UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

FABÍOLA DE CARVALHO CHAVES DE SIQUEIRA MENDES

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA E DO AMBIENTE SOBRE O APRENDIZADO ESPACIAL E O PADRÃO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM MODELO MURINO SENIL

Belém – PA
2014

FABÍOLA DE CARVALHO CHAVES DE SIQUEIRA MENDES

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA E DO AMBIENTE SOBRE O APRENDIZADO ESPACIAL E O PADRÃO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM MODELO MURINO SENIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Consentino Kronka Sosthenes

Co-orientador: Prof. Dr. Cristovam Wanderley Picanço Diniz

Belém – PA
2014

Biblioteca Central da UFPA, Belém, Pará - Brasil

Mendes, Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes

Influência da atividade mastigatória e do ambiente sobre o aprendizado espacial e o padrão da atividade exploratória em modelo murino senil / Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes; orientadora: Marcia Consentino Kronka Sosthenes. – 2014.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2014. 105f

1. Mastigação. 2. Ambiente Enriquecido. 3. Reabilitação Mastigatória. 4. Memória espacial. 5. Atividade Exploratória. I. Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. II. Título

---

FABÍOLA DE CARVALHO CHAVES DE SIQUEIRA MENDES

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA E DO AMBIENTE SOBRE O APRENDIZADO ESPACIAL E O PADRÃO DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM MODELO MURINO SENIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.
Área de concentração: Neurociências

Apresentação e aprovação em: 01 / 04 / 2014

Banca examinadora:

Orientadora: Profª. Drª. Marcia Consentino Kronka Sosthenes
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliador (a): Profª. Drª. Lucídia Fonseca Santiago
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliador (a): Profª. Drª. Elizabeth Sumi Yamada
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Dedico este trabalho aos meus pais, Raimundo José (*in memorian*) e Norma Siqueira Mendes, sem os quais nada disso seria possível, pois permitiram e ofereceram condições para que eu partisse em busca dos meus sonhos. No caso de meu pai, lamento sua partida e o pouco tempo que faltou para ele presenciar a finalização dos meus trabalhos. Apesar da tristeza e da saudade, seu legado foi maior e me impulsionou a seguir na minha caminhada. Um homem inteligente e educador nato que propalou seus ensinamentos em escolas, universidades, reuniões descontraídas entre amigos e dentro de casa.

Meu pai, o bem maior que o senhor deixou é imaterial e não sofrerá a corrosão ou destruição do tempo. São os seus ensinamentos, princípios éticos e morais, olhares reflexivos e irreverentes sobre a vida, valorização e paixão pela educação, que levarei sempre comigo para tornar o meu futuro cada vez mais próximo do meu presente e o meu presente um motivo de satisfação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas conquistas, força espiritual e resiliência.

Ao meu irmão, Fábio Siqueira Mendes, parceiro de todas as horas, personagem indispensável da minha história e à sua esposa, Camilla Batista.

O meu obrigado aos amigos do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção – UFPA e, principalmente, aos companheiros do grupo "MASTIGATÓRIO". Trabalhamos todos em prol de uma ciência com qualidade em nosso país.

Agradeço também à minha querida orientadora, Profª Drª Marcia Kronka Sosthenes, e ao meu estimado co-orientador, Prof Dr. Cristovam Picanço Diniz, pela solicitude em todos os momentos e contribuições marcantes neste trabalho. Ambos foram figuras ímpares na minha formação acadêmica e os anfitriões desse mundo científico, cuja grandiosidade e desafios me fascinaram.

Os meus agradecimentos, ainda, às agências de fomento à pesquisa do governo brasileiro: o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Amazônia Paraense (FAPESPA) pelas concessões e financiamento sem os quais não seria possível realizar esse trabalho, além da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Como alguns dos resultados deste trabalho já foram publicados em formato de artigo científico em revista internacional, agradeço o suporte da Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP) e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESP / UFPA), através do Programa de Apoio à Publicação Qualificada (PAPQ) que arcaram com os custos de revisão, edição e taxas de publicação.

Idéias que não se tornam palavras, são inúteis. Palavras que não se tornam atitudes, são mais inúteis ainda...

Raimundo José de Siqueira Mendes

RESUMO

Para medir possíveis influências da mastigação e do estilo de vida sedentário em modelo murino senil, impusemos um de três regimes de dieta aos diferentes grupos experimentais do 21º dia pós-natal até 6 ou 18 meses de vida: dieta sólida tipo *pellet*; dieta em *pellet* seguida por uma em pó, farelada; ou dieta peletizada seguida de pó e novamente *pellet*, com intervalos de tempo iguais em cada dieta. Para mimetizar o estilo de vida sedentário ou ativo, os animais foram criados, respectivamente, em gaiolas-padrão (ambiente empobrecido-AP) ou em gaiolas enriquecidas (ambiente enriquecido-AE). Para medir os efeitos da dieta, do ambiente e da idade sobre a atividade exploratória, realizamos o teste do campo aberto, onde camundongos jovens de AP que sofreram alteração da atividade mastigatória demonstraram maior preferência pela zona periférica, mas no envelhecimento e no AE essas diferenças foram minimizadas. Nos velhos de AE, essas diferenças reapareceram. Já sobre as influências na aprendizagem e memória espacial, aplicamos o labirinto aquático de Morris e vimos que a redução da atividade mastigatória, independente do ambiente, diminuiu a taxa média de aprendizado espacial e sua reabilitação recuperou as perdas associadas em animais jovens e, quando combinada ao AE, melhorou a taxa de aprendizado em velhos. Não se encontrou correlação entre taxa de aprendizado e velocidade de nado dos camundongos sugerindo que os déficits são de natureza cognitiva. Concluímos assim, que a alteração da atividade mastigatória influencia o padrão de exploração por zonas no campo aberto e a estimulação ambiental acentua os seus efeitos no envelhecimento, privilegiando a preferência pela zona periférica e a redução da atividade mastigatória prejudica a memória espacial durante o teste do labirinto aquático de Morris e a sua reabilitação é capaz de recuperar as habilidades espaciais, mas em idosos é necessária a combinação com um AE.

Palavras-chave: mastigação; ambiente enriquecido; reabilitação mastigatória; memória espacial; atividade exploratória.

ABSTRACT

To measure possible influences of the mastication and sedentary lifestyle, we imposed masticatory patterns with three different experimental diet regimes starting at 21st postnatal day during 6 (6M) or 18 (18M) months: continuous pellet hard diet, equal periods of hard followed by soft diet or equal periods of hard followed by soft followed by hard diet. To mimic the sedentary and active lifestyles, the animals were raised, respectively in standard (AP) or enriched cages (AE). To measure the effects of diet, environment and age on the exploratory activity, we performed the open field test. Young mice (AP) with altered masticatory activity demonstrated more preference for peripheric zone, but in aging and AE animals these differences were minimized. In the aging specimens maintained in AE, these differences were reappeared. About influences on learning and spatial memory, we apply the Morris water maze and the reduced masticatory activity, regardless of the environment, decreased the average rate of spatial learning and rehabilitation recovered the losses associated in young animals and the association with AE improved the learning rate in old mice. No significant correlations were observed between swimming speed and learning rate. We conclude that the change in masticatory activity influences the pattern of exploration by zones in the open field and environmental stimulation enhances the effects of aging, emphasizing the preference for peripheric zone and reduced masticatory activity impairs spatial memory during the test of the Morris water maze and rehabilitation is able to recover spatial ability. Here, the combination with AE is required in aging.

Keywords: mastication; enriched environment; masticatory rehabilitation; spatial learning; exploratory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores moleculares e celulares que contribuem para a vulnerabilidade seletiva de neurônios ao estresse oxidativo..... 16

Figura 2 – Circuito trissináptico simplificado do hipocampo..... 24

Figura 3 – Representação dos circuitos neuronais que medeiam as respostas relacionadas ao comportamento ansioso..... 30

Figura 4 – Tipos diferentes de ração ofertada aos animais para instituir diferentes regimes de dieta..... 34

Figura 5 – Alojamento dos animais em ambiente empobrecido 35

Figura 6 – Alojamento dos animais em ambiente enriquecido..... 36

Figura 7 – Sequência de eventos do modelo experimental..... 37

Figura 8 – Ilustração do teste de atividade em campo aberto..... 38

Figura 9 – Ilustração da análise dos vídeos da atividade em campo aberto com o recurso do programa *ANY-maze (StoeltingCo©)*..... 39

Figura 10 – Ilustração do teste do labirinto aquático de Morris 41

Figura 11 – Ilustração da análise dos vídeos no Labirinto Aquático de Morris pelo programa *ANY-maze (StoeltingCo©)*..... 42

Figura 12 – Gráfico da relação do tempo preferencialmente dispendido na zona periférica do campo aberto para cada grupo experimental..... 45

Figura 13 – Gráfico da relação da distância preferencialmente percorrida na zona periférica do campo aberto para cada grupo experimental 47

Figura 14 – Gráfico da média de distância total percorrida para cada grupo experimental por minuto de teste no campo aberto..... 49

Figura 15 – Representação das trajetórias percorridas ao longo do teste de campo aberto..... 51

Figura 16 – Taxa de aprendizado (%) no 4º dia de teste do labirinto aquático de Morris sob diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), ambiente (AP e AE) e idade (6 e 18 meses)..... 52

Figura 17 – Representação dos valores médios da distância total percorrida no labirinto aquático e na zona do quadrante oposto ao da plataforma; as trajetórias de nado e a velocidade média de nado para cada grupo experimental..... 54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Número de animais utilizados nos ensaios comportamentais..... 44

Quadro 2 – Índice de contrate para o tempo nas zonas do campo aberto..... 47

Quadro 3 – Índice de contrate para a distância percorrida nas zonas do campo aberto.. 48

Quadro 4 – Média da taxa de aprendizado (%) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 e 18 meses, nos dois ambientes (empobrecido e enriquecido)..... 53

Quadro 5 – Média da distância total percorrida (cm) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 e 18 meses, nos dois ambientes (empobrecido ou enriquecido)..... 55

Quadro 6 – Média da distância total percorrida no quadrante oposto à plataforma (cm) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 e 18 meses, nos dois ambientes (empobrecido ou enriquecido)..... 55

Quadro 7 – Média da velocidade de nado (cm/s) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 meses, nos dois ambientes (empobrecido ou enriquecido)..... 56

Quadro 8 – Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para o índice de tempo preferencial na zona periférica do campo aberto** para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE)..... 85

Quadro 9 – Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para o índice de distância percorrida preferencialmente na zona periférica do campo aberto** para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE)..... 86

Quadro 10 – Representação da **média** e respectivos valores de **erro-padrão** da **distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente empobrecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD)..... 87

Quadro 11 – Representação da **média** e respectivos valores de **erro-padrão** da **distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente enriquecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD)..... 88

Quadro 12 – Representação dos **valores de significância** para a análise da **distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente empobrecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD)..... 89

Quadro 13 – Representação dos **valores de significância** para a **análise da distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente enriquecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD)..... 90

Quadro 14 – Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a taxa de aprendizado (%)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE)..... 91

Quadro 15 – Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a distãncia total percorrida (cm)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE)..... 92

Quadro 16 – Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a distãncia total percorrida no quadrante oposto à plataforma (cm)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE)..... 93

Quadro 17 – Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a velocidade média (cm/s)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE)..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

AE - Ambiente Enriquecido

ANOVA - do inglês: *Analysis of Variance* (em português: análise de variância)

AP - Ambiente Empobrecido

ATP – Adenosina Trifosfato

BDNF - do inglês: *brain-derived neurotrophic fator* (em português: fator neurotrófico derivado do cérebro)

CA - Corno de Amon

CE - Córtex Entorrinal

CEPAE - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação

CTb – do inglês: *cholera toxin B subunit* (em português: sub-unidade B da toxina colérica)

DHS - Diferença Honestamente Significativa

DNA - do inglês: *deoxyribonucleic acid* (em português: ácido desoxirribonucleico)

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

GD - Giro Denteado

GR - Receptor de Glicocorticóide

HD - do inglês: *Hard Diet* (em português: dieta dura)

HHA - Hipótalamo-Hipófise-Adrenal

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

NGF - do inglês: *nerve growth fator* (em português: fator de crescimento neuronal)

NMDA - N-metil D-Aspartato

OF - do inglês: *Open Field* (em português: campo aberto)

RNAm - RNA mensageiro (RNA do inglês: *ribonucleic acid*)

SAMP - do inglês: *senescence-accelerated-prone mice* (em português: camundongo de senescência acelerada)

SAMR - do inglês: *senescence-accelerated-resistant mouse* (em português: roedor resistente à senescência acelerada)

SD - do inglês *Soft Diet* (em português: dieta macia)

UFPA - Universidade Federal do Pará

WM - do inglês: *Water Maze* (em português: labirinto aquático)

ZC - Zona Central

ZP - Zona Periférica

6M - seis meses

18M - dezoito meses

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....14
1.1 O ENVELHECIMENTO POPULACIONAL: CONQUISTA E DESAFIOS DE UMA VIDA MAIS LONGA. 14
1.2 ALTERAÇÕES MASTIGATÓRIAS E DECLÍNIO COGNITIVO.....17
1.3 PLASTICIDADE CEREBRAL E AMBIENTE 19
1.4 HIPOCAMPO E MEMÓRIA.....21
1.5 ATIVIDADE EXPLORATÓRIA E COMPORTAMENTOS SUGESTIVOS DE ANSIEDADE 26
2. OBJETIVOS 32
2.1 GERAL.....32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....33
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO 33
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS SEGUNDO OS REGIMES DE DIETA, IDADE E AMBIENTE 33
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS.....36
3.3.1 Atividade em campo aberto - *Open Field* (OF) 37
3.3.2 Labirinto Aquático de Morris – *Water Maze* (WM) 40
4 RESULTADOS.....45
4.1 ATIVIDADE EM CAMPO ABERTO.....45
4.2 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS 51
4.2.1 Taxa de Aprendizagem.....51
4.2.2 Velocidade de Nado e Distância Percorrida.....54
4.2.3 Peso Corporal e Regimes de Dieta 58
5 DISCUSSÃO 59
5.1 ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA COMO FATOR DESENCADEADOR DO ESTRESSE E DO ESTADO ANSIOSO.....59
5.2 O ESTADO ANSIOSO E SUA NEUROANATOMIA NO ENVELHECIMENTO.61
5.3 O AMBIENTE E A SUGESTÃO DE FATORES ANSIOGÊNICOS.....62
5.4 ENVELHECIMENTO, AMBIENTE E DECLÍNIO COGNITIVO 65
5.5 REABILITAÇÃO DA FUNÇÃO MASTIGATÓRIA PARA PREVENIR DÉFICITS DE APRENDIZAGEM ESPACIAL EM ADULTOS IDOSOS.....66
5.6 DESORDENS DE ANSIEDADE E *PERFORMANCES* COGNITIVAS.....68
6 CONCLUSÃO.....70
REFERÊNCIAS 71
APÊNDICES.....85
ANEXOS 95

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ENVELHECIMENTO POPULACIONAL: CONQUISTA E DESAFIOS DE UMA VIDA MAIS LONGA.

O envelhecimento da população mundial nos últimos anos constitui um processo chamado de “transição demográfica”, pautado na queda da mortalidade e da fecundidade. Durante o último meio século, a taxa de fecundidade total diminuiu globalmente, passando de 5,0 para 2,7 filhos por mulher (ONU, 2001). Com a também queda do índice de mortalidade, aumentou a proporção de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos, superando os números de qualquer outra faixa etária. As projeções consideram que entre os anos de 1970 a 2025 haja um crescimento acumulado de 694 milhões de idosos ou, em valores percentuais, um aumento de 223%. Em 2025, estima-se que haverá um total de cerca de 1,2 bilhão de pessoas com idade superior a 60 anos e cerca de 2 bilhões em 2050, sendo 80% dessas pessoas localizadas em países em desenvolvimento (OMS, 2002).

Refletindo essas tendências, conforme dados do último censo realizado em 2010, a população idosa no Brasil cresce cada vez mais, enquanto a jovem diminui. Essa diferença se acentua se compararmos os números de crianças com idade de até 4 anos (13,8 milhões) que já é inferior ao de pessoas com mais de 65 anos (14 milhões). Em um cenário subsequente, as projeções populacionais apontam que o número de idosos será quatro vezes maior em 2060. Nessa projeção, teríamos 58,4 milhões de idosos (26,7% do total da população brasileira), com expectativa de vida para as mulheres de 84,4 anos, e de 78,03 para os homens (IBGE, 2011).

Nesse contexto, a participação da população acima de 65 anos na estrutura organizacional dos países tende a aumentar e traz consigo a necessidade de geração de recursos e construção de infraestrutura que permita um “envelhecimento ativo” (WONG; CARVALHO, 2006).

Cunhou-se o termo “envelhecimento ativo” para expressar o processo de geração de oportunidades contínuas de saúde, participação e segurança melhorando a qualidade de vida daqueles que estão passando pelo processo de senescência. A palavra “ativo” faz menção não somente à presença de saúde no seu conceito de bem-estar físico, mental e social, mas refere-se também à participação contínua dos idosos nas questões sociais, econômicas, culturais, espirituais e civis, de forma que se sintam autônomos e independentes (OMS, 2002).

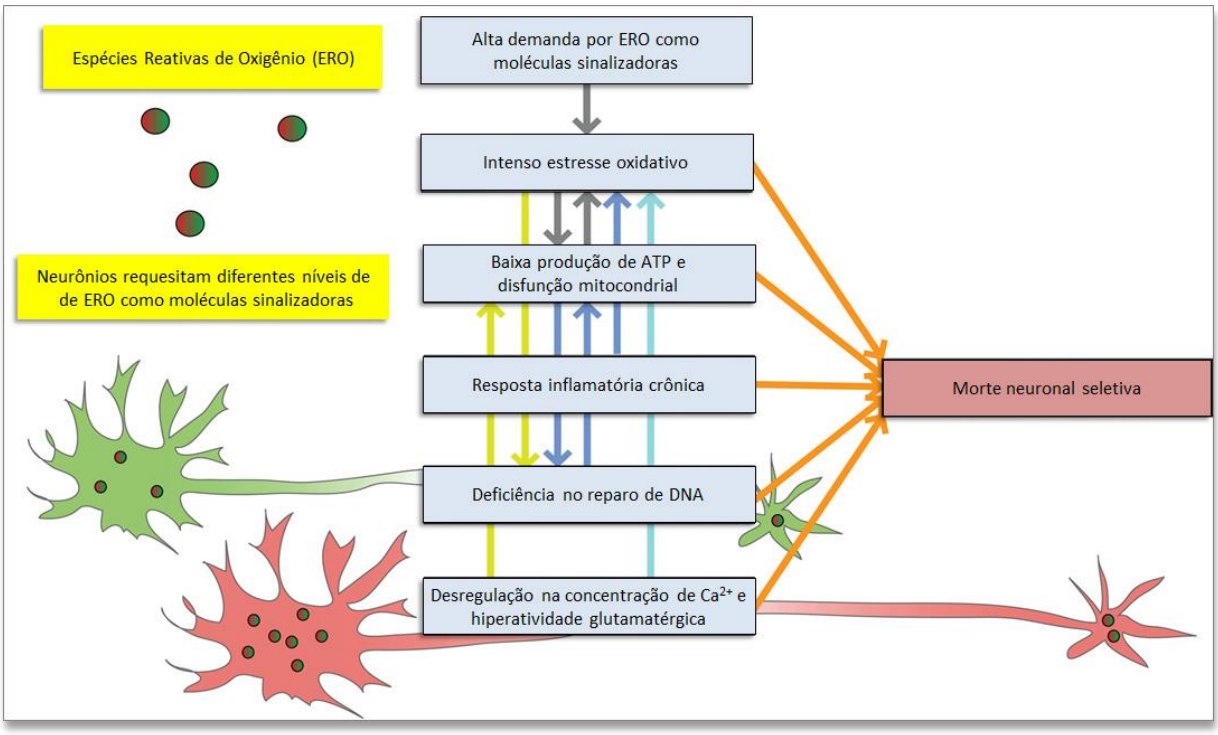
Por outro lado, com o envelhecimento progressivo da população, mais indivíduos atingem uma idade crítica para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas caracterizadas em sua maioria pelas demências (BURNS; BYRNE; MAURER, 2002), comprometendo, assim, sua autonomia e independência. Aliado a isso, muitos são os fatores de risco identificados para o surgimento dessas demências, mas as causas e mecanismos que levam a esses estados demenciais relacionados ao envelhecimento não são conhecidos na mesma proporção.

Portanto, é imprescindível investigar as bases fisiológicas do envelhecimento saudável e do alterado de modo a contribuir para a prevenção de patologias relacionadas à idade, como o declínio cognitivo associado ao envelhecimento (SIGRIST *et al*., 2013).

A origem dessa deterioração, que se agrava com a idade, parece estar na ruptura do equilíbrio delicado entre o estresse oxidativo e a capacidade redutora que protege as células das ações deletérias dos radicais livres. Estudos sobre o envelhecimento, tanto de cérebro normal quanto patológico, fornecem evidências acerca da contribuição dos danos oxidativos para as perdas cognitivas associadas à idade. Disfunções mitocondriais e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) parecem estar intimamente relacionadas a esses efeitos deletérios (HEAD, 2009).

O desequilíbrio nessa relação entre as defesas antioxidantes e a concentração intracelular das espécies reativas de oxigênio promove um aumento na peroxidação dos lipídeos, oxidação de proteínas do DNA nuclear e mitocondrial (DROGE; SCHIPPER, 2007). Os neurônios, com capacidade glicolítica limitada, tornam-se altamente dependentes da fosforilação aeróbica oxidativa das mitocôndrias. Se essas apresentam alguma disfunção, a função neuronal fica comprometida (ZHU *et al.*, 2004). Na **Figura 1**, dispomos de um resumo esquemático dos eventos celulares comentados.

Figura 1: Fatores moleculares e celulares que contribuem para a vulnerabilidade seletiva de neurônios ao estresse oxidativo.



Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem servir como moléculas de sinalização, enquanto níveis aumentados delas podem causar danos às biomoléculas. Os neurônios possuem diferentes demandas pelas ERO como moléculas de sinalização e uma grande demanda torna a célula seletivamente vulnerável diante de maior estresse. Uma vez vulneráveis, os neurônios têm baixa produção de ATP que, quando combinada com a elevada oxidação, pode afetar o reparo da molécula de DNA, possibilitando mudanças na atividade genômica e diminuição da atividade metabólica na mitocôndria. Estudos também sugerem a existência de resposta inflamatória crônica nos neurônios vulneráveis, o que pode elevar ainda mais o estresse oxidativo no seu interior. A desregulação da concentração de cálcio e glutamato estão intimamente ligados à geração de estresse oxidativo e os neurônios mais vulneráveis tendem a ser maiores, com axônios mais longos, que, uma vez alterados, comprometem a função de suas projeções. As setas coloridas no painel apontam possíveis relações de causa e efeito e indicam possíveis relações diretas entre os eventos.

Fonte: adaptado de Wang; Michaelis (2010).

O comprometimento da memória associada ao decréscimo de antioxidantes no plasma e no cérebro já foi previamente descrito (BERR, 2000); e essas alterações progressivas se agravam à medida que envelhecemos. Ocorrem alterações estruturais e funcionais no sistema nervoso central, como diminuição da massa encefálica, perda significativa da substância branca em até 8%, atrofia neuronal, diminuição do número de sinapses, alterações sinápticas com declínio de neurotransmissores, de receptores, de vesículas sinápticas e diminuição de fatores neurotróficos responsáveis pela plasticidade e astrocitose reativa (DESGRANGES *et al.*, 2008; BURKE; BARNES, 2006; RIDDLE *et al.*, 2003; SEGOVIA *et al.*, 2001; PETIT-TABOUE *et al.*, 1998).

É razoável supor, portanto, que o envelhecimento crescente da população trará implicações profundas para a sociedade, tornando-se essencial orientar o planejamento de políticas públicas baseadas em evidências.

Recentes evidências recolhidas em estudos com animais (KUBO *et al*., 2007; WATANABE *et al*., 2002) e humanos (SIMONATO *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2008), apontam a redução e o desequilíbrio (desarmonia oclusal) da atividade mastigatória como um fator de risco para o declínio cognitivo senil patológico (WEIJENBERG; SCHERDER; LOBBEZOO, 2011; MIURA *et al*., 2003).

É útil, portanto, rever os efeitos da redução e do desequilíbrio da atividade mastigatória sobre as perdas cognitivas.

1.2 ALTERAÇÕES MASTIGATÓRIAS E DECLÍNIO COGNITIVO

Uma variedade de abordagens experimentais convergem para a associação entre mudanças de comportamento e privação da atividade mastigatória induzida pela perda dos dentes (YAMAZAKI *et al*., 2008), alimentação por longo prazo com dieta farelada (DE ALMEIDA *et al*., 2012) ou implantação de dispositivos de alteração oclusal.

Sob condição de perda dental através da exodontia dos molares de camundongos, foi observado que déficits no aprendizado espacial manifestaram-se na meia-idade e se acentuaram em idade avançada. Isso, por outro lado, não foi observado em camundongos jovens, corroborando, assim, a idéia de que a diminuição da atividade mastigatória agrava o declínio cognitivo senil e esse agravamento parece estar associado as mudanças no hipocampo (WATANABE *et al.*, 2001).

De fato, camundongos idosos que tiveram redução da mastigação, apresentaram decréscimo no aprendizado espacial e redução da densidade neuronal na região de CA1 do hipocampo, peça chave para a consolidação da memória e aprendizado espacial em roedores e humanos (KUBO *et al*., 2007).

A formação hipocampal é muito sensível ao processo de envelhecimento, sendo uma das primeiras regiões do cérebro a evidenciar mudanças morfológicas, fisiológicas e neuroquímicas com o avanço da idade e testes realizados em ratos sem os dentes molares

mostraram que a redução da atividade mastigatória pode estar envolvida no processo de degeneração associada ao declínio cognitivo senil (WATANABE *et al*., 2002).

Nesse contexto, além da perda de dentes, admite-se que a duração e frequência dos ciclos mastigatórios, com repercussão na atividade mastigatória global, são influenciados pela liberdade dos movimentos mandibulares (de abertura, fechamento e possível lateralidade para algumas espécies) e o tipo e consistência dos alimentos (BERRETIN-FELIX *et al*., 2005; BIANCHINI, 2005).

Sobre as alterações na consistência de alimentos, camundogos que fizeram uso de ração farelada desde o desmame, apresentaram reduções da capacidade de aprendizado espacial na idade adulta e formação sináptica no córtex parietal e hipocampo, sugerindo que a redução da atividade mastigatória é um fator de risco para a demência senil (YAMAMOTO; HIRAYAMA, 2001).

Em consonância, as deficiências da atividade mastigatória foram identificadas, em última análise, influenciando as funções cerebrais superiores, como a memória verbal imediata, avaliada através de testes neuropsicológicos em humanos com 67 a 74 anos de idade (MORIYA *et al*., 2011). Apesar de todas as evidências apontadas, permanecem, entretanto, pouco esclarecidos os mecanismos pelo quais a mastigação modularia esses desempenhos cognitivos (SAKAMOTO; NAKATA; KAKIGI, 2009).

Imagens de ressonância magnética demonstraram que a mastigação promove um aumento no fluxo sanguíneo do cérebro humano e eleva a atividade neuronal em várias regiões do córtex cerebral (MIYAMOTO *et al.*, 2005). Além disso, demonstrou-se que testes de memória que são precedidos de atividade mastigatória estão associados a um melhor desempenho nos testes de memória de trabalho e isso é acompanhado por um aumento do fluxo sanguíneo cerebral no hipocampo, cortex pré-frontal dorso-lateral, córtex frontal, cortex pré-motor, pré-cúneo, tálamo e lobo parietal inferior (HIRANO *et al.*, 2008). Coerentemente, a velocidade de processamento medida pelo tempo de reação, revelou melhor desempenho quando a atividade mastigatória precedeu o início dos testes (HIRANO *et al.*, 2013).

Dessa forma, se existe então a possibilidade de que a mastigação imprima efeito positivo sobre o funcionamento cerebral e de que a sua manutenção/reabilitação pode ser uma alternativa de baixo custo para retardar ou recuperar efeitos indesejáveis associados, decidimos investigar essas questões com ênfase particular na reabilitação da atividade mastigatória, pois os estudos dedicados a essa área, na sua maioria, não incluem preocupação clara em investigar tais efeitos.

Aliado a isso, e por conta de um conjunto importante de demonstrações prévias, em nosso e em outros laboratórios, apontando o enriquecimento ambiental como uma forma de minimizar o declínio cognitivo senil (DINIZ *et al.*, 2010; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000), decidimos investigar possíveis efeitos benéficos aditivos da reabiltação oral e do ambiente enriquecido em modelo murino.

Uma vez que as ações neuroprotetoras exigem um substrato neural plástico para se instalarem, é útil rever as relações entre plasticidade e enriquecimento ambiental.

1.3 PLASTICIDADE CEREBRAL E AMBIENTE

O termo neuroplasticidade refere-se à capacidade do sistema nervoso de se reorganizar, alterando sua estrutura e função no decorrer do desenvolvimento e maturação do sistema nervoso e mediante mudanças ambientais e patologias cerebrais. No cérebro adulto, essas alterações plásticas envolvem vários níveis de organização, estendendo-se desde o nível molecular até o nível comportamental. Tais alterações sistêmicas são dependentes de mudanças nos elementos teciduais, incluindo neurônios, as células da glia e os vasos sanguíneos (LLEDO *et al.*, 2006).

As evidências associadas à neuroplasticidade decorrentes de mudanças ambientais foram reunidas a partir da transposição do conceito de enriquecimento ambiental para a realidade de modelos experimentais (para revisão ver REYNOLDS; LANE; RICHARDS, 2010). Nesses ambientes, os animais geralmente são alojados em gaiolas amplas, com múltiplos níveis e uma grande variedade de brinquedos, trocados de maneira periódica, sendo essas mudanças as responsáveis por promover nesses animais grande variedade de estímulos somatossensoriais, visuo-espaciais, cognitivos e motores (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000).

Essa forma de manter os animais permanentemente estimulados é reconhecida como capaz de aumentar a neurogênese, promover maturação neuronal e inserir os novos neurônios em circuitos funcionais e esses eventos são acompanhados de aumento na expressão de moléculas envolvidas na sinalização neuronal e na promoção da plasticidade sináptica (NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; RODRIGUEZ *et al*., 2005).

Outro componente fundamental das gaiolas enriquecidas é a existência de rodas de correr. Segundo Kempermann e col. (2010), o exercício físico voluntário é o principal agente

responsável pela neurogênese, maturação e inserção dos novos neurônios nos circuitos funcionais no hipocampo o que provavelmente contribui para a proteção relacionada ao agravamento dos déficits cognitivos do envelhecimento.

Em um trabalho realizado por Diniz e colaboradores (2010), com fêmeas adultas de camundongos suíços albinos envelhecidos (a mesma linhagem utilizada no presente trabalho), concluiu-se que, em longo prazo, o enriquecimento ambiental é capaz de influenciar o número de astrócitos de diferentes camadas do giro denteado, bem como, de melhorar ou evitar o declínio do desempenho desses animais em testes comportamentais que avaliavam a memória espacial e a memória semelhante à episódica, demonstrando, dessa forma, os efeitos do ambiente e do envelhecimento sobre a plasticidade glial.

Coerentemente, camundongos e ratos idosos mantidos em ambiente pobre de estímulos, apresentaram deficiências de memória espacial em testes como o do labirinto aquático de Morris (DINIZ *et al.*, 2010; WINOCUR, 1998). Esse teste exige a aquisição, consolidação e recuperação de informações espaciais aprendidas (MORRIS, 1984), sendo essas, tarefas dependentes da integridade do hipocampo (MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993; MORRIS *et al*., 1982). Mudanças estruturais/funcionais como as associadas ao envelhecimento (SHARMA; RAKOCZY; BROWN-BORG, 2010), e a um ambiente pouco estimulante (VOLKERS; SCHERDER, 2011), ou ainda, à desarmonia oclusal (WEIJENBERG; SCHERDER; LOBBEZOO, 2011; ONO *et al*., 2010), podem agir de forma combinada ou isolada e promover maior ou menor déficits cognitivos.

De fato, esse agravamento do declínio cognitivo senil tem sido confirmado entre idosos institucionalizados que habitam os ambientes pouco propícios à atividade física e a estimulação multissensorial e cognitiva das instituições de longa permanência tem demonstrado que é possível reverter prontamente grande parte desses déficits a partir de programas de estimulação apropriados (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

De forma mais abrangente, tem-se documentado de forma sistemática que a estimulação cognitiva que se manifesta através da educação, da complexidade do trabalho e/ou de atividades de lazer, produz efeitos benéficos, ajudando a preservar as várias funções cognitivas e retardando o desenvolvimento de demências. Os efeitos benéficos dessa estimulação em humanos podem ser explicados pela hipótese de reserva cognitiva, em que se afirma que a estimulação cognitiva promove a aplicação bem sucedida dos recursos plásticos ainda disponíveis no cérebro do idoso, reduzindo a taxa de desenvolvimento de patologias cerebrais (MILGRAM *et al*., 2006).

Por conta de que a formação e consolidação da memória do tempo presente (normalmente afetada durante o envelhecimento patológico) é dependente da integridade da formação hipocampal, é útil rever os aspectos conceituais relacionados à memória tanto quanto a organização morfofuncional das sub-regiões hipocampais que contribuem para sua consolidação.

1.4 HIPOCAMPO E MEMÓRIA

A partir das observações de Brenda Milner e Scoville acerca das funções mnemônicas do paciente H.M. que sofreu profunda amnésia após ressecção cirúrgica bilateral da porção medial dos lobos temporais, foi possível reconhecer que a memória é uma capacidade cerebral separada de outras funções cognitivas, como a percepção, a inteligência, a personalidade ou a motivação; e que as memórias de curto e longo prazo são entidades funcionais distintas; e que o substrato anatômico para manutenção da memória de longo prazo não é o lobo temporal medial (CLARK; SQUIRE, 2013). Desde então, uma busca sistemática tem sido feita para encontrar as bases neurais (celulares e moleculares) da memória, tentando reproduzir as mesmas lesões do paciente H.M. (CORRELL; SCOVILLE, 1965).

A memória, em função do intervalo de tempo de sua manutenção, pode ser classificada em memória de curta e de longa duração. A memória de curta duração possui uma capacidade de recordação limitada, com duração de segundos a minutos (EYSENCK, 1988). A memória de longa duração pode ser dividida em memória não-declarativa (implícita) e memória declarativa (explícita) (ANDERSON, 1976). A memória não-declarativa está relacionada ao processo de aquisição de habilidades, sobretudo motoras (SALMON; BUTTERS, 1995). No caso da memória declarativa, esta pode ainda ser subdividida em memórias semântica e episódica (LENT, 2013).

A memória espacial, sendo uma subcategoria da memória episódica, abrange o conhecimento da localização dentro de um contexto ambiental (FOSTER; DEFAZIO; BIZON, 2012). Esse tipo de memória envolve a habilidade para codificar, armazenar e recuperar informações sobre localizacões espaciais, configurações ou rotas (KESSELS *et al*., 2001). Desssa forma, sua função permite lembrar a localização de objetos ou encontrar um trajeto dentro de um ambiente.

Para tanto, algumas tarefas espaciais podem ser executadas usando informações chamadas “egocêntricas” (por exemplo, usando o sistema vestibular ou sinais proprioceptivos como recurso, de maneira que é possível fazer associações como: sempre se aproximar do estímulo X, sempre se afastar do estímulo Y, e assim por diante) ou fazendo uso de informações “alocêntricas”, as quais exigem codificação de características marcantes do ambiente, independentemente da localização atual do indivíduo no espaço. Nesse último caso, é necessária a formação de um mapa cognitivo do ambiente, pois não é possível mais recorrer às associações do primeiro caso (sempre se aproximar do estímulo X ou sempre se afastar do estímulo Y) (BANNERMAN *et al.*, 2014).

Dessa forma, para que ocorra a formação de memória, informações originárias de fontes externas (experiências sensoriais oriundas da interação com o ambiente), mas também internas (cognição, emoção) devem ser adquiridas (MCGAUGH, 2000).

Dos ensaios iniciais em primatas, tornou-se aparente que humanos e animais experimentais desenvolvem estratégias diferentes para resolver tarefas comportamentais em função da existência de múltiplos sistemas de memória. Macacos, por exemplo, aprendem tarefas de discriminação visual complexas após muitas tentativas, o que tem sido referido como aprendizado de habituação e que parece incluir os núcleos da base (TENG *et al.*, 2000); enquanto em humanos, essas tarefas são aprendidas memorizando diretamente o material utilizado para estimulação e essa estratégia de aprendizado parece envolver apenas os lobos temporais mediais.

Assim, a escolha de testes comportamentais hipocampo-dependentes em espécies não humanas é uma tarefa que exige cuidado para que o teste selecionado para avaliação seja equivalente ao mesmo tipo de memória que é comprometida em humanos após o dano no lobo temporal medial (CLARK; SQUIRE, 2013).

Tratando-se do estudo individualizado de memória espacial, esta é particularmente bastante estudada e avaliada através de paradigmas bem consolidados na literatura. Os principais modelos utilizados para análise da memória espacial em roedores são: o labirinto de braços radiais, o *T-maze* ou *Y-maze* e o labirinto aquático de Morris, sendo este último considerado como “padrão-ouro” no exame de memória espacial em relação a danos no hipocampo ou associado ao envelhecimento de roedores e razão pela qual decidimos adotá-lo em nosso estudo. Para revisão de protocolos ver Morellini (2013) e Sharma, Rakoczy e Brown-borg (2010).

No labirinto aquático de Morris, em um procedimento típico e amplamente difundido, os animais são colocados dentro de uma piscina circular de água opaca e devem nadar até encontrar uma plataforma escondida, submersa na água. A posição da plataforma permanece constante e espera-se que o desempenho do animal melhore ao longo dos ensaios repetidos, indicado por meio da redução no tempo de latência para encontrar a plataforma. Presumivelmente, uma *performance* eficiente nessa tarefa reflete a preservação dos processos relacionados à memória espacial e também envolvendo estratégias de navegação guiada por pistas visuais utilizadas como informações egocêntricas ou alocêntricas (TECOTT; NESTLER, 2004).

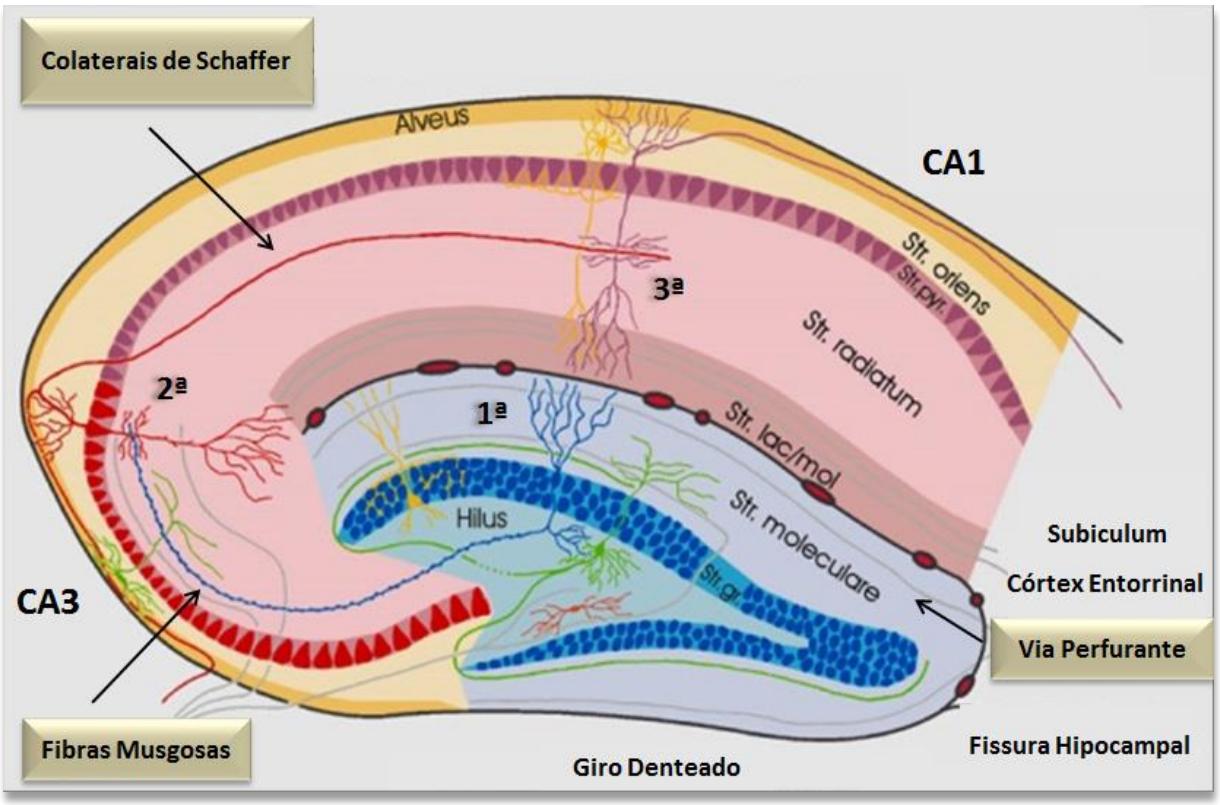
O principal substrato das habilidades de memória espacial subjacentes ao processo de navegação espacial e envolvido no teste do labirinto aquático de Morris parece envolver os neurônios piramidais do hipocampo (POUCET; SAVE; LENCK-SANTINI, 2000). Evidências indicam que essa estrutura participa na aquisição e na recuperação da informação espacial, bem como, na consolidação da informação. Teorias sobre a função das sub-regiões do hipocampo, nesse cenário, foram criadas com base na sua capacidade de processamento, conexões anatômicas e propriedades fisiológicas. Portanto, é útil uma breve revisão da anatomia regional do hipocampo e estruturas próximas relacionadas a esse processo.

O hipocampo é dividido em Corno de Amon 1, 2, 3 e 4 (CA1, CA2, CA3 e CA4), e possui fundamentalmente três camadas: a camada polimórfica (*stratum oriens*), camada piramidal (*stratum pyramidale*) e camada molecular (*stratum radiatum e stratum lacunosum-moleculare*). O hipocampo, aliado ao giro denteado (GD), ao subiculum e ao córtex entorrinal (CE) constituem o que se chama de “formação hipocampal”. O GD, por sua vez, é detentor da camada polimórfica ou hilus, camada granular (*stratum granulosum*) e a camada molecular (*stratum moleculare*) que é contínua com o hipocampo (BROWN; ZADOR, 1990).

No hipocampo identificamos uma rede neuronal que se comunica através de um bem definido circuito trissináptico. Os axônios de outras regiões corticais fazem sinapse com os córtices entorrinal e perirrinal, os quais projetam suas eferências através da via perfurante em direção às células granulares do giro denteado cujos axônios estão situados na camada molecular. As células granulares do giro denteado estimuladas pelas fibras da via perfurante, emitem axônios chamados de fibras musgosas para excitar neurônios piramidais na região do Corno de Amon 3 (CA3). Os neurônios de CA3 projetam colaterais axonais glutamatérgicos (colaterais de Schaffer) para neurônios piramidais no Corno de Amon 1 (CA1) fechando o

circuito trissináptico básico do hipocampo (para revisão ver AGGLETON; BROWN; ALBASSER, 2012 e TURNER *et al*., 1998) (**Figura 2**).

Figura 2: Circuito trissináptico simplificado do hipocampo.



Em cores diferenciadas, as laminações do hipocampo, giro denteado e vias componentes do circuito trissináptico (via perfurante na cor cinza; fibras musgosa em azul; colaterais de Schaffer em vermelho). Note que o giro denteado recebe projeções do córtex entorrinal através da via perfurante até ocorrer a 1ª sinapse no *stratum granulosum* do giro denteado. Em seguida, axônios das células granulares (fibras musgosas) partem em direção a CA3 (2ª sinapse), de onde eferências se projetam para CA1 através da rede de colaterais de Schaffer até ocorrer a 3ª sinapse.

Fonte: Formação Hipocampal... (2014) (adaptado e disponível em: http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus_schema_mittel.jpg).

A codificação de nova informação espacial dentro do hipocampo parece dependente do desenvolvimento de novas representações durante a exploração do ambiente onde o animal está. De fato, quando um animal se move pela primeira vez em um novo ambiente, cerca de 50% dos neurônios piramidais de CA1 tornam-se ativos e cada neurônio ativo é ativado em uma área restrita do ambiente referida como o “campo local” (do inglês *place field*) (KARLSSON; FRANK, 2008).

Esses campos receptores que detectam a localização espacial relativa, respondendo de forma seletiva à posição do animal em áreas espaciais definidas, desenvolvem-se a partir da

exploração do novo ambiente e isso é consistente com a importância do hipocampo para a codificação da novidade espacial (CARR; FRANK, 2012; SPIERS *et al.*, 2013). Por outro lado, evidências recentes revelam que os neurônios hipocampais podem codificar várias tarefas cognitivas relacionadas, permitindo correlacionar a posição relativa do animal e a informação associada ao comportamento corrente (ALLEN *et al.*, 2012).

Nesse contexto, as células piramidais de CA1 são a origem das eferências primárias do circuito trissináptico hipocampal e peças fundamentais na formação de memórias declarativas. Porém, essa região não atua isoladamente, mas sim, como parte de um circuito reverberante e funcionalmente ativo que envolve o córtex entorrinal, o giro denteado e CA3; e é através do giro denteado que o córtex entorrinal exerce sua maior influência sobre o hipocampo.

Para executar a tarefa de integração e separação de padrões, o giro denteado recebe aferências múltiplas que incluem as originárias dos córtices relacionados ao sistema vestibular, olfatório, visual, auditivo e somatossensorial, convergindo para o hipocampo através das áreas perirrinal e entorrinal lateral, assim como, recebe projeções específicas para a representação espacial em células especializadas (AGGLETON, 2012). Num caso e noutro, é através das vias perfurantes lateral e medial que essas informações são carreadas, de modo que o componente medial é seletivo para o processamento de informação espacial e o componente lateral para os componentes não espaciais (HAFTING *et al.*, 2005; HARGREAVES *et al.*, 2005; WITTER *et al.*, 1989).

Seis horas após o treinamento para aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de Morris, já é evidente o remodelamento das sinapses da camada molecular do giro denteado dorsal de ratos adultos com aumento de sua densidade no terço médio, e isso parece ser a expressão morfológica neuronal da consolidação desse aprendizado (SCULLY *et al.*, 2012).

Dessa forma, tendo em conta que a manipulação experimental induzida no presente trabalho, em que se reduz a atividade mastigatória ao mesmo tempo em que se submete os animais a um ambiente pobre de estímulos somato-motores e visuo-espaciais, é útil investigar se essa combinação afeta a atividade exploratória natural gerando o que tem sido caracterizado como comportamento semelhante à ansiedade (do inglês *anxiety-like behavior*).

1.5 ATIVIDADE EXPLORATÓRIA E COMPORTAMENTOS SUGESTIVOS DE ANSIEDADE

A ansiedade é definida como uma antecipação emocional a uma situação aversiva, ou seja, é primariamente uma resposta a um perigo potencial evoluindo enquanto resposta comportamental no sentido de evitá-lo. A ansiedade se distingue do medo pelo fato deste último estar relacionado a uma ameaça real e bem definida de perigo. A ansiedade, portanto, estaria associada a um estado de conflito ou incerteza, e surge quando existe a concorrência entre duas opções simultâneas e o indivíduo tem que fazer uma escolha entre elas (BANNERMAN *et al.*, 2014; DAVIS *et al*., 2009).

A ansiedade varia desde padrões fisiológicos até o patológico, onde são inúmeras as causas que podem levar um indivíduo a estados conflitantes e alterados de humor. Dentre elas, estão a predisposição genética, o funcionamento alterado de neurotransmissores ou de seus receptores, lesões cerebrais e presença de outras condições patológicas que interferem em circuitos neuronais relacionados às emoções (TENG; HUMES; DEMETRIO *et al*., 2005; ROZENTHAL *et al.*, 2004).

Assim, o estudo das emoções, a partir de modelos animais, tem buscado responder a três questões: quais sistemas neuronais estão envolvidos nas emoções; como esses sistemas funcionam quando alterados; e como essas condições patológicas podem ser modeladas (CRYAN; HOLMES, 2005).

Em nível comportamental, é possível avaliar determinadas atitudes do animal, como a esquiva, a fuga ou o “congelamento” (do inglês *freezing*), traduzidas como reflexo de um componente emocional subjacente. Essa leitura comportamental pode ser usada como marcador de um estado sugestivo de maior ansiedade. Desse modo, esse tipo de manifestação em modelos experimentais é muitas vezes referido como "relacionado à ansiedade" (do inglês *anxiety-related* ou *anxiety-like behavior*) (SARTORI; LANDGRAF; SINGEWALD, 2011).

Além dessa diferenciação na terminologia para humanos e os outros animais, é importante diferenciar duas condições analisadas em testes de ansiedade. Na primeira, são reunidos modelos que visam reproduzir a fisiopatologia dos transtornos de ansiedade humana, manipulando experimentalmente o meio ambiente, a neurofisiologia, a neuroquímica ou e até mesmo a genética dos animais e daí podem ser pensados como instrumentos de avaliação para "traços" de ansiedade, pois nesses casos haveria uma persistência ou predisposição dos sujeitos analisados em apresentar uma resposta ansiosa (BELZUNG; GRIEBEL, 2001).

Na segunda, são reunidos comportamentos oriundos de uma resposta emocional aguda, produto de atitude espontânea, sem qualquer outra intervenção (esse é o caso do presente trabalho); são considerados os comportamentos sugestivos de um "estado" emocional ansioso (KALUEFF; WHEATON; MURPHY, 2007; BEUZEN; BELZUNG, 1995). Para revisão consultar Sartori, Landgraf e Singewald (2011).

Os testes comportamentais mais comumente utilizados para medir o grau de comportamentos relacionados à ansiedade são: labirinto em cruz elevado (LCE), caixa claro-escuro e de campo aberto; sendo esse último também útil para avaliar atividade locomotora (CRYAN; HOLMES, 2005).

Assim sendo, no presente estudo foi aplicado o teste de campo aberto (*open field test* - OF) constituído por uma arena com seu entorno fechado por paredes e região central livre, oferecendo liberdade ao animal de explorá-la. Preferências do animal pela periferia do campo aberto, ou seja, próximo às paredes, são consideradas por muitos autores como comportamento sugestivo de um estado ansioso (CRYAN; SWEENEY, 2011).

O paradigma é pautado no fato de que o comportamento semelhante à ansiedade é desencadeado por duas situações postas ao animal: o isolamento e a agorafobia. O teste é individual, e, portanto, o animal fica isolado do seu grupo social. No que se refere a agorafobia, admite-se que o animal teria medo de ambientes abertos e expostos, como é o caso da zona central do campo aberto, afinal ali, ele se tornaria mais vulnerável a outros elementos potencialmente ameaçadores (PRUT; BELZUNG, 2003). É esperado, então, que nesse teste, níveis mais altos de ansiedade estejam associados a aumento do tempo de permanência na zona periférica do campo aberto.

De forma complementar, investiga-se também a neurobiologia das alterações comportamentais. As semelhanças neurofuncionais entre os vertebrados, especialmente os mamíferos, possibilitaram o desenvolvimento de diversas técnicas experimentais. Com o desenvolvimento das pesquisas genéticas e com o avanço do conhecimento sobre as bases neuronais do comportamento, tornou-se possível o uso de animais, como os camundongos, de manipulação mais fácil e menor custo (CRYAN; HOLMES, 2005).

Embora o córtex cerebral murino seja muitas vezes menor do que o humano, ele mantém muitas características que representam os princípios fundamentais da organização cortical, função e desenvolvimento partilhado pelos mamíferos; e as estruturas subcorticais relacionadas

ao processamento da ansiedade, como a amígdala, o hipocampo, o tálamo e hipotálamo são bem conservadas entre as duas espécies (JONES, 2009).

Além dessa correspondência neuroanatômica entre humanos e roedores, foram encontradas semelhanças entre o comportamento relacionado à ansiedade, assim como, em alguns modelos específicos de animais, encontrou-se respostas endócrinas semelhantes, com ativação de regiões que regulam a ansiedade (tal qual a de seres humanos), como a amígdala e o hipocampo (LICINIO; WONG, 2005; RUMSFELD; HO, 2005; WONG; LICINIO, 2001).

Frente a situações de estresse, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é ativado. O hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotrofina que age sobre a hipófise e leva à secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Em elevadas concentrações, o ACTH induz o córtex da adrenal a secretar corticosterona. Uma região-alvo para tal substância é o hipocampo que responde, sob condições plasmáticas elevadas desse hormônio, com supressão do aprendizado e memória hipocampo-dependentes (KIM; SONG; KOSTEN *et al*., 2006).

Sabe-se que o hipocampo possui dois tipos de receptores de esteróides suprarrenais: Tipo I (receptor de mineralocorticóide) e Tipo II (receptor de glicocorticóide, GR), que desempenham um papel importante no eixo HHA por meio de seus efeitos sobre o *feedback* negativo de glicocorticóides (HERMAN *et al*., 1989). O mecanismo direto e principal pelo qual os glicocorticóides inibem o eixo HHA é através da inibição tanto de hipotálamo quanto de hipófise. O mecanismo indireto sobre o eixo é através da ligação de glicocorticóides a receptores GR no hipocampo (SAPOLSKY; KREY; MCEWEN, 1984). A secreção crônica de glicocorticoides, estimuladas pelo estresse crônico, diminui a participação da proteína GR e os níveis de RNAm no hipocampo (FREEMAN *et al*., 2004; HERMAN; ADAMS; PREWITT, 1995; SAPOLSKY; KREY; MCEWEN, 1986; SAPOLSKY; KREY; MCEWEN, 1984);

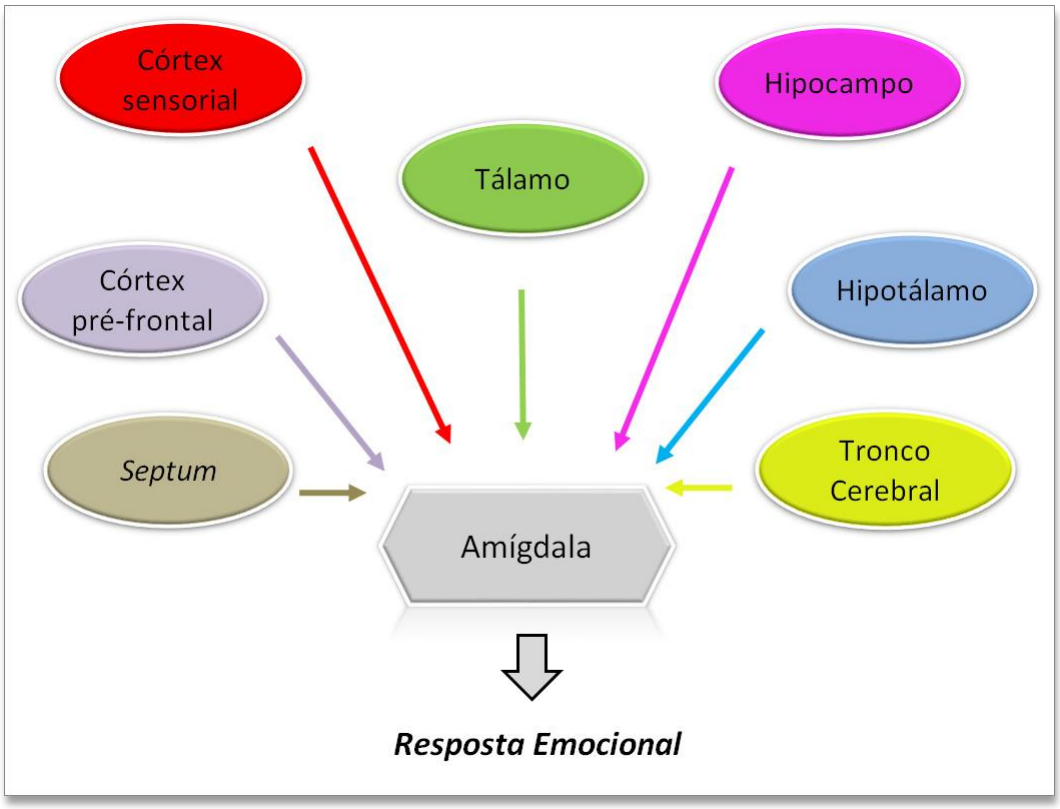
Outros estudos corroboraram esse resultado ao reunir evidências de que o hipocampo, de fato, é uma estrutura importante na regulação de estados e comportamentos relacionados à ansiedade, porém havendo uma dissociação de sua função ao longo de sua extensão septotemporal (BANNERMAN e*t al.*, 2004; ENGIN; TREIT, 2007). Lesões no hipocampo ventral, mas não do dorsal, reduziram o comportamento de ansiedade avaliado segundo o paradigma do labirinto em cruz elevado (KJELSTRUP *et al*., 2002).

De forma complementar, Hale e cols. (2008) utilizando neurotraçador retrógrado (CTb - cholera toxin B subunit) e produtos proteicos de gene de expressão rápida (c-Fos) (para revisão ver: KNAPSKA *et al*., 2007), testaram a hipótese de que a exposição a estímulos relacionados

à ansiedade ativariam um sistema de distribuição neuronal com convergência para o complexo amigdaloide basolateral. Esse método seria útil para identificar regiões candidatas à ativação frente a um estímulo indutor de ansiedade. Expondo ratos Wistar ao campo aberto, verificaram que essa exposição aumentava a expressão de c-Fos e também de neurônios CTb^{+}/c-Fos^{+} na região ventral de CA1 do hipocampo, subiculum e córtex entorrinal lateral. Aliado a isso, essa ativação esteve relacionada às medidas de comportamento relacionado à ansiedade, tais como a habituação, definida por uma diminuição progressiva da locomoção no campo aberto. Em outras palavras, ratos com maior ativação do circuito de projeção da amígdala basolateral tiveram um menor grau de habituação à arena.

Portanto, o hipocampo ventral, córtex entorrinal e amígdala basolateral parecem fazer parte de um circuito integrador e regulador de respostas aos estímulos ansiogênicos leves (HALE *et al*., 2008). De forma coerente, outros estudos sugerem a participação do hipocampo ventral em respostas relacionadas ao estresse e ansiedade, ao passo que o hipocampo dorsal desempenharia papel dominante em tarefas de navegação espacial (HERMAN; DOLGAS; CARLSON, 1998). Na **Figura 3**, destacamos os circuitos neuronais que participariam das respostas relacionadas ao comportamento ansioso.

Figura 3: Representação dos circuitos neuronais que medeiam as respostas relacionadas ao comportamento ansioso.



A amígdala é essencial para a codificação de emoções. Muitas entradas sensoriais convergem diretamente para ela a partir do tálamo sensorial ou dos vários córtices sensoriais para informar os potenciais perigos do ambiente. Existem várias outras estruturas que projetam seus axônios para a amígdala, como hipotálamo, *septum* e a formação reticular do tronco cerebral. No caso do hipocampo, ele responde a situações em que o mundo perceptual difere daquilo que era esperado, gerando conflito emocional a partir dessa incompatibilidade. Na imprevisibilidade, CA1 ventral do hipocampo medeia a resposta ao núcleo anterior da amígdala basolateral, que atribui significado emocional ao estímulo, regulando a resposta autonômica. O córtex pré-frontal também parece estar envolvido na fase de planejamento da atitudes, onde o indivíduo é forçado a reagir e escolher o curso de ação que melhor pode lhe preservar perante um estímulo estressor, permitindo um certo controle consciente sobre a ansiedade. Entretanto, o córtex pre-frontal é também capaz de gerar ansiedade, permitindo imaginar o fracasso de um determinado cenário ou até mesmo a presença de perigos que na verdade não existem.

Fonte: Ansiedade... (2014) (adaptado e disponível em: http://thebrain.mcgill.ca/flash/i/i_04/i_04_cr/i_04_cr_peu/i_04_cr_peu.html).

Afirma-se também que a exposição a eventos estressores parece promover aumento na liberação de glutamato no hipocampo (MOGHADDAM, 1993). Fatores envolvendo plasticidade neuronal no hipocampo (neurogênese, remodelação dendrítica, potencialização de longa duração) parecem igualmente estar envolvidos na mediação de consequências comportamentais do estresse. O sistema glutamatérgico hipocampal tem papel fundamental nesses processos, possivelmente atuando de forma sinérgica com os glicocorticóides. Além disso, o hipocampo sofre alterações plásticas em decorrência da exposição a eventos estressores significativos (MOGHADDAM, 1993). Joca, Padovan e Guimarães (2003) verificaram que a

exposição a diferentes agentes estressores produz modificações distintas na expressão do RNAm de uma das subunidades (NR1) do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA). Enquanto a imobilização forçada aumentou esta expressão, o nado forçado a diminuiu, confirmando a sensibilidade do sistema glutamatérgico hipocampal aos efeitos do estresse dependendo do tipo de agente estressor.

Além disso, são conhecidas muitas relações entre atividade mastigatória, estresse e declínio cognitivo. De fato, em trabalhos prévios que abordaram suas repercussões sobre o hipocampo e ansiedade, foi sugerido que os movimentos mastigatórios ajudam a reduzir a influência negativa do estresse sobre a memória dependente do hipocampo. Mascar, por exemplo, melhora a diminuição da expressão de NMDA mediada pela potenciação de longa duração induzida pelo estresse (ONO *et al*., 2008). Além disso, a ativação do receptor H1 da histamina pela mastigação, medeia a recuperação da plasticidade sináptica hipocampal suprimida pelo estresse (ONO *et al*., 2009).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a desarmonia na mastigação pode estar associada à Doença de Alzheimer (OKAMOTO *et al.*, 2010), onde a indução ao estresse pela alteração da mastigação seria agente causador do aumento no acúmulo de proteína β-amilóide através da sinalização mediada por glicocorticóide (EKUNI *et al*., 2011). Os autores identificaram acréscimo nos níveis de Aβ40 e Aβ42, assim como, aumento dos receptores de glicocorticóides no hipocampo de ratos, sendo que os níveis plasmáticos de corticosterona variaram em função do tempo e foram reversíveis com a recuperação da oclusão.

Dessa forma, buscando identificar as interações entre estresse mastigatório, alterações ambientais e idade na gênese do comportamento semelhante ao ansioso em modelo murino, empregamos o teste de campo aberto. Aditivamente, pelo exposto até aqui, apresentamos a seguir os nossos objetivos.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar as possíveis influências do ambiente, da idade e da redução da atividade mastigatória sobre o aprendizado e memória espacial no labirinto aquático de Morris e sobre o comportamento exploratório na arena aberta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar em camundongos fêmeas da variedade albina suíça de 6 e 18 meses de idade, os possíveis efeitos da redução e reabilitação da atividade mastigatória e do ambiente enriquecido sobre**:**

a) o padrão da atividade exploratória em campo aberto como sugestão de um estado ansioso;

b) o aprendizado e memória espacial empregando o labirinto aquático de Morris.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Belém, recebendo aprovação integral dos seus procedimentos experimentais, conforme o parecer CEPAE-UFPA: BIO005-09 (**Anexo A**).

Já foram antecipadamente publicados os resultados relacionados à influência do ambiente, da idade e da reabilitação da atividade mastigatória sobre o aprendizado e a memória espacial descritos no presente trabalho (MENDES *et al*., 2013; **Anexo B**).

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) suíços albinos fêmeas originados de fêmeas grávidas fornecidas pelo biotério do Instituto Evandro Chagas. No 5º dia pós-natal foram selecionados aleatoriamente seis filhotes (fêmeas) de cada ninhada que permaneceram com sua nutriz até o 21º dia pós-natal para amamentação. Caso o número de fêmeas em cada ninhada fosse insuficiente (menos que seis), era mantido um macho para preservar a proporção de seis filhotes por nutriz. No desmame, 174 fêmeas foram agrupadas aleatoriamente para a formação dos grupos experimentais. Os animais utilizados foram manipulados segundo os "Principles of Laboratory Animal Care" (*National Institutes of Health*) nas instalações do Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção no Hospital Universitário “João de Barros Barreto” da Universidade Federal do Pará.

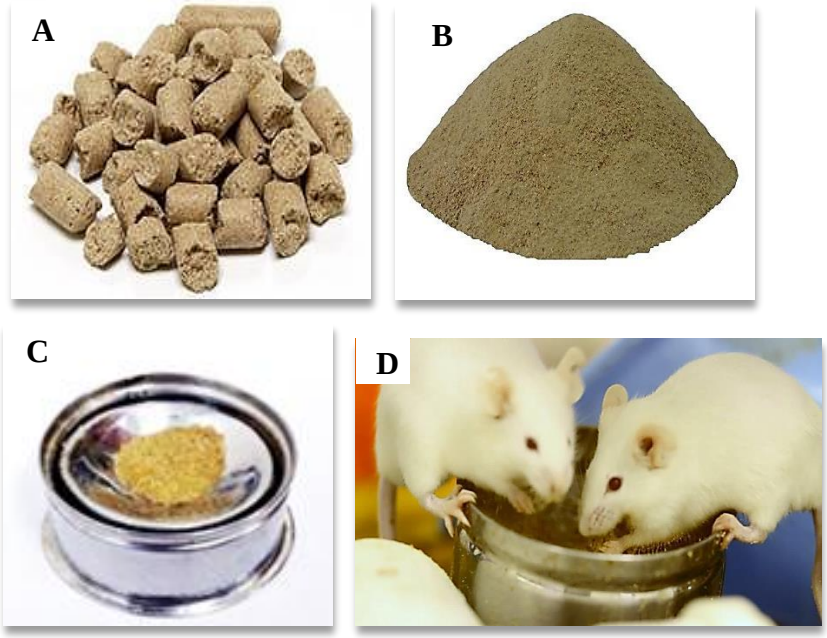
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS SEGUNDO OS REGIMES DE DIETA, IDADE E AMBIENTE

No 21º dia pós-natal (dia do desmame), os grupos experimentais foram formados com base nas três variáveis a serem investigadas: idade, alteração mastigatória e ambiente.

As análises comportamentais foram iniciadas aos seis (6M) ou aos dezoito (18M) meses de idade.

No que concerne à alteração mastigatória, foram criados três diferentes regimes de dieta a partir da oferta de combinações de dois tipos de ração: a ração em *pellet (Hard Diet* – HD) e a farelada, em pó (*Soft Diet* – SD), conforme apresentação na **Figura 4**.

Figura 4: Tipos diferentes de ração ofertada aos animais para instituir diferentes regimes de dieta



A – ração em *pellet* (*Hard Diet)*; **B** – ração farelada em pó (*Soft Diet);* **C** – recipiente de aço inoxidável utilizado para ofertar a ração farelada (sua tampa apresentava o centro perfurado em forma circular para acesso ao pó. A tampa era móvel, cedendo em direção ao fundo do pote à medida que a ração era consumida); **D** – camundongos alimentando-se com a ração farelada.

Fonte: Elaborada pela autora

O primeiro regime de dieta (HD) impôs ração peletizada de forma contínua até a conclusão de sua janela temporal (6 ou 18 meses de vida). O segundo regime de dieta (HD/SD) impôs os dois tipos de ração: inicialmente o *pellet* e posteriormente a ração farelada. Dizemos que houve nessa situação uma redução da atividade mastigatória pelo fato da ração farelada requisitar um menor esforço mastigatório durante a sua ingestão.

A oferta das rações peletizada e farelada foi feita por um período de 3 meses em cada uma delas nos animais de 6 meses de idade e por um período 9 meses nos animais de 18 meses de idade.

No caso do terceiro e último regime de dieta (HD/SD/HD), os animais receberam as sequências de *pellet*, pó e *pellet* novamente, com intervalo de 2 ou 6 meses em cada ração para as idades de 6 ou 18 meses, respectivamente.

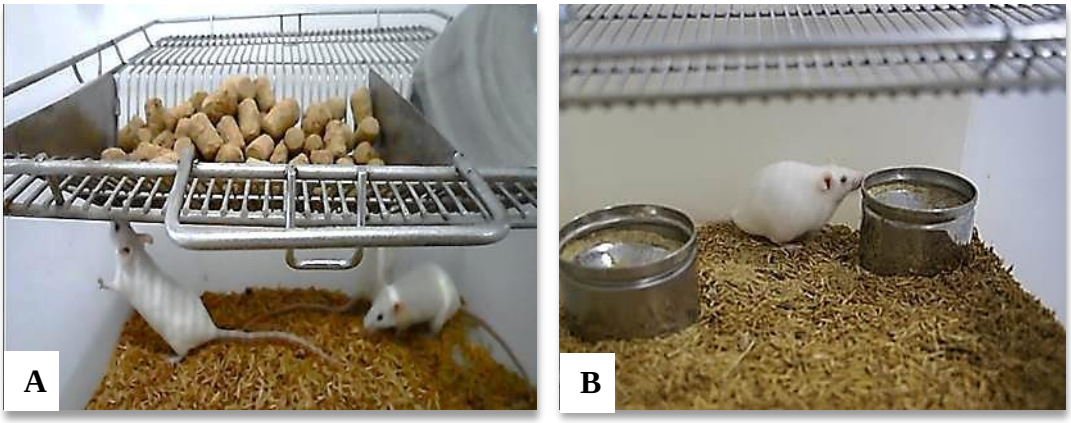
Dessa forma, animais em regime de dieta HD constituíram o grupo controle. Aqueles em regime HD/SD constituíram o grupo com redução da atividade mastigatótia, e os HD/SD/HD constituíram os reabilitados. Apesar da utilização de diferentes rações, os regimes de dieta mantiveram igual valor nutritivo.

Todos os animais tiveram livre acesso à comida e à água e foram mantidos em temperatura ambiente controlada (23 ± 1°C) e 12 horas de ciclo claro-escuro (período claro: 6h -18h; período escuro: 18h - 6h).

No que diz respeito ao ambiente, nos referimos às condições de alojamento dos animais: em ambiente empobrecido (AP) ou em ambiente enriquecido (AE). Após os 21 dias pós-natal, todos os animais ficaram somente em um dos ambientes até a idade de seu sacrifício (6 ou 18 meses).

O AP era composto por gaiolas de plástico com dimensões de 32 × 45 × 16,5 cm, forrada com palha de arroz e cobertas por grades de metal. Cada gaiola de AP abrigava no máximo nove camundongos (**Figura 5**).

Figura 5: Alojamento dos animais em ambiente empobrecido.



A – animais alimentando-se com a ração em *pellet* colocada sobre a grade da gaiola. **B** - animais alimentando-se com a ração farelada com recurso do dispositivo criado exclusivamente para oferta da ração em pó.

Fonte: Elaborada pela autora

O AE (**Figura 6**) consistiu em gaiolas de arame com dois andares com dimensões de 50 × 50 × 50 cm, equipadas com cordas, pontes, túneis, hastes, rodas de corrida e brinquedos. Os brinquedos foram feitos de diferentes tipos de plástico e cores, sendo trocados semanalmente com alteração na posição ou substituição destes. Água e comida eram oferecidas em andares superior e inferior, respectivamente. Esse arranjo obrigava os camundongos a se deslocarem de

um compartimento para outro para beber ou comer. Cada gaiola de AE abrigava no máximo 20 camundongos.

Figura 6: Alojamento dos animais em ambiente enriquecido.

O ambiente era modificado semanalmente a partir da alteração na posição dos objetos ou mesmo troca destes.

Fonte: Elaborada pela autora

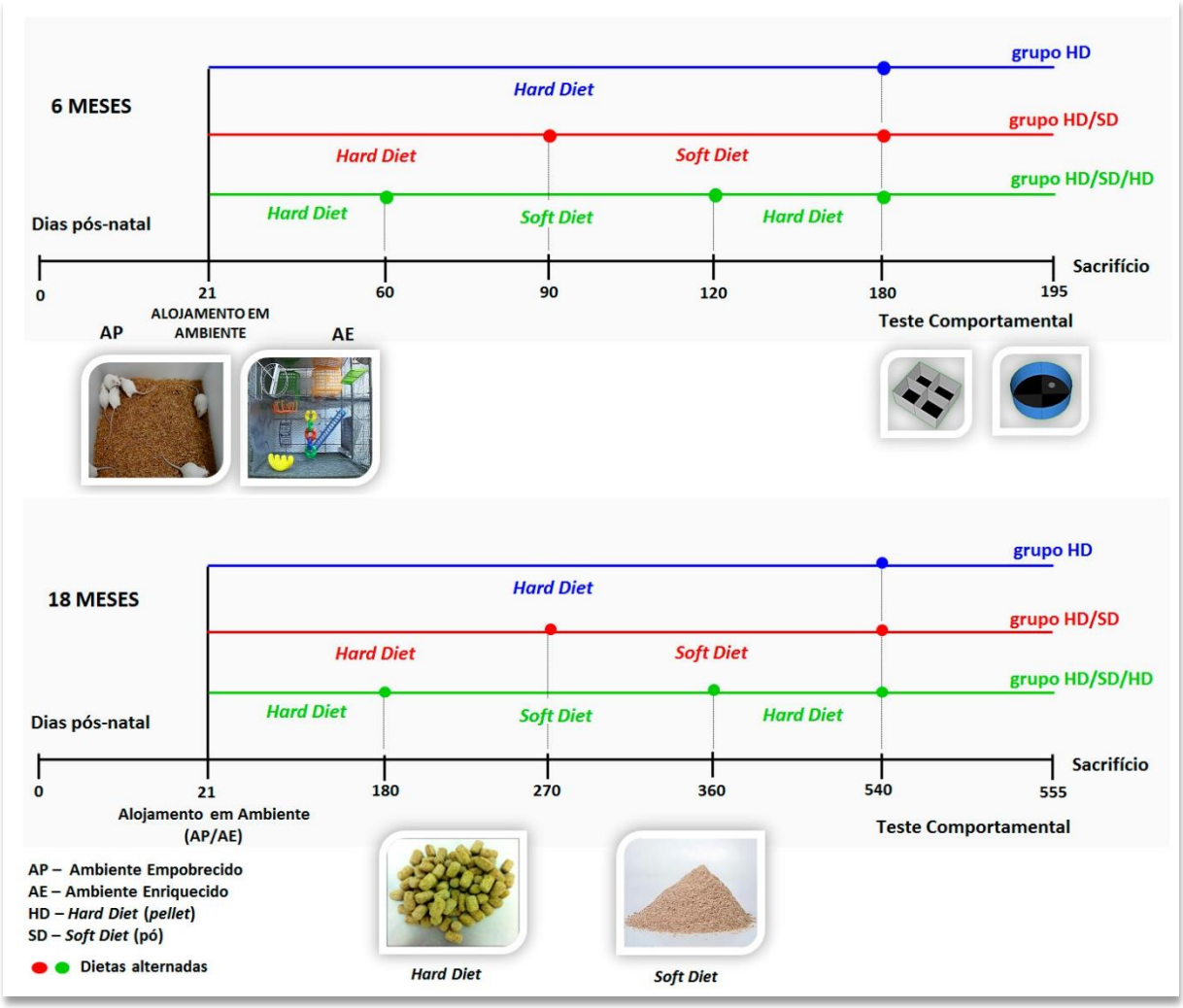
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

Após completarem 6 ou 18 meses de vida, os animais foram submetidos à ensaios comportamentais. Os procedimentos experimentais foram filmados através de sistema de captação de imagem instalado no teto da sala e conectado a um programa computacional de aquisição de imagens. Utilizamos, ainda, outro programa computacional, o *ANY-maze Video Tracking System* (*StoeltingCo*©), para processamento e análise de parâmetros comportamentais detectados nos vídeos.

Todos os testes foram realizados nos mesmos níveis de luminosidade, medidos através de fotômetro (4-5cd/m^2) e nos mesmos horários do dia (ciclo claro) para todos os grupos.

A **Figura 7** mostra a sequência de eventos e sintetiza o modelo experimental criado.

Figura 7: Sequência de eventos do modelo experimental.



Camundongos foram alojados em ambientes empobrecido ou enriquecido (imagem central e à esquerda) desde o 21º dia pós-natal até 180 dias (6 meses de idade – 6M) ou 540 dias (18 meses de idade – 18M), em um dos seguintes regimes de dieta: grupo HD (com dieta contínua de *pellet);* grupo HD/SD (correspondendo a alternância de dieta em *pellet* e em pó a cada 3 ou a cada 9 meses em função do grupo etário: 6M ou 18M, respectivamente); grupo HD/SD/HD (com as sequências de *pellet*, pó e *pellet* a cada 2 ou 6 meses em função do grupo etário de 6M ou 18M, respectivamente). Todos os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e ao do labirinto aquático de Morris (imagem central, à direita) entre 180 e 195 e entre 540 e 555 dias após o nascimento para as idades de 6M e 18M, respectivamente. No painel inferior, as representações dos alimentos em *pellet* (*hard diet*) e em pó (*soft diet*). O tempo é representado em dias após o nascimento e aumenta da esquerda para a direita.

Fonte: Elaborada pela autora

3.3.1 Atividade em campo aberto - *Open Field* (OF)

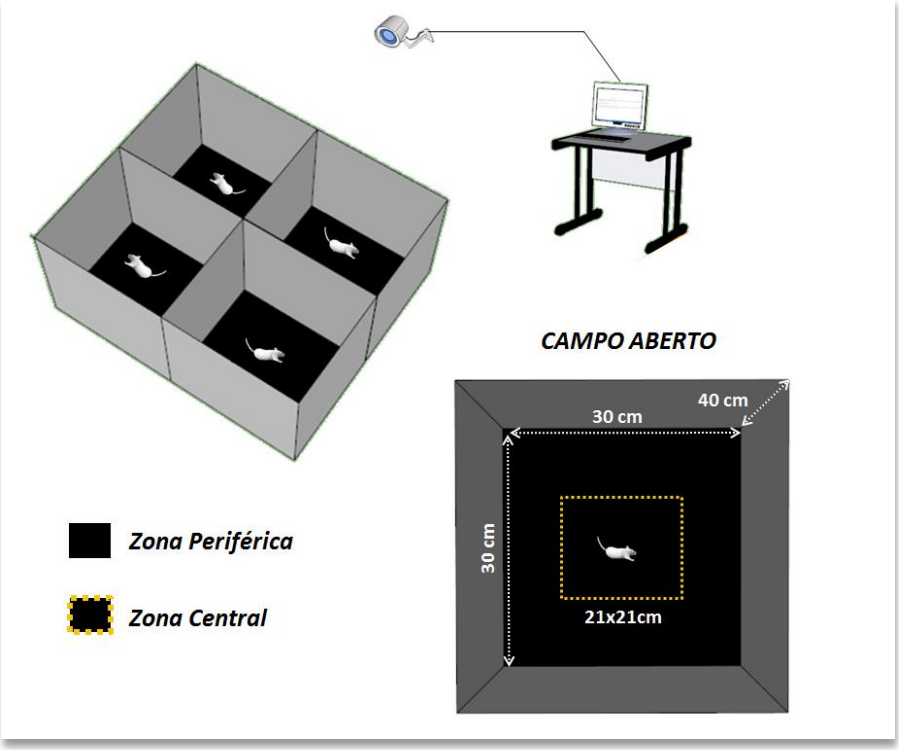
A atividade exploratória foi avaliada em campo aberto através de uma caixa com dimensões de 30 x 30 x 40cm, revestida em fórmica cinza e fundo preto. Cada animal permaneceu 5 minutos dentro da caixa, sendo gentilmente introduzido no centro da arena no

início do teste. Antes da caixa ser novamente usada por outro animal, ela era limpa com solução de etanol a 75% para remoção das pistas olfatórias deixadas durante o seu uso.

Com o auxílio do programa de análise, o assoalho da caixa foi dividido virtualmente em duas zonas denominadas Zona Periférica (ZP) e Zona Central (ZC). Ambas possuíam o mesmo formato (em forma de quadrado) com áreas aproximadamente iguais: ZP = 459cm^2 e ZC = 441cm^2, o equivalente à 51% e 49%, respectivamente, da área total da caixa.

A seguir, um desenho esquemático com a representação do cenário de teste e os critérios utilizados para sua análise (**Figura 8**), e ilustração da análise de vídeos com o recurso do programa computacional de análise **ANY-maze** (**Figura 9**).

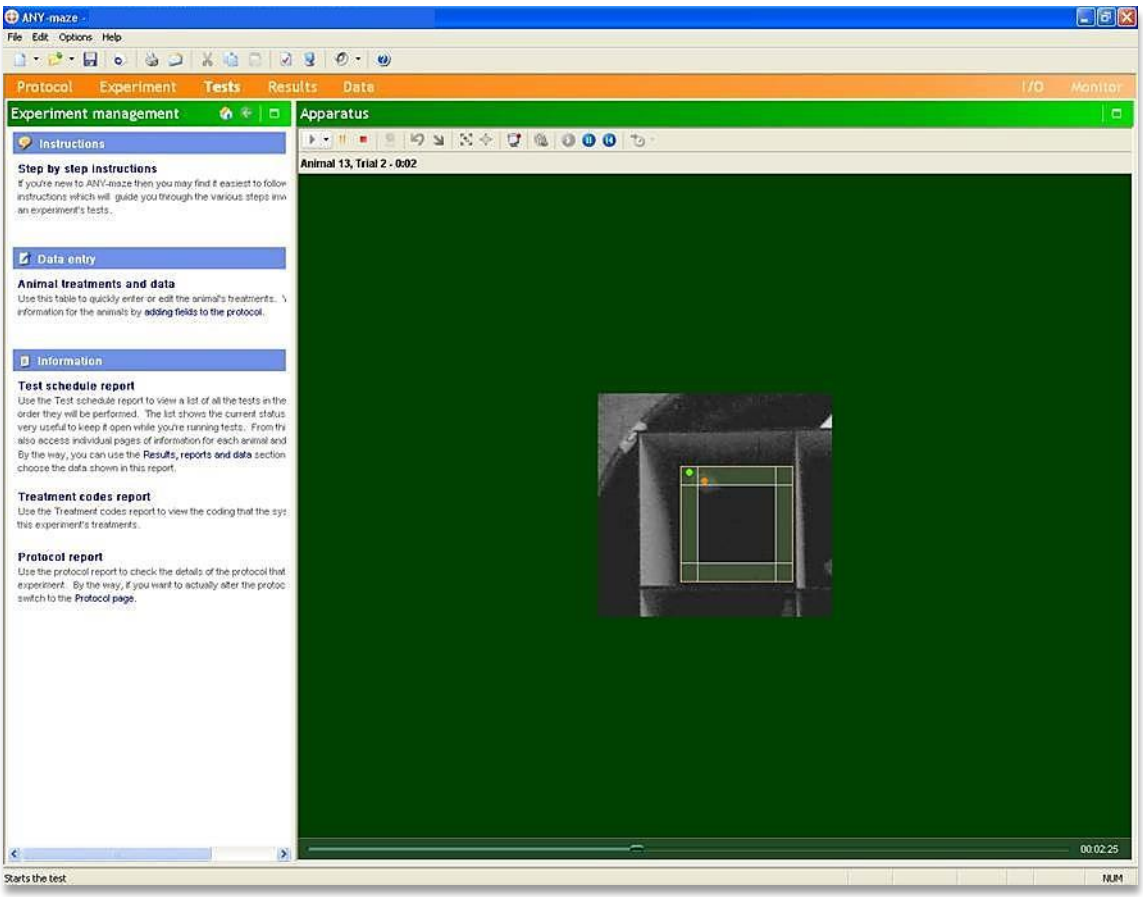
Figura 8: Ilustração do teste de atividade em campo aberto.



Na parte superior do painel, uma representação esquemática do cenário de teste com sistema de monitoramento para captação de vídeo e aparato utilizado na avaliação de atividade em campo aberto. Conforme sua arquitetura, era possível testar 4 animais concomitantemente, mas sem comunicação entre eles ou interferência de comportamentos. Na parte inferior, as dimensões e divisão do fundo da caixa em zonas periférica e central criadas virtualmente e analisadas comparativamente.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 9: Ilustração da análise dos vídeos da atividade em campo aberto com o recurso do programa *ANY-maze (StoeltingCo©).*



O círculo verde no canto superior esquerdo da arena sinaliza o reconhecimento da cabeça do animal e o laranja, do centro de seu corpo. A área sombreada na cor verde representa a presença do animal na zona periférica do campo aberto.

Fonte: Interface do programa computacional *ANY-maze (StoeltingCo©).*

Com o intuito de avaliar a diferença na atividade exploratória do animal em cada uma das zonas do campo aberto, adotamos a equação para cálculo do índice de contraste para que então fosse estabelecida uma razão entre as zonas. Essa equação é descrita a seguir e foi utilizada para análise de vários parâmetros extraídos do teste, como tempo e distância em cada uma das zonas.

$$I_c = [(X_p - X_c) / (X_p + X_c)] * 100, \text{ onde:}$$

I_c = índice de contraste;

X = parâmetro que se deseja analisar (tempo, distância) durante os 5 minutos de teste;

p = referente à zona periférica;

c = referente à zona central.

O índice de contraste normaliza as escalas e estabelece uma relação entre as zonas, pois expressa a fração de preferência exclusiva pela zona periférica e o quanto ela representa, em valores percentuais, do total de atividade exploratória durante todo o teste.

Assim, a partir dessa análise, os sete animais de cada grupo, com os maiores valores de contraste para o parâmetro tempo nas zonas, foram selecionados e comparados através do teste de Análise de Variância (ANOVA – *three way*), seguido pelo pós-teste de Tukey-Diferença Honestamente Significativa (DHS). As diferenças entre os grupos foram aceitas como significativas a um nível de confiança de 95% ($p<0,05$).

Em seguida, com base na equação do contraste, esses mesmos sete animais foram comparados (ANOVA – *three way;* pós-teste de Tukey) quanto à distância total percorrida em cada uma das zonas durante os cinco minutos de teste. Finalmente, para cada grupo experimental, comparamos, entre os minutos de teste (ANOVA – *one way;* pós-teste de Tukey), os valores brutos da distância total percorrida na arena (sem discriminá-la por zona). Nesse último caso, não utilizamos a equação do contraste uma vez que não houve a necessidade de se estabelecer uma relação comparativa entre as zonas.

3.3.2 Labirinto Aquático de Morris – *Water Maze* (WM)

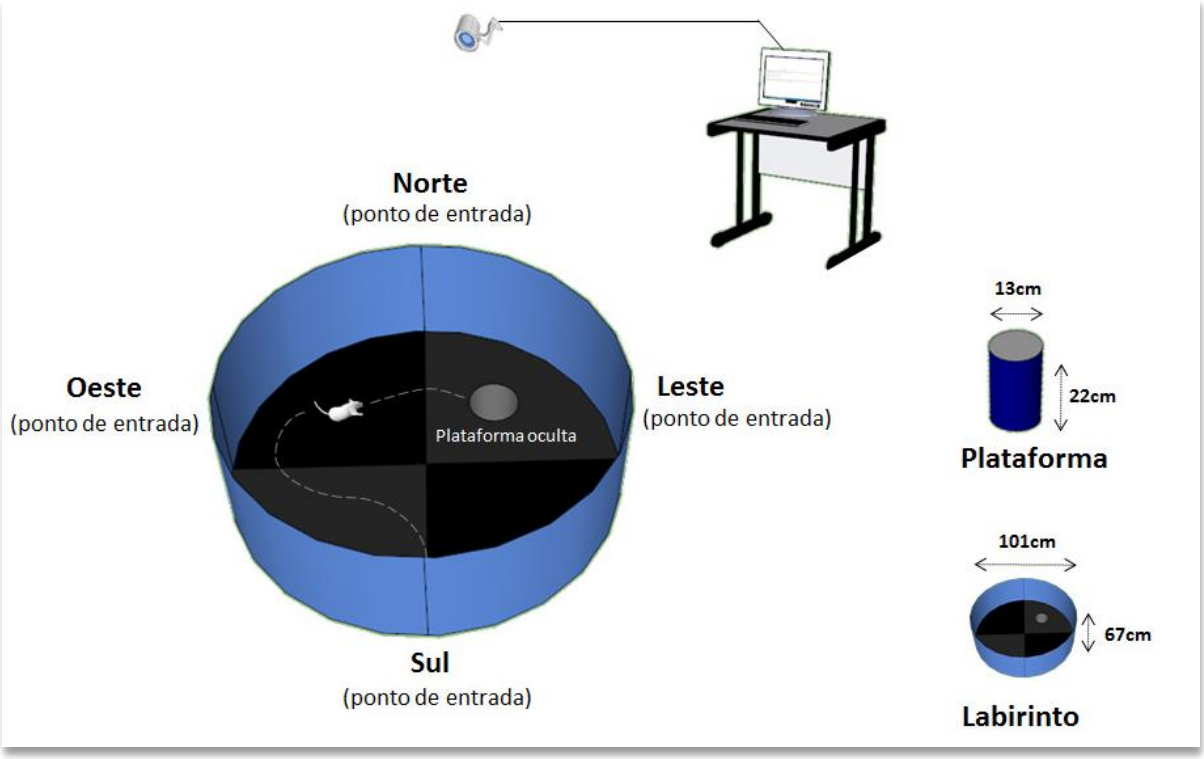
Além do campo aberto, realizamos o teste do labirinto aquático de Morris (do inglês *Water Maze* - WM). O intervalo entre um teste e outro foi de 6 dias, pois nesse período realizamos outros testes comportamentais, mas que não serão abordados no presente trabalho.

O WM é útil na avaliação da memória espacial e todos os grupos foram treinados seguindo o protocolo proposto por outros autores (MORRIS, 1984) e adaptado para as dimensões do camundongo. Uma piscina circular com 101cm de diâmetro foi utilizada e preenchida com água de forma a deixar submersa uma plataforma com 13 cm de diâmetro e 22 cm de altura, mantida sempre a 1cm abaixo da superfície da água. Para ocultar a plataforma, a água da piscina foi escurecida com um corante preto não-tóxico e a água era mantida à uma temperatura de 22 ± 2 °C.

Em seguida, foram criados quatro pontos de entrada no labirinto baseados nos pontos cardeais (Norte, Sul, Leste e Oeste) e dividido virtualmente a sua circunferência em quatro quadrantes. Ao centro de um desses quadrantes (escolhido de forma aleatória) era posta a

plataforma (**Figura 10**). Três permanentes pistas visuais externas foram utilizadas durante todos os dias de teste.

Figura 10: Ilustração do teste do labirinto aquático de Morris.



À esquerda do painel, uma representação esquemática do cenário de teste com o labirinto e o sistema de monitoramento para captação de vídeo durante sua execução. Note sua divisão em quadrantes e os quatros pontos de entrada do animal conforme os pontos cardeais e o destaque para a plataforma ao centro do quadrante à nordeste com o animal buscando encontrá-la. À direita do painel, as dimensões dos materiais utilizados durante no teste.

Fonte: Elaborada pela autora

No que concerne aos procedimentos de teste, foi realizado um treinamento prévio dedicado à adaptação ao aparato. Esse consistiu em uma única exposição com duração máxima de 60s. Caso o animal não encontrasse a plataforma nesse tempo, o mesmo era conduzido até ela e retirado da água após 10s sobre a plataforma. A escolha da posição da plataforma no labirinto e o ponto de entrada foram randomizados (por sorteio).

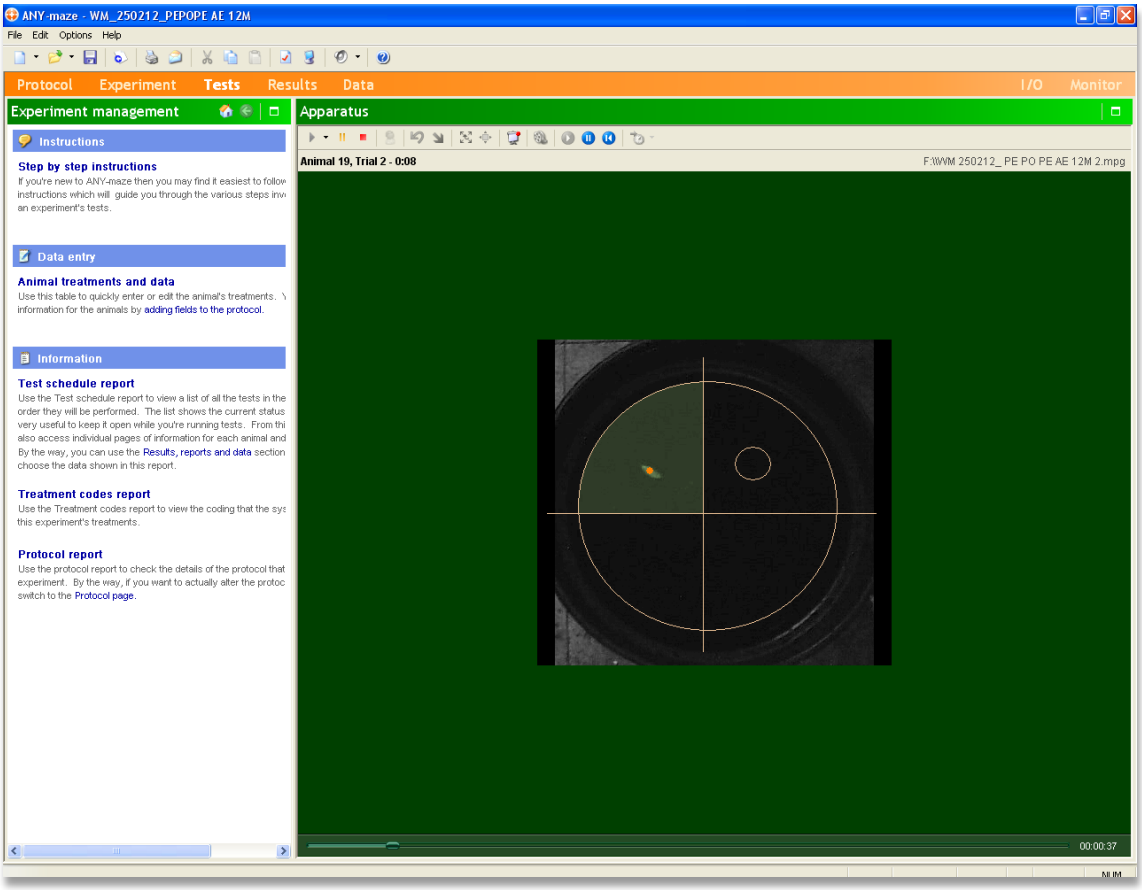
Nos cinco dias subsequentes, os animais foram testados uma vez por dia em três ensaios consecutivos.

Para cada uma das três tentativas diárias, também foram sorteados os pontos de entrada, entretanto evitando a repetição da entrada no mesmo ponto por duas vezes consecutivas. Cada uma das três tentativas possuía duração máxima de 60s e 30s era o tempo de intervalo entre

elas. A tarefa era considerada completa quando o animal encontrava e permanecia sobre a plataforma durante 10s. Caso ele não a encontrasse, o animal era conduzido até ela e sobre a plataforma deveria ficar 10s. Destaca-se, também, que nessses cinco dias de teste, o local da plataforma não foi modificado entre os dias, porém foi diferente do utilizado no dia de adaptação. A escolha do novo local da plataforma foi feita através de sorteio.

Todos os ensaios comportamentais foram filmados e a partir de informações detalhadas extraídas do programa computacional *ANY-maze (StoeltingCo©)* (**Figura 11**), estimou-se para cada animal um valor médio diário das latências de escape, de distância (o comprimento total do caminho percorrido em todo o labirinto e aquela percorrida somente no quadrante oposto ao da plataforma escondida) e de velocidade média de nado.

Figura 11: Ilustração da análise dos vídeos no Labirinto Aquático de Morris pelo programa *ANY-maze (StoeltingCo©)*.



O círculo laranja menor representa o reconhecimento do centro do animal pelo programa. A área sombreada na cor verde, a sua presença no quadrante noroeste da piscina, à esquerda de onde estava a plataforma (círculo vazio menor no quadrante nordeste).

Fonte: Interface do programa computacional *ANY-maze (StoeltingCo©)*.

A taxa de aprendizado no labirinto foi avaliada pela relação entre as latências de escape para encontrar a plataforma no primeiro e nos dias subsequentes (2º ao 5º dia) de ensaio (desconsiderando o dia de adaptação). Para tanto, foi utilizada a equação do índice de contraste já mencionada:

$$I_c = (L_1 - L_N) / (L_1 + L_N), \text{ onde:}$$

I_c = é o índice de contraste para expressar a taxa de aprendizado;

L_1 = latência de escape para encontrar a plataforma no primeiro dia de teste;

L_N = latência de escape para encontrar a plataforma no dia que está sendo comparado com o primeiro dia de teste (2º, 3º, 4º ou 5º dia);

Essa equação foi sistematicamente aplicada a todos os dias de treinamento utilizando o valor médio de latência diária com base nos três ensaios.

O índice de contraste foi anteriormente aplicado em outros estudos que utilizaram o teste do labirinto de aquático de Morris (TORRES *et al*., 2006; DINIZ *et al*., 2010) com o intuito de normalizar a curva de aprendizado para o desempenho de cada indivíduo, representando a variação de desempenho entre eles.

Assim, a partir dessa análise, quatro valores de contrastes foram obtidos para cada animal (relações L_1 e L_2, L_1 e L_3, L_1 e L_4, L_1 e L_5) e uma curva de taxa de aprendizado durante os cinco dias de treino pôde ser determinada para cada indivíduo. A fim de expressar essa taxa em valores percentuais para cada dia, foi selecionado a partir de todos os grupos experimentais, independentemente do regime de dieta, idade ou ambiente, o valor de contraste mais elevado para cada dia, estimando os valores percentuais de contraste do seguinte modo:

$$C\,(\%) = \frac{[(L_1 - L_N) / (L_1 + L_N)] * 100}{C_{max}}, \text{ onde:}$$

C (%) = é o índice de contraste para expressar a taxa de aprendizado em valores percentuais;

L_1 = latência de escape para encontrar a plataforma no primeiro dia de teste;

L_N = latência de escape para encontrar a plataforma no dia que está sendo comparado com o primeiro dia de teste (2º, 3º, 4º ou 5º dia);

C_{max} = corresponde ao animal com maior valor de I_c no dia que está sendo comparado com o primeiro dia de teste.

Pelo fato do quarto dia de treinamento ter reunido o maior número de animais com uma taxa de aprendizado igual ou superior a 60% para todos os grupos experimentais, esse dia foi selecionado para a análise comparativa entre os grupos. Para esse fim, foram escolhidas as cinco melhores *performances* de cada grupo experimental no quarto dia de teste, considerando sempre que estes cinco melhores resultados de aprendizagem tivessem sido mantidos ao longo dos outros dias de teste, ou seja, que expressassem valores de C (%) > 0 no 4º e no 5º dia de treino ou C (%) > 0 no 4º dia e em pelo menos mais dois dias de teste.

A partir de então, foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA – *three way*), seguido pelo pós-teste de Tukey (DHS) para analisar a taxa de aprendizado em valores percentuais, distância total percorrida (comprimento do trajeto até o encontro da plataforma), distância percorrida no quadrante oposto ao da plataforma e velocidade média de nado. As diferenças entre os grupos foram aceitas como significativas a um nível de confiança de 95% ($p<0,05$).

Portanto, conforme a divisão em regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD), idade (6M ou 18M) e ambiente (AP ou AE), foram organizados 12 grupos experimentais com o quantitativo utilizado em cada ensaio comportamental (OF e WM) descrito no quadro a seguir (**Quadro 1**).

Quadro 1: Número de animais utilizados nos ensaios comportamentais.

Idade	**Teste**	**Número de Animais**					
		Ambiente Empobrecido (AP)			**Ambiente Enriquecido (AE)**		
		HD	**HD/SD**	**HD/SD/HD**	**HD**	**HD/SD**	**HD/SD/HD**
6 meses	**OF**	16	15	18	16	17	17
	WM	28	15	18	27	11	11
18 meses	**OF**	7	8	12	9	18	17
	WM	19	11	12	18	25	27

Distribuição do número de animais por cada regime de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), nos ambientes empobrecido (AP) e enriquecido (AE), nas idades de 6 e 18 meses e que realizaram os testes comportamentais (OF - *open field*; WM – *water maze*).

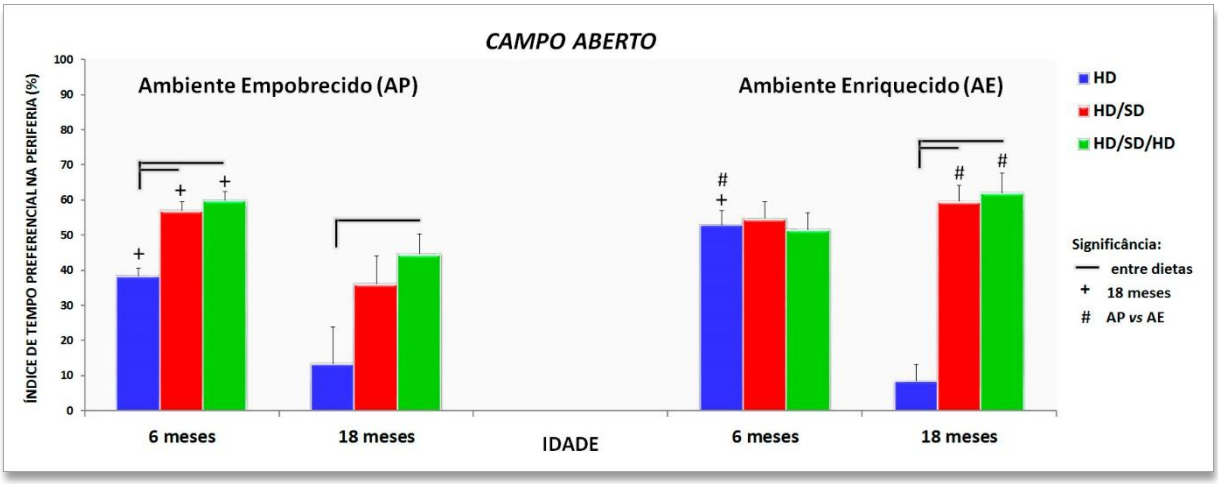
4 RESULTADOS

4.1 ATIVIDADE EM CAMPO ABERTO

Com base no cálculo do índice de tempo preferencial pela zona periférica, vimos que todas as variáveis estudadas contribuíram de forma significativa para as diferenças encontradas. Foram elas: alteração mastigatória ($F_{(2,72)} = 28$; $p < 0,000001$), idade ($F_{(1,72)} = 22,5$; $p < 0,00001$) e ambiente ($F_{(1,72)} = 4,48$; $p < 0,0377$); tanto quanto foi significativa também a interação entre as três ($F_{(2,72)} = 5,7$; $p < 0,005$) ou apenas entre a idade e a alteração mastigatória ($F_{(2,72)} = 9,92$; $p < 0,000156$).

Nesse contexto, o grupo HD-AP 6M apresentou tendência a explorar por menos tempo a zona periférica se comparado ao grupo HD/SD-AP 6M e HD/SD/HD-AP 6M. Tomando como indicador da intensidade do comportamento semelhante ao ansioso o tempo de permanência na zona periférica, esse resultado sugere menor intensidade do estado semelhante ao ansioso no grupo HD-AP 6M em comparação aos outros regimes mastigatórios pareados por idade e ambiente (**Figura 12)**.

Figura 12: Gráfico da relação do tempo preferencialmente dispendido na zona periférica do campo aberto para cada grupo experimental.



Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do índice de contraste para o tempo preferencial na zona periférica durante os 5 minutos de teste nas idades de 6 ou 18 meses, em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambiente (empobrecido ou enriquecido). n = 7, onde: Linhas de conectores indicam diferenças significativas entre diferentes regimes de dieta, entretanto mesmo ambiente e idade; (+) diferenças significativas entre as idades, mas igual regime de dieta e ambiente; (#) diferenças significativas entre os ambientes, porém igual regime de dieta e idade.

Além disso, o envelhecimento em ambiente empobrecido promoveu um decréscimo na preferência pela zona periférica, tanto para animais do grupo controle (HD-AP 6M *vs* HD-AP

18M), quanto para os que sofreram redução da atividade mastigatória (HD/SD-AP 6M *vs* HD/SD-AP 18M) ou foram reabilitados (HD/SD/HD-AP 6M *vs* HD/SD/HD-AP 18M). Com essa redução, passou a haver diferença aos 18 meses somente entre o HD-AP 18M e o HD/SD/HD-AP 18M.

Quando submetidos ao ambiente enriquecido, encontramos que em adultos jovens a estimulação ambiental minimizou as diferenças entre os grupos de alteração mastigatória e o controle. Entretanto, essa menor diferença entre os grupos foi a custa do aumento da preferência do grupo HD-AE 6M pela periferia, o que o tornou significativamente diferente do HD-AP 6M.

Camundongos velhos nesse ambiente e que sofreram alteração da atividade mastigatória, também aumentaram sua preferência pela zona periférica (HD/SD-AP 18M *vs* HD/SD-AE 18M e HD/SD/HD-AP 18M *vs* HD/SD/HD-AE 18M), revelando, ainda, diferença significativa com o grupo controle nas mesmas condições ambientais e de idade (HD-AE 18M *vs* HD/SD-AE 18M e HD/SD/HD-AE 18M).

O grupo de animais velhos que não sofreu alteração da atividade mastigatória, mas cresceu em ambiente enriquecido (HD-AE 18M), reduziu sua preferência pela zona periférica em comparação com os adultos jovens HD-AE 6M.

Os valores exatos de média e erro-padrão para cada grupo experimental, relacionados ao índice de contraste com base no tempo, estão representados no **Quadro 2.** Para encontrar os valores das significâncias obtidas para amostras pareadas (pós-teste de Tukey – DHS), consultar a seção de apêndices (**Quadro 8**) ao final do trabalho.

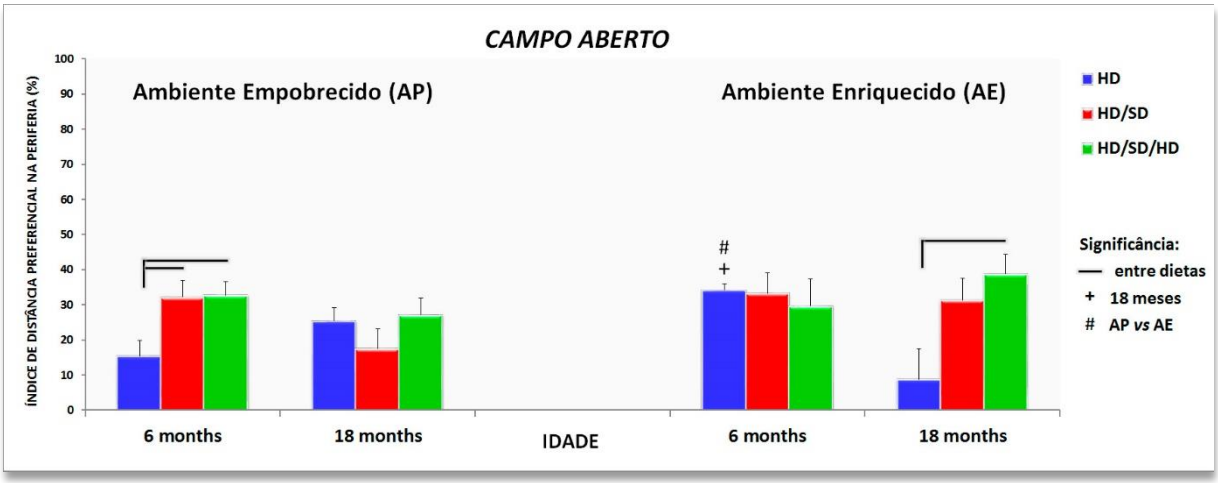
Quadro 2: Índice de contrate para o tempo nas zonas do campo aberto.

	Índice de Contraste (TEMPO): média (%) ± erro-padrão			
GRUPOS	**Ambiente Empobrecido**		**Ambiente Enriquecido**	
	6 meses	**18 meses**	**6 meses**	**18 meses**
HD	38,28 ± 2,28	13,40 ± 10,52	52,87 ± 3,99	8,54 ± 4,67
HD/SD	56,95 ± 2,42	36,12 ± 7,99	54,73 ± 4,77	59,62 ± 4,56
HD/SD/HD	59,90 ± 2,42	44,65 ± 5,64	51,56 ± 4,73	62,07 ± 5,63

Média do índice de constraste em valores percentuais e respectivos valores de erro-padrão com base no parâmetro tempo nas zonas da arena de campo aberto para os grupos experimentais de 6 e 18 meses de idade, nos diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambientes (empobrecido ou enriquecido).

Ao analisar os resultados do índice de distância total percorrida (**Figura 13**), observamos que houve uma tendência desse parâmetro em acompanhar os achados já descritos para o tempo, de maneira que grupos que ficaram maior tempo na zona periférica, também percorreram maiores distância nessa zona.

Figura 13: Gráfico da relação da distância preferencialmente percorrida na zona periférica do campo aberto para cada grupo experimental.



Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do índice de contraste utilizando como parâmentro a distância total percorrida preferencialmente na zona periférica durante os 5 minutos de teste nas idades de 6 ou 18 meses em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambiente (empobrecido ou enriquecido). n = 7, onde: linhas de conectores indicam diferenças significativas entre diferentes regimes de dieta, entretanto mesmo ambiente e idade; (+) diferenças significativas entre as idades, mas igual regime de dieta e ambiente; (#) diferenças significativas entre os ambientes, porém igual regime de dieta e idade.

Assim, encontramos diferenças significantes do grupo HD-AP 6M com o HD/SD-AP 6M, o HD/SD/HD-AP 6M e o HD-AE 6M. Houve também diferenças entre o HD-AE 6M e o HD-AE 18M e, desse último, com o HD/SD/HD-AE 18M.

A alteração mastigatória exerceu influência significativa sobre o comportamento exploratório ($F_{(2,72)} = 4,3$; $p < 0,0172$), revelando também interação com a idade e com o ambiente ($F_{(2,72)} = 6,6$; $p < 0,00233$).

Os valores exatos de média e erro-padrão para cada grupo experimental, relacionados ao índice de contraste com base na distância, estão representados no **Quadro 3** e os valores das significâncias obtidas para amostras pareadas (pós-teste de Tukey – DHS) estão disponíveis nos apêndices (**Quadro 9**).

Quadro 3: Índice de contrate para a distância percorrida nas zonas do campo aberto.

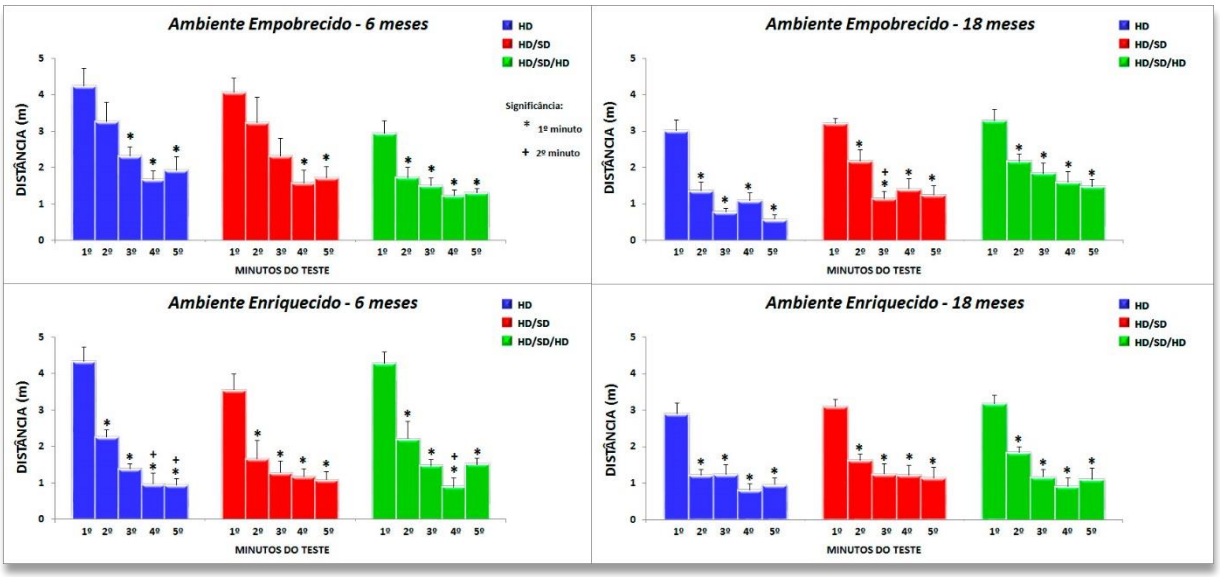
	Índice de Contraste (DISTÂNCIA): média (%) ± erro-padrão			
GRUPOS	**Ambiente Empobrecido**		**Ambiente Enriquecido**	
	6 meses	**18 meses**	**6 meses**	**18 meses**
HD	15,37 ± 4,53	25,37 ± 3,79	34,19 ± 1,88	8,76 ± 8,70
HD/SD	32,18 ± 4,84	17,50 ± 5,54	33,35 ± 5,82	31,34 ± 6,22
HD/SD/HD	32,71 ± 3,76	27,20 ± 4,61	29,70 ± 7,64	38,85 ± 5,57

Média do índice de constraste em valores percentuais e respectivos valores de erro-padrão com base no parâmetro distância percorrida nas zonas da arena de campo aberto para os grupos experimentais de 6 e 18 meses de idade, nos diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambientes (empobrecido ou enriquecido).

É importante destacar que camundongos sedentários velhos, ao contrário dos demais, apresentaram um padrão de atividade inverso ao esperado entre tempo e distância, isto é, grupos que passaram muito tempo na periferia não necessariamente percorreram distâncias maiores nessa zona, sugerindo que um tempo de imobilidade aumentado pode estar associado ao envelhecimento. De fato esses animais pareceram ter uma tendência a ficar mais imóveis nessa zona e diante disso, decidimos investigar o

padrão de atividade exploratória no campo aberto ao longo de todo o teste, independente da zona visitada. Para tanto, analisamos os valores absolutos de distância total percorrida minuto a minuto de teste. Os resultados obtidos são apresentados a seguir (**Figura 14)**.

Figura 14: Gráfico da média de distância total percorrida para cada grupo experimental em cada minuto de teste no campo aberto.



Representação da média e respectivos valores de erro-padrão da distância total percorrida em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste nas idades de 6 e 18 meses em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambiente (empobrecido ou enriquecido). n = 7 (*) Indica diferença significativa com o primeiro minuto de teste; (+) diferença significativa com o segundo minuto de teste.

É notável que independente do grupo experimental, todos percorreram distâncias menores ao longo do teste, com importante diferença entre o 1º minuto e os minutos subsequentes, sugerindo uma possível habituação à arena à medida que o tempo de teste transcorria.

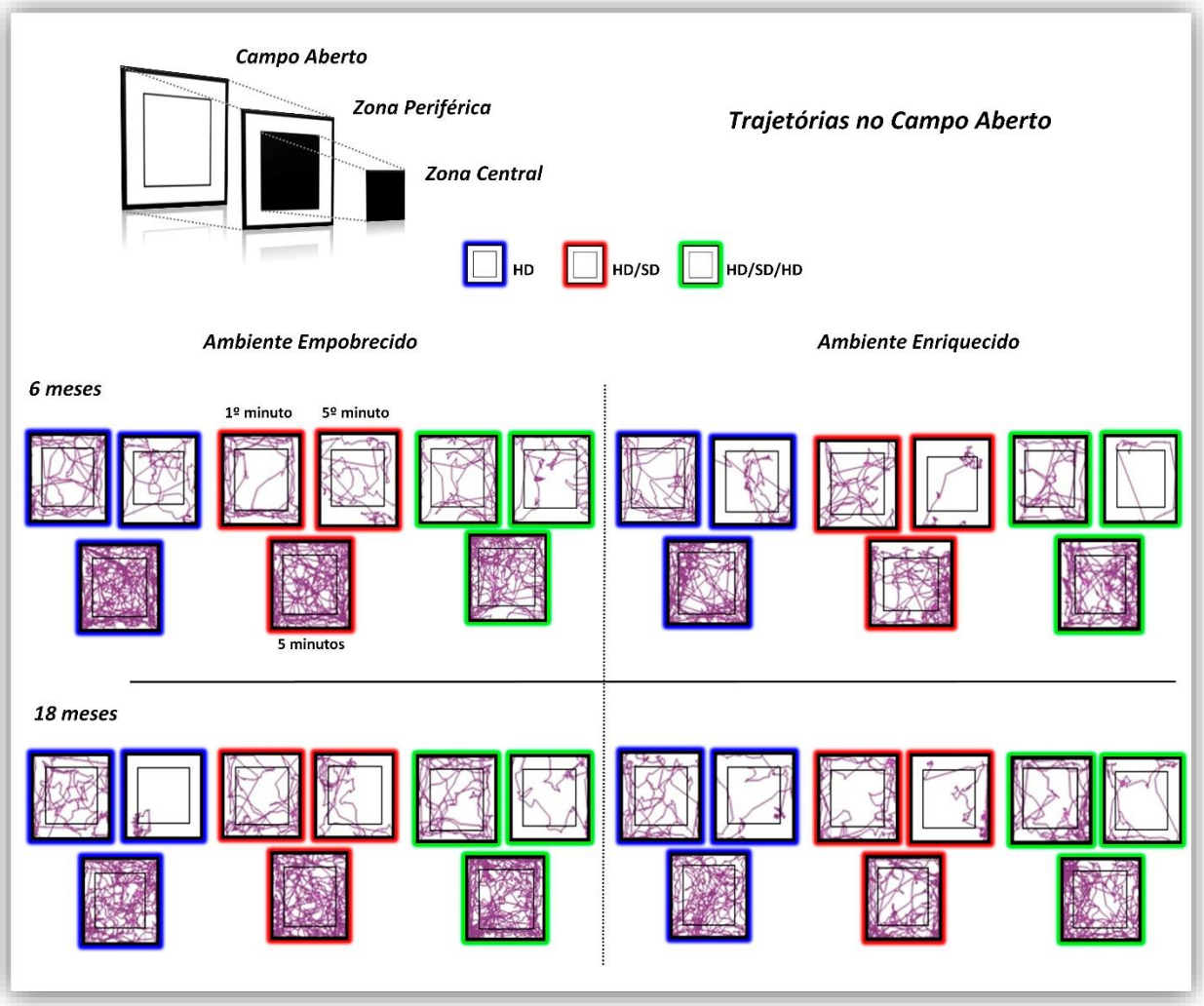
Note que logo no segundo minuto de teste, os animais jovens de ambiente enriquecido, independentemente do regime de dieta, reduziram de forma significativa a distância percorrida na arena, diferentemente do observado para os animais do ambiente empobrecido (diferença na média de distância percorrida no 1º e 2º minutos de teste: HD 6M → AP = 0,98 *vs* AE = 2,08; HD/SD 6M → AP = 0,84 *vs* AE = 1,89; HD/SD/HD 6M → AP = 1,22 *vs* AE = 2,07; onde p = 0,0014 em bicaudal t-teste para comparação AP *vs* AE). Diante disso, o enriquecimento ambiental pareceu proporcionar uma acomodação mais precoce à arena.

Por outro lado, nos animais velhos (18M) não vimos essa diferença marcante entre ambientes, pois todos os grupos reduziram a sua exploração já no segundo minuto (diferença na média de distância percorrida no 1º e 2º minutos de teste: HD 18M → AP = 1,65 *vs* AE = 1,68; HD/SD 18M → AP = 1,04 *vs* AE = 1,47; HD/SD/HD 18M → AP = 1,12 *vs* AE = 1,34; onde p = 0,3522 em bicaudal t-teste para comparação AP *vs* AE). Nesse caso, é possível que a redução na atividade exploratória seja oriunda dos efeitos do envelhecimento que acaba se sobrepondo às influências do ambiente, aumentando o tempo de imobilidade do animal.

Para maiores detalhes das médias obtidas e valores de significâncias, consultar seção de apêndices (**Quadros 10, 11, 12, e 13**).

Para ilustrar a locomoção descrescente dos animais, apresentamos as trajetórias de cada grupo no primeiro e no quinto minutos de teste e ao longo dos 5 minutos. Importante destacar que escolhemos o animal com valores de distância percorrida mais próximo ao da média do grupo para representar a trajetória daquele grupo experimental (**Figura 15**). Note que em geral os traçados das trajetórias revelam redução importante das distâncias percorridas entre o primeiro e o quinto minuto, independente do regime de dieta e do ambiente, e que os animais de 18 meses, em particular, tendem a acentuar essa diferença.

Figura 15: Representação das trajetórias percorridas ao longo do teste de campo aberto.



Logo acima no painel, o destaque para a identificação das zonas criadas virtualmnete na arena (zona periférica e central). Abaixo e ao centro, as trajetórias no primeiro, quinto e cinco minutos totais de teste para os diversos grupos experimentais na idade de 6 e 18 meses em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD) e ambiente (empobrecido ou enriquecido).

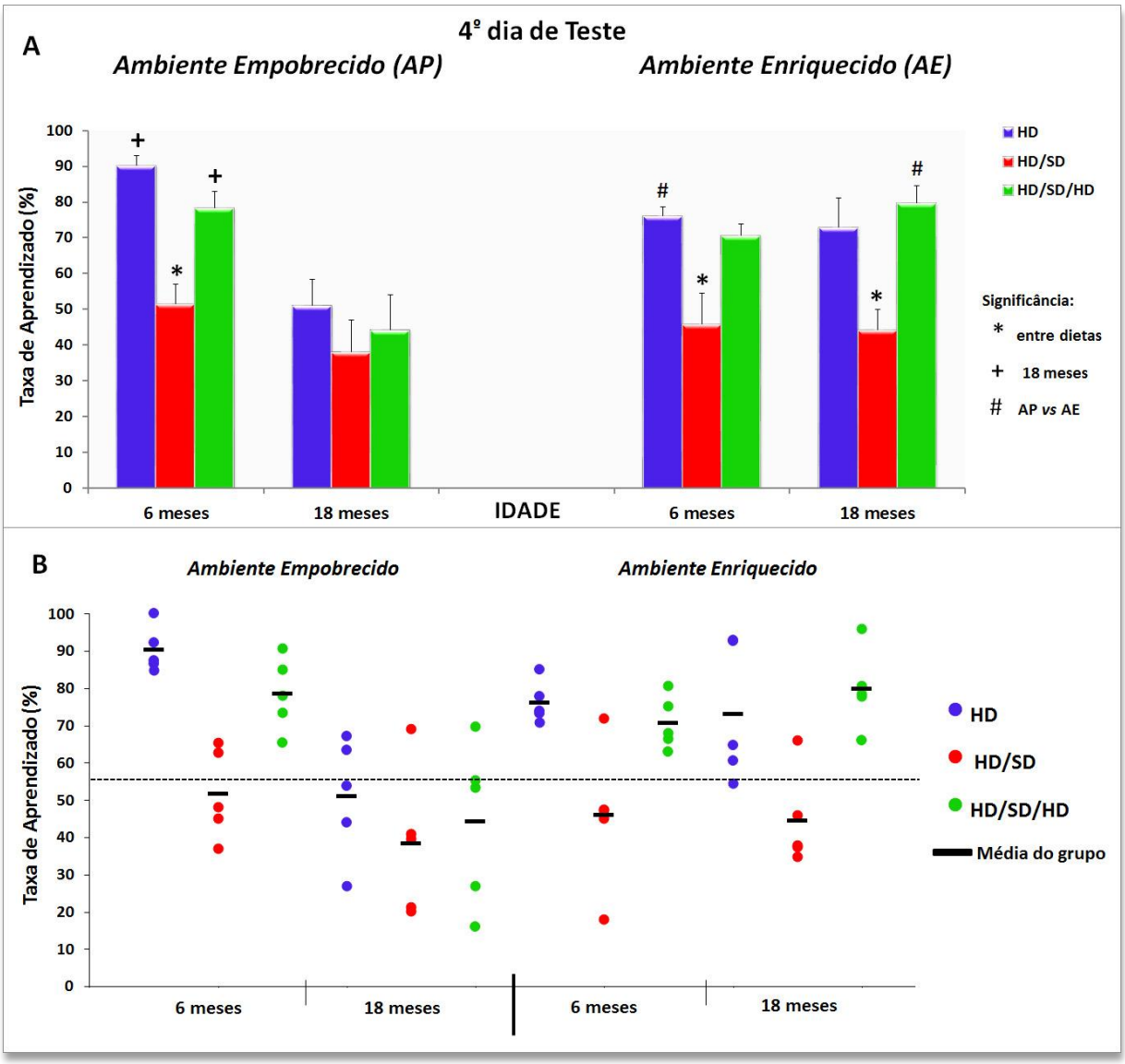
4.2 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

4.2.1 Taxa de Aprendizagem

Apresentamos na **Figura 16** os resultados da influência dos três regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD) nas diferentes idades (6M e 18M) e ambientes (AP e AE) sobre a taxa de aprendizado dos cinco melhores animais de cada grupo experimental no quarto dia de teste no labirinto aquático de Morris. No painel superior (**Figura 16A)** são indicadas as diferenças significativas entre os grupos com a representação das suas médias para a taxa de aprendizado,

e no painel inferior (**Figura 16B)** as *performances* individuais dos animais de cada grupo, destacando-se as médias dos grupos. Os valores exatos de média e erro-padrão para cada grupo experimental, relacionado à taxa de aprendizado, estão descritos no **Quadro 4**.

Figura 16: Taxa de aprendizado (%) no 4º dia de teste do labirinto aquático de Morris sob diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), ambiente (AP e AE) e idade (6 e 18 meses).



(**A**) No painel superior são indicados os valores médios e erros-padrão das taxas de aprendizado para cada grupo experimental, destacando-se as diferenças significantes. n = 5, onde: (*) indica diferença significativa nas taxas de aprendizagem entre diferentes regimes de dieta. (+) diferença significativa entre as idades. (#) diferença significativa entre ambientes. (**B**) No painel inferior são representadas as *performances* individuais dos animais (círculos sólidos coloridos) e média dos grupos (traços escuros entre círculos sólidos).

Quadro 4: Média da taxa de aprendizado (%) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 e 18 meses, nos dois ambientes (empobrecido e enriquecido).

	Taxa de Aprendizado (%): média ± erro-padrão			
GRUPOS	**Ambiente Empobrecido**		**Ambiente Enriquecido**	
	6 meses	**18 meses**	**6 meses**	**18 meses**
HD	90,19 ± 2,74	51,02 ± 7,26	76,14 ± 2,48	73,03 ± 8,22
HD/SD	51,60 ± 5,40	38,16 ± 8,91	45,91 ± 8,53	44,35 ± 5,70
HD/SD/HD	78,49 ± 4,43	44,25 ± 9,89	70,66 ± 3,19	79,75 ± 4,77

Nota-se que aos seis meses, a condição de escassez de estímulos ambientais, aliada a uma redução na atividade mastigatória (HD/SD-AP 6M) esteve associada a menores valores de taxa de aprendizado em comparação com camundongos controle (HD-AP 6M) ou reabilitados (HD/SD/HD-AP 6M).

Da mesma forma, animais HD/SD-AE 6M apresentaram desempenho inferior aos controles (HD-AE 6M) ou ao grupo de camundongos reabilitados (HD/SD/HD-AE 6M), sendo isso também evidente nos camundogos velhos de ambiente enriquecido (HD/SD-AE 18M *vs* HD-AE 18M e HD/SD/HD-AE 18M).

Portanto, do conjunto de dados emerge claramente o impacto negativo da redução da atividade mastigatória e, em contrapartida, os benefícios de sua reabilitação no aprendizado e memória espacial. Ademais, demonstramos que o envelhecimento e a pobreza de estímulos ambientais contribuíram para diminuir a taxa de aprendizado no WM (HD-AP 6M *vs* HD-AP 18M; HD/SD/HD-AP 6M *vs* HD/SD/HD-AP 18M). Porém, a reabilitação, aliada ao enriquecimento ambiental em animais velhos, culminou com a melhora na taxa de aprendizado em comparação com os camundongos pareados por idade e que cresceram em ambiente padrão.

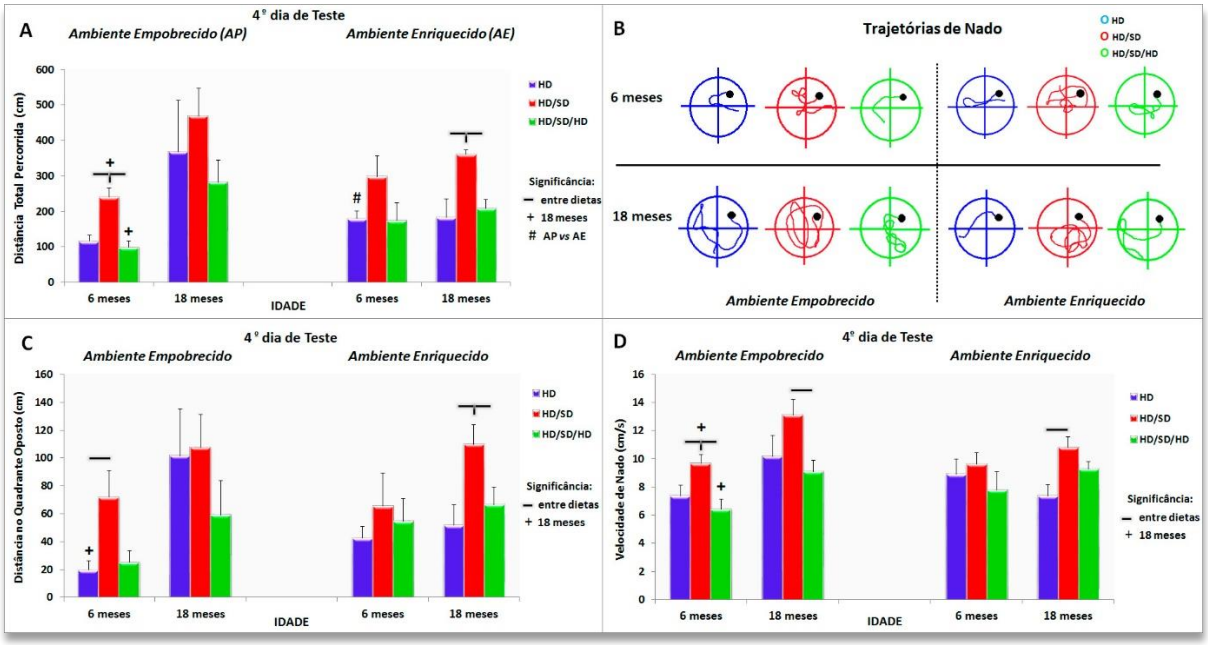
A partir disso, mensurando a influência das variáveis para os resultados obtidos em relação à taxa de aprendizado no quarto dia de treinamento, foram obtidas como significativa a contribuição da alteração mastigatória ($F_{(2,48)} = 21,2$; $p < 0,000001$), da idade ($F_{(1,48)} = 13,6$; $p < 0,000567$) e da interação entre idade e ambiente ($F_{(1,48)} = 16,7$; $p < 0,000164$). Todos os

valores das significâncias obtidas (pós-teste de Tukey – DHS) para as amostras pareadas estão disponíveis nos apêndices (**Quadro 14**).

4.2.2 Velocidade de Nado e Distância Percorrida

Considerando que a redução da latência de fuga durante o treinamento no labirinto aquático de Morris pudesse ser simplesmente consequência da velocidade de nado aumentada ao longo dos dias e/ou do abandono da estratégia tigmotáxica dos primeiros dias de treinamento, na **Figura 17** são apresentados os resultados referentes à distância total percorrida (comprimento do trajeto até o encontro da plataforma - **Figura 17A**), além dos respectivos diagramas com a representação dos percursos médios (**Figura 17B**), a distância percorrida no quadrante oposto ao da plataforma (**Figura 17C**) e a velocidade média de nado (**Figura 17D**).

Figura 17: Representação dos valores médios da distância total percorrida no labirinto aquático e na zona do quadrante oposto ao da plataforma; as trajetórias de nado e a velocidade média de nado para cada grupo experimental.



(**A**) Representação dos valores médios e erro-padrão da distância total percorrida por cada grupo experimental. (**B**) As trajetórias de nado representativas de cada grupo, considerando animais com distância média mais próxima à do grupo. (**C**) Valores médios e erro-padrão da distância percorrida no quadrante oposto ao da plataforma (**D**) e da velocidade média de nado. Todos os painéis possuem dados expressos em função do ambiente, idade e regimes de dieta com valores referentes ao 4º dia de teste do labirinto aquático de Morris. n = 5, onde: linhas de conectores indicam diferenças significativas entre os regimes de dieta; (+) entre as idade de 6 e 18 meses; (#) entre ambientes.

A seguir, nos **quadros 5, 6 e 7**, os valores exatos de média e erro-padrão para cada grupo experimental, para os dados de distância total percorrida, distância no quadrante oposto e velocidade média de nado, respectivamente.

Quadro 5: Média da distância total percorrida (cm) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 e 18 meses, nos dois ambientes (empobrecido ou enriquecido).

	Distância Total Percorrida (cm): média ± erro-padrão			
GRUPOS	**Ambiente Empobrecido**		**Ambiente Enriquecido**	
	6 meses	**18 meses**	**6 meses**	**18 meses**
HD	116,23 ± 16,07	368,24 ± 144,83	179,87 ± 21,43	183,82 ± 52,02
HD/SD	241,36 ± 23,77	467,93 ± 79,75	297,63 ± 60,39	360,23 ± 13,21
HD/SD/HD	98,03 ± 19,55	281,14 ± 63,03	174,32 ± 49,32	207,83 ± 26,32

Quadro 6: Média da distância total percorrida no quadrante oposto à plataforma (cm) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 e 18 meses, nos dois ambientes (empobrecido ou enriquecido).

	Distância no Quadrante Oposto (cm): média ± erro-padrão			
GRUPOS	**Ambiente Empobrecido**		**Ambiente Enriquecido**	
	6 meses	**18 meses**	**6 meses**	**18 meses**
HD	19,69 ± 6,54	101,45 ± 34,03	42,57 ± 8,36	51,69 ± 14,62
HD/SD	71,67 ± 19,30	107,44 ± 23,77	65,38 ± 23,92	109,78 ± 14,11
HD/SD/HD	25,43 ± 8,12	58,95 ± 24,59	54,62 ± 16,43	66,19 ± 13,03

Quadro 7: Média da velocidade de nado (cm/s) no 4º dia de teste e erro-padrão para os grupos experimentais (HD, HD/SD e HD/SD/HD) na idade de 6 meses, nos dois ambientes (empobrecido ou enriquecido).

	Velocidade de Nado (cm/s): média ± erro-padrão			
GRUPOS	**Ambiente Empobrecido**		**Ambiente Enriquecido**	
	6 meses	**18 meses**	**6 meses**	**18 meses**
HD	7,35 ± 0,78	10,16 ± 1,51	8,91 ± 1,04	7,36 ± 0,79
HD/SD	9,67 ± 0,63	13,09 ± 1,13	9,61 ± 0,84	10,77 ± 0,78
HD/SD/HD	6,39 ± 0,75	9,05 ± 0,83	7,75 ± 1,33	9,24 ± 0,57

A ANOVA – *three way* para esses dados revelou que a distância total percorrida foi influenciada pela idade ($F_{(1,48)} = 13,6$; $p < 0,0006$) e pela alteração mastigatória ($F_{(2,48)} = 7,55$; $p < 0,001$), com interação significativa entre ambiente e idade ($F_{(1,48)} = 7,40$; $p < 0,009$).

Como esperado, os melhores desempenhos nas taxas de aprendizado estiveram associados às menores distâncias percorridas. Comparações pareadas (**Figura 17A**) mostraram que o grupo HD/SD-AP 6M percorreu maiores distâncias em comparação ao HD-AP 6M e ao HD/SD/HD-AP 6M e com o envelhecimento, a distância percorrida se tornou maior (HD/SD AP 6M *vs* HD/SD-AP 18M). Esse mesmo efeito do envelhecimento ocorreu para o grupo reabilitado (HD/SD/HD-AP 6M *vs* HD/SD/HD-AP 18M).

Todavia, animais velhos de AE não tiveram diferenças significativas com os adultos jovens de mesmo ambiente e, mais uma vez, o grupo não reabilitado nadou distâncias maiores para encontrar a plataforma (nesse caso HD/SD-AE 18M *vs* HD-AE 18M e HD/SD/HD-AE 18M). De forma supreendente, mas concordantes com os resultados da taxa de aprendizado, o HD-AP 6M percorreu distâncias mais curtas do que HD-AE 6M.

No que concerne à distância percorrida no quadrante oposto ao da plataforma, verificamos que essa foi influenciada de forma significante pela idade ($F_{(1,48)} = 10,9$; $p < 0,002$) e pela alteração mastigatória ($F_{(2,48)} = 4,83$; $p < 0,01$). Em análise pareada (**Figura 17C**) encontramos que o HD-AP 6M nadou menos no quadrante oposto do que o HD/SD-AP 6M,

revelando melhor estratégia de nado do grupo controle se comparado ao grupo de redução mastigatória.

Da mesma forma aconteceu para o HD-AE 18M e o HD/SD/HD-AE 18M em comparação com o HD/SD-AE 18M.

Quanto à velocidade de nado, essa foi afetada pela idade ($F_{(1,48)} = 9,08$; $p < 0,004$), alteração mastigatória ($F_{(2,48)} = 9,26$; $p < 0,0004$), com interação significativa entre o ambiente e a idade ($F_{(1,48)} = 5,51$; $p < 0,02$).

Nas comparações pareadas (**Figura 17D**), o HD/SD-AP 6M nadou mais rápido que HD-AP 6M e o HD/SD/HD-AP 6M. Por outro lado, esse grupo foi mais lento do que o grupo HD/SD-AP18M.

O grupo HD/SD/HD-AP 6M, por sua vez, nadou mais lento que o HD/SD/HD-AP 18M, mas este último acabou nadando mais lentamente que o HD/SD-AP 18M.

Apesar das significâncias citadas para AP, a velocidade de nado não se alterou para os animais de AE, destacando-se uma única exceção: o HD-AE 18M que nadou mais lento que HD/SD-AE 18M.

Todos os valores das significâncias para amostras pareadas e obtidas após o teste de Tukey (DHS) e citadas até aqui para a velocidade de nado, distância total percorrida e aquela percorrida no quadrante oposto ao da plataforma estão disponíveis nos apêndices (**Quadros 15, 16 e 17**).

Tomando esses resultados em conjunto, vimos que as taxas de aprendizado pareceram estar diretamente relacionadas com a distância percorrida, ou seja, grupos experimentais que apresentaram as melhores *performances* no labirinto aquático descreveram menores trajetórias de nado, percorrendo menores distâncias. Aliado a isso, também foram menores a sua velocidade de nado, sugerindo que os efeitos comportamentais não são produtos de alterações sensório-motoras e que a atividade mastigatória parece sim afetar o aprendizado espacial de camundongos quando esses são submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris.

Os resultados também sugerem que a reabilitação da atividade mastigatória em animais submetidos previamente a redução dessa atividade, pode beneficiar tanto os camundongos jovens quanto idosos no desempenho em testes de memória espacial.

4.2.3 Peso Corporal e Regimes de Dieta

Para detectar possível influência dos regimes de dieta e do ambiente sobre o peso corporal dos animais, todos eles foram pesados logo após o término dos testes comportamentais.

O teste ANOVA-*one-way* (Bonferroni pós-teste; $p < 0,05$) revelou diferença significativa entre os pesos dos animais de AP ($F_{(2, 12)} = 16,04$; $p < 0,0006$), onde o HD/SD 6M (52,84 ± 2,45 g, média ± erro-padrão) pesou significativamente menos que o HD-AP 6M (75,96 ± 3,69) e o HD/SD/HD-AP 6M (71,56 ± 2,93).

Em razão dessa diferença no peso corporal, testamos a sua correlação com a taxa de aprendizado. Essa análise foi feita para todos os grupos experimentais e encontramos uma única correlação inversa significativa nos animais do grupo HD/SD-AP 6M (coeficiente de Pearson = - 0,99; $R^2 = 0,99$; $p = 0,0007$). Não houve qualquer diferença no peso corporal entre os animais de AE.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho testamos a hipótese de que a alteração da atividade mastigatória, o envelhecimento e o estilo de vida pudessem influenciar no comportamento semelhante ao ansioso em teste de campo aberto e, ainda, no aprendizado e a memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris.

Para mimetizar o estilo de vida sedentário e ativo, os camundongos, desde o desmame, foram criados, respectivamente, em um AP e um AE. Aditivamente, para induzir uma redução na atividade mastigatória, parte dos animais após ter sido previamente alimentada com dieta sólida foi alimentada logo em seguida com ração em pó (HD/SD) e, assim, seu desempenho no teste no labirinto aquático de Morris pôde ser comparado com outros dois grupos alimentados com dieta sólida: um de maneira contínua (HD - grupo controle) e outro com uma sequência alternada de dietas (HD/SD/HD - grupo reabilitado).

5.1 ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE MASTIGATÓRIA COMO FATOR DESENCADEADOR DO ESTRESSE E DO ESTADO ANSIOSO

Estudos prévios apontaram que o ato de roer atenuaria uma variedade de índices fisiológicos de estresse em ratos, tais como, o aumento de atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e participação de catecolaminas centrais (OKADA *et al.*, 2007; HORI; YUYAMA; TAMURA, 2004).

Ao considerarmos uma situação desencadeadora de estresse, visualizada pelo teste onde ratos são submetidos ao pinçamento suave de sua cauda, identificou-se um aumento prolongado na produção de dopamina no corpo estriado (particularmente na sua região ventrolateral) e também no córtex pré-frontal. Nesse contexto, a via mesocortical seria a mais sensível ao estresse em comparação as outras projeções dopaminérgicas (GÓMEZ *et al.*, 2010). Ratos submetidos à condições estressoras e de bloqueio ou dano dessa via, demostraram menor capacidade de adaptação comportamental, maior ansiedade e exagerada resposta neuroendócrina de estresse, tornando-se ainda mais vulneráveis às suas consequências patológicas (ESPEJO, 1997; SULLIVAN; SZECHTMAN, 1995). Dessa forma, esses resultados suportam a idéia de que a dopamina pré-frontal teria um papel ansiolítico.

Em concordância, foi relatado um aumento seletivo na imunorreatividade para c-Fos no córtex pré-frontal de ratos que optaram por mastigar de forma espontânea durante exposição ao

estresse (STALNAKER; ESPANA; BERRIDGE, 2009), sinalizando uma maior ativação mesocortical ao ato de mastigar. Em contraste, a expressão deste marcador neuronal foi atenuada em outras áreas do cérebro (STALNAKER; ESPANA; BERRIDGE, 2009; KANEKO *et al*., 2004). Assim, evidências apontam que o córtex pré-frontal parece desempenhar um papel específico também em relação ao comportamento mastigatório.

No teste de campo aberto vimos que os animais sedentários adultos jovens que sofreram alteração mastigatória (HD/SD e HD/SD/HD AP 6M) apresentaram maior preferência pela zona periférica se comparados aos animais controle (HD-AP 6M). Esse resultado sugere que a predileção pela ZP seja uma resposta frente um estado semelhante ao ansioso nesses animais, ou ainda, que a simples alteração da atividade mastigatória induz uma modificação no padrão de exploração no OF.

Utilizando camundongos machos C57BL6/J jovens (com 7 e 14 semanas de vida) criados em AP e submetidos à dieta com ração farelada, Nose-Ishibashi e col. (2014) concluíram em teste de campo aberto que, a distância total de locomoção foi significativamente maior para esses animais, entendendo-se que uma dieta habitual com ração em pó pode afetar a capacidade de resposta a novos ambientes, gerando, inclusive, possível dificuldade desses animais de se adaptarem aos novos ambientes.

Em nossos achados, os dois grupos que sofreram alteração da atividade mastigatória (HD/SD e HD/SD/HD AP 6M) revelaram esse possível estado semelhante ao ansioso, independente de terem sofrido redução ou reabilitação da mastigação. Portanto, a simples alteração da condição habitual da mastigação, ou seja, deixar de requisitar permanentemente uma atividade mastigatória (HD) parece influenciar nos comportamentos relacionados à ansiedade. Alguns autores alegam que a simples manipulação da atividade mastigatória seria crítica para a vulnerabilidade a desordens mentais se introduzida precocemente (NOSE-ISHIBASHI *et al*., 2014). Aliado a isso, não podemos esquecer que o córtex pré-frontal recebe várias outras aferências e especialmente de regiões límbicas, como a amígdala, que podem afetar significativamente essa reposta dopaminérgica. Hipocampo ventral, córtex entorrinal e amígdala basolateral configuram como parte de um circuito integrador e regulador de respostas aos estímulos ansiogênicos leves (HALE *et al*., 2008).

5.2 O ESTADO ANSIOSO E SUA NEUROANATOMIA NO ENVELHECIMENTO

Eventos outros, como o envelhecimento, também têm investigada a sua relação com a ansiedade. É bem documentado que o envelhecimento está associado ao declínio das funções cognitivas e também a mudanças emocionais. Em nossos resultados, vimos que camundongos velhos de ambiente empobrecido apresentaram redução do tempo de permanência na ZP em relação aos animais jovens, sugerindo menor estado semelhante ao ansioso.

Em modelos experimentais, a maioria dos autores tem abordado essa questão em roedores descrevendo um aumento da ansiedade em idades avançadas (BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2002; MIYAGAWA *et al*., 1998; NAGAHARA; HANDA, 1997; LI *et al*., 1995; BLOKLAND; RAAJIMAKERS, 1993; LAMBERTY; GOWER, 1993; FRUSSA-FILHO *et al*., 1992; LAMBERTY; GOWER, 1992). Testes aplicados, como o do labirinto em cruz elevado, convergem para essa conclusão (BESSA *et al*., 2005; BOGUSZEWSKI; ZAGRODZKA, 2002). Entretanto, alguns resultados opostos, isto é, de que a ansiedade em roedores envelhecidos é diminuída, também têm sido relatados no mesmo aparato (PISARSKA *et al*., 2000; TORRAS-GARCIA *et al*., 2005).

Chen e col. (2007) comparando camundongos SAMP8 (com senescência acelerada) e SAMR1 (resistentes à senescência), de ambos os sexos e em diferentes idades (2, 6 e 10 meses). Realizaram uma bateria de testes (incluindo o campo aberto) para avaliar comportamentos sugestivos de ansiedade. No OF, os animais SAMP8 apresentaram ansiedade reduzida em comparação com os SAMR1 e este efeito ocorreu principalmente nas fêmeas mais jovens. No entanto, nos testes de LCE os resultados foram inversos. Dessa forma, mudanças no estado ansioso e relacionadas à idade parecem ter origem multifatorial (CHEN *et al*., 2007), justificando possivelmente os controversos achados na literatura, sobretudo em modelos experimentais, onde resultados parecem ser dependentes também dos testes e procedimentos experimentais aplicados.

Em humanos, pesquisas gerontológicas indicam um aumento da ansiedade e depressão em idosos (VAN'T VEER-TAZELAAR *et al*., 2008), mas, por outro lado, pesquisas psicológicas sugerem que a regulação da emoção e o gerenciamento do humor melhoram com a idade e, assim, adultos mais velhos sofreriam menos efeitos negativos das variações de humor (BLANCHARD-FIELDS, 2009; CARSTENSEN *et al*., 2000; LARCOM; ISAACOWITZ, 2009).

Estudos utilizando neuroimagem, em particular a ressonância magnética funcional, são apontados como importantes ferramentas para se investigar a fenomenologia dos transtornos de ansiedade. Nesses casos, a amígdala tem se mostrado hiperativa em vários trabalhos (NITSCHKE *et al*., 2009; ETKIN *et al*., 2010; MONK *et al*., 2008), mas não em outros (MONK *et al*., 2006; WHALEN *et al*., 2008). Região ventral do córtex pré-frontal, incluindo o córtex pré-frontal ventrolateral e o córtex cingulado anterior, também mostraram padrões anormais de ativação (ETKIN *et al*., 2010; MCCLURE *et al*., 2007; MONK *et al*., 2006).

Essas áreas têm sido destaque em pesquisas sobre regulação e modulação das emoções em populações saudáveis e especula-se, afinal, que o córtex pré-frontal e giro do cíngulo modulariam essas respostas, enquanto que a manifestação direta de uma amígdala hiperativa seria observada nos casos de ansiedade elevada (TROMP *et al*., 2012).

Ainda aplicando-se o recurso da ressonância magnética funcional, observou-se uma perda envelhecimento-dependente da reatividade da amígdala e, em contraposição, atividade amplificada no córtex pré-frontal em resposta a estímulos nocivos (GUNNING-DIXON *et al*., 2003; MATHER, 2004; ROALF *et al*., 2011; TESSITORE *et al*., 2005; WILLIAMS *et al*., 2006).

Isso poderia explicar o fato dos nossos animais velhos de ambiente empobrecido revelarem redução na apresentação de comportamento semelhante ao ansioso em comparação com os adultos jovens. Para animais velhos, a diferença ficou restrita entre o HD e HD/SD/HD, provavelmente resultado da maior diversificação da atividade mastigatória nesse último grupo.

Outro candidato a estudos para se testar conexões estruturais é o fascículo uncinado. Ele é o principal trato de substância branca que conecta diretamente a amígdala às regiões ventrais do córtex pré-frontal e giro do cíngulo (CATANI *et al*., 2002; KIER *et al*., 2004). Redução da sua integridade estrutural parece estar implicada em vários transtornos de ansiedade (PHAN *et al*., 2009; WANG *et al*., 2009; KIM; WHALEN, 2009).

5.3 O AMBIENTE E A SUGESTÃO DE FATORES ANSIOGÊNICOS

No OF também vimos que ao serem submetidos ao enriquecimento ambiental, diferentemente do que fora visto nos animais de AP, os animais jovens que sofreram alteração da atividade mastigatória (HD/SD e HD/SD/HD AE 6M) tiveram minimizadas as suas

diferenças em relação ao grupo controle (HD AE 6M). Isso a custa do aumento significativo da preferência desse último pela ZP em relação ao HD-AP 6M.

Investigando os efeitos do ambiente sobre comportamentos emocionais, muitos estudos sugeriram que experiências precoces de vida podem afetar o desenvolvimento cerebral, contribuindo para moldar diferenças interindividuais, vulnerabilidade ao estresse e comportamentos ansiosos. Os mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos estão sob intensa investigação. Em ratos, vários estudos apontaram que variações nos níveis de cuidados maternos poderiam induzir efeitos duradouros sobre o comportamento dos filhotes, sobre a estrutura e função do hipocampo e em resposta ao estresse (para revisão, ver MEANEY; SZYF, 2005; ZHANG *et al*., 2013). Filhotes que apresentaram alto nível de lambidas das suas mães apresentaram maior comportamento exploratório e memória espacial, além de redução do comportamento sugestivo de ansiedade e maior nível de receptores de glicocorticóides no hipocampo, levando a uma diferença no controle de retroalimentação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e à diferenças na densidade da coluna e plasticidade sináptica no hipocampo (LIU *et al*., 1997, ZHANG *et al*., 2013). O AE, nesse contexto, logo após o desmame ou incluído no período de desmame, seria eficaz na proteção ou reversão do efeito de um agente estressor em animais altamente ansiosos (CHAPILLON *et al*., 2002; FRANCIS *et al*., 2002; LAVIOLA *et al*., 2004).

Apesar disso, na literatura, muitos são os achados controversos acerca dos efeitos da estimulação ambiental sobre comportamentos semelhante à ansiedade. Estudos apontam que o exercício diminuiria os sintomas de depressão e ansiedade (GREENWOOD *et al*., 2003; DUMAN *et al*., 2008; LEASURE, JONES, 2008), ao passo que outros sugerem que ele seria ansiogênico (FUSS *et al*., 2010; LEASURE, JONES, 2008; BURGHARDT *et al*., 2004; VAN HOOMISSEN *et al*., 2004). Essa aparente inconsistência pode em parte ser atribuída ao tipo de testes de ansiedade, assim como, a espécie e a variedade do animal utilizada no experimento.

Em estudo recente com camundongos fêmeas na idade de 6 meses, pesquisadores encontraram que tanto no labirinto em cruz elevado quanto no campo aberto, animais mantidos em habitação enriquecida apresentaram comportamento sugestivo de ansiedade, com hesitação em explorar os braços abertos do LCE e a região central do OF. As escolhas por regiões a serem exploradas é dependente de uma tomada de decisão do animal por assumir o risco de explorar espaços abertos. Esse receio em explorar essas áreas torna-se um exemplo de estado semelhante ao ansioso em função da representação de uma atitude de prevenção de conflitos, cuja solução é a evasão dessas áreas (PIETROPAOLO; FELDON; YEE, 2014).

Essa atitude de evazão da área central e constante exploração da área ao entorno do aparato (periferia) pode também ser definida como um comportamento tigmotáxico no qual espera-se que o animal reduza sua atividade locomotora em função do tempo a medida que ele se sinta acomodado ao ambiente da arena. Dessa forma, se tomarmos os nossos achados para comparação e utilizarmos como um indicador da intensidade do comportamento semelhante ao ansioso uma maior latência de acomodação à arena, é razoável inferir que os animais do ambiente enriquecido exibem sinais menos intensos desse tipo de comportamento do que os animais do ambiente empobrecido, pois a taxa de exploração no primeiro e no segundo minutos de teste revelou maior redução do comportamento tigmotáxico (semelhante ao ansioso) nos animais do ambiente enriquecido, independente da dieta, e isso foi particularmente evidente nos animais de 6 meses. Os animais de AP, em oposição, levaram maior tempo até a sua acomodação na arena.

Em outros testes, pesquisadores utilizando ratos Wistar com 40 dias de habituação em AE, analisaram as alterações no *status* neuroendócrino ocorridos a partir desses estímulos ambientais, e seus efeitos sobre a adaptação hormonal. Nesse estudo, encontraram que o enriquecimento ambiental resultou em aumento do peso da glândula-supra-renal e nos níveis de concentração de corticosterona basais, sugerindo disparo de mecanismos relacionados ao estresse e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (MONCEK *et al*., 2004).

No caso de camundongos C57BL6/J do tipo selvagem de ambos os sexos, ao serem avaliados para ansiedade e terem medidos os níveis de BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), esses revelaram que a magnitude do comportamento de ansiedade foi positivamente relacionada aos níveis do referido fator neurotrófico no hipocampo dorsal, mas negativamente relacionado ao níveis de NGF (do inglês *nerve growth factor*) na mesma região e na amígdala (YEE *et al*., 2007). Portanto, é possível que o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo possa estar relacionado ao efeito ansiogênico do AE. Isso poderia ainda potencializar a funcionalidade do hipocampo como uma chave no processamento de estímulos que provocam ansiedade (MCNAUGHTON; GRAY, 2000).

Entretanto, no caso dos animais controle velhos de ambiente enriquecido (HD-AE 18M), vimos que eles apresentaram uma redução dos níveis ansiogênicos em relação ao animais jovens de mesmo ambiente. Dessa forma, pode-se supor que a exposição a uma variação constante no ambiente e de forma duradoura (18 meses) permitiu que esses animais, na ausência de estimulo aversivo, reduzissem o nível de estresse geral exibindo maiores taxas de acomodação á arena aberta (DUPIRE *et al*., 2013). Alternativamente, o enriquecimento poderia

também representar um mecanismo de indução de estresse, onde a renovação contínua do meio pela substituição ou deslocamento dos brinquedos poderia ser comparável com exposições repetidas ao estresse leve (LARSSON *et al.*, 2002). Isso de forma crônica, poderia tornar os animais de ambiente enriquecido velhos mais adaptados a esses desafios (KONKLE *et al*., 2010).

5.4 ENVELHECIMENTO, AMBIENTE E DECLÍNIO COGNITIVO

Nossos resultados no labirinto aquático de Morris revelaram que todos os camundongos adultos jovens controles de AP e AE puderam aprender e lembrar a posição da plataforma escondida depois de quatro dias de treinamento, mas apenas camundongos idosos de AE preencheram o critério de obtenção de 60% de taxa de aprendizado. De fato, camundongos de AP idosos atingiram uma média perto do nível do acaso (HD-AP 18M = 51,02 ± 7,26). Esses resultados sugerem que até os 6 meses em condições de pobreza ambiental os mecanismos hipocampais para a aprendizagem espacial são preservados em camundongos jovens e poderiam ser requisitados após o treinamento.

Como esperado, a capacidade de memória tornou-se pior quando a idade avançou e foi combinada ao AP. Nessas condições, o declínio da aprendizagem espacial relacionada com a idade foi agravado.

Em contraste, o enriquecimento ambiental para camundongos envelhecidos fez com que esses animais exibissem uma aprendizagem espacial relativamente intacta nos testes do labirinto aquático, sugerindo que os mecanismos de consolidação e de recuperação para estas memórias foram poupados em condições enriquecidas. Essas observações replicam os resultados anteriores nossos e de outros pesquisadores em camundongos e ratos submetidos à aprendizagem espacial e testes de memória (OBIANG *et al*., 2011; DINIZ *et al*., 2010; HARBURGER; LAMBERT; FRICK, 2007).

De fato, o alojamento de animais em um ambiente com altos níveis de estimulação cognitiva, física, social e somatossensorial tem sido empregado com o objetivo de analisar as reações de adaptações dos espécimes frente a padrões de novidade e complexidade (PANG; HANAN, 2013). A atividade física envolvida no enriquecimento ambiental tem sido associada a melhora da função cognitiva através de efeitos em processos neurais como a neurogênese hipocampal (VAN PRAAG, 2008), angiogênese cerebral (KERR *et al*., 2010), aumento da

expressão de fatores neurotróficos (LISTA; SORRENTINO, 2010), a expressão de genes (KOHMAN *et al*., 2011) e o crescimento neurítico (WU *et al*., 2008).

Mais recentemente, em nosso laboratorio foi investigado o impacto da institucionalização em seres humanos idosos, sedentários, vivendo em condições precárias de estimulação cognitiva e sensório-motora (condições empobrecidas e similares). Os participantes foram submetidos a testes neuropsicológicos e os resultados foram comparados com os de um grupo controle de idosos vivendo na comunidade com suas famílias (condições enriquecidas e similares). Os resultados revelaram escores significativamente mais elevados entre os participantes que vivem em comunidade. Consistente com essa descoberta, os pacientes institucionalizados após seis meses de estimulação motora, sensorial e cognitiva (como o ambiente enriquecido) melhoraram significativamente suas *performances* em testes neuropsicológicos (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

5.5 REABILITAÇÃO DA FUNÇÃO MASTIGATÓRIA PARA PREVENIR DÉFICITS DE APRENDIZAGEM ESPACIAL EM ADULTOS IDOSOS

Diversos estudos usando uma variedade de ensaios comportamentais, incluindo o labirinto de aquático de Morris (ONOZUKA *et al*., 1999; WATANABE *et al*., 2002; ONOZUKA *et al*., 2002; ONOZUKA *et al*., 2000; KUBO *et al*., 2005; WATANABE *et al*., 2001; TSUTSUI *et al*., 2007; DE ALMEIDA *et al*., 2012), a esquiva passiva (KUSHIDA *et al*., 2008) e labirinto radial (YAMAZAKI *et al*., 2008; KATO *et al*., 1997; YAMAMOTO; HIRAYAMA 2001), indicam que, a longo prazo, uma dieta em pó ou a exodontia de molares resultaram em déficits de aprendizagem e memória (KUBO *et al*., 2010).

Estudos recentes com o labirinto aquático de Morris demonstraram que camundongos alimentados com uma dieta sólida reduziram significativamente a latência de escape para atingir a plataforma e gastaram maior tempo na zona em que ela estava, sugerindo que a dieta sólida está relacionada com a melhores *performances* quando se é requisitada a memória espacial (AKAZAWA *et al*., 2013).

Além disso, com um ano (TSUTSUI *et al*., 2007) ou 18 meses de idade (DE ALMEIDA *et al*., 2012), camundongos alimentados com uma dieta farelada, em comparação aos alimentados com dieta sólida, apresentaram piores desempenhos em testes espaciais. Da mesma forma, camundongos SAMR1 e SAMP8 alimentados com uma dieta sólida apresentaram

desempenho melhor no labirinto de oito braços do que os camundongos alimentados com uma dieta em pó (YAMAMOTO; HIRAYAMA 2001).

Camundongos SAMP8 atingem a maturidade adulta aos 6 meses de idade, quando déficits de memória e aprendizagem se tornam aparentes em uma variedade de testes comportamentais (FLOOD; MORLEY, 1993; MIYAMOTO *et al*., 2005; OHTA *et al*., 1989; YAGI *et al*., 1988) e quando a redução da atividade mastigatória acelera o declínio relacionado à idade (KUBO *et al*., 2010). Nesse conxtexto, também está inserida a desarmonia oclusal, que parece agravar déficits de memória espacial relacionadas à idade (KUBO *et al*., 2007; ARAKAWA *et al*., 2007; ICHIHASHI *et al*., 2007; IINUMA *et al*., 2008; KUBO *et al*., 2008), ver para revisão recente (ONO *et al*., 2010; KUBO *et al*., 2010). Além disso, estudos demonstraram que macacos submetidos à correção de desarmonia oclusal tiveram o desaparecimento dessa resposta associada ao estresse imposto pela condição anterior (BUDTZ-JORGENSEN, 1981).

Os resultados do presente trabalho acrescentaram uma nova peça de informação, demonstrando um efeito vigoroso de mudanças na dieta sobre o aprendizado espacial no labirinto aquático de Morris após uma redução na atividade mastigatória imposta com uma dieta em pó em camundongos previamente alimentados com uma dieta sólida. Também é demonstrado que essas perdas de aprendizagem espaciais podem ser prontamente recuperadas por reabilitação mastigatória na idade adulta (6M), mas que os camundongos idosos (18M) exigem uma combinação de estímulos ambientais e de reabilitação mastigatória para obter efeitos semelhantes. Pelo fato do labirinto aquático de Morris ser uma tarefa hipocampo-dependente, é sugerido que a reabilitação da atividade mastigatória em camundongos adultos jovens e uma combinação de AE e reabilitação mastigatória em camundongos idosos possam resgatar a função do hipocampo.

Importante realçar que os animais que tiveram reduzida sua atividade de mastigação, não a tiveram totalmente suprimida e isso se aproxima da condição humana que em geral preserva algum grau de atividade mastigatória quando da perda dental durante o envelhecimento ou na meia idade. Dessa forma, especula-se que a reabilitação oral e a estimulação sensório-motora e cognitiva podem ajudar a proteger os seres humanos de declínios cognitivos relacionados à idade e que essas intervenções seriam mais eficazes quanto mais precocemente fossem implementadas.

5.6 DESORDENS DE ANSIEDADE E *PERFORMANCES* COGNITIVAS

A cognição refere-se a um amplo leque de processos mentais incluindo a atenção, a tomada de decisão, a resolução de problemas, linguagem e memória. A maior parte dos déficits cognitivos consistentemente documentados em desordens psiquiátricas envolvem funções executivas (do inglês *executive functioning*); estas funções incluem três categorias: (i) funções inibitórias (capacidade de suprimir uma função em função de outra), (ii) memória de trabalho (capacidade de manter e manipular múltiplas partes da informação ao mesmo tempo), e (iii) flexibilidade cognitiva (capacidade de ajustar a resposta ou atenção rapidamente frente à modificação da demanda). Componentes das funções executivas também estão implicados nas desordens de ansiedade (ETKIN *et al*., 2013).

Desse modo, as perguntas que se relacionam a esse contexto são: quais fatores seriam gatilhos para tais disfunções? Quais déficits seriam manifestados?

Focados nos recentes, mas poucos estudos acerca da influência da atividade mastigatória sobre a cognição e alterações comportamentais, especialmente aquelas relacionadas a comportamentos sugestivos de ansiedade, trabalhamos com a hipótese de que modificações na mastigação após o desmame poderiam afetar o desenvolvimento emocional e, ainda, que a redução na atividade mastigatória poderia aumentar a vulnerabilidade de indivíduos às desordens cognitivas.

Para verificar essa hipótese, recorremos a um modelo experimental (camundongos – *Mus musculus*) e, aditivamente, examinamos as relações entre mastigação, ambiente enriquecido e envelhecimento, também numa tentativa de esclarecer se o ambiente enriquecido seria um fator neuroprotetor contra processos de repercussão comportamental (manifestações semelhantes àquelas de ansiedade, declínio cognitivo e de memória espacial) e que poderiam surgir durante o envelhecimento e/ou nas alterações oriundas de deficiências na atividade mastigatória.

Demonstramos, ao final, que uma redução na atividade mastigatória e um ambiente pobre em estímulos prejudicam a aprendizagem espacial e uma combinação de reabilitação mastigatória e enriquecimento ambiental recuperam a capacidade de aprendizagem espacial de camundongos adultos jovens e idosos.

Apesar da reabilitação mastigatória se mostrar eficaz nas tarefas de aprendizado e memória espacial, surpreendentemente os grupos reabilitados não apresentaram distinção no

comportamento sugestivo de ansiedade em comparação com os não reabilitados. Poucos, mas crescentes dados na literatura tem sugerido uma relação negativa entre a ansiedade e cognição. Em revisão recente acerca do assunto, idosos com sintomas de ansiedade revelaram desempenho cognitivo inferior àqueles com nenhum ou sintomas mínimos de ansiedade (BEAUDREAU; O'HARA, 2008).

No entanto, em roedores, a relação entre ansiedade e cognição não está claramente estabelecida. Muitos resultados são controversos e os testes de ansiedade atualmente disponíveis não permitem a diferenciação entre ansiedade positiva (aquela que impulsiona o indivíduo a planejar suas metas até a sua ação) e negativa (que paralisa e impede a ação do indivíduo) em roedores (DUCHEMIN *et al*., 2013).

Além disso, presumia-se que a ansiedade prejudicaria o controle da atenção, uma função-chave da cognição. Entretanto, há uma suposição de que a ansiedade aumenta a alocação de atenção para estímulos relacionados às ameaças. Assim sendo, a ansiedade reduziria o foco de atenção na tarefa que está sendo executada somente se ela não envolvesse estímulos tipicamente ameaçadores. Dessa suposição, resultaria que indivíduos ansiosos alocam preferencialmente recursos de atenção para estímulos relacionados com ameaças que sejam internas (por exemplo, pensamentos preocupantes) ou externas, distraindo-se somente para tarefas irrelevantes (EYSENCK *et al*., 2007).

Nesse contexto, considerando que Görtz e col. (2008) afirmam que a fuga da água em labirintos aquáticos reflete uma situação de emergência (possivelmente uma ameaça), o WM, durante sua execução, realocaria para si a atenção do animal e, portanto, o possível déficit de atenção advindo do estado de ansiedade deixaria de ser relevante. Nesse caso, não existiria a aparente oposição entre os resultados de ansiedade e cognição para o grupo reabilitado e, portanto, sua boa *performance* nos testes de aprendizagem e memória espacial seriam fruto da conservação dos mecanismos envolvidos na execução dessas tarefas, diferentemente do que se acredita que acontece com o grupo não reabilitado.

6 CONCLUSÃO

A partir da interação entre condições de envelhecimento, alteração da atividade mastigatória e estimulação somatomotora e visuoespacial, buscamos investigar as possíveis alterações de atividade locomotora, de comportamento sugestivo de ansiedade e de aprendizado (memória espacial). Os resultados obtidos sugerem que:

a) a alteração da atividade mastigatória influencia o padrão de exploração por zonas no campo aberto e a estimulação ambiental acentua os seus efeitos no envelhecimento, privilegiando a preferência pela zona periférica como sugestão de um estado ansioso;

b) a atividade exploratória no campo aberto decresce ao longo do teste e o primeiro minuto é aquele em que os camundongos exibem maior atividade, independentemente do regime de dieta, idade ou ambiente;

c) o ambiente enriquecido parece acentuar os comportamentos naturais promovendo respostas tigmotáxicas mais intensas e de menor duração adaptando os animais a arena aberta em progressão mais rápida do que os animais do ambiente padrão.

d) a redução da atividade mastigatória em camundongos prejudica a aprendizagem espacial desses animais no labirinto aquático de Morris;

e) a reabilitação da atividade mastigatória desses animais na idade adulta, independentemente do ambiente, recupera as perdas de aprendizado espacial e uma combinação de ambiente enriquecido e reabilitação oferece beneficios significativos tanto para camundongos jovens quanto velhos.

REFERÊNCIAS

AGGLETON, J. P. Multiple anatomical systems embedded within the primate medial temporal lobe: implications for hippocampal function. **Neurosci Biobehav Rev**., v. 36, n. 7, p. 1579-96, 2012.

AGGLETON, J. P.; BROWN, M. W.; ALBASSER, M. M. Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. **Neuropsychologia**, v. 50, n. 13, p. 3141-55, 2012.

AKAZAWA, Y. *et al*. Forced mastication increases survival of adult neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus. **Int J Mol Med**., v. 31, n. 2, p. 307-314, 2013.

ALLEN, K. *et al*. Hippocampal place cells can encode multiple trial-dependent features through rate remapping. **J Neurosci,** v. 32, n. 42, p. 14752-66, 2012.

ANDERSON, J. R. Learning and Retention. Language, Memory and Thought. **Lawrence Erlbaum Associates Inc**., New Jersey, 1976, p. 378–437.

Ansiedade, 2014. Disponível em <http://thebrain.mcgill.ca/flash/i/i_04/i_04_cr/i_04_cr_peu/i_04_cr_peu.html> **Acesso em: 20 fev. 2014.**

ARAKAWA, Y. *et al.* Duration-dependent effects of the bite-raised condition on hippocampal function in SAMP8 mice. **Okajimas Folia Anat Jpn**. v. 84, n. 3, p. 115-119, 2007.

BANNERMAN, D. M. *et al.* Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neurosci Biobehav Rer**., v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.

BANNERMAN, D. M. e*t al.* Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. **Nat Rev Neurosci**., v. 15, n. 3, p. 181-92, 2014.

BEAUDREAU, S. A.; O'HARA, R. Late-life anxiety and cognitive impairment: a review. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 16, n. 10, p. 790–803, 2008.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav. Brain Res**., v. 125, n. 1–2, p.141–149, 2001.

BERR, C. Cognitive impairment and oxidative stress in the elderly: results of epidemiological studies. **Biofactors**, v. 13, n. 1-4, p. 205-209, 2000.

BERRETIN-FELIX, G. *et al.* Masticatory function in temporomandibular dysfunction patients: electromyographic evaluation. **J Appl Oral Sci**., v. 13, n. 4, p. 360-365, 2005.

BESSA, J. M. *et al*. Age related qualitative shift in emotional behaviour: paradoxical findings after re-exposure of rats in the elevated-plus maze. **Behav Brain Res**., v. 162, n. 1, p 135-42, 2005.

BEUZEN, A.; BELZUNG, C.; Link between emotional memory and anxiety states: a study by principal componente analysis. **Physiol. Behav**., v. 58, n. 1, p. 111–118, 1995.

BIANCHINI, E. M. G. (Ed.) Mastigação e ATM Avaliação e Terapia. In: MARCHESAN, I. Q. Fundamentos em Fonoaudiologia – Aspectos Clínicos da Motricidade Oral, 2ª ed., 2005, p.45-57.

BLANCHARD-FIELDS, F. Flexible and socio-emotional problem solving in adult development and ageing. **Restor Neurol Neruosci**., v. 27, n. 5, p. 539–550, 2009.

BLOKLAND, A.; RAAJIMAKERS, W. Age-related changes in correlation between behavioral and biochemical parameters in Lewis rats. **Behav Neural Biol**., v. 60, n. 1, p. 52–61, 1993.

BOGUSZEWSKI, P.; ZAGRODZKA, J. Emotional changes related to age in rats–a behavioral analysis**. Behav Brain Res**., v. 133, n. 2, p. 323–332, 2002.

BROWN; ZADOR. Hippocampus. Shepherd GM, editor. New York: Oxford University Press, 1990.

BUDTZ-J0RGENSEN, E. Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. **Journal of oral pathology**., v. 10, n. 2, p. 65 -80, 1981.

BURGHARDT, P. R. *et al*. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. **Brain Res,** v.1019**,** n. 1-2, p.84-96, 2004.

BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nat Rev Neurosci**., v. 7, n. 1, p. 30-40, 2006.

BURNS, A.; BYRNE, E. J.; MAURER, K. Alzheimer's desease. **The Lancet**, v. 360, p. 163-165, 2002.

CARR, M. F.; FRANK, L. M. A single microcircuit with multiple functions: state dependent information processing in the hippocampus. **Curr Opin Neurobiol**., v. 22, n. 4, p. 704-8, 2012.

CARSTENSEN, L. L. *et al*. Emotional experience in everyday life across the adult life span. **J Pers Soc Psychol**., v. 79, n. 4, p. 644–655, 2000.

CATANI, M. *et al.* Virtual in vivo interactive dissection of white matter fasciculi in the human brain. **Neuroimage**, v. 17, n. 1, p. 77–94, 2002.

CHAPILLON, P. *et al.* Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. **Dev Psychobiol**., v. 41, n. 4, p. 373–387, 2002.

CHEN, G. H. *et al* Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. **Physiol Behav**., v. 91, n. 5, p. 644-51, 2007.

CLARK, R. E.; SQUIRE, L. R. Similarity in form and function of the hippocampus in rodents, monkeys, and humans. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 110 Suppl 2, p. 10365-70, 2013.

CORRELL, R. E.; SCOVILLE, W. B. Effects of medial temporal lesions on visual discrimination performance. **J Comp Physiol Psychol**., v. 60, n. 2, p. 175-81, 1965.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. **Nature**, v. 4, n. 9, p. 775-790, 2005.

CRYAN, J. F.; SWEENEY, F.F. The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug Discovery**. Br. J. Pharmacol**., v. 164, n. 4, p. 1129–1161, 2011.

DAVIS, M. *et al*. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 105–135, 2009.

DE ALMEIDA, M. N. F. *et al.* Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes. **BMC Neurosci**., v. 13, n**.** 23, 2012.

DESGRANGES, B. *et al.* Cerebral imaging in healthy aging: contrast with Alzheimer disease. **Rev Neurol.,** v. 164, n 3, p. 102-107, 2008.

DINIZ, D G. *et al.* Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **Eur J Neurosci.,** v. 32, n. 3, p. 509-519, 2010.

DROGE, W.; SCHIPPER, H. M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. **Aging Cell**. v. 6, n. 3, p. 361-70, 2007.

DUCHEMIN, S. *et al*. Chronic perfusion of angiotensin II causes cognitive dysfunctions and anxiety in mice. **Physiology & behavior**., v. 109, p. 63 -68, 2013.

DUMAN, C. H. *et al.* Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Res.**, v. 1199, p.148-58, 2008.

DUPIRE, A. *et al*. A role for anterior thalamic nuclei in affective cognition: interaction with environmental conditions. **Hippocampus**., v. 23, n. 5, p. 392-404, 2013.

EKUNI, D. *et al*. Occlusal disharmony increases amyloid-β in the rat hippocampus. **Neuromol Med.**, v. 13, n. 3, p. 197–203, 2011.

ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. **Behav Pharmacol**., v. 18, n. 5-6, p. 365–374, 2007.

ESPEJO, E. F. Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. **Brain Res**., v. 762, n. 1-2, p. 281–284, 1997.

ETKIN, A. *et al.* Failure of anterior cingulate activation and connectivity with the amygdala during implicit regulation of emotional processing in generalized anxiety disorder. **Am J Psychiatry**., v.167, n. 5, p. 545-54, 2010.

ETKIN, A.; GYURAK, A.; O'HARA, R. A neurobiological approach to the cognitive deficits of psychiatric disorders. **Dialogues Clin Neurosci**., v. 15, n. 4, p. 419-29, 2013.

EYSENCK, M. W. *et al*. Anxiety and cognitive performance: attentional control theory. **Emotion**, v. 7, n. 2, p. 336–353, 2007.

EYSENCK, M. W. Models of memory: information processing. **Psychopharmacol Ser**, v. 6, p. 3–11, 1988.

FLOOD, J. F; MORLEY, J. E. Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in senescence accelerated mouse (SAM). **Neurobiol Aging**, v. 14, n. 2, p. 153-157, 1993.

Formação Hipocampal, 2014. Disponível em <http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus_schema_mittel.jpg> Acesso em: 20 fev. 2014.

FOSTER, T. C.; DEFAZIO, R. A.; BIZON, J. L. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. **Front Aging Neurosci**., v. 4, n. 12, 2012.

FRANCIS, D. D. *et al.* Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **J Neurosci**., v. 22, n. 18, p. 7840–7843, 2002.

FREEMAN, A. I. *et al*. Glucocorticoid down-regulation of rat glucocorticoid receptor does not involve differential promoter regulation. **J Endocrinol.**, v.183, n. 2, p. 365-74, 2004.

FRUSSA-FILHO, R *et al*. Effect of age on antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure. **Braz J Med Biol Res**., v. 25, n. 8, p. 827–829, 1992.

GÓMEZ, F. M.; ORTEGA, J. E.; HORRILLO, I.; MEANA, J. J. Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. **Journal of oral rehabilitation**, v. 37, n. 11, p. 827 -833, 2010.

GÖRTZ, N. *et al*. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. **Behav Brain Res**., v. 191, n. 1, p. 43-8, 2008.

GREENWOOD, B. N. *et al.* Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. **J Neurosci.,** v. 23, n. 7, p.2889-98, 2003.

GUNNING-DIXON, F. M. et al. Age-related differences in brain activation during emotional face processing. **Neurobiol Ageing**, v. 24, n. 2, p. 285–295, 2003.

HAFTING, T. *et al*. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. **Nature,** v. 436, n. 7052, p. 801-6, 2005.

HALE, M. W. *et al.* Exposure to an open-field arena increases c-fos expression in a distributed anxiety-related system projecting to the basolateral amygdaloid complex. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 659–672, 2008.

HARBURGER, L. L.; LAMBERT, T. J.; FRICK, K. M. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. **Behav Brain Res**., v. 185, n. 1, p. 43-48, 2007.

HARGREAVES, E. L. *et al.* Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. **Science**, v. 308, n. 5729, p. 1792–1794, 2005.

HEAD, E. Oxidative Damage and Cognitive Dysfunction: Antioxidant Treatments to Promote Healthy Brain Aging. **Neurochem Res.,** v. 34, n. 4, p. 670–678, 2009.

HERMAN, J. P.; ADAMS, D.; PREWITT, C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. **Neuroendocrinology**, v. 61, n. 2, p. 180-90, 1995.

HERMAN, J. P.; DOLGAS, C. M.; CARLSON, S. L. Ventral subiculum regulates hypothalamo-pituitary-adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. **Neuroscience**, v. 86, n. 2, p. 449–459, 1998.

HERMAN, J. P. et al. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. **Mol Endocrinol**., v. 3, n. 11, p. 1886-94, 1989.

HIRANO, Y. *et al*. Effects of chewing in working memory processing. **Neurosci Lett,** v. 436, n. 2, p. 189-92, 2008.

HIRANO, Y. *et al*. Effects of chewing on cognitive processing speed. **Brain Cogn,** v. 81, n. 3, p. 376-81, 2013.

HORI, N.; YUYAMA, N.; TAMURA, K. Biting suppresses stress-induced expression of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus. **J Dent Res.**, v. 83, n. 2, p. 124-128, 2004.

ICHIHASHI, Y. *et al.* Occlusal disharmony attenuates glucocorticoid negative feedback in aged SAMP8 mice. **Neurosci Lett**, v. 427, n. 2, p. 71-76, 2007.

IINUMA, M. *et al.* Malocclusion induces chronic stress. **Okajimas Folia Anat Jpn**., v**.** 85, n. 1, p. 35-42, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Brasileiro-2010.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1866&id_pagina=1> Acesso em: 04 nov. 2013.

JOCA, S. R. L; PADOVAN, C. M.; GUIMARAES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Rev. Bras. Psiquiatr**., São Paulo, v. 25, n. 2, 2003.

JONES, E. G. The origins of cortical interneurons: mouse versus monkey and human. ***Cereb. Cortex***, v. 19, n. 9, p. 1953–1956, 2009.

KALUEFF, A. V.; WHEATON, M.; MURPHY, D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression. **Behav. Brain Res**., v. 179, n. 1, p. 1–18, 2007.

KANEKO, M. *et al*. Biting suppresses Fos expression in various regions of the rat brain – further evidence that the masticatory organ functions to manage stress. **Stomatologie**, v. 101, p. 151–156, 2004.

KARLSSON, M. P.; FRANK, L. M. Network dynamics underlying the formation of sparse, informative representations in the hippocampus. **J Neurosci**., v. 28, n. 52, p. 14271-81, 2008.

KATO, T. *et al*. The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. **Behav Brain Res**., v. 83, n. 1-2, p. 239-242, 1997.

KEMPERMANN, G. *et al*. Why and how physical acticity promotes experience-induced brain plasticity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 4, 2010.

KERR, A. L. *et al*. Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. **Neuroscience**, v. 171, n. 1, p. 214–226, 2010.

KESSELS, R. P. C. *et al.* Varieties of humam spatial memory. A meta-analysis on the effects of hippocampal lesion. **Brain Research Rev**. v. 35, n. 3, p. 295-303, 2001.

KIER, E. L. *et al.* MR imaging of the temporal stem: Anatomic dissection tractography of the uncinate fasciculus, inferior occipitofrontal fasciculus, and meyer's loop of the optic radiation. **AJNR Am J Neuroradiol**., v.25, n. 5, p. 677–691, 2004.

KIM, J. J.; SONG, E. Y.; KOSTEN, T. A. Stress effects in the hippocampus: synaptic plasticity and memory. **Stress**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2006.

KIM, M. J.; WHALEN, P. J. The structural integrity of an amygdala-prefrontal pathway predicts trait anxiety. **J Neurosci**., v. 29, n. 37, p. 11614–11618, 2009.

KJELSTRUP, K. G. *et al.* Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proc Natl Acad SciUSA**, v**.** 99, n. 16, p. 10825–10830, 2002.

KNAPSKA, E. *et al*. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiol Rev.,** v. 87, n. 4, p. 1113–1173, 2007.

KOHMAN, R.A. *et al.* Rhodes Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. **PLoS One**, v. 6, n. 8, 2011.

KONKLE, A. T. *et al*. Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. **J Am Assoc Lab Anim Sci**., v. 49, n. 4, p. 427–436, 2010.

KUBO, K. Y. *et al.* Molarless-induced changes of spines in hippocampal region of SAMP8 mice. **Brain Res**., v. 1057, n. 1-2, p. 191-195, 2005.

KUBO, K. Y, *et al.* Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. **Neurosci Lett**, v. 414, n. 2, p 188-191, 2007.

KUBO, K. Y. *et al.* The bite-raised condition enhances the aging process in the dorsal and ventral hippocampus. **Okajimas Folia Anat Jpn**., v. 85, n. 2, p. 43-48, 2008.

KUBO, K. Y. *et al.* Masticatory function and cognitive function. **Okajimas Folia Anat Jpn**., v. 87, n. 3, p 135-140, 2010.

KUSHIDA, S. *et al.* Soft-diet feeding decreases dopamine release and impairs aversion learning in Alzheimer model rats. **Neurosci Lett**, v. 439, n. 2, p. 208-211, 2008.

LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J. Age-related changes in spontaneous behavior and learning in NMRI mice from middle to old age**. Physiol Behav**., v. 51, n. 1, p. 81–88, 1992.

LAMBERTY, Y.; GOWER, A. J. Spatial processing and emotionality in aged NMRI mice: a multivariate analysis**. Physiol Behav**, v. 54, n. 2, p. 339–343, 1993.

LARCOM, M. J.; ISAACOWITZ, D. M. Rapid emotion regulation after mood induction: age and individual diferences. **J Gerontol: B Psychol Sci Soc Sci**, v. 64, n. 6, p. 733–744, 2009.

LARSSON, F.; WINBLAD, B.; MOHAMMED, A. H. Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats. **Pharmacol Biochem Behav**., v. 73, n. 1, p. 193–207, 2002.

LAVIOLA, G. *et al*. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. **Eur J Neurosci**., v. 20, n. 6, p. 1655–1664, 2004.

LEASURE, J. L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. **Neuroscience**, v.156, n. 3, p.456-65, 2008.

LENT, Roberto. Neurociência da mente e do comportamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, cap. 11, p. 241-252.

LI, J. W. *et al*. Relation between age-related changes in hyper-emotionality and serotonergic neuronal activitites in rat limbic system**. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, v. 15, n. 3, p. 231–238, 1995.

LICINIO, J.; WONG, M. L. Depression, antidepressants and suicidality: a critical appraisal. **Nature Rev. Drug Discov**., v. 4, n. 2, p. 165–171, 2005.

LISTA, I.; SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. **Cellular Mol. Neurobiol**., v. 30, n. 4, p. 493–503, 2010.

LIU, D. *et al*. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659–62, 1997.

LLEDO, P. M.; ALONSO, M.; GRUBB, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosci**., v. 7, n. 3, p. 179-93, 2006.

MATHER, M. *et al*. Amygdala responses to emotionally valenced stimuli in older and younger adults. **Psychol Sci**., v. 15, n. 4, p. 259–263, 2004.

MCCLURE, E. B. *et al.* Abnormal attention modulation of fear circuit function in pediatric generalized anxiety disorder. **Arch Gen Psychiatry**., v. 64, n. 1, p. 97-106, 2007.

MCGAUGH, J. L. Memory – A century of consolidation. **Science**, v. 287, p. 248- 251, 2000.

MCNAUGHTON, N.; GRAY, J. A. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 61, n. 3, p. 161–176, 2000.

MEANEY, M. J.; SZYF, M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. **Dialogues Clin Neurosci**., v. **7**, n. 2, p. 103–123, 2005.

MENDES, F. C. C. S. *et al.* Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. **BMC Neuroscience,** v. 14, n.63, 2013.

MILGRAM, N. W. *et al*. Neuroprotective effects of cognitive enrichment. **Ageing Research Reviews,** v. 5, n. 3, p. 354–369, 2006.

MIURA, H. *et al.* Relationship between cognitive function and mastication in elderly females. **Journal of oral rehabilitation,** v. 30, n. 8, p. 808-811, 2003.

MIYAGAWA, H *et al*. Dissociation of impairment between spatial memory and motor functions and emotional behavior in aged rats**. Behav Brain Res**., v. 91, n. 1-2, p. 73–81, 1998.

MIYAMOTO, I. *et al*. Rehabilitation with dental prosthesis can increase cerebral regional blood volume. **Clin Oral Implants Res.**, v. 16, n. 6, p. 723-7, 2005.

MOGHADDAM, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal gangli. **J Neurochem**, v.60, n. 5, p. 1650-7, 1993.

MONCEK, F. *et al*. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. **J Neuroendocrinol.**, v.16, n. 5, p. 423-31, 2004.

MONK, C. S. *et al.* Amygdala and ventrolateral prefrontal cortex activation to masked angry faces in children and adolescents with generalized anxiety disorder. **Arch Gen Psychiatry**., v. 65, n. 5, p. 568-76, 2008.

MONK, C. S. *et al.* Ventrolateral prefrontal cortex activation and attentional bias in response to angry faces in adolescents with generalized anxiety disorder. **Am J Psychiatry**., v. 163, n. 6, p. 1091-7, 2006.

MORELLINI, F. Spatial memory tasks in rodents: what do they model? **Cell Tissue Res**., v. 354, n. 1, p. 273–286, 2013.

MORIYA, S. *et al.* Associations between self-assessed masticatory ability and higher brain function among the elderly. **Journal of Oral Rehabilitation,** v. 38, n. 10, p. 746–753, 2011.

MORRIS, R. G. *et al.* Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, n. 5868, p. 681-683, 1982.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods,** v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984.

MOSER, E.; MOSER, M. B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3916-3925, 1993.

NAGAHARA, A. H.; HANDA, R. J. Age-related changes in c-fos mRNA induction after open-field exposure in the rat brain. **Neurobiol Ageing**., v. 18, n. 10, p. 45–55, 1997.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nat Rev Neurosci**., v. 7, n. 9 p. 697-709, 2006.

NITSCHKE, J. B. *et al*. Anticipatory activation in the amygdala and anterior cingulate in generalized anxiety disorder and prediction of treatment response. **Am J Psychiatry**., v. 166, n. 3, p. 302-10, 2009.

NOSE-ISHIBASHI, K. *et al*. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: Potential increase in vulnerability to mental disorders**. Neuroscience**, v. 263, n. 28, p. 257–268, 2014.

OBIANG, P. *et al.* Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. **Neurobiol Learn Mem**., v. 96, n. 2, p. 121-129, 2011.

OHTA, A. *et al.* Behavioral characteristics of the SAM-P/8 strain in Sidman active avoidance task. **Brain Res**., v. 498, n. 1, p. 195-198, 1989.

OKADA, S. *et al*. Effects of biting on elevation of blood pressure and other physiological responses to stress in rats: biting may reduce allostatic load. **Brain Res**., v. 1185**,** p. 189–194, 2007.

OKAMOTO, N. *et al*. Tooth loss is associated with mild memory impairment in the elderly: the Fujiwara-kyo study. **Brain Research**, v. 1349, p. 68–75, 2010.

OLIVEIRA, T. *et al.* Beneficial effects of multisensory and cognitive stimulation on age-related sognitive decline in long-term-care institutions. **Clinical Interventions and Aging**, v. 9, p. 1-13, 2014.

ONO, Y. *et al*. Chewing ameliorates stress-induced suppression of hippocampal long-term potentiation. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1352-9, 2008.

ONO, Y. *et al*. Chewing rescues stress-suppressed hippocampal long-term potentiation via activation of histamine H1receptor. **Neurosci Res**., v. 64, n. 4, p. 385-90, 2009.

ONO, Y. *et al.* Occlusion and brain function: mastication as a prevention of cognitive dysfunction. **J Oral Rehabil**., v. 37, n. 8, p. 624-640, 2010.

ONOZUKA, M. *et al*. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. **Brain Res.**, v. 826, n. 1, p. 148-153, 1999.

ONOZUKA, M. *et al*. Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. **Behav Brain Res**., v. 108, n. 2, p. 145-155, 2000.

ONOZUKA, M. *et al*. Evidence for involvement of glucocorticoid response in the hippocampal changes in aged molarless SAMP8 mice. **Behav Brain Res**., v. 131, n. 1-2, p. 125-129, 2002.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. World population ageing: 1950-2050. Department of economic and social affairs population division, New York, 2001. Disponível em: <www.un.org/esa/population/publications/worldageing19502050/> Acesso em: 04 nov. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Active Ageing A Policy Framework. Noncommunicable Diseases and Mental Health Cluster and Noncommunicable Disease Prevention and Health Promotion Department. Geneva, 2002. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/who_nmh_nph_02.8.pdf > Acesso em: 04 nov. 2013.

PANG, T. Y.; HANNAN, A. J. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 515–528, 2013.

PETIT-TABOUE, M. C. *et al.* Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. **Neuroimage**, v. 7, n. 3, p. 176-84, 1998.

PHAN, K. L. *et al*. Preliminary evidence of white matter abnormality in the uncinate fasciculus in generalized social anxiety disorder. **Biol Psychiatry**., v. 66, n. 7, p. 691–694, 2009.

PIETROPAOLO, S.; FELDON, J.; YEE, B. K. Environmental enrichment eliminates the anxiety phenotypes in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Cogn Affect Behav Neurosci.** 2014.

PISARSKA, M. *et al*. Age-related alterations in emotional behaviors and amygdalar corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein expression. In aged Fischer 344 rats. **Brain Res**., v. 877, n. 2, p. 184-90, 2000.

POUCET, B.; SAVE, E.; LENCK-SANTINI, P. P. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. **Rev. Neurosci**., v. 11, p. 95–111, 2000.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **Eur J Pharmacol**., v. 463, n. 1-3, p. 3–33, 2003.

REYNOLDS, S.; LANE, S. J.; RICHARDS, L. Using animal models of enriched environments to inform research on sensory integration intervention for the rehabilitation of neurodevelopmental disorders. **J Neurodev Disord**., v. 2, n. 3, p. 120-32, 2010.

RIDDLE, D. R. *et al.* Microvascular plasticity in aging. **Ageing Res Rev**., v. 2, n. 2, p. 149-68, 2003.

ROALF, D.R. *et al*. More is less: Emotion induced prefrontal cortex activity habituates in ageing. **Neurobiol Ageing**, v. 32, n. 9, p. 1634-50, 2011.

RODRIGUEZ, J. J. *et al.* Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. **Eur J Neurosci**., v. 21, n. 9, p. 2384-2396, 2005.

ROZENTHAL, M.; LAKS, J.; ENGELHARDT, E. Aspectos neuropsicológicos da depressão. **R. Psiquiatr**., v. 26, n.2, p. 204-212, 2004.

RUMSFELD, J. S.; HO, P. M. Depression and cardiovascular disease: a call for recognition. **Circulation**, v. 111, n. 3, p. 250–253, 2005.

SAKAMOTO, K.; NAKATA, H.; KAKIGI, R. The effect of mastication on human cognitive processing: A study using event-related potentials. **Clinical Neurophysiology**, v. 120, n. 1, p. 41–50, 2009.

SALMON, D. P.; BUTTERS, N. Neurobiology of skill and habit learning. **Current Opinions in Neurobiology**, v. 5, n. 2, p. 184–190, 1995.

SAPOLSKY R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. **Proc Natl Acad Sci U S A**., v. 81, n. 19, p. 6174-7, 1984.

SAPOLSKY, R. M.; KREY, L. C.; MCEWEN, B. S. The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. **Endocr Rev**., v. 7, n. 3, p. 284-301, 1986.

SARTORI, S. B.; LANDGRAF, R.; SINGEWALD, N. The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. **Future Neurol**., v. 6, n. 4, p. 531–571, 2011.

SCULLY, D. *et al*. Regional dissociation of paradigm-specific synapse remodeling during memory consolidation in the adult rat dentate gyrus. **Neuroscience,** v. 209, p. 74-83, 2012.

SEGOVIA, G. *et al.* Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 1, p. 1-29, 2001.

SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sci.,** v. 87, n. 17-18, p. 521-536, 2010.

SIGRIST, S. J *et al*. Spermidine-triggered autophagy ameliorates memory during aging. **Autophagy. v. 10, n. 1, p. 178-9, 2013.**

SIMONATO, M. *et al*. Disaturated-phosphatidylcholine and surfactant protein-B turnover in human acute lung injury and in control patients. **Respir Res**., v. 12, n. 36, p. 1-7, 2011.

SPIERS, H. J. *et al.* Place Field Repetition and Purely Local Remapping in a Multicompartment Environment. **Cereb Cortex**, p. 1-16, 2013 [Epud ahead of print].

STALNAKER, T. A.; ESPANA, R. A.; BERRIDGE, C. W. Coping behavior causes asymmetric changes in neuronal activation in the prefrontal cortex and amygdala. **Synapse**, v. 63, n. 1, p. 82–85, 2009.

SULLIVAN, R. M.; SZECHTMAN, H. Asymmetrical influence of mesocortical dopamine depletion on stress ulcer development and subcortical dopamine systems in rats: implications for psychopathology. **Neuroscience.,** v. 65, n. 3, p. 757–766, 1995.

TECOTT, L. H.; NESTLER, E.J. Neurobehavioral assessment in the information age. **Nat Neurosci.**, v. 7, n. 5, p. 462-6, 2004.

TENG, C. T; HUMES, E. C.; DEMETRIO, F. N. Depressão e comorbidades clínicas. **Rev. Psiquiatr. Clin**., v. 32, n. 3, p. 149-159, 2005.

TENG, E. *et al*. Contrasting effects on discrimination learning after hippocampal lesions and conjoint hippocampal-caudate lesions in monkeys. **J Neurosci,** v. 20, n. 10, p. 3853-63, 2000.

TESSITORE, A. *et al*. Functional changes in the activity of brain regions underlying emotion processing in the elderly. **Psychiatry Res.**, v. 139, n. 1, p. 9–18, 2005.

TORRAS-GARCIA, M. *et al*. Decreased anxiety levels related to aging. **Exp Brain Res**., v. 164, n. 2, p. 177–184, 2005.

TORRES, J. B. *et al*. NADPH-diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances. **Experimental Brain Research.,** v. 175, n. 2, p. 292-304, 2006.

TROMP, D. P. *et al.* Reduced structural connectivity of a major frontolimbic pathway in generalized anxiety disorder. **Arch Gen Psychiatry**., **v. 69, n. 9, p. 925-34, 2012.**

TSUTSUI, K. *et al.* Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. **Biomed Res**.,v. 28, n. 1, p. 1-7, 2007.

TURNER, D. A. *et al.* Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog. Neurobiol.**, v. 55, n. 6, p.537-562, 1998.

VAN HOOMISSEN, J.D. *et al.* Effects of beta-adrenoreceptor blockade during chronic exercise on contextual fear conditioning and mRNA for galanin and brain-derived neurotrophic factor. **Behav Neurosci**., v.118**,** n. 6, p.1378-90, 2004.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular Med**., v. 10, n. 2, p. 128–140, 2008.

VAN PRAAG, H., KEMPERMANN, G., GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews**, v.1, n.3, p.191-198, 2000.

VAN'T VEER-TAZELAAR, P. J. *et al*. Depression in old age (75+), the PIKO study. **J Affect Disord**, v. 106, n. 3, p. 295–299, 2008.

VOLKERS, K. M.; SCHERDER, E. J Impoverished environment, cognition, aging and dementia. **Rev Neurosci.**, v. 22, n. 3, p. 259-266, 2011.

WANG, F. *et al.* Functional and structural connectivity between the perigenual anterior cingulate and amygdala in bipolar disorder. **Biol Psychiatry**, v.66, n. 5, p. 516–521, 2009.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci.,** v. 2, n. 12, p. 1-13, 2010.

WATANABE, K. *et al*. Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice. **Experimental Gerontology,** v. 36, n. 2, p. 283-295, 2001.

WATANABE, K. *et al.* The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. **Behav Brain Res**., v. 128, n. 1, p.19-25, 2002.

WEIJENBERG, R. A.; SCHERDER, E. J.; LOBBEZOO, F. Mastication for the mind--the relationship between mastication and cognition in ageing and dementia. **Neurosci Biobehav Rev**., v. 35, n. 3, p. 483-497, 2011.

WHALEN, P. J. *et al.* A functional magnetic resonance imaging predictor of treatment response to venlafaxine in generalized anxiety disorder. **Biol Psychiatry**., v. 63, n. 9, p. 858-63, 2008.

WILLIAMS, L. M. *et al*. The mellow years?: neural basis of improving emotional stability over age. **J Neurosci**., v. 26, n. 24, p. 6422–6430, 2006.

WINOCUR, G. Environmental influences on cognitive decline in aged rats. **Neurobiol Aging**, v. 19, n. 6, p. 589-597, 1998.

WITTER, M. P. *et al*. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. **Progress in Neurobiology**., v. 33, n. 3, p. 161–253, 1989.

WONG, L. L. R.; CARVALHO, J. A. O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. **Bras. Est. Pop**., São Paulo, v. 23, n. 1, p. 5-26, 2006.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Rev. Neurosci**., v. 2, n. 5, p. 343–351, 2001.

WU, B. *et al.* Cognitive function and oral health among community-dwelling older adults. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**., v. 63, n. 5, p. 495-500, 2008.

WU, C.W. *et al*. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. **J. Appl. Physiol**., v. 105, n. 5, p. 1585–1594, 2008.

YAGI, H. *et al.* Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. **Brain Res**., v. 474, n. 1, p. 86-93, 1988.

YAMAMOTO, T.; HIRAYAMA, A. Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. **Brain Research,** v. 902, n. 2, p. 255–263, 2001.

YAMAMOTO, T.; HIRAYAMA, A. Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. **Brain Res**., v. 902, n. 2, p. 255-263, 2001.

YAMAZAKI, K. *et al.* Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 6, p. 542-547, 2008.

YEE, B. K. *et al.* Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety and fear related behaviour in C57BL6 mice. **J Neural Transm**., v. 114, n. 4, p. 431-44, 2007.

ZHANG, T. Y. *et al*. Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 111–123, 2013.

ZHU, X. *et al*. Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen**., v. 19, n. 6, p. 345-52, 2004.

APÊNDICES – QUADRO DE SIGNIFICÂNCIAS ESTATÍSTICAS

Quadro 8: Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para o índice de tempo preferencial na zona periférica do campo aberto** para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para o Tempo Preferencial na Zona Periférica											
GRUPOS	***HD AP 6M***	***HD/SD AP 6M***	***HD/SD/HD AP 6M***	***HD AP 18M***	***HD/SD AP 18M***	***HD/SD/HD AP 18M***	***HD AE 6M***	***HD/SD AE 6M***	***HD/SD/HD AE 6M***	***HD AE 18M***	***HD/SD AE 18M***	***HD/SD/HD AE 18M***
HD AP 6M	-	$q_{(12)} = 5,62$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 6,51$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 2,31$ $p < 0,04$	-	-	$q_{(12)} = 3,18$ $p < 0,008$	-	-	-	-	-
HD/SD AP 6M	$q_{(12)} = 5,62$ $p < 0,0001$	-	-	-	$q_{(12)} = 2,49$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 6M	$q_{(12)} = 6,51$ $p < 0,0001$	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,49$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-
HD AP 18M	$q_{(12)} = 2,31$ $p < 0,04$	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,62$ $p < 0,02$	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 18M	-	$q_{(12)} = 2,49$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,55$ $p < 0,03$	-
HD/SD/HD AP 18M	-	-	$q_{(12)} = 2,49$ $p < 0,03$	$q_{(12)} = 2,62$ $p < 0,02$	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,19$ $p < 0,05$
HD AE 6M	$q_{(12)} = 3,18$ $p < 0,008$	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 7,22$ $p < 0,0001$	-	-
HD/SD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 7,22$ $p < 0,0001$	-	-	-	$q_{(12)} = 7,83$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 7,32$ $p < 0,0001$
HD/SD AE 18M	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,55$ $p < 0,03$	-	-	-	-	$q_{(12)} = 7,83$ $p < 0,0001$	-	-
HD/SD/HD AE 18M						$q_{(12)} = 2,19$ $p < 0,05$				$q_{(12)} = 7,32$ $p < 0,0001$		

Quadro 9: Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para o índice de distância percorrida preferencialmente na zona periférica do campo aberto** para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para o Índice de Distância Percorrida Preferencialmente na Zona Periférica											
GRUPOS	***HD AP 6M***	***HD/SD AP 6M***	***HD/SD/HD AP 6M***	***HD AP 18M***	***HD/SD AP 18M***	***HD/SD/HD AP 18M***	***HD AE 6M***	***HD/SD AE 6M***	***HD/SD/HD AE 6M***	***HD AE 18M***	***HD/SD AE 18M***	***HD/SD/HD AE 18M***
HD AP 6M	-	$q_{(12)} = 2,53$ $p < 0,03$	$q_{(12)} = 2,94$ $p < 0,01$	-	-	-	$q_{(12)} = 3,83$ $p < 0,002$	-	-	-	-	-
HD/SD AP 6M	$q_{(12)} = 2,53$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 6M	$q_{(12)} = 2,94$ $p < 0,01$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 6M	$q_{(12)} = 3,83$ $p < 0,002$	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,86$ $p < 0,01$	-	-
HD/SD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,86$ $p < 0,01$	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,91$ $p < 0,01$
HD/SD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(12)} = 2,91$ $p < 0,01$	-	-

Quadro 10: Representação da **média** e respectivos valores de **erro-padrão** da **distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente empobrecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD).

	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m): média ± erro-padrão				
	Ambiente Empobrecido				
GRUPOS	**1º minuto**	**2º minuto**	**3º minuto**	**4º minuto**	**5º minuto**
HD – 6M	4,25 ± 0,47	3,27 ± 0,53	2,32 ± 0,25*	1,67 ± 0,23*	1,93 ± 0,37*
HD/SD – 6M	4,07 ± 0,39	3,23 ± 0,69	2,31 ± 0,49	1,57 ± 0,35*	1,71 ± 0,31*
HD/SD/HD – 6M	2,94 ± 0,35	1,72 ± 0,28*	1,49 ± 0,22*	1,23 ± 0,15*	1,30 ± 0,12*
HD – 18M	3,01 ± 0,29	1,36 ± 0,23*	0,78 ± 0,11*	1,10 ± 0,21*	0,58 ± 0,12*
HD/SD – 18M	3,22 ± 0,14	2,18 ± 0,3*	1,15 ± 0,19**	1,41 ± 0,28*	1,24 ± 0,25*
HD/SD/HD – 18M	3,29 ± 0,31	2,17 ± 0,20*	1,84 ± 0,28*	1,59 ± 0,30*	1,47 ± 0,19*

(*) Indica diferença significativa intra-grupo com o primeiro minuto de teste; (**) diferença significativa intra-grupo simultânea com o primeiro e o segundo minutos de teste.

Quadro 11: Representação da **média** e respectivos valores de **erro-padrão** da **distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente enriquecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD).

	DISTÂNCIA PERCORRIDA (m): média ± erro-padrão				
	Ambiente Enriquecido				
GRUPOS	**1º minuto**	**2º minuto**	**3º minuto**	**4º minuto**	**5º minuto**
HD – 6M	4,34 ± 0,37	2,26 ± 0,18*	1,39 ± 0,13*	0,97 ± 0,31**	0,95 ± 0,17**
HD/SD – 6M	3,55 ± 0,44	1,66 ± 0,49*	1,28 ± 0,31*	1,17 ± 0,22*	1,09 ± 0,23*
HD/SD/HD – 6M	4,28 ± 0,31	2,21 ± 0,48*	1,47 ± 0,18*	0,89 ± 0,25**	1,51 ± 0,17*
HD – 18M	2,90 ± 0,30	1,22 ± 0,14*	1,23 ± 0,27*	0,80 ± 0,18*	0,96 ± 0,18*
HD/SD – 18M	3,10 ± 0,20	1,63 ± 0,17*	1,25 ± 0,28*	1,23 ± 0,26*	1,14 ± 0,30*
HD/SD/HD – 18M	3,17 ± 0,23	1,83 ± 0,17*	1,17 ± 0,20*	0,91 ±0,23*	1,10 ± 0,30*

(*) Indica diferença significativa intra-grupo somente com o primeiro minuto de teste; (**) diferença significativa intra-grupo simultânea com o primeiro e o segundo minutos de teste.

Quadro 12: Representação dos **valores de significância** para a análise da **distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente empobrecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para Distância Percorrida					
	Ambiente Empobrecido					
GRUPOS	**ANOVA-*one way***	**1º *vs* 2º (minuto)**	**1º *vs* 3º (minuto)**	**1º *vs* 4º (minuto)**	**1º *vs* 5º (minuto)**	**2º *vs* 3º (minuto)**
HD – 6M	$F_{(4,30)} = 7,46$ $p = 0,0004$	—	$q_{(12)} = 4,96$ $p < 0,05$	$q_{(12)} = 6,62$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 5,97$ $p < 0,01$	—
HD/SD – 6M	$F_{(4,30)} = 5,15$ $p = 0,003$	—	—	$q_{(12)} = 5,35$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 5,05$ $p < 0,01$	—
HD/SD/HD – 6M	$F_{(4,30)} = 8,53$ $p = 0,0002$	$q_{(12)} = 5,10$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 6,03$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 7,15$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 6,85$ $p < 0,01$	—
HD – 18M	$F_{(4,30)} = 22,92$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 8,17$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 11,05$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 9,46$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 12,04$ $p < 0,01$	—
HD/SD – 18M	$F_{(4,30)} = 13,22$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 4,33$ $p < 0,05$	$q_{(12)} = 8,64$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 7,54$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 8,24$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 4,31$ $p < 0,05$
HD/SD/HD – 18M	$F_{(4,30)} = 7,75$ $p = 0,0004$	$q_{(9)} = 4,27$ $p < 0,05$	$q_{(9)} = 5,53$ $p < 0,01$	$q_{(9)} = 6,47$ $p < 0,01$	$q_{(9)} = 6,92$ $p < 0,01$	—

Em ANOVA-*one way*, os valores de "F" e do p-valor obtidos ao comparar a distância percorrida entre os minutos de teste. Ao lado, os valores obtidos no pós-teste de Tukey (q) e do p-valor na comparação dos minutos significativamente diferentes.

Quadro 13: Representação dos **valores de significância** para a **análise da distância total percorrida** em metros, minuto a minuto, durante os 5 minutos de teste de campo aberto para os diversos grupos experimentais alojados em **ambiente enriquecido**, nas idades de 6 e 18 meses e em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD ou HD/SD/HD).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para Distância Percorrida						
	Ambiente Enriquecido						
GRUPOS	**ANOVA-one way**	**1º *vs* 2º (minuto)**	**1º *vs* 3º (minuto)**	**1º *vs* 4º (minuto)**	**1º *vs* 5º (minuto)**	**2º *vs* 4º (minuto)**	**2º *vs* 5º (minuto)**
HD – 6M	$F_{(4,30)} = 31,98$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 8,27$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 11,72$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 13,41$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 13,50$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 5,15$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 5,23$ $p < 0,01$
HD/SD – 6M	$F_{(4,30)} = 8,34$ $p = 0,0002$	$q_{(12)} = 5,29$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 6,36$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 6,67$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 6,91$ $p < 0,01$	—	—
HD/SD/HD – 6M	$F_{(4,30)} = 19,68$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 6,94$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 9,45$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 11,39$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 9,31$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 4,45$ $p < 0,05$	—
HD – 18M	$F_{(4,30)} = 14,73$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 7,61$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 7,57$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 9,51$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 8,82$ $p < 0,01$	—	—
HD/SD – 18M	$F_{(4,30)} = 11,14$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 5,96$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 7,52$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 7,61$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 7,96$ $p < 0,01$	—	—
HD/SD/HD – 18M	$F_{(4,30)} = 16,34$ $p < 0,0001$	$q_{(12)} = 5,85$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 8,74$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 9,89$ $p < 0,01$	$q_{(12)} = 9,03$ $p < 0,01$	—	—

Em ANOVA-*one way*, os valores de "F" e do p-valor obtidos ao comparar a distância percorrida entre os minutos de teste. Ao lado, os valores obtidos no pós-teste de Tukey (q) e do p-valor na comparação dos minutos significativamente diferentes.

Quadro 14: Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a taxa de aprendizado (%)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para a Taxa de Aprendizado (%) no Labirinto Aquático de Morris											
GRUPOS	***HD AP 6M***	***HD/SD AP 6M***	***HD/SD/HD AP 6M***	***HD AP 18M***	***HD/SD AP 18M***	***HD/SD/HD AP 18M***	***HD AE 6M***	***HD/SD AE 6M***	***HD/SD/HD AE 6M***	***HD AE 18M***	***HD/SD AE 18M***	***HD/SD/HD AE 18M***
HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 6,38$ $p < 0,0002$	-	$q_{(8)} = 5,05$ $p < 0,001$	-	-	$q_{(8)} = 3,8$ $p < 0,005$	-	-	-	-	-
HD/SD AP 6M	$q_{(8)} = 6,38$ $p < 0,0002$	-	$q_{(8)} = 3,85$ $p < 0,005$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 3,85$ $p < 0,005$	-	-	-	$q_{(8)} = 3,16$ $p < 0,01$	-	-	-	-	-	-
HD AP 18M	$q_{(8)} = 5,05$ $p < 0,001$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 18M	-	-	$q_{(8)} = 3,16$ $p < 0,01$	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,23$ $p < 0,01$
HD AE 6M	$q_{(8)} = 3,8$ $p < 0,005$	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,4$ $p < 0,009$	-	-	-	-
HD/SD AE 6M	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,4$ $p < 0,009$		$q_{(8)} = 2,72$ $p < 0,03$	-	-	-
HD/SD/HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,72$ $p < 0,03$	-	-	-	-
HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,87$ $p < 0,02$	-
HD/SD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,87$ $p < 0,02$	-	$q_{(8)} = 4,76$ $p < 0,001$
HD/SD/HD AE 18M	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,23$ $p < 0,01$	-	-	-	-	$q_{(8)} = 4,76$ $p < 0,001$	-

Quadro 15: Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a distância total percorrida (cm)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para a Distância Total Percorrida (cm) no Labirinto Aquático de Morris											
GRUPOS	***HD AP 6M***	***HD/SD AP 6M***	***HD/SD/HD AP 6M***	***HD AP 18M***	***HD/SD AP 18M***	***HD/SD/HD AP 18M***	***HD AE 6M***	***HD/SD AE 6M***	***HD/SD/HD AE 6M***	***HD AE 18M***	***HD/SD AE 18M***	***HD/SD/HD AE 18M***
HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 4,36$ $p < 0,002$	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,38$ $p < 0,04$	-	-	-	-	-
HD/SD AP 6M	$q_{(8)} = 4,36$ $p < 0,002$	-	$q_{(8)} = 4,66$ $p < 0,002$	-	$q_{(8)} = 2,72$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 4,66$ $p < 0,002$	-	-	-	$q_{(8)} = 2,78$ $p < 0,02$	-	-	-	-	-	-
HD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 18M	-	$q_{(8)} = 2,72$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 18M	-	-	$q_{(8)} = 2,78$ $p < 0,02$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 6M	$q_{(8)} = 2,38$ $p < 0,04$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,29$ $p < 0,01$	-
HD/SD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,29$ $p < 0,01$	-	$q_{(8)} = 5,18$ $p < 0,0008$
HD/SD/HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 5,18$ $p < 0,0008$	-

Quadro 16: Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a distância total percorrida no quadrante oposto à plataforma (cm)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para a Distância Total Percorrida no Quadrante Oposto à Plataforma (cm) no Labirinto Aquático de Morris											
GRUPOS	***HD AP 6M***	***HD/SD AP 6M***	***HD/SD/HD AP 6M***	***HD AP 18M***	***HD/SD AP 18M***	***HD/SD/HD AP 18M***	***HD AE 6M***	***HD/SD AE 6M***	***HD/SD/HD AE 6M***	***HD AE 18M***	***HD/SD AE 18M***	***HD/SD/HD AE 18M***
HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 2,55$ $p < 0,03$	-	$q_{(8)} = 2,36$ $p < 0,05$	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 6M	$q_{(8)} = 2,55$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AP 18M	$q_{(8)} = 2,36$ $p < 0,05$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,86$ $p < 0,02$	-
HD/SD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,86$ $p < 0,02$	-	$q_{(8)} = 2,27$ $p < 0,05$
HD/SD/HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 2,27$ $p < 0,05$	-

Quadro 17: Representação dos valores obtidos após a ANOVA-*three way* no **pós-teste de Tukey (q)** e **p-valor (p) significativos para a velocidade média (cm/s)** no 4º dia de teste no labirinto aquático de Morris para os diversos grupos experimentais em diferentes regimes de dieta (HD, HD/SD e HD/SD/HD), idade (6M e 18M) e ambiente (AP e AE).

	Valores de Significância de Amostras Pareadas para a Velocidade Média de Nado (cm/s) no Labirinto Aquático de Morris											
GRUPOS	***HD AP 6M***	***HD/SD AP 6M***	***HD/SD/HD AP 6M***	***HD AP 18M***	***HD/SD AP 18M***	***HD/SD/HD AP 18M***	***HD AE 6M***	***HD/SD AE 6M***	***HD/SD/HD AE 6M***	***HD AE 18M***	***HD/SD AE 18M***	***HD/SD/HD AE 18M***
HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 2,31$ $p < 0,05$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 6M	$q_{(8)} = 2,31$ $p < 0,05$	-	$q_{(8)} = 3,33$ $p < 0,01$	-	$q_{(8)} = 2,63$ $p < 0,03$	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 6M	-	$q_{(8)} = 3,33$ $p < 0,01$	-	-	-	$q_{(8)} = 2,39$ $p < 0,04$	-	-	-	-	-	-
HD AP 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AP 18M	-	$q_{(8)} = 2,63$ $p < 0,03$	-	-	-	$q_{(8)} = 2,87$ $p < 0,02$	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AP 18M	-	-	$q_{(8)} = 2,39$ $p < 0,04$		$q_{(8)} = 2,87$ $p < 0,02$	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD/SD/HD AE 6M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,07$ $p < 0,02$	-
HD/SD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	$q_{(8)} = 3,07$ $p < 0,02$	-	-
HD/SD/HD AE 18M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

cepae comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação

PARECER BIO005-09

Projeto: Alteração da atividade mastigatória e declínio cognitivo em modelo murino de senescência

Coordenador: Prof. Dra. Marcia Consentino Kronka

Área Temática: Biologia/Neurociências

Vigência: 03/2011 a 03/2014

No no CEPAE-UFPA: BIO004-09

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria No 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 17 de agosto de 2012

Prof. Dr. Walace Gomes Leal
Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa
Com Animais de Experimentação da Universidade
Federal do Pará

ANEXO B – PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

Mendes *et al. BMC Neuroscience* 2013, 14:63
http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/63

BMC Neuroscience

RESEARCH ARTICLE Open Access

Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice

Fabíola de Carvalho Chaves de Siqueira Mendes[1], Marina Negrão Frota de Almeida[1], André Pinheiro Gurgel Felício[1], Ana Carla Fadel[1], Diego de Jesus Silva[1], Thaíssa Gomes Borralho[1], Rodrigo Perez da Silva[1], João Bento-Torres[1], Pedro Fernando da Costa Vasconcelos[2], Victor Hugh Perry[3], Edson Marcos Leal Soares Ramos[4], Cristovam Wanderley Picanço-Diniz[1] and Marcia Consentino Kronka Sosthenes[1*]

Abstract

Background: To measure the impact of masticatory reduction on learning and memory, previous studies have produced experimental masticatory reduction by modified diet or molar removal. Here we induced spatial learning impairment in mice by reducing masticatory activity and then tested the effect of a combination of environmental enrichment and masticatory rehabilitation in recovering spatial learning at adulthood and in later life. For 6 months (6M) or 18 months (18M), we fed three groups of mice from postnatal day 21 respectively with a hard diet (HD) of pellets; pellets followed by a powdered, soft diet (HD/SD, divided into equal periods); or pellets followed by powder, followed by pellets again (HD/SD/HD, divided into equal periods). To mimic sedentary or active lifestyles, half of the animals from each group were raised from weaning in standard cages (impoverished environment; IE) and the other half in enriched cages (enriched environment; EE). To evaluate spatial learning, we used the Morris water maze.

Results: IE6M-HD/SD mice showed lower learning rates compared with control (IE6M-HD) or masticatory rehabilitated (IE6MHD/SD/HD) animals. Similarly, EE-HD/SD mice independent of age showed lower performance than controls (EE-HD) or rehabilitated mice (EE-HD/SD/HD). However, combined rehabilitation and EE in aged mice improved learning rate up to control levels. Learning rates did not correlate with swim speed.

Conclusions: Reduction in masticatory activity imposed on mice previously fed a hard diet (HD/SD) impaired spatial learning in the Morris water maze. In adults, masticatory rehabilitation recovered spatial abilities in both sedentary and active mice, and rehabilitation of masticatory activity combined with EE recovered these losses in aged mice.

Keywords: Mastication, Enriched environment, Masticatory rehabilitation, Spatial learning, Morris water maze

* Correspondence: makronka@gmail.com
[1]Universidade Federal do Pará/UFPA, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Rua dos Mundurucus, 4487 – Guamá Belém, Pará, Brasil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2013 Mendes et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

The proportion of the elderly population that experiences dementia is rapidly increasing, and both human and animal studies have indicated a relationship between reduced masticatory function (e.g., from occlusal disharmony) in elderly individuals and cognitive impairment [1,2]. In addition, data from human and animal reports reveal that an impoverished environment (IE) is associated with aggravation of aging-related cognitive decline; for a recent review see [3]. Indeed, compared with geriatric persons with poor levels of physical and social activities, exercise programs for institutionalized older people improve cognitive function [4-6]. Consistent experimental data from aged mice and rats maintained in IEs also point to spatial memory impairments in Morris water maze tests [7,8]. Water maze tests require acquisition and retrieval of spatial information [9], and this hippocampal-dependent task [10,11] can be impaired by a variety of structural/functional changes including aging [12], IE [3], and occlusal disharmony [2,13].

Human epidemiological studies [14-16] and experimental data from rodents [17-19] also show direct correlations between aging, masticatory imbalances (e.g., occlusal disharmony), and cognitive decline, but with no references to environmental conditions. Experimental approaches imposing masticatory deprivation, like tooth-loss [20], long-term soft diet [21], or bite-rise occlusion, suggest a behavioural displacement, but more research is needed into the effects of rehabilitation. Here we examined outcomes at the intersection of masticatory deprivation, environmental conditions, and spatial memory impairments in adult (6-month-old; 6M) and aged (18-month-old; 18M) mice. To assess the effects of masticatory rehabilitation on the Morris water maze task, we used different sequences of hard diet (HD) and soft diet (SD) on the aged and young mice and included an environmental component with an IE or enriched environment (EE). To mimic masticatory rehabilitation, we fed some animals with HD followed by SD, with a return to HD, and compared them to animals without rehabilitation (HD/SD).

Results

Masticatory reduction, environmental changes, and water maze tests at 6 and 18 months.

Learning rate

Figure 1 depicts the diet regime, age, and environmental influences on learning rate of the best five performances of each experimental group on the fourth training day. The top panel (Figure 1A) indicates the significant between-group differences in the learning rates, and the bottom (Figure 1B) panel shows individual performances and group means. Note that at 6M, impoverished conditions associated with a reduction in masticatory activity (HD/SD) were also associated with lower learning rate values compared with control (HD) or masticatory rehabilitated (HD/SD/HD) mice. On the other hand, spatial learning performance was impaired in aged IE mice regardless of diet regime but less so in the rehabilitated group. Similarly, EE-HD/SD animals independent of age showed lower performance than EE controls (HD) or rehabilitated mice (EE-HD/SD/HD). However, rehabilitation + EE in aged mice improved learning rates up to EE control levels. Indeed, on the fourth training day, learning rate was influenced by diet regime ($F_{(2,48)} = 21.2$, $p < 0.000001$) and age ($F_{(1,48)} = 13.6$, $p < 0.000567$) with interactions between environment and age ($F_{(1,48)} = 16.7$, $p < 0.00164$). Pairwise comparisons (Tukey Honestly Significant Difference) showed significant differences between mean values of IE6M-HD (90.19 ± 2.74, mean ± S.E.) and IE6M-HD/SD (51.60 ± 5.40) ($t(8) = 6.38$, $p < 0.0002$); IE6M-HD and IE6M-HD/SD/HD (78.49 ± 4.43) ($t(8) = 2.25$, $p < 0.05$); IE6M-HD and IE18M-HD (51.02 ± 7.26) ($t(8) = 5.05$, $p < 0.001$); IE6M-HD and EE6M-HD (76.14 ± 2.48) ($t(8) = 3.80$, $p < 0.005$); IE6M-HD/SD and IE6M-HD/SD/HD ($t(8) = 3.85$, $p < 0.005$); IE6M-HD/SD/HD and IE18M-HD/SD/HD (44.25 ± 9.89) ($t(8) = 3.16$, $p < 0.013$); and IE18M-HD/SD/HD and EE18M-HD/SD/HD (79.75 ± 4.77) ($t(8) = 3.23$, $p < 0.01$). For EE-only animals, we identified the following values: EE6M-HD and EE6M-HD/SD (45.91 ± 8.53) ($t(8) = 3.40$, $p < 0.009$); EE6M-HD/SD and EE6M-HD/SD/HD (70.66 ± 3.19) ($t(8) = 2.72$, $p < 0.03$); EE18M-HD (73.03 ± 8.22) and EE18M-HD/SD (44.35 ± 5.70) ($t(8) = 2.87$, $p < 0.02$); and EE18M-HD/SD and EE18M-HD/SD/HD ($t(8) = 4.76$, $p < 0.001$).

Swim speed and distance travelled

Because a reduction in escape latency during training might simply suggest that mice learned to swim faster across days and or abandoned the thigmotactic strategy that is preferred during the very first days of training, in Figure 2 we show total distance travelled (path length) (Figure 2A) and respective mean trajectories (Figure 2B); distance travelled on the quadrant opposite the platform (Figure 2C); and the average swim speed (Figure 2D). Three-way ANOVA of these data revealed that distance travelled was influenced by age ($F_{(1,48)} = 13.6$, $p < 0.0006$) and diet ($F_{(2,48)} = 7.55$, $p < 0.001$) with significant interaction between environment and age ($F_{(1,48)} = 7.40$, $p < 0.009$). As expected, the best performances in learning rates were associated with shorter distances travelled. Indeed, pairwise comparisons showed that IE6M-HD/SD (241.36 ± 23.77 cm, mean ± S.E.) travelled longer distances than IE6M-HD (116.23 ± 16.07) ($t(8) = 4.36$, $p < 0.002$) and IE6M-HD/SD/HD (98.03 ± 19.55) ($t(8) = 4.66$, $p < 0.002$), but shorter than IE18M-HD/SD (467.93 ±

Mendes *et al. BMC Neuroscience* 2013, **14**:63
http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/63

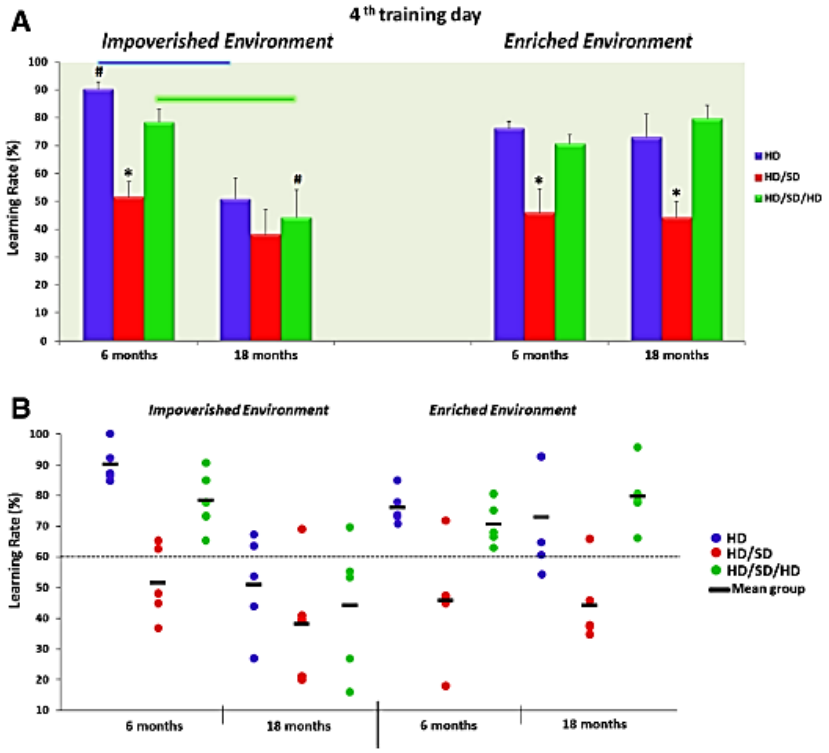


Figure 1 Learning rate on water maze test under different diet regimes, ages, and environments. Graphic representation of diet regime, age, and environmental influences on learning rate of the best five performances of each experimental group on the fourth training day. In the top panel (**A**), indicated in different colours, are the mean values and standard errors of the learning rates with respective significance values, and in the bottom panel (**B**) are the individual performances (coloured, solid circles) and mean groups (dark dashes between solid circles). (*) indicates significant differences in learning rates between different diet regimes, (#) significant differences in learning rates between environments, and coloured line connectors differences in learning rates between age.

79.75) ($t(8) = 2.72$, $p < 0.026$) and IE18M-HD/SD/HD (281.14 ± 63.03) ($t(8) = 2.78$, $p < 0.02$). Consistent with learning rate results, IE6M-HD also travelled shorter distances than EE6M-HD (179.87 ± 21.43) ($t(8) = 2.38$, $p < 0.045$). In addition, EE18M-HD/SD (360.23 ±13.21) swam longer distances to find the platform than EE18M-HD (183.82 ± 52.02) ($t(8) = 3.29$, $p < 0.01$) or EE18M-HD/SD/HD (207.83 ± 26.32) ($t(8) = 5.18$, $p < 0.0008$).

In keeping with these findings, the distance travelled in the opposite quadrant to the platform was also influenced by age ($F_{(1,48)} = 10.9$, $p < 0.0019$) and diet ($F_{(2,48)} = 4.83$, $p < 0.01$), but no interactions were identified. Pairwise analysis demonstrated that IE6M-HD (19.69 ± 6.54, mean ± S.E.) swam less in the opposite quadrant than IE6M-HD/SD (71.67 ± 19.30) ($t(8) = 2.55$, $p < 0.03$) and IE18M-HD (101.45 ± 34.03) ($t(8) = 2.36$, $p < 0.046$). In addition, EE18M-HD/SD (109.78 ± 14.11) swam longer distances in the opposite quadrant than EE18M-HD (51.69 ± 14.62) ($t(8) = 2.86$, $p < 0.02$) and EE18M-HD/SD/HD (66.19 ± 13.03) ($t(8) = 2.27$, $p < 0.05$).

Finally, three-way ANOVA indicated that swim speed was affected by age ($F_{(1,48)} = 9.08$, $p < 0.004$) and diet ($F_{(2,48)} = 9.26$, $p < 0.0004$) with significant interaction between environment and age ($F_{(1,48)} = 5.51$, $p < 0.023$). However, pairwise comparisons showed that IE6M-HD/SD (9.67 ± 0.63 cm/s, mean ± S.E.) swam faster than IE6M-HD (7.35 ± 0.78) ($t(8) = 2.31$, $p < 0.05$) and IE6M-HD/SD/HD (6.39 ± 0.75) ($t(8) = 3.33$, $p < 0.01$) but slower than IE18M-HD/SD (13.09 ± 1.13) ($t(8) = 2.63$, $p < 0.03$). In addition, IE6M-HD/SD/HD swam slower than IE18M-HD/SD/HD (9.05 ± 0.83) ($t(8) = 2.39$, $p < 0.04$), and IE18M-HD/SD swam faster than IE18M-HD/SD/HD ($t(8) = 2.87$, $p < 0.021$). However, swim speed did not change in animals raised in enriched conditions with a single exception: EE18M-HD (7.36 ± 0.79) swam slower than EE18M-HD/SD (10.77 ± 0.78) ($t(8) = 3.07$, $p < 0.02$).

Taking these results together, learning rates seem to be directly related to distance travelled, but swim speed values do not, suggesting that the behavioural effects are not the result of sensorimotor changes and that masticatory activity seems to affect spatial learning in the

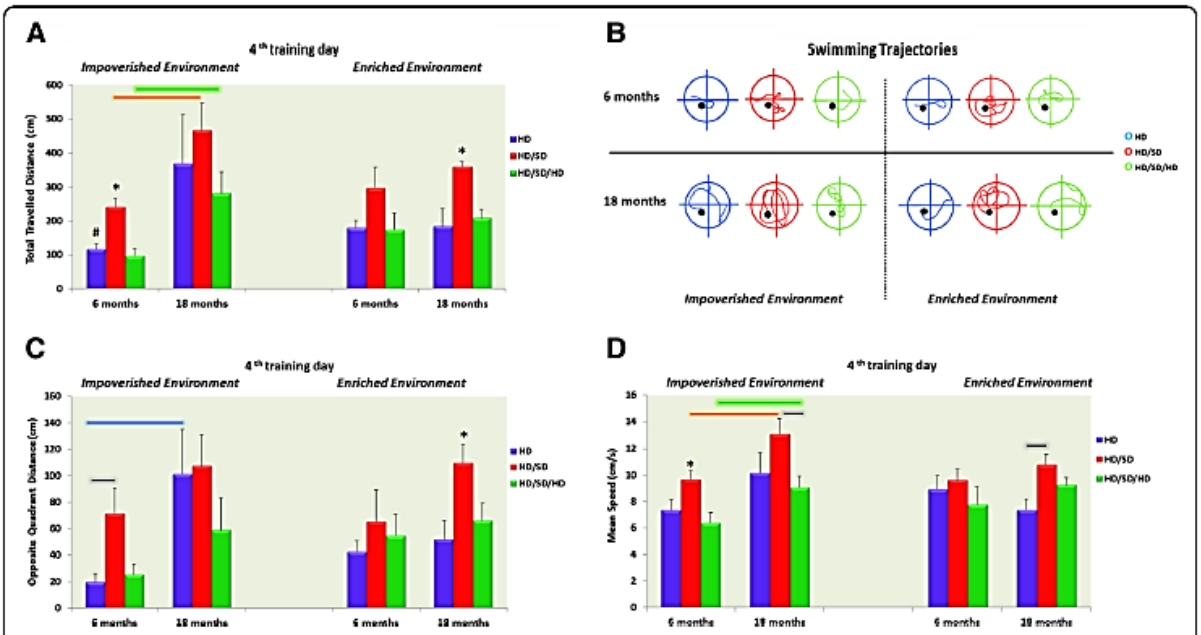


Figure 2 Total and opposite quadrant travelled distances, representative swimming trajectories, and swimming speed. In the top panels, indicated in different colours, are the mean values and standard errors of the total distances (**A**) and representative swimming trajectories of each group of animals closer to the mean distance group (**B**). In the bottom panels are the mean values of opposite quadrant distances (**C**) and swimming speeds (**D**). All data plots are expressed as a function of age, environment, and diet regimes. As expected, HD/SD groups, independent of age or environment, swam longer distances both in total and in the opposite quadrant than all other groups. (*) indicates significant differences between different diet regimes, (#) significant differences between environments, and coloured line connectors differences between ages, and the edges of the black line link differences between diet.

Morris water maze test. The findings also indicate that a combination of increased masticatory activity and EE in animals with a previous reduction in masticatory activity may benefit both young and aged mice.

Body weight and diet regimes

To detect a possible influence of diet regimes and environment on body weight, we weighed all animals after behavioural tests. One-way ANOVA revealed significant influence of diet regimes on body weight of IE animals ($F_{(2, 12)} = 16.04$, $p < 0.0006$), and IE6M-HD/SD (52.84 ± 2.45 g, mean ± S.E.) weighed significantly less than IE6M-HD (75.96 ± 3.69) or IE6M-HD/SD/HD (71.56 ± 2.93) mice (Bonferroni post-tests, $p < 0.05$). No body weight differences were detected in EE animals. We did find a single significant inverse correlation between body weights and performance in the water maze in IE6M-HD/SD mice (Pearson's coefficient = –0.99; $R^2 = 0.99$, $p = 0.0007$).

In addition, t-tests revealed no significant differences between body weights of IE6M-HD/SD and EE6M-HD/SD mice (two-tailed t-test, $p = 0.38$) and no differences in learning rates. Based on this finding, we speculated that the sedentary IE lifestyle is associated with being overweight and that the HD/SD diet regime in IE may reduce food intake. Observing the active lifestyle of EE animals (EE6M-HD vs IE6M-HD, two-tailed t-test, $p = 0.0002$; EE6M-HD/SD/HD vs IE6M-HD/SD/HD, two-tailed t-test, $p = 0.0049$), we noted that it reduced weight gain independent of the diet regime. However, these differences disappeared after 18M in all diet regimes.

Discussion

In the present report, we tested the hypothesis that a combination of masticatory rehabilitation and EE would recover impaired spatial learning induced by a combination of IE and reduced masticatory activity. To mimic sedentary or active lifestyles, respectively, we raised mice from weaning onwards in either IE or EE. To mimic a reduction in masticatory activity, we fed a soft diet to mice previously fed with a hard diet (HD/SD) and compared water maze performances of this group with two other groups fed with continuous hard diet (HD – control group) or with a sequence of hard, soft, and hard diets (HD/SD/HD – rehabilitated group). We found that a reduction in masticatory activity and IE impaired spatial learning on the Morris water maze and a combination of masticatory rehabilitation and EE recovered spatial learning abilities of both adult and aged mice.

Aging cognitive decline and environment

We tested adult and aged mice raised in IE or EE for spatial memory and learning using the water maze paradigm. The results revealed that all IE and EE adult mice could learn and remember the position of the hidden platform after four training days; however, only aged EE mice met the criterion of 60% or more in learning rate (EE18M-HD = 73.03 ± 8.22). Indeed, the aged IE mice learning rate was on average near the chance level (IE18M-HD = 51.02 ± 7.26). These findings suggest that after 6 months of impoverished conditions, the hippocampal requirements for spatial learning were spared in young mice and could be activated after training. As expected, memory capabilities became worse when advanced age was combined with IE; under these conditions, age-related spatial learning decline was aggravated. In contrast, EE-raised aged mice exhibited relatively unimpaired spatial learning in water maze tests, suggesting that the consolidation and retrieval mechanisms for these memories were spared under enriched conditions. These observations replicate previous results of ours and others in mice and rats undergoing spatial learning and memory tests [7,22-29].

More recently, we investigated the impact of institutionalization on aged humans, living sedentarily under poor conditions of cognitive and motor–sensory stimulation (impoverished-like conditions). Participants underwent neuropsychological tests, and outcomes were compared to those of an aged control group living in the community with their families (enriched-like conditions). Our findings revealed significantly higher scores among community-living participants. Consistent with this finding, institutionalized patients after 6 months of motor–sensory and cognitive stimulation (enriched-like environment) experienced significant improvement in their performances on neuropsychological tests [30].

Rehabilitation of masticatory function to prevent adult and aging-related spatial learning losses

A number of studies using a variety of behavioural assays, including the Morris water maze [18,19,31-36], passive avoidance [37], and radial arm maze [20,38,39], indicate that long-term soft-diet feeding or extraction of molar teeth results in learning and memory deficits [40]. Recent studies with the Morris water maze demonstrated that mice fed a hard diet required significantly less time to reach the platform than experimental mice and spent significantly more time in the former platform area, suggesting that hard-diet feeding is associated with improved spatial memory [41]. In addition, one-year-old [35] or 18-month-old [36] adult mice fed with a soft diet, compared to a solid-diet group, showed lower spatial performances on the Morris water maze. Similarly, SAMR1 and SAMP8 mice fed a solid diet performed better in the eight-arm radial maze than mice fed a powdered diet [39]. SAMP8 mice reach adult maturity at 6 months of age when learning and memory deficits become apparent in a variety of behavioural tests [42-45] and when reduced masticatory activity accelerates age-related learning and memory decline [40]. Occlusal disharmony also aggravates age-dependent deficits in spatial learning in the Morris water maze [17,46-49]; see [13,40] for recent reviews. Moreover, monkey studies demonstrate that when occlusal disharmony is removed, the associated stressful response disappears [50].

Here the results add a new piece of information, demonstrating a vigorous effect of diet changes on spatial learning in the Morris water maze after a reduction in masticatory activity imposed with a soft diet on mice previously fed a hard diet. We also demonstrated that these spatial learning losses can be promptly recovered by masticatory rehabilitation at adulthood (6M) but that aged mice (18M) require a combination of environmental stimuli and masticatory rehabilitation to obtain similar effects. Because the Morris water maze is a hippocampal-dependent task, we suggest that rehabilitation of masticatory activity in adult mice and a combination of EE and masticatory rehabilitation in aged mice may rescue hippocampal function.

We emphasize that the animals were deprived of their masticatory activity but not fully suppressed in an effort to simulate the human condition. Taking all of the results together, we can speculate that oral rehabilitation and sensory–motor and cognitive stimulation may help protect human subjects from age-related cognitive decline and that these interventions would be more effective if implemented as early as possible.

Conclusions

An imposed reduction in masticatory activity by administration of a soft diet to sedentary mice previously fed a hard diet impaired spatial learning in the Morris water maze. The rehabilitation of masticatory activity of these deprived mice at adulthood, independent of environment, recovered spatial learning losses, and a combination of enriched environment and rehabilitation benefited significantly both young and aged mice. We are now investigating the cellular and molecular changes associated with spatial learning recovery after masticatory rehabilitation.

Methods

All animals, female albino Swiss mice, were maintained in accordance with the guidelines published by the National Institutes of Health (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*). The experimental protocol was tested and approved prior to study initiation by the Ethics Committee on Experimental Animal Research (from

Mendes *et al. BMC Neuroscience* 2013, **14**:63
http://www.biomedcentral.com/1471-2202/14/63

the Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, Brazil, CEPAE-UFPA:BIO004-09).

Environment, age, diet regimes, and experimental groups

The EE consisted of two-level wire cages (100×50×100 cm) equipped with ropes, rod bridges, tunnels, running wheels, and toys. Toys were made of different forms of plastic, wood, and metal of different colours and were changed periodically. Each EE cage housed 20 young and aged mice. Water and food were delivered to the top and bottom levels, respectively. This arrangement obliged mice to move from one compartment to another to drink and eat. Impoverished conditions comprised plastic cages (32×45×16.5 cm) without equipment or toys and covered by metal grids. The IE mice were maintained in groups of six until sacrifice. Each IE cage housed 9 young or aged mice. Animals had free access to food and water and were raised at a controlled room temperature (23 ± 1°C) and 12-hour light–dark cycle. Figure 3 depicts the experimental timeline.

All animals from IE or EE cages were organized into six groups according to diet regime (HD, HD/SD, or HD/SD/HD) and age (6 or 18 months). Animals were housed either in enriched or impoverished environments from postnatal day 21 onwards, under one of the following diet regimes: IE6M (HD, n = 28; HD/SD, n = 15; HD/SD/HD, n = 18), EE6M (HD, n = 27; HD/SD, n = 11; HD/SD/HD, n = 11), IE18M (HD, n = 19; HD/SD, n = 11; HD/SD/HD, n = 12), and EE18M (HD, n = 18; HD/SD, n = 25; HD/SD/HD, n = 27). HD groups were fed a continuous pellet diet; HD/SD regimes for 6 or 18 months followed an alternating pellet and powder diet every 3 or 9 months, respectively; and HD/SD/HD regimes for 6 or 18 months followed sequences of pellet, powder, and pellet food every 2 or 6 months, respectively (Figure 3). All animals were albino Swiss female mice.

Behavioural tests

At corresponding time points (6 or 18 months), all groups were trained in the water maze paradigm [9], adapted for mouse dimensions. The circular pool and

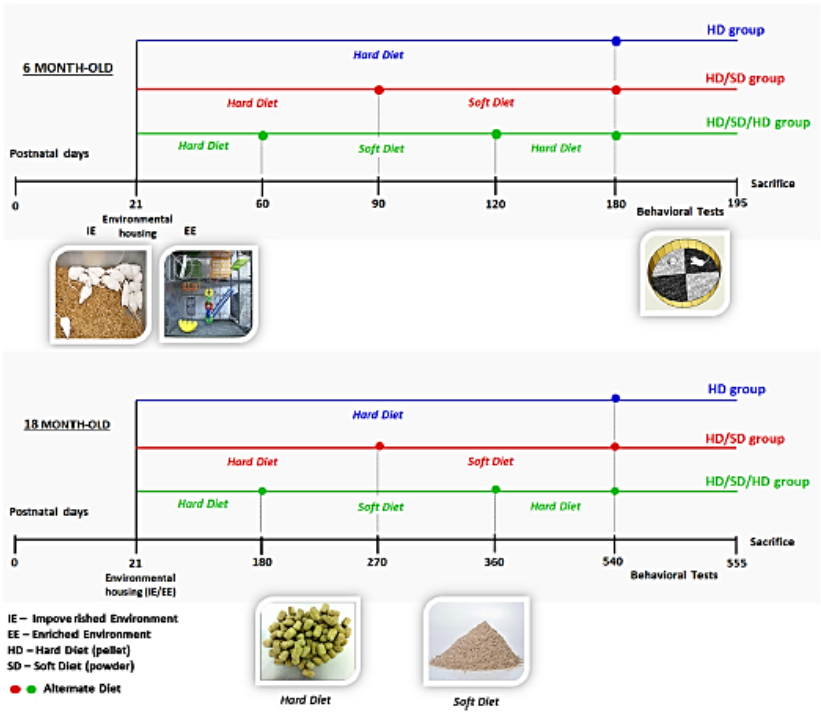


Figure 3 Experimental timeline. Female albino Swiss mice were housed either in impoverished or enriched environments (middle panel left) from postnatal days 21 until 180 (6 months old; 6M) or 540 (18 months old; 18M), under one of the following diet regimes: HD groups correspond to continuous pellet diets; HD/SD regimes for 6 or 18 months correspond to alternating pellet and powder diet every 3 or 9 months, respectively; HD/SD/HD regimes for 6 or 18 months correspond to sequences of pellet, powder, and pellet food every 2 or 6 months, respectively. All 6M and 18M animals were submitted to the Morris water maze (middle panel, right) between 180 and 195 and between 540 and 555 postnatal days, respectively. Bottom panel: pellet (hard diet) and powder (soft diet) food. Time is represented in days after birth and increases from left to right.

platform were 101 and 13 cm in diameter, respectively; the platform was 1 cm below the water surface. To occlude the platform, the pool was filled with black water (22 ± 2°C) coloured with a non-toxic dye. The first day of water maze training was dedicated to adapting the animal to the aquatic labyrinth. In the remaining 5 days, animals were tested once per day in three trials. Three permanent external cues were used during all day tests, and luminance level in the pool was kept constant between 4–5 cd/m^2. The enter points in the pool, based on dividing this apparatus according to cardinal points and thus into four equal quadrants, were semi-randomized, and we systematically avoided repeating entry at the same point more than twice. In each trial, the animals were allowed three trials of 60 s each to find the hidden platform; trials were separated by intervals of 30 s, and the task was considered complete when they found and remained on the platform for 10 s.

Any-Maze® tracking software was systematically used to precisely record the position of the mouse throughout the test. From this detailed positional information, we estimated for each animal a daily average value of escape latencies, travelled distances (path length), average swim speed, and time spent in the quadrant opposite to the hidden platform. The learning rate for the water maze was assessed by the ratio between escape latencies to find the platform on the first and subsequent test days (days 2–5) using the following equation: $C = (L_1-L_N)/(L_1+L_N)$, where C is a contrast index to express the learning rate and L_1 and L_N are the escape latencies to find the platform on the first and the subsequent test days, respectively. This equation was systematically applied every training day using the escape latency mean value of the daily three trials of each animal. Thus, four values of contrasts were obtained for each animal (L_1/L_2, L_1/L_3, L_1/L_4, and L_1/L_5), and a learning rate curve for five training days could be plotted for each animal. To express the learning rate in percentage values for each day, we selected from all experimental groups, independent of the diet regimen, age, or environment, the higher contrast value for each day and estimated the remaining contrast values as follows: $C\ (\%) = [(L_1-L_N)/(L_1+L_N)] * 100 / C_{max}$, where C_{max} corresponds to the best performance on that day in comparison with the first day and L_1 and L_N correspond to the escape latency in the first and subsequent days, respectively. Because the fourth training day showed the highest number of animals with a learning rate equal to or above 60% in all experimental groups, we selected this training day for comparative analysis between groups. To this end, we chose the five best performances of each experimental group from that day, considering that these five best specimens showed consistent learning (C (%) > 0, at the fourth training day and on at least two more test days, or C (%) > 0, at training days 4 and 5) and applied three-way ANOVA, followed by Tukey post-tests, with differences between groups accepted as significant at a 95% confidence level ($p < 0.05$). The contrast index has been previously applied to water maze results [51,52] to normalize the learning curve to each individual's performance, thus accounting for the variation in performances among individuals.

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
FCCSM, MNFA, APGF, ACF, DJS, TGB, RPS, CWPD, and MCKS conceived the study, participated in the experimental design, and drafted the manuscript. FCCSM, MNFA, APGF, ACF, DJS, TGB, RPS, CWPD, and MCKS performed the experiments and analysed and interpreted the data. FCCSM, JBT, PFCV, VHP, EMLSR, CWPD, and MCKS participated in the data analysis, were involved in drafting the manuscript, and made important intellectual contributions. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments
This project was supported by research funds from the Brazilian government. MCKS was supported by grants from the Brazilian Research Council CNPq (grant numbers 475677/2008-0 and 470077/2012-3) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA, grant number 136/08). Research funds from the Fundação de Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP) and the Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESP/UFPA) covered proofreading, editing, and publication fees.

Author details
[1]Universidade Federal do Pará/UFPA, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Investigações em Neurodegeneração e Infecção, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Rua dos Mundurucus, 4487 – Guamá Belém, Pará, Brasil. [2]Instituto Evandro Chagas/ IEC, Departamento de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas, Ananindeua, Pará, Brasil. [3]Southampton Neuroscience Group, School of Biological Sciences, University of Southampton, Southhampton, UK. [4]Universidade Federal do Pará/UFPA, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Sistema de Informação e Georrefrenciamento, Pará, Brasil.

Received: 13 May 2013 Accepted: 20 June 2013
Published: 28 June 2013

References
1. Miura H, Yamasaki K, Kariyasu M, Miura K, Sumi Y: **Relationship between cognitive function and mastication in elderly females.** *J Oral Rehabil* 2003, 30(8):808–811.
2. Weijenberg RA, Scherder EJ, Lobbezoo F: **Mastication for the mind–the relationship between mastication and cognition in ageing and dementia.** *Neurosci Biobehav Rev* 2011, 35(3):483–497.
3. Volkers KM, Scherder EJ: **Impoverished environment, cognition, aging and dementia.** *Rev Neurosci* 2011, 22(3):259–266.
4. Netz Y, Jacob T: **Exercise and the psychological state of institutionalized elderly: a review.** *Percept Mot Skills* 1994, 79(3 Pt 1):1107–1118.
5. Dorner T, Kranz A, Zettl-Wiedner K, Ludwig C, Rieder A, Gisinger C: **The effect of structured strength and balance training on cognitive function in frail, cognitive impaired elderly long-term care residents.** *Aging Clin Exp Res* 2007, 19(5):400–405.
6. Rolland Y, Pillard F, Klapouszczak A, Reynish E, Thomas D, Andrieu S, Riviere D, Vellas B: **Exercise program for nursing home residents with Alzheimer's disease: a 1-year randomized, controlled trial.** *J Am Geriatr Soc* 2007, 55(2):158–165.
7. Diniz DG, Foro CA, Rego CM, Gloria DA, de Oliveira FR, Paes JM, de Sousa AA, Takuhashi TP, Trindade LS, Turiel MC, *et al*: **Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes.** *Eur J Neurosci* 2010, 32(3):509–519.
8. Winocur G: **Environmental influences on cognitive decline in aged rats.** *Neurobiol Aging* 1998, 19(6):589–597.

9. Morris R: **Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.** *J Neurosci Methods* 1984, **11**(1):47–60.
10. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J: **Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions.** *Nature* 1982, **297**(5868):681–683.
11. Moser E, Moser MB, Andersen P: **Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions.** *J Neurosci* 1993, **13**(9):3916–3925.
12. Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H: **Assessment of spatial memory in mice.** *Life Sci* 2010, **87**(17–18):521–536.
13. Ono Y, Yamamoto T, Kubo KY, Onozuka M: **Occlusion and brain function: mastication as a prevention of cognitive dysfunction.** *J Oral Rehabil* 2010, **37**(8):624–640.
14. Wu B, Plassman BL, Crout RJ, Liang J: **Cognitive function and oral health among community-dwelling older adults.** *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008, **63**(5):495–500.
15. Winter C, Kampik NB, Vedovelli L, Rothenberger F, Paunescu TG, Stehberger PA, Brown D, John H, Wagner CA: **Aldosterone stimulates vacuolar H (+)-ATPase activity in renal acid-secretory intercalated cells mainly via a protein kinase C-dependent pathway.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2011, **301**(5):C1251–1261.
16. Simonato M, Baritussio A, Ori C, Vedovelli L, Rossi S, Dalla Massara L, Rizzi S, Carnielli VP, Cogo PE: **Disaturated-phosphatidylcholine and surfactant protein-B turnover in human acute lung injury and in control patients.** *Respir Res* 2011, **12**:36.
17. Kubo KY, Yamada Y, Iinuma M, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K, Nakamura H, Onozuka M: **Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice.** *Neurosci Lett* 2007, **414**(2):188–191.
18. Onozuka M, Watanabe K, Mirbod SM, Ozono S, Nishiyama K, Karasawa N, Nagatsu I: **Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice.** *Brain Res* 1999, **826**(1):148–153.
19. Watanabe K, Ozono S, Nishiyama K, Saito S, Tonosaki K, Fujita M, Onozuka M: **The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance.** *Behav Brain Res* 2002, **128**(1):19–25.
20. Yamazaki K, Wakabayashi N, Kobayashi T, Suzuki T: **Effect of tooth loss on spatial memory and trkB-mRNA levels in rats.** *Hippocampus* 2008, **18**(6):542–547.
21. de Almeida MN, Mendes FC, Felicio AP, Falsoni M, de Andrade ML, Bento-Torres Neto J, Vasconcelos PF, Perry VH, Picanco-Diniz CW, Sosthenes MC: **Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes.** *BMC Neurosci* 2012, **13**(1):23.
22. Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM: **Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice.** *Behav Brain Res* 2007, **185**(1):43–48.
23. Bennett JC, McRae PA, Levy LJ, Frick KM: **Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice.** *Neurobiol Learn Mem* 2006, **85**(2):139–152.
24. Frick KM, Fernandez SM: **Enrichment enhances spatial memory and increases synaptophysin levels in aged female mice.** *Neurobiol Aging* 2003, **24**(4):615–626.
25. Frick KM, Stearns NA, Pan JY, Berger-Sweeney J: **Effects of environmental enrichment on spatial memory and neurochemistry in middle-aged mice.** *Learn Mem* 2003, **10**(3):187–198.
26. Speisman RB, Kumar A, Rani A, Pastoriza JM, Severance JE, Foster TC, Ormerod BK: **Environmental enrichment restores neurogenesis and rapid acquisition in aged rats.** *Neurobiol Aging* 2013, **34**(1):263–274.
27. Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F: **Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats.** *Brain Res Bull* 2006, **70**(1):8–14.
28. Qiu X, Huang CX, Lu W, Yang S, Li C, Shi XY, Chen L, Xiu Y, Yang JQ, Tang Y: **Effects of a 4 month enriched environment on the hippocampus and the myelinated fibers in the hippocampus of middle-aged rats.** *Brain Res* 2012, **1465**:26–33.
29. Obiang P, Maubert E, Bardou I, Nicole O, Launay S, Bezin L, Vivien D, Agin V: **Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF.** *Neurobiol Learn Mem* 2011, **96**(2):121–129.
30. Oliveira T: ***Efeitos da Estimulação Multissensorial e Cognitiva sobre o Declínio Cognitivo Senil agravado pelo Ambiente Empobrecido das Instituições de Longa Permanência.*** *Instituto de Ciências Biológicas, Belém - Pará* - Brazil: Universidade Federal do Pará; 2012.
31. Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tonosaki K, Saito S: **Evidence for involvement of glucocorticoid response in the hippocampal changes in aged molarless SAMP8 mice.** *Behav Brain Res* 2002, **131**(1–2):125–129.
32. Onozuka M, Watanabe K, Nagasaki S, Jiang Y, Ozono S, Nishiyama K, Kawase T, Karasawa N, Nagatsu I: **Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice.** *Behav Brain Res* 2000, **108**(2):145–155.
33. Kubo KY, Iwaku F, Watanabe K, Fujita M, Onozuka M: **Molarless-induced changes of spines in hippocampal region of SAMP8 mice.** *Brain Res* 2005, **1057**(1–2):191–195.
34. Watanabe K, Tonosaki K, Kawase T, Karasawa N, Nagatsu I, Fujita M, Onozuka M: **Evidence for involvement of dysfunctional teeth in the senile process in the hippocampus of SAMP8 mice.** *Exp Gerontol* 2001, **36**(2):283–295.
35. Tsutsui K, Kaku M, Motokawa M, Tohma Y, Kawata T, Fujita T, Kohno S, Ohtani J, Tenjoh K, Nakano M, *et al*: **Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice.** *Biomed Res* 2007, **28**(1):1–7.
36. Frotade Almeida M, Mendes F, Felicio A, Falsoni M, Andrade M, Bento-Torres J, Vasconcelos P, Perry V, Picanço-Diniz C, Sosthenes M: **Spatial memory decline after masticatory deprivation and aging is associated with altered laminar distribution of CA1 astrocytes: behavioral and stereological analysis.** *BMC Neuroscience* 2012, **13**:23.
37. Kushida S, Kimoto K, Hori N, Toyoda M, Karasawa N, Yamamoto T, Kojo A, Onozuka M: **Soft-diet feeding decreases dopamine release and impairs aversion learning in Alzheimer model rats.** *Neurosci Lett* 2008, **439**(2):208–211.
38. Kato T, Usami T, Noda Y, Hasegawa M, Ueda M, Nabeshima T: **The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats.** *Behav Brain Res* 1997, **83**(1–2):239–242.
39. Yamamoto T, Hirayama A: **Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice.** *Brain Res* 2001, **902**(2):255–263.
40. Kubo KY, Ichihashi Y, Kurata C, Iinuma M, Mori D, Katayama T, Miyake H, Fujiwara S, Tamura Y: **Masticatory function and cognitive function.** *Okajimas Folia Anat Jpn* 2010, **87**(3):135–140.
41. Akazawa Y, Kitamura T, Fujihara Y, Yoshimura Y, Mitome M, Hasegawa T: **Forced mastication increases survival of adult neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus.** *Int J Mol Med* 2013, **31**(2):307–314.
42. Flood JF, Morley JE: **Age-related changes in footshock avoidance acquisition and retention in senescence accelerated mouse (SAM).** *Neurobiol Aging* 1993, **14**(2):153–157.
43. Miyamoto I, Yoshida K, Tsuboi Y, Iizuka T: **Rehabilitation with dental prosthesis can increase cerebral regional blood volume.** *Clin Oral Implants Res* 2005, **16**(6):723–727.
44. Ohta A, Hirano T, Yagi H, Tanaka S, Hosokawa M, Takeda T: **Behavioral characteristics of the SAM-P/8 strain in Sidman active avoidance task.** *Brain Res* 1989, **498**(1):195–198.
45. Yagi H, Katoh S, Akiguchi I, Takeda T: **Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory.** *Brain Res* 1988, **474**(1):86–93.
46. Arakawa Y, Ichihashi Y, Iinuma M, Tamura Y, Iwaku F, Kubo KY: **Duration-dependent effects of the bite-raised condition on hippocampal function in SAMP8 mice.** *Okajimas Folia Anat Jpn* 2007, **84**(3):115–119.
47. Ichihashi Y, Arakawa Y, Iinuma M, Tamura Y, Kubo KY, Iwaku F, Sato Y, Onozuka M: **Occlusal disharmony attenuates glucocorticoid negative feedback in aged SAMP8 mice.** *Neurosci Lett* 2007, **427**(2):71–76.
48. Iinuma M, Ichihashi Y, Hioki Y, Kurata C, Tamura Y, Kubo KY: **Malocclusion induces chronic stress.** *Okajimas Folia Anat Jpn* 2008, **85**(1):35–42.
49. Kubo KY, Saitoh N, Kogaya Y, Iwaku F, Ichihashi Y, Arakawa Y, Kurata C, Iinuma M, Tamura Y: **The bite-raised condition enhances the aging process in the dorsal and ventral hippocampus.** *Okajimas Folia Anat Jpn* 2008, **85**(2):43–48.
50. Budtz-Jørgensen E: **Occlusal dysfunction and stress.** *An experimental study in macaque monkeys. J Oral Rehabil* 1981, **8**(1):1–9.

51. Torres JB, Assuncao J, Farias JA, Kahwage R, Lins N, Passos A, Quintairos A, Trevia N, Diniz CW: **NADPH-diaphorase histochemical changes in the hippocampus, cerebellum and striatum are correlated with different modalities of exercise and watermaze performances.** *Experimental Brain Research* 2006, **175**(2):292–304.
52. Diniz DG, Foro CAR, Rego CMD, Gloria DA, de Oliveira FRR, Paes JMP, de Sousa AA, Tokuhashi TP, Trindade LS, Turiel MCP, *et al*: **Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes.** *European Journal of Neuroscience* 2010, **32**(3):509–519.

doi:10.1186/1471-2202-14-63
Cite this article as: Mendes *et al.*: Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. *BMC Neuroscience* 2013 14:63.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central