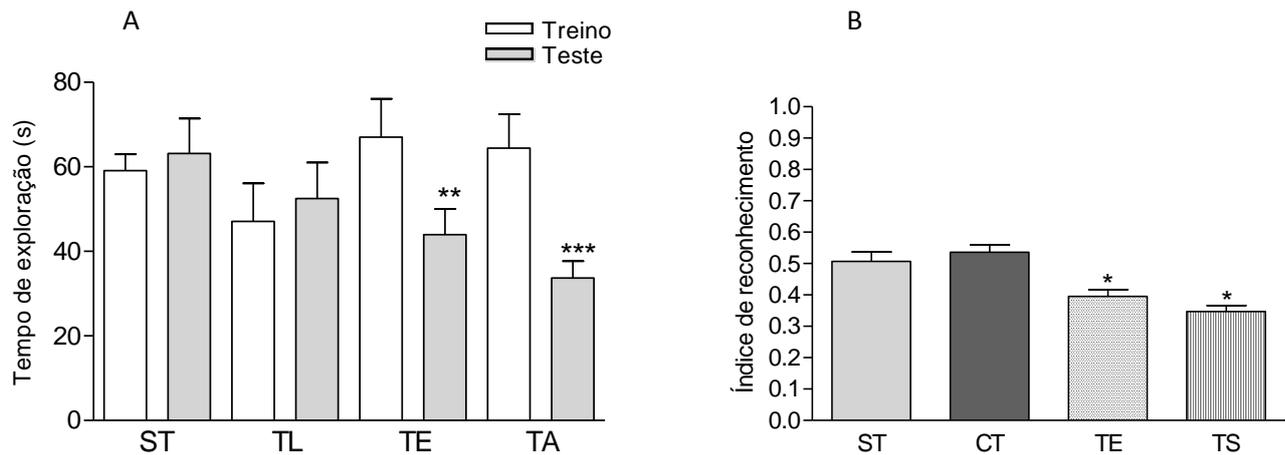


Figura 18: Inclusão de componentes olfatórios de origem social e não social reverte o déficit de memória social de longa duração induzido pelo isolamento. Em (A) estão representados os tempos de exploração nas sessões de treino e teste e em (B) os índices de reconhecimento social de cada grupo. Todos os dados estão expressos como média \pm EPM. Grupos: **ST**- Animais previamente isolados por 7 dias sem troca de maravalha. **TL**- animais previamente isolados por 7 dias com troca de maravalha todos os dias. **TE** – animais previamente isolados por 7 dias com troca de maravalha com 1 ml de essência. **TA**- animais previamente isolados por 7 dias com troca de maravalha de outros animais agrupados. * indica $P<0.05$ e *** indica $P< 0.01$, em relação aos grupos controle.

5.6 – Enriquecimento do ambiente

Uma vez que a estimulação olfatória reverte o déficit de memória social de longa duração, a próxima proposta foi analisar se outras modalidades sensoriais teriam o mesmo efeito promnésico. Nossos resultados mostraram que animais isolados em um ambiente enriquecido ($n=10$, $P=0.0066$) são capazes de consolidar a memória social de longa duração, situação que não ocorreu nos animais isolados na ausência do ambiente enriquecido ($n=10$, $P=0.8724$) (Figura 17). Nossos resultados demonstram que a inserção de ambiente enriquecido é suficiente para bloquear a expressão do déficit de memória promovido pelo isolamento social.

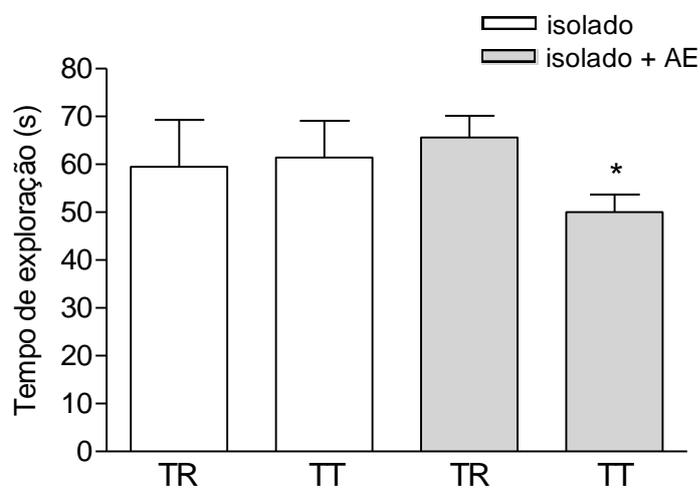


Figura 19: O enriquecimento do ambiente reverte o déficit de memória social induzida pelo isolamento. Os dados são expressos como média \pm EPM do tempo de exploração. * indica $P<0.05$ quando comparado à sessão treino, dentro do grupo.

6- DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o isolamento social de 7 dias, iniciado na vida adulta, não afeta a memória social de curta duração, mas prejudica a memória social de longa duração. Este efeito amnésico do isolamento poderia ser devido a alterações nos níveis de ansiedade ou estresse. Porém, nossos resultados mostraram que não houve diferença nos níveis de ansiedade dos animais agrupados e isolados, logo o efeito amnésico do isolamento social de 7 dias não pode ser atribuído a efeitos ansiogênicos.

Além disso, os efeitos do isolamento na vida adulta parecem ser tempo-dependente. O isolamento crônico, de 7 semanas, é capaz de prejudicar o desempenho dos animais nas tarefas de reconhecimento de objetos e condicionamento ao medo (Voikar et al., 2005) e também aumentar marcadores de estresse e de ansiedade (Ferdman et al., 2007). Este efeito, porém, parece não estar presente quando o isolamento se dá por períodos mais curtos como o utilizado aqui em nosso trabalho. Logo, apesar de não termos medido nenhum parâmetro de estresse, os dados da literatura suportam a hipótese de que o período de isolamento social utilizado em nosso trabalho não foi suficiente para causar estresse nos animais.

Já que os níveis de estresse e a ansiedade parecem não estar relacionados com o efeito diferenciado do isolamento sobre as memórias de curta e longa duração, provavelmente os mecanismos de consolidação destas memórias são distintos e processados independentemente. De fato, isto ocorre com outros tipos de memória e em vários modelos animais e em humanos (Izquierdo et al., 1999, Cowan, 2008).

A primeira demonstração de mecanismos distintos de consolidação da memória de curta e longa duração foi dada por Emptage e Carew em 1993. Esses autores encontraram que o antagonista não específico de serotonina, ciproheptadina bloqueia a memória de curta (2-6min) mas não a de longa duração (24horas) após a facilitação da resposta monossináptica induzida pela serotonina na lesma marinha *Aplysia*. Rossato e colaboradores (2007) ampliaram estes achados, agora utilizando mamíferos como modelo animal e a tarefa de esquiva inibitória.

Em se tratando da memória social, ainda sabe-se pouco sobre as bases moleculares das memórias de curta e longa duração. Porém, alguns trabalhos têm demonstrado que assim como em outros tipos de memória, a memória social de longa-duração depende de síntese protéica (Richter et al., 2005).

O prejuízo na memória social de longa duração induzido pelo isolamento pode ser devido ao fato da entrada de informações olfatórias estar comprometida nestas condições. Nossa hipótese inicial era de que a monotonia olfativa, imposta pelo isolamento social, causaria uma diminuição na atividade das células mitrais do órgão vomeronasal, impossibilitando que as mesmas liberassem glutamato em quantidades suficientes para ativar os substratos neurais necessários para a formação da memória social de longa duração. Esta idéia é apoiada no fato da formação da memória olfativa está associada ao aumento da eficiência sináptica entre células mitrais e células granulares e periglomerulares. A apresentação de um novo odor social promove o aumento de acetilcolina ou norepinefrina, desencadeado pela atenção ou excitação, nas sinapses das células granulares.

Estas células reduzem a liberação de GABA sobre as células mitrais e conseqüentemente desinibem as mesmas. Com a ativação dos receptores olfativos na presença das células mitrais em estado desinibido, estas células liberam glutamato em suas sinapses, aumentando a excitabilidade e promovendo alterações plásticas duradouras (Kendrick et al., 1992; Brennan et al., 1998; revisado por Sanchez-Andrade et al. 2005,2009).

De fato, já foi proposta por outros autores esta mesma idéia, porém utilizando como paradigma um tipo de condicionamento clássico, onde o odor (estímulo condicionado) é pareado à administração de leite, trauma ou choque (estímulos incondicionados) (Sullivan e Wilson 1994; Sullivan et al., 2000a). Nesses casos, o aprendizado é localizado no bulbo olfatório e é dependente de norepinefrina (Sullivan et al., 2000b). Baseado nestes resultados, os autores propuseram que o aprendizado resulta da desinibição das células mitrais, o que permite que as mesmas liberem glutamato, que irá ativar receptores NMDA e promover mudanças de longa-duração nas conexões entre célula granular olfatória e célula mitral. Podemos propor então, que no caso da memória de reconhecimento social de longa duração, as células mitrais encontram-se no estado inibido devido à monotonia olfativa proporcionada pelo isolamento social. Logo, quando o novo estímulo olfativo é apresentado ao animal, não há disparo suficiente destas células mitrais, nem liberação de glutamato suficiente para desencadear síntese protéica, logo não há retenção da memória social de longa duração, que já foi demonstrado ser dependente de síntese protéica (Kogan et al., 2000).

Nossos resultados e de outros estudos sugerem que este processo de síntese protéica ocorre normalmente em animais agrupados, já que os mesmos não passam por esta monotonia olfativa e provavelmente suas células mitrais encontram-se no estado desinibido, favorecendo que a retenção da memória social ocorra por períodos, inclusive, superiores à 24h (Kogan et al., 2000).

Para testar a nossa hipótese, acrescentamos ao isolamento social odores sociais e não-sociais com o intuito de restabelecer o enriquecimento olfativo. Nossos resultados mostraram que a inclusão de ambos os estímulos olfativos foi capaz de bloquear o déficit de memória social de longa-duração imposto pelo isolamento social. Este efeito promnésico não foi devido à manipulação diária dos animais, já que o mesmo não foi observado no grupo de animais que tiveram a maravalha trocada diariamente, porém sem a adição de odores. Este resultado foi inesperado, pois desde que a retenção da memória social analisada no nosso trabalho requer o processamento de informações sociais esperávamos que apenas a inclusão de feromônios revertesse o déficit de memória induzido pelo isolamento.

Classicamente, o sistema olfatório principal murino detecta odorantes voláteis, enquanto o sistema olfatório acessório responde aos odores não-voláteis, como os feromônios. Os odorantes voláteis ligam a receptores nos neurônios olfativos sensoriais do epitélio olfativo principal. No bulbo olfatório principal, as células mitrais projetam seus axônios para o córtex olfativo bem como para o núcleo amigdalóide cortical (Chess et al., 1992).

Já os feromônios ativam receptores nos neurônios do órgão vomeronasal, que não estão relacionados com os neurônios do epitélio olfativo principal (Dulac e Axel, 1995). No bulbo olfatório acessório (Wagner et al., 2006) as células mitrais projetam seus axônios para a amígdala medial e diferentes alvos hipotalâmicos (Halpern e Martinez-Marcos, 2003). Porém, esta visão clássica tem sido modificada, já que os dois sistemas parecem ser complementares, ou seja, o principal pode ser ativado por odores não-voláteis (Spehr et al., 2006; Sharp, 1975 ; Martel e Baum, 2009).

Ambas as células do epitélio olfativo principal e acessório expressam c-fos, marcador de atividade neural, em resposta a odores urinários voláteis (Muroi et al., 2006; Martel e Baum, 2007). Estudos utilizando ovelhas como modelos animais têm demonstrado que a secção da projeção nervosa do órgão vomeronasal não prejudica o comportamento maternal ou o reconhecimento social de co-específicos, porém, lesões no epitélio olfativo principal prejudicam (Levy et al., 1995).

Logo, apesar de não termos evidências diretas, podemos propor que ambos os odores adicionados à condição de isolamento social foram capazes de manter a desinibição de células mitrais de ambos os sistemas olfatórios, favorecendo assim a retenção da memória social por 24h.

Uma vez que nossos resultados mostraram que o enriquecimento olfativo bloqueia o déficit de memória social de longa duração promovido pelo isolamento social, nosso próximo passo foi investigar se outros estímulos sensoriais poderiam influenciar este tipo de memória. Para isso utilizamos o ambiente enriquecido, onde são estimuladas outras modalidades sensoriais.

Para tanto, minimizamos ao máximo o enriquecimento olfativo, logo, não houve troca de maravalha durante o período de isolamento, os objetos foram limpos com álcool 70% no início do experimento, e os cilindros de papelão foram trocados diariamente.

Nossos resultados mostraram que o enriquecimento ambiental também foi capaz de bloquear o déficit de memória social de longa duração induzida pelo isolamento. Portanto, a retenção da memória social de longa duração, em caso de isolamento social, parece ser dependente de enriquecimento sensorial. Seria interessante observar também se outras modalidades sensoriais tais como a audição poderia reverter o déficit de memória social de longa duração.

Uma das possíveis explicações para o efeito promnésico do ambiente enriquecido baseia-se no fato do mesmo induzir neurogênese (Meshi,2006). Interessantemente, estudos mostraram que animais juvenis submetidos ao isolamento social possuem neurogênese hipocampal reduzida na idade adulta (Lu et al., 2003, Ibi et al., 2008). Apesar de não termos verificado se a condição de isolamento utilizada no nosso trabalho foi capaz de induzir neurogênese, podemos propor que esse possa ser o mecanismo pelo qual o enriquecimento do ambiente preveniu o déficit de memória social induzido pelo isolamento.

Apesar da monotonia olfativa imposta pelo isolamento social ter afetado de forma deletéria a retenção da memória social de longa-duração, o mesmo não aconteceu quando as memórias testadas foram avaliadas na tarefa de esQUIVA inibitória e reconhecimento de objetos.

Na esquia inibitória, o aprendizado se estabelece pela associação entre a descida de uma plataforma, ato motor, com a administração de um choque nas patas do animal, entrada sensorial nociceptiva. Em se tratando do reconhecimento de objetos, as principais informações obtidas dos objetos explorados são de origem tátil e visual, desde que tanto o contexto quanto os objetos são neutros de odores. Logo, esperávamos que a monotonia olfativa, nas condições utilizadas em nosso trabalho, não afetasse memórias de longa-duração relativamente independente da modalidade sensorial olfato.

Portanto, nossos resultados demonstraram que o isolamento social de 7 dias prejudica especificamente a memória social de longa duração, não afetando a memória social de curta duração, as memórias associativa e declarativa ou os níveis de ansiedade. Além disso, a inclusão de condições ambientais como o enriquecimento sensorial durante o isolamento poderia promover alterações plásticas que seriam suficientes para prevenir o déficit de memória social de longa duração.

7 - CONCLUSÕES

- A memória social de curta duração não foi prejudicada por 7 dias de isolamento;
- A memória social de longa duração foi prejudicada por 7 dias de isolamento;
- O isolamento social de 7 dias não afetou a memória do tipo declarativa de longa duração, avaliada na tarefa de reconhecimento de objetos;
- O isolamento social de 7 dias não afetou a memória associativa de longa duração, avaliada na tarefa de esquiva inibitória;
- O isolamento social de 7 dias não afetou o comportamento do tipo ansiedade, avaliado no labirinto em cruz elevado.
- O constante estímulo olfativo de origem social e não-social em animais isolados por 7 dias previne o déficit de memória social de longa duração;
- O ambiente enriquecido é capaz de prevenir o déficit de memória social de longa duração induzido pelo isolamento;

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel, T.; Lattal, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11: 180-187.

Abraham NM, Egger V, Shimshek DR, Renden R, Fukunaga I, Sprengel R, Seeburg PH, Klugmann M, Margrie TW, Schaefer AT, Kuner T. Synaptic inhibition in the olfactory bulb accelerates odor discrimination in mice. *Neuron.* 2010 Feb 11; 65(3):399-411.

Ardenghi P, Barros D, Izquierdo LA, Bevilaqua L, Schroder N, Quevedo J, Rodrigues C, Madruga M, Medina JH, Izquierdo I. Late and prolonged memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase ; a signalling pathway . *Behav Pharmacol* 1997; 8: 745-51.

Axelson, J.G; Smith,M; Duarte,M. Prenatal Flutamide Treatment Eliminates the Adult Male Rat's Dependency upon Vasopressin When Forming Social-Olfactory Memories. *Horm Behav.* 1999 ;36(2):109-118.

Baddley, A. Working memory. *Life Sci.* 1998; 321: 167-173.

Bevilaquia L, Ardenghi P, Schroder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. Drugs acting upon the protein kinase A/CREB pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdale . *Behav Pharmacol* 1997;8:331-338.

Bliss TPV & Collingridge GL. A synaptic model of memory: longterm potentiation in the hippocampus. *Nature London.* 1993; 361: 31-39.

Blundon,J.A; Zakharenko,S.S. Dissecting the Components of Long-Term Potentiation. *Neuroscientist.* 2008; 14(6): 598-608.

Bluthé, R.M.;Dantzer, R. Social recognition does not involve vasopressinergic neurotransmission in female rats. *Brain Research* 1990; 535 (2): 301-4.

Bonini JS, Rodrigues L, Kerr DS, Bevilacqua LR, Cammarota M, Izquierdo I. AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. *Behav Pharmacol.* 2003; 14(2):161-166.

Brennan PA, Friedrich RW. Something in the air: new vistas on olfaction. *Trends Neurosci* 1998;21:1–2.

Brown, M.W., Wilson, F.A., Riches, I.P.,. Neuronal evidence that inferomedial temporal cortex is more important than hippocampus in certain processes underlying recognition memory. *Brain Res.* 1987; (409): 158–162.

Brown, M.W., Aggleton, J.P. Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* 2001; (2): 51–61.

Britton JC, Tavor SF, Sudheimer KD, Liberzon I. Facial expressions and complex IAPS pictures: common and differential networks. *Neuroimage.* 2006. Jun : 31(2): 906-19

Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors—a molecular-basis for odor recognition. *Cell* 1991;65:175–87.

Buffalo, E.A., Reber, P.J., Squire, L.R. The human perirhinal cortex and recognition memory. *Hippocampus* 1998; 8: 330–339.

Cahill L, McGaugh JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 1998;21:294-299.

Caldwell HK, Lee HJ, Macbeth AH, Young WS 3rd. Vasopressin: behavioral roles of an "original" neuropeptide. *Prog Neurobiol.* 2008 Jan;84(1):1-24.

Cammarota M, Paratcha G, Levi de Stein M, Bernabeu R, Izquierdo I, Medina JH. B-50: GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochem Res* 1997;22:499–505.

Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent JD, Gheusi G, Lledo PM. Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 1959. 3;183(4653):55-6.

Cilia, J., Reavill, C., Hagan, J.J., Jones, D.N., 2001. Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats. *Psychopharmacology* 156,327e337.

Cilia, J., Hatcher, P.D., Reavill, C., Jones, D.N.C. Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats: an update *Psychopharmacology* (2005) 180: 57–62

Critchley, H.D., Daly, E.M., Bullmore, E.T., Williams, S.C Van Amelsvoort, T., Robertson, D.M., Rowe, A., Phillips, M., McAlonan, G., Howlin, P., Murphy, D.G., 2000. The function neuroanatomy of social behaviour: changes in cerebral blood flow when people with autistic disorder process facial expressions. *Brain* 123 (Pt 11) 2203-2212

Dalton, K. M, Nacewicz, B.M, Johnstone, T. Schaefer, H.S, Gernsbacher, M. A. Goldsmith, H.H. Alexander, A. L, Davidson, R.J, 2005. Gaze fixation and the neural circuitry of face processing in autism. *Nat. Neurosci.* 8 (4) 519-526.

Davis, H.P., and Squire, L.R Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull.* 1984; 96: 518-559.

De Gasperín-Estrada, G.P; Camacho, F.J; Paredes, R.G. Olfactory discrimination and incentive value of non copulating and sexually sluggish male rats. *Physiology & Behavior.* 2008. 93;18: 742-7.

Dudai, Y. Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron*. 1996; 617: 367-370.

Dulac C, Wagner S. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Ann Rev Genet* .2006;40:449–67.

Emptage, N.J., and Carew, T.J (1993). Long term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* 262, 253-256.

Engelmann M, Wotjak CT, Landgraf R. Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 1995; 58: 315–321.

Ennaceur A, Delacour J. Effect of combined or separate administration of piracetam and choline on learning and memory in the rat. *Psychopharmacology*. 1987;92:58–67.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioral data. Behav Brain Res* 1988; 31:47–59.

Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J.P.,. Neurotoxic lesions of the perirhinal cortex do not mimic the behavioural effects of fornix transection in the rat. *Behav. Brain Res*. 1996; 80, 9–25.

Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res*. 2005;159:247–66.

Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL. Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty and to an object recognition task in an open space and an enclosed space. *Behav Brain Res*. 2009;197:417–34.

Ennaceur. A. One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behavioural Brain Research*. 2010.;1-11.

Essman WB. The development of activity differences in isolated and aggregated mice. *Anim Behav.* 1966 ;14(4):406-409.

Fahy, F.L., Riches, I.P., Brown, M.W.,. Neuronal activity related to visual recognition memory: long-term memory and the encoding of recency and familiarity information in the primate anterior and medial inferior temporal and rhinal cortex. *Exp. Brain Res.* 1993; 96: 457–472.

Ferdman N, Murmu RP, Bock J, Braun K, Leshem M. Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav Brain Res.* 2007. 18;180(2):174-82.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 2001; 21: 8278–6285.

Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 2000; 25: 284–288.

Ferguson, J,N.Young L,J. Insel, T, R. The Neuroendocrine Basis of Social Recognition.*Frontiers in Neuroendocrinology* .2002;23: 200–224

Ferreira ,M.B.C, da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: role of NMDA and GABAergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;41:767–71.

Gaffan, D. Dissociated effects of perirhinal cortex ablation, fornix transaction and amygdalectomy: evidence for multiple memory systems in the primate temporal lobe. *Exp. Brain Res.* 1994;99: 411–422.

Garau, A. Marti, M, A. Sala,J.; Balada, F. Age effects on the social interaction test in early adulthood male rats. *Depress Anxiety*, v.12, n.4,p,226-31,2000

Gheusi G., Bhuthe, R.m.; Goodall, G.; Dantzer, R. Ethological study of the effects of tetrahydroaminoacridine (THA) on social recognition in rats. *Psychopharmacology*, v.114, p. 644-50, 1994.

Gobbini MI, Leibenluft E, Santiago N, Haxby JV. Social and emotional attachment in the neural representation of faces. *Neuroimage*. 2004 Aug;22(4):1628-35.

Gold PE, McGaugh JL. 1975. A single-trace, two process view of memory storage processes. In: Deutsch & JA Deutsch. *Short-term Memory*, Academic Press, New York, 1975. 355-378 p.

Goldman-Rakic P. 1992. Prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia: the relevance of working memory. In: BJ Carroll & JE Barrett (Eds), *Psychopathology and the Brain*, Raven Press, New York. 1-23 p.

Goldman-Rakic P. Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci* . 1996; 93: 13473-13480.

Gresack JE, Kerr KM, Frick KM. Short-term environmental enrichment decreases the mnemonic response to estrogen in young, but not aged, female mice. *Brain Res*. 2007 Jul 30;1160:91-101.

Hajilou, B.B., Done, D.J. Evidence for a dissociation of structural and semantic knowledge in dementia of the Alzheimer type (DAT). *Neuropsychologia* .2007; 4: 810–816.

Hall, F.S. (1998) Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. *Crit. Rev. Neurobiol.* 12, 129–162

Halpin ZT. Individual differences in the biological odors of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Behav Biol*. 1974;11(2):253-9.

Halpern M., Martinez-Marcos A. (2003.). Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog. Neurobiol.* 70, 245–318

Holdstock, J.S., The role of the human medial temporal lobe in object recognition and object discrimination. *Q. J. Exp. Psychol. B* 2005; 58: 326–339.

Hunter AJ, Murray TK. Cholinergic mechanisms in a simple test of olfactory learning in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989; 99 (2):270-5.

Ibi,D.,Takuma, K, Koike, H., Mizoguchi, H.,Tsuritani,K., Kuwahara, Y.,Kamei,H., Nagai, T., Yoneda,Y. Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. *Journal of Neurochemistry*.2008; 105: 921-932.

Illig K,R. Haberty L.B. Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *J Comp Neurol* .2003; 457: 361-73.

Insel, T.R. A neurobiological basis of social attachment. *Am J Psychiatry*. 1989;154 :726-735.

Irle, E., Kessler, J., Markowitsch, H.J., Hofmann, W. Primate learning tasks reveal strong impairments in patients with presenile or senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Cogn.* 1987; 6: 429–449.

Izquierdo I, da Cunha C, Rossato R, Ferreira MBC, Jerusalinsky D, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. *Behav Neural Biol* 1992;58:16–25.

Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina JH. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol.* 1992; 9: 421-427.

Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 1995;63:19–32.

Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 1997a;9:786–93.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res.* 1999b; 103, 100-111.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connections to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997a;68:285–316.

Izquierdo LA, Schroöder N, Ardenghi P, Quevedo J, Bevilaqua L, Netto CA, Izquierdo I, Medina JH. Systemic administration of ACTH and vasopressin in rats reverses the amnesic effect of posttraining β -endorphin or electroconvulsive shock but not that of intrahippocampal infusion of protein kinase inhibitors. *Neurobiol Learn Mem* 1997b;68:197–202.

Izquierdo I, Medina JH. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. *Trends Neurosci* 1998;21:423–6.

Izquierdo, I., 2002. *Memória*. Artmed, Porto Alegre.

Izquierdo, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *TRENDS in Neurosciences* 2006 Vol.29 No.9.

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

Jedlicka, P. Vlachos, A. Schwarzacher, S.W, Deller, T. A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behavioural Brain Research*. 2008; 192: 12–19.

Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Da Silva RC, Bianchin M, Ruschel A, Medina JH, Izquierdo I. Amnesia by infusion of glutamate receptor blockers into the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*, 1992;58:76–80.

Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. Posttraining intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes retrograde amnesia in rats. *Behav Neural Biol* 1994;61:107–109.

Kandel, E.R. Schwartz, J.H, Jessel. T.M. Principles of neural science. McGraw-Hill. New York.

Karim A, Arslan MI. Isolation modifies the behavioural response in rats. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 2000 ;26(1):27-32.

Kaut KP, Bunsey MD. The effects of lesions to the rat hippocampus or rhinal cortex on olfactory and spatial memory: retrograde and anterograde findings. *Cogn Affect Behav Neurosci* 2001;1:270–86

Kaut KP, Bunsey MD, Riccio DC Olfactory learning and memory impairments following lesions to the hippocampus and perirhinal-entorhinal cortex. *Behav Neurosci*. 2003 ;117(2):304-19.

Kendrick, KM, Levy, F. Kaverne, EB. Changes in the sensory processing of olfactory signals induced by birth in sheep. *Science* 1992;256: 833-836.

Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus*. 2000;10(1):47-56.

Kokare DM, Dandekar MP, Singru PS, Gupta GL, Subhedar NK Involvement of alpha-MSH in the social isolation induced anxiety- and depression-like behaviors in rat. *Neuropharmacology*. 2010 Jan 18. [Epub ahead of print

Kwaki, C., Lee, S.H., Kaang, B.K. Social isolation selectively increases anxiety in mice without affectin depression-like behavior. *Korean J. Physiol Pharmacol.* 2009; 13: 357 - 360.

Laatu, S., Revonsuo, A., Jaykka, H., Portin, R., Rinne, J.O. Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. *Acta Neurol. Scand.* 2003; 108: 82–89.

Leach MC, Ambrose N, Bowell VJ, Morton DB (2000) The development of a new form of mouse cage enrichment. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 3, 81±91

Lee, A.C., Rahman, S., Hodges, J.R., Sahakian, B.J., Graham, K.S., Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 18: 1660–10.

Lorenzini, CA, Baldi, E, Bucherelli, C, Sacchetti, B, Tassoni, G. Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* 1996; 730(1-2):32-9.

Lu L., Bao G., Chen H., Xia P., Fan X., Zhang J., Pei G. and Ma L. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp. Neurol.* 2003; 183: 600–609.

Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 1999; 96: 713–23.

Manns, J.R., Squire, L.R. Impaired recognition memory on the Doors and People Test after damage limited to the hippocampal region. *Hippocampus* 1999; 9: 495–499.

McGaugh JL. Time-dependent processes in memory storage. *Science.* 1966; 153: 1351-1359.

McGaugh JL. A multi-trace view of memory storage processes. *Accademia Nazionale dei Lincei*. 1968; 109: 13-28.

McGaugh, J. L. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000; 287: 248- 251.

MacLeod K, Laurent G. Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odorencoding neural assemblies. *Science* 1996;274:976–9.

Meredith M. Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain—cooperation or coincidence? *Olfaction and taste Xii*. 1998; 855: 349–61.

Meunier, M., Bachevalier, J., Mishkin, M., Murray, E.A. Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *J. Neurosci*. 1993;13:, 5418–5432.

Mombaerts,P. Genes and ligans for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004. 5:263-278.

Moura,PJ. Contribuições para o estudo da memória de reconhecimento social em ratos.Universidade de São Paulo.2008.70p.

Murray, E.A., Bussey, T.J. Perceptual-mnemonic functions of the perirhinal cortex. *Trends Cogn. Sci*.1999; 3, 142–151.

Neville KR, Haberly LB. Olfactory cortex. In: Shepherd GM, editor. *The synaptic organization of the brain, 5th ed*. New York: Oxford; 2004. pp. 415–454.

Okuda H, Tatsumi K, Makinodan M, Yamauchi T, Kishimoto T, Wanaka A.Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala.*J Neurosci Res*. 2009 Dec;87(16):3546-53.

Packard, M.G, Cahill, L, James, L.,Macgauch,L. Amygdala modulation of hippocampal-dependent and caudate nucleus-dependent memory processes. *Proc Natl Acad Sci* .1994;91(18):8477-8481.

Petrulis A, Alvarez P, Eichenbaum H. Neural correlates of social odor recognition and the representation of individual distinctive social odors within entorhinal cortex and ventral subiculum. *Neuroscience* 2005;130:259–74.

Pinheiro SH, Zangrossi H Jr, Del-Ben CM, Graeff FG. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. *An Acad Bras Cienc*. 2007 Mar;79(1):71-85.

Popik P, van Ree JM. Neurohypophyseal peptides and social recognition in rats. *Prog BrainRes* 1998; 119: 415–436.

POPIK, P.;VAN REE, J.M. Neurohypophyseal peptides and social recognition in rats. *Prog Brain Res*, 1998; 119: 415-36.

Prado VF, Martins-Silva CM, Castro BM, Barros DM, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim H, Rossato JI, Freitas R, Koenen J, Kushmerick C, Quan H, Cota VR , Moraes MFD, Gomez MV, Wetsel WC, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo IA, Caron MG and Prado MAM. Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in social recognition. *Neuron*: 51: 601-612, 2006.

Price DL. The central olfactory and accessory olfactory systems. In; Finger TE, Silver WL, editors. *Neurobiology of taste and smell*. New York: John Wiley & Sons; 1987.p.179-203.

Purdy, K.S., McMullen, P.A., Freedman, M. Changes to the object recognition system in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Brain Cogn*. 2002.;49: 213–216

Przybylski,J.; Sara,S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res*. 1997; 84: 241-246.

Reed, J.M., Squire, L.R. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation. *Behav. Neurosci.* 1997; 111: 667–675.

Richter K, Wolf G, Engelmann M. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn Mem* 2005;12:407–13.

Ringo J. Stimulus specific adaptation in inferior temporal and medial temporal cortex of the monkey. *Behav Brain Res* .1996; 76:191–197.

Rossato, J. I., et al. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 2007;14, 36-46.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res* 1978;153:563–76

Sanchez-Andrade G, James BM, Kendrick KM. Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev.* 2005;51:547–58.

Sanchez-Andrade, G. Kendrick, K, M. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behavioural Brain Research.* 2009; 200: 323–335.

Schafe, G.E.; Nader, K.; Blair, H.T.; Le Doux, J.E. Memory consolidation of pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci.* 24(9): 540-546, 2001.

Sharp, F.R., Kauer, J.S. and Shepherd, G.M. Local sites of activity-related glucose metabolism in rat olfactory bulb during olfactory stimulation. *Brain Res.* (1975) 98, 596–600.

Squire, LR e Kandel, ER. *Memória - Da mente às moléculas.* ArtmedEd., Porto Alegre, 2003, 251p.

Sullivan,R.M; Wilson, D.A The locus coeruleus , norepinephrine , and memory in newborns. *Brain Res Bull.* 1994. 35; 467-472.

Sullivan,R.M. Landers, m., Yeaman,B.,and Wilson. Good memories of bad events in infancy. *Nature.* 2000a ;407:38-39.

Sullivan,R.M., Stackenwalt, G., Nasr, F., Lenon,C., Wilson,D.A. Association of an odor with activation of olfactory bulb noradrenergic beta-receptor or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav. Neurosci.* 2000b; 114:957-962.

Staubli U, Shcottler F, Nejat-Bina D. Role of dorsomedial thalamic: nucleus and piriform cortex in processing olfactory information. *Behav Brain Res* 1987 ; 25: 117-29.

Suzuki W, Zola-Morgan S, Squire L, Amaral D. Lesions of the perirhinal and parahippocampal cortices in the monkey produce longlasting temporal cortex of the monkey. *Behav Brain Res* .1993; 76:191–197.

Thor DH, Holloway WR. Social memory of the male laboratory rat. *Journal of Comparative Psychology* .1982; 96: 1000–1006.

Tulving, E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W, editors. *Organization of memory.* New York: Academic Press, 1972: 381-403.

Tirindelli R, Mucignat-Caretta C, Ryba NJ. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 1998 Nov;21(11):482-6.

van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage,F.H. 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* .415: 1030–1034.

Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., and Gage, F.H. 2006. NMDA receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442: 929–933.

Tulving, E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E, Donaldson W, editors. *Organization of memory*. New York: Academic Press, 1972: 381-403.

Valzelli L, Garattini S Biochemical and behavioural changes induced by isolation in rats. *Neuropharmacology*. 1972 Jan;11(1):17-22.

Võikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav*. 2005 Jun;4(4):240-52.

Wallace ME (1982) Some thoughts on the laboratory cage design process. *International Journal for the Study of Animal Problems* 3, 234±42

Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, McCoy JG. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol Behav*. 2001 Jul;73(4):649-58.

Wilson DA, Kadohisa M, Fletcher ML. Cortical contributions to olfaction: Plasticity and perception. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2006; 17:462-470.

Winslow JT, Camacho F. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology*. 1995; 121: 164–172.

Winslow, J.T. Insel, T.R. Neuroendocrine basis of social recognition. *Psychopharmacology*. 1989; 99(2):270-5.

Winslow, J.T., 2003 . Mouse social recognition and preference. *Current Protocols in Neuroscience*, vol 1. John Wiley and Sons, Inc. New York, pp 8-16.

Winter, B,D, Saksida, L,M, Bussey, T. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding,consolidation and retrieval. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* .2008; 32:1055–1070.

Wright RL, Conrad CD. Enriched environment prevents chronic stress-induced spatial learning and memory deficits.*Behav Brain Res*. 2008 11;187(1):41-7.

Wolfman C, Fin C, Dias M, Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo, I. Intrahippocampal or intra-amygdala infusion of Kn62, a specific inhibitor of calcium:calmodulin–dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol*.1994;61(3):203-5.

WÜRBEL, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *TRENDS in Neurosciences*. 2001; 24:207-211.

Xiang, J.Z., Brown, M.W., Differential neuronal encoding of novelty, familiarity and recency in regions of the anterior temporal lobe. *Neuropharmacology* 1998; 37:657–676.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)