

Aquisição de uma Tarefa Espacial por Ratos Submetidos a Lesão Hipocampal Neonatal Induzida por Radiação Ionizante

Acquisition of a Non-Matching to Place task by Rats with Neonatal Hippocampal Lesion Induced by Ionizing Radiation

Valéria Catelli Infantozzi Costa*, Rita de Cássia Margarido Moreira,
José Lino Oliveira Bueno**, Gilberto Fernando Xavier** & Bárbara Ramos

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil

Resumo

Costa, Bueno e Xavier (2005) mostraram que ratos com lesão do giro denteado hipocampal produzida por colchicina apresentam prejuízo de desempenho em testes pós-operatórios em uma tarefa espacial de discriminação condicional (tarefa de *non-matching-to-place*, NMTP), embora o treino repetitivo promova recuperação do desempenho dos animais lesados. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho de ratos com danos seletivos no giro denteado, induzidos pela exposição neonatal a radiação ionizante, na tarefa de NMTP. O grupo irradiado apresentou prejuízo nas primeiras sessões de treino quando comparado ao grupo controle; porém, seu desempenho se igualou ao dos animais controles nas últimas sessões, replicando resultados anteriores. Os resultados são discutidos no contexto da teoria do mapa espacial cognitivo.

Palavras-chave: Radiação ionizante; discriminação espacial; NMTP; hipocampo; giro denteado.

Abstract

Costa, Bueno e Xavier (2005) showed that rats with hippocampus dentate gyrus lesions produced by colchicine have post-surgical tests deficits in spatial tasks involving conditional discrimination (non-matching-to-place, NMTP), although repetitive training does promote the recovery of the lamed subject's performance. The purpose of this experiment was to assess the performance of rats with selective lesions of dentate gyrus induced by neonatal ionizing radiation in the NMTP task. The irradiated group showed deficits in the first training sessions when compared to the control group. Nevertheless, the performance of lesion and control groups was similar at the end of the sessions, as previously reported. The results are discussed in light of the cognitive map theory.

Keywords: Ionizing radiation; spatial discrimination; NMTP task acquisition; hippocampus; dentate gyrus.

Segundo Bueno (1989) a noção de representação ganhou espaço no contexto de uma mudança significativa na estrutura de pensamento da análise do comportamento. Em modelos de análise do comportamento centrados na aprendizagem instrumental ou operante, considera-se que as modificações do comportamento são instaladas e mantidas como consequência de contingências estabelecidas entre um estímulo, o reforço, com classes específicas de comportamento. A tradição pavloviana, por outro lado, enfatiza o componente associativo da aprendizagem; neste caso, o modelo é determinado pela reflexologia de origem fisiológica e diz-se que houve uma transferência do controle de um reflexo, de um estímulo para outro. Nestes dois modelos a resposta é o tema organizador central das discussões sobre aprendizagem. Bueno (1989) discute se tais descri-

ções de respostas são suficientes para explicar os fenômenos psicológicos identificados nos animais, apresentando modelos alternativos de análise do comportamento. Rescorla e Holland (1982) examinam o condicionamento pavloviano não mais em termos de uma transferência de reflexos. Esses autores sugerem que não basta que um estímulo tenha uma relação temporal com outro, mas é preciso que haja uma relação lógica, informativa, entre os dois estímulos. Estas relações lógicas dar-se-iam ao nível das representações internas do mundo que são criadas pelas informações obtidas dos estímulos ambientais.

Investigações experimentais do comportamento animal sugerem que os organismos são capazes de adquirir informações acerca de aspectos do ambiente e também de seus próprios atos, de forma a registrar e conservar de modo codificado, em seu sistema nervoso central (SNC), eventos relevantes. O registro ou a informação codificada seria a representação da realidade externa no SNC. Representações possibilitam a adaptação do comportamento animal aos aspectos ambientais ou contextuais (Gallistel, 1989, 1990), tornando o animal capaz de prever eventos e de preparar-se para ação (Ades, 1993).

* Endereço para correspondência: Departamento de Psicologia e Educação da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FFCL-RP- USP), Av. dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP, 14040-901. Fone: (55) 163602-3697, Fax: (55) 163633-5668. E-mail: costaval@terra.com.br

Bolsista da FAPESP (Doutorado e Pós-Doutorado).

** Apoio Financeiro Pesquisador I CNPq, FAPESP e CAPES.

Os animais possuem sofisticados processos sensorio-perceptivos para determinação das distâncias e direções de estímulos, ou seja, para a formação de representações das posições relativas dos estímulos e, portanto, formação de mapas cognitivos.

O conceito de mapa cognitivo refere-se à capacidade de o organismo estabelecer representações entre múltiplos estímulos do ambiente e suas relações de ângulo e distância, independente da posição do sujeito, permitindo definir locais a partir dessas relações, e utilizar tais representações para se orientar no ambiente. É a multiplicidade das relações entre os estímulos que define o espaço e não um estímulo particular qualquer.

A teoria do mapa cognitivo (O'Keefe & Nadel, 1978) sustenta que os animais possuem um sistema que codifica o ambiente sob a forma de mapas cognitivos e, segundo a proposta dos autores, a formação hipocampal constitui o substrato neural para a aprendizagem e armazenamento de tais processos. Segundo esta teoria, as informações são processadas em dois sistemas distintos: sistema de táxon e sistema de mapeamento. As estratégias comportamentais baseadas no sistema de táxon podem ser subdivididas em estratégias de guiamento e de orientação. As estratégias de guiamento envolvem a identificação de um objeto ou uma pista no ambiente da qual o sujeito deve aproximar-se ou afastar-se. As estratégias de orientação corpórea ou estratégia corpórea egocêntrica envolvem rotações corpóreas egocêntricas em resposta a uma pista ou informação. No sistema de mapeamento é processada a estratégia de lugar e são formados os mapas espaciais. O mapa de um ambiente é composto por um conjunto de representações de lugares conectados entre si de acordo com as regras que representam as distâncias e direções entre os lugares. Os mapas podem ser utilizados pelos animais para se localizarem no ambiente, localizarem itens (ou eventos) neste ambiente, incluindo recompensas e punições. Por exemplo, “no local A existe alimento” ou “no local B existe estimulação aversiva”, ou ainda para se locomoverem de um ponto a outro, inclusive por caminhos novos ou atalhos não experimentados anteriormente.

O'Keefe e Nadel (1978) desenvolvem considerações detalhadas acerca dos efeitos de lesões hipocampais no comportamento animal. Uma das mais importantes predições de sua teoria propõe que tais efeitos podem ser interpretados como uma perda da aprendizagem de lugar (ou perda da capacidade de utilização do sistema de mapeamento) e do comportamento exploratório, sem afetar as estratégias de guiamento ou de orientação egocêntrica. A estratégia de guiamento envolve, como visto, a aproximação ou afastamento, por meio de qualquer comportamento disponível, de uma pista específica (ou objeto), enquanto a hipótese por orientação específica uma rotação egocêntrica, cujo eixo pode ser o corpo, a cabeça ou os olhos. Em contraposição, o sistema de mapeamento torna disponível a outras partes do cérebro a representação de lugares que pode ser utilizada na solução de problemas. Se um animal está faminto, o mapa do ambiente no qual se encontra pode ser consultado para

verificar se há uma representação de alimento naquele ambiente. Se houver, então o mapa pode ser usado para gerar um programa motor, o qual levará o animal da sua posição atual no mapa para a localização do alimento. Lesões hipocampais devem resultar em prejuízo no desempenho de tarefas que envolvem preponderantemente estratégias de lugar. Por outro lado, determinados tipos de tarefas espaciais podem ser resolvidos por uma ou várias dessas estratégias, não raro envolvendo combinações das mesmas (Whishaw & Mittleman, 1986). Nestes casos, danos no sistema hipocampal, que impedem a utilização do sistema de mapeamento cognitivo, podem não resultar em prejuízo de desempenho uma vez que o mesmo, nessas tarefas, pode basear-se em estratégias de guiamento ou de orientação egocêntrica.

As estruturas da formação hipocampal parecem desempenhar um papel crítico em tarefas espaciais de discriminação condicional, como uma tarefa de *non-matching-to-place* (NMTP) (Freeman & Stanton, 1991; Knowlton, Shapiro, & Olton, 1989; M'Harzi, Jarrard, Willig, Palacios & Delacour, 1991; Walker & Olton, 1984). Cada tentativa de uma tarefa de NMTP é composta por duas fases. Em uma primeira fase (fase de informação), uma ou mais alternativas são reforçadas. Na segunda fase (fase de escolha), o animal deve escolher entre duas ou mais alternativas, sendo que a alternativa reforçada é aquela que não estava previamente disponível durante a fase de informação. Assim, a informação da alternativa previamente reforçada na 1ª fase deve ser processada de tal forma a permanecer retida no Sistema Nervoso até o momento de ser utilizada, ou seja, a informação deve ser mantida, na memória, uma vez que para emitirem a resposta correta na 2ª fase eles dependem dessa informação. Como a alternativa correta varia aleatoriamente a cada par de tentativas, essa informação é útil apenas durante o desempenho de um par de tentativas, deixando de ser útil depois de sua utilização. Assim, essa informação pode ser apagada da memória após seu uso.

Costa, Bueno e Xavier (2005) mostraram que ratos com lesão do giro denteado do hipocampo, produzida por micro-injeções múltiplas e tópicas de colchicina, apresentaram prejuízo no desempenho dos testes pós-lesão em uma tarefa espacial de NMTP em um labirinto em MAIS. Nesta tarefa, na fase de informação, o reforço é colocado somente em uma das caixas localizadas no final dos braços transversais – o acesso à outra caixa é bloqueado. Na fase de escolha, o acesso às duas caixas transversais é liberado e o reforço é colocado somente na caixa que não estava previamente disponível durante a fase de informação. Embora tenha havido um prejuízo de retenção e nas taxas de re-aquisição da resposta nos testes realizados após a lesão, o treinamento repetitivo fez com que o desempenho dos animais lesados se equiparasse ao dos animais controle. Os resultados foram interpretados no contexto da teoria do mapeamento cognitivo de O'Keefe e Nadel (1978). Isto é, os autores consideraram que na fase pré-operatória os animais adquiriram a tarefa baseando-se em estratégias de lugar, uma vez que o sistema de mapeamento cognitivo estava intacto. Porém, como após

a lesão esse sistema deixou de estar disponível, os animais tiveram que re-adquirir a tarefa com base em estratégias de guiamento e egocêntricas. Neste estudo os animais foram submetidos à indução da lesão seletiva quando adultos.

Além de se poder obter uma lesão do giro denteado do hipocampo, em roedores, pela aplicação tópica de colchicina, é possível provocar lesão semelhante por meio da aplicação de radiação ionizante. Ao mesmo tempo, a literatura clínica disponível sugere que os efeitos cognitivos da radiação ionizante em humanos refletem o envolvimento do hipocampo como componente crítico do sistema de memória (ver Tada, Parent, Lowenstein, & Fike, 2000). Assim, devido ao potencial envolvimento do hipocampo nas alterações cognitivas induzidas pela radiação, encontram-se vários estudos sobre a estrutura e função do hipocampo mostrando os efeitos da radiação ionizante em roedores (a) jovens – 4 semanas de vida (Rola et al., 2004; Silasi et al., 2004), (b) adultos – de 8 a 13 semanas de vida (Hodges et al., 1998; Tada et al., 2000), (c) pré-natais (Vital, Vital & Dutra, 2006) ou ainda, (d) neonatais (Czurko, Czeh, Seress, Nadel & Bures, 1997; Moreira & Bueno, 2003; Moreira, Moreira, Bueno & Xavier, 1997). Esses estudos mostram graus variados de mudança morfológica no hipocampo e/ou giro denteado, inclusive uma redução no número das células granulares e sugerem que várias deficiências cognitivas provavelmente sejam devidas às lesões da formação hipocampal. Os mecanismos subjacentes às mudanças nas estruturas hipocampais ainda não são claros, embora recentemente tenha sido sugerido que mudanças nas células neuronais precursoras da zona subgranular do giro denteado do hipocampo podem estar envolvidas nestes mecanismos (Rola et al., 2004; Silasi et al., 2004; Tada et al., 2000). As mudanças cognitivas induzidas por radiação frequentemente se manifestam como deficiências na aprendizagem e memória dependentes das funções hipocampais, incluindo o processamento de informações espaciais (Hodges et al., 1998; Rola et al., 2004; Vital et al., 2006).

Moreira et al. (1997) replicaram a técnica de radiação ionizante de regiões específicas do sistema nervoso de ratos neonatos desenvolvida por Bayer e Peters (1977) e estabeleceram parâmetros de radiação para lesar células em proliferação, como as células granulares do giro denteado hipocampal. Tal procedimento induz a uma perda de aproximadamente 85% da população destas células. De forma similar, lesões por colchicina têm resultado em uma perda de 90 a 95%. Entretanto, enquanto as lesões por colchicina produzem uma pequena perda de células nos campos CA1 (22-23%) e CA4 (33%) (ver Costa et al., 2005; Xavier, Oliveira-Filho & Santos, 1999) o procedimento de lesão por radiação ionizante, empregado por Moreira et al. (1997) e Moreira e Bueno (2003), não produz qualquer perda celular de outras estruturas hipocampais, além do giro denteado.

A lesão do giro denteado por colchicina, portanto, causa prejuízo no desempenho de ratos em uma tarefa espacial de NMTP em um labirinto em MAIS (Costa et al., 2005); porém, tal lesão também provoca alguma perda celular em outros subcomponentes da formação hipocampal. Diferen-

temente, a indução da perda de células granulares do giro denteado por irradiação ionizante neonatal, de extensão similar à induzida por colchicina, parece poupar os demais subcomponentes da formação hipocampal.

Os objetivos do presente estudo são avaliar (a) se a perda de células granulares do giro denteado por radiação ionizante neonatal, promove o mesmo tipo de prejuízo comportamental observado por Costa et al. (2005) após indução de perda celular por colchicina nessa região nervosa e (b) se a indução de danos equivalentes nessa mesma região, porém em fases distintas da vida, i.e., danos neonatais, por radiação ionizante, ou danos neurotóxicos quando adulto, produzem resultados comportamentais equivalentes.

Para isso, um grupo de animais irradiados na fase neonatal e um grupo de animais controle foram submetidos a uma tarefa espacial de NMTP em um labirinto em MAIS, seguindo-se o mesmo procedimento utilizado por Costa et al. (2005).

Método

Sujeitos

Foram utilizados 18 ratos Wistar, machos, neonatos, provenientes do Biotério Central da USP/Campus Ribeirão Preto. A partir do 3º mês de vida os animais foram submetidos a um esquema de privação que limitava o acesso à água de tal forma a manter o peso dos animais em 80% do peso *ad lib*. Aos quatro meses de idade os animais foram submetidos ao procedimento experimental da tarefa espacial NMTP.

Procedimento de Radiação-X

O equipamento irradiador é o RT Philips, o mesmo utilizado nas radioterapias de orthovoltagem para carcinomas basocelulares em humanos, tendo sua energia escolhida de 200 kVp e 20 mA. Usou-se cone localizador que distancia a fonte de raios-X do alvo em 30,0 cm e que permite uma limitação do tamanho do campo de irradiação para localização da área a ser irradiada. A técnica e procedimento empregados foram os mesmos utilizados por Moreira e Bueno (2003). Os dezoito animais neonatos foram distribuídos em dois grupos: o grupo Irradiado (IR) foi submetido a um procedimento de radiação-X, a partir do segundo dia de vida, conforme parâmetros estabelecidos por Moreira et al. (1997), com uma dose total de 14 Grays, fracionada em sete sessões, por dia, de 2 Grays cada, emitindo um fluxo de dose de 0,54 Grays/min, gerando, portanto um tempo de exposição de 3,70 minutos para cada dose diária. Os animais eram mantidos imóveis em um aparelho imobilizador de acrílico confeccionado especificamente para este propósito. A radiação foi liberada dorsalmente no plano coronal à área que previamente foi determinada conter o hipocampo (Bayer & Peters, 1977); somente as células granulares do giro denteado são sensíveis aos efeitos da radiação-X neste estágio do desenvolvimento. Os animais do grupo Controle (CO) foram submetidos ao mesmo procedimento de imobilização, sem que fossem expostos à radiação (ver detalhes em Moreira et al., 1997 e Moreira, & Bueno, 2003).

Equipamento

O equipamento utilizado foi o mesmo empregado por Costa et al. (2005). Foi utilizado um labirinto com a forma de um MAIS, construído em acrílico transparente (Figura 1). Cada corredor do labirinto (50 x 10 x 10 cm) é conectado a uma caixa (30 x 30 x 10 cm) construída em acrílico transparente. Todas as quatro caixas de acrílico são separadas dos corredores do labirinto por portas tipo guilhotina. Quatro portas guilhotina separam o quadrado central (10 x 10 x 10 cm) dos corredores; deste modo, pode-se bloquear o corredor e caixa de saída S' do restante do labirinto. Nas caixas A e B , a 4 cm da parede oposta à porta, há um orifício circular no assoalho no qual podem ser colocadas gotas de água. O labirinto é mantido sobre uma estrutura de madeira a uma altura de 100 cm do assoalho. Este conjunto estava localizado em uma sala de 1.85 m por 2.30 m. Além da experimentadora, os objetos visíveis na sala incluíam a maçaneta da porta, interruptor de luz, tomada de luz, alavanca para abertura da janela da sala (a janela estava encoberta por uma cortina da mesma cor das paredes) e três barras de ferro horizontais fixadas em uma das paredes.

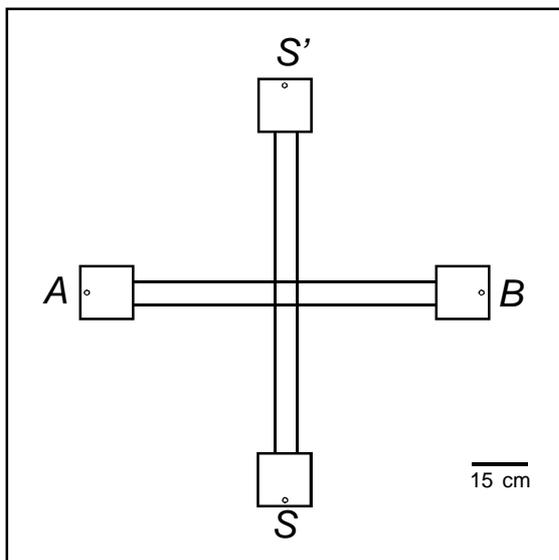


Figura 1. Labirinto em MAIS. S e S' , caixas de saída; A e B, caixas alvo.

Procedimento – Tarefa Espacial

Aos quatro meses de idade, os animais foram individualmente submetidos a duas sessões de pré-exposição ao labirinto. Nestas sessões, as portas do labirinto permaneciam abertas (com exceção do corredor e respectiva caixa S'). O animal era colocado na caixa S e tinha livre acesso aos corredores e caixas do labirinto. No orifício das caixas A e B eram colocadas duas gotas de água. A sessão teve a duração de 5 minutos para cada animal. Foram realizadas em seguida, cinco sessões de pré-treino, uma por dia, com oito tentativas por sessão para cada animal. Cada tentativa consistiu na corrida forçada para uma das caixas-alvo (A ou B): a porta do corredor de uma das caixas (A ou B) permanecia fechada, o outro corredor e caixa correspondente estavam

livres. O animal era colocado na caixa S podendo dirigir-se à caixa disponível onde encontraria as gotas de água. Nesta fase, o acesso ao corredor e caixa S' estava bloqueado. Após a fase de pré-treino, os animais foram submetidos a seis sessões de treino, uma por dia, em esquema de NMTP. Cada sessão era constituída de oito tentativas, cada tentativa contendo uma fase de informação e uma fase de escolha, com intervalo de 10 minutos entre tentativas.

1. Fase de Informação: a porta do corredor de uma das caixas (A ou B) permanecia fechada, enquanto a do outro corredor (e caixa correspondente) permanecia aberta. Nesta fase, o acesso ao corredor e caixa S' estava bloqueado. O animal era colocado na caixa S e podia dirigir-se à caixa disponível onde encontraria duas gotas de água. Depois de consumir a água disponível o animal era colocado na gaiola, onde permanecia por 10 min., após os quais dava-se início a tentativa de escolha.
2. Fase de Escolha - as portas das caixas A e B ficavam abertas, permitindo ao animal deslocar-se para qualquer ponto do labirinto (com exceção do corredor e caixa S' que estavam bloqueados). Após o animal beber as gotas de água da fase anterior (de Informação), era retirado da caixa onde se encontrava e recolocado na caixa S ; a porta era aberta e, então, o animal encontraria as gotas de água na outra caixa que não a visitada na fase de informação. Assim, nesta fase, a melhor estratégia para o animal é entrar na caixa que não estava previamente disponível durante a fase de informação. Entre uma fase e outra havia um intervalo de aproximadamente 3 s. Quando em uma tentativa o animal entrasse na caixa incorreta, as portas do labirinto eram fechadas, encerrando-se tal tentativa e dando-se continuidade à sessão.

Os animais eram submetidos, também, a um segundo esquema de treino: na fase de escolha, o animal era colocado na caixa S' ; o acesso ao corredor e caixa S era bloqueado. Este esquema garantia que os animais não utilizassem uma estratégia de orientação do eixo do corpo, i.e., virar à esquerda ou à direita. O procedimento era idêntico ao descrito anteriormente, porém o animal não poderia associar a virada do corpo da Fase de Informação com a rotação do corpo na fase de escolha. Neste caso, garante-se que o animal não está aprendendo a virar para o lado oposto ao virado na fase de informação. O treino dos animais nestes dois esquemas (saída da caixa S e saída da caixa S') foi pseudo-aleatório, i.e., os animais foram treinados nos dois esquemas o mesmo número de vezes em cada sessão, porém a ordem dos esquemas no decorrer da sessão foi aleatória.

Análise Histológica

Ao término dos testes comportamentais os animais foram anestesiados profundamente e perfundidos intracardiacamente com 400 ml de solução de sulfeto tamponada. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos da caixa craniana, fixados em Carnoy e processados até sua inclusão final em parafina.

Depois de emblocados em parafina, os cérebros foram fatiados em micrótomo. Uma secção de 30 μm de espessura foi recolhida em lâmina histológica a cada 10 secções, e corada com violeta de cresila, para evidenciar os corpúsculos de Nissl. Essas secções coradas permitiram avaliar a ocorrência de perda celular no giro denteado, CA1 e outras estruturas. As lâminas foram analisadas ao microscópio para se avaliar a extensão das lesões produzidas.

Análise dos Resultados

A partir do número de entradas na caixa incorreta calculou-se o índice de eficiência (*IE*): $IE (\%) = (8 - n^{\circ} \text{ de entradas na caixa incorreta}) \times 12,5$. O desempenho máximo possível ocorre quando o número de entradas na caixa incorreta é igual a zero. Assim, $IE (\%) = 8 - 0 \times 12,5 = 100\%$. Os índices de eficiência (*IE*) diários dos (*n*) sujeitos dos grupos CO e IR ao longo das sessões foram usados em uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), utilizando-se “Grupo” como fator entre-sujeitos e “Sessões” como fator intra-sujeitos. Esta análise permitiu a comparação entre as curvas de desempenho dos grupos CO e IR ao longo das sessões de treino. O Teste de Newman-Keuls foi utilizado como teste de comparações múltiplas complementares a ANOVA para identificação da origem das diferenças.

Foram consideradas diferenças significativas as comparações cujos níveis de significância foram iguais ou menores do que 0,05.

Resultados

Resultados Histológicos

A observação e análise, ao microscópio, das lâminas referentes aos animais submetidos à radiação-X (grupo IR) mostraram que houve extensa lesão das células do giro denteado, tanto no hemisfério direito quanto esquerdo, ao longo de todo o eixo septo-temporal, não havendo, aparentemente, perda celular dos campos CA1 e CA3. Além disso, não houve perda aparente de células do córtex sobreposto ao hipocampo (Figura 2). Para ilustrar quantitativamente o efeito da radiação-X foram calculadas as áreas dos campos CA1, CA3 e giro denteado dos cortes histológicos apresentados na Figura 2 (programa analisador de imagem Scion Image, versão Beta 3, Scion Corporation, Maryland, USA). A comparação das áreas dessas estruturas nas secções coronais dos dois grupos mostrou que houve uma redução média de 79% da área do giro denteado do grupo Irradiado (Controle=0,43 mm^2 , Irradiado=0,09 mm^2). Além disso, não foram encontradas alterações relevantes nas áreas dos campos CA1 (Controle=0,32 mm^2 , Irradiado=0,31 mm^2) e CA3

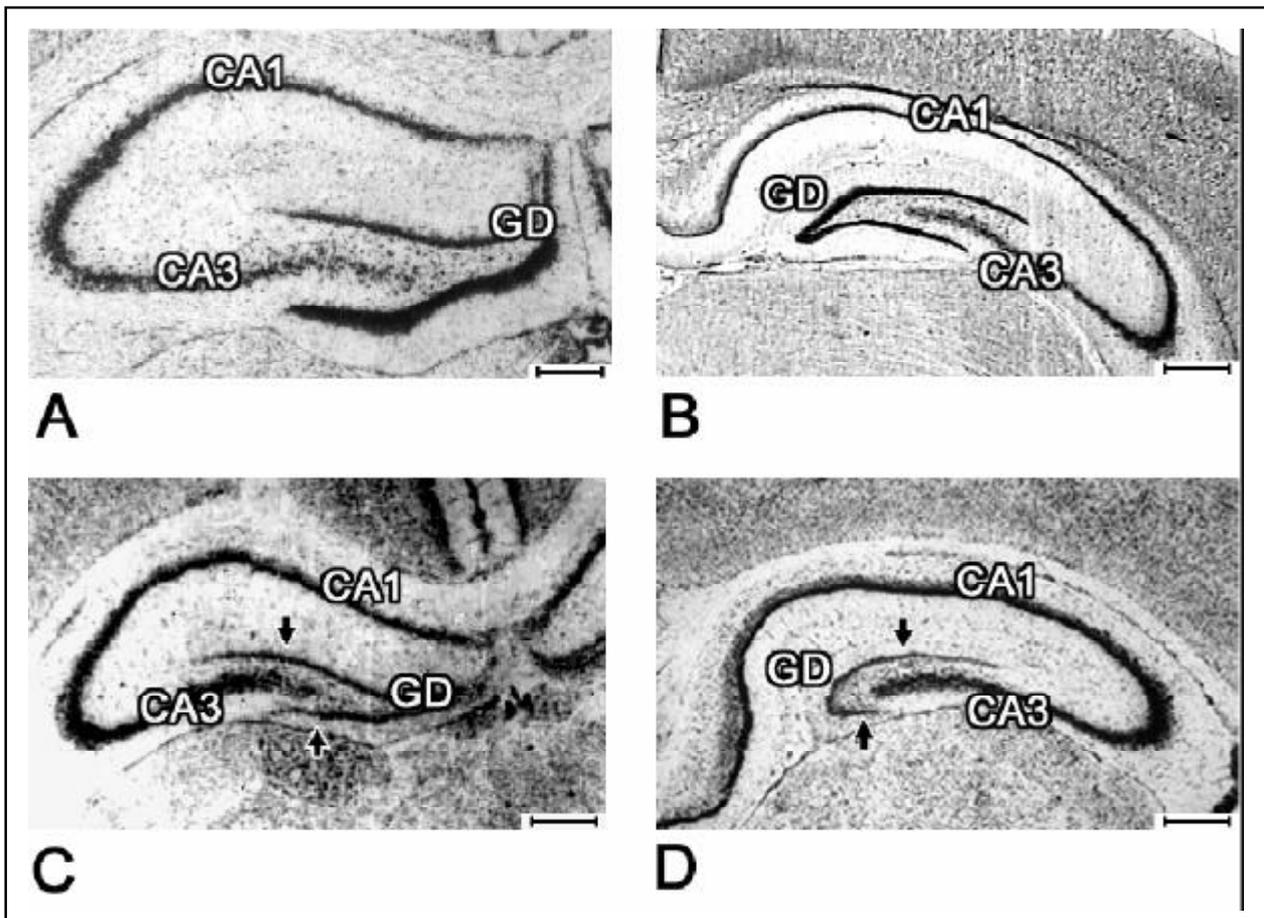


Figura 2. Fotomicrografias de secções coronais do pólo septal do hemisfério direito de animais representativos dos grupos Controle (A) e Irradiado (C) e do pólo intermediário do hemisfério esquerdo dos grupos Controle (B) e Irradiado (D). As secções coronais do grupo Irradiado (C e D) apresentam uma redução média de 79% da área do Giro Denteado (flechas) em relação às secções coronais do grupo Controle (A e B). CA1 e CA3 = Cornos de Ammon do Hipocampo; GD=Giro Denteado. Barra de escala igual a 400 μm .

(Controle=0,35 mm², Irradiado=0,35 mm²). Moreira e Bueno (2003) encontraram uma redução de 85% da área do giro denteado e no experimento 2 de Moreira et al. (1997) encontrou-se uma redução de 80-85% da mesma área. Assim, os resultados do presente estudo confirmam os descritos por Moreira et al. (1997) e Moreira e Bueno (2003) que utilizaram o mesmo procedimento de radiação-X. Além disso, Czurko et al. (1997), apesar de terem utilizado uma dose única de raios-X de 9 Grays, também em ratos neonatais, encontraram uma redução de 60 a 80% da área do giro denteado, sem danos, no entanto, às células piramidais das áreas CA1-3. Costa et al. (2005) encontram uma redução de 86% na área do giro denteado, porém, diferente da lesão por irradiação, a lesão por colchicina provocou uma redução de 22% da área do campo CA1. Em nenhum dos estudos citados acima foram encontradas alterações no campo CA3.

Resultados Comportamentais

Os índices de eficiência (IE), expressos pela porcentagem de tentativas corretas, dos grupos CO e IR são apresentados na Figura 3. Os animais controle apresentaram um desempenho acima de 80% já na primeira sessão de treino. Este nível de desempenho, em torno de 85%, manteve-se ao longo das seis sessões. Por outro lado, os animais irradiados apresentaram nas duas primeiras sessões, um IE estatisticamente inferior (em torno de 70%) ao dos animais controles; a análise estatística (ANOVA) indicou diferenças significativas entre os grupos ($F_{1,16}=6,66$; $p<0,05$) e o Teste de Newman-Keuls mostrou que o grupo IR difere significativamente dos animais controles nas sessões 1 e 2.

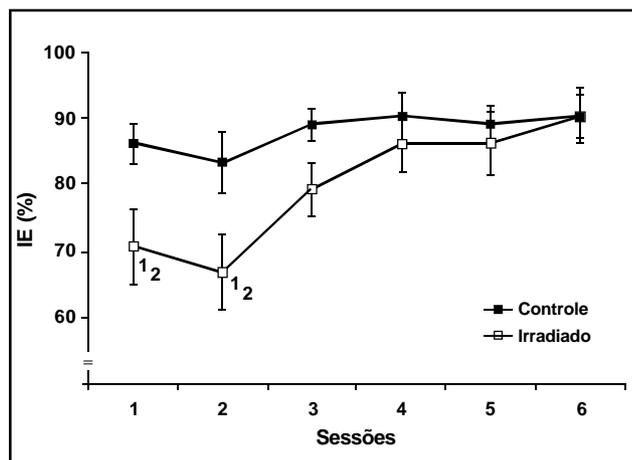


Figura 3. Média (\pm EP) dos índices de eficiência (IE %) dos grupos Controle (N=9) e Irradiado (N=9) submetidos ao treino pós-irradiação da tarefa espacial NMTP.

Notas. (1) diferença significativa em relação ao grupo Controle, na respectiva sessão; (2) diferença significativa em relação à 6ª sessão de treino. Teste de Newman-Keuls, $p<0,05$.

Os animais irradiados mostraram uma melhora do desempenho ao longo das sessões, alcançando nas duas últimas sessões IEs acima dos 85%; a ANOVA indicou diferenças significativas entre as sessões ($F_{5,80}=3,27$; $p<0,05$), porém, não houve interação significativa grupo x sessão

($F_{5,80}=1,07$; $p>0,05$). O Teste de Newman-Keuls não apontou diferenças significativas entre as sessões, para o grupo CO, enquanto, as sessões 1 e 2 do grupo IR diferem significativamente da sessão 6.

Esses resultados indicam que os animais controle mantiveram seu nível de desempenho ao longo das sessões de treino; por outro lado, os animais irradiados apresentaram um comprometimento do desempenho nas primeiras sessões do treino, porém, apresentaram uma recuperação ao longo das sessões.

Discussão

As diferenças no Índice de Eficiência mostraram um prejuízo no início da aquisição da tarefa NMTP para animais com lesão neonatal do giro denteado induzida por radiação ionizante. Apesar disso, nas últimas quatro sessões, os animais lesados atingem o mesmo nível de desempenho que os animais com o hipocampo intacto. Estes dados se assemelham aos obtidos com lesões por colchicina onde ratos pré-treinados nesta mesma tarefa também apresentam déficits iniciais quando testados após a lesão, com recuperação posterior de desempenho (Costa et al., 2005). Enquanto no presente estudo a perda celular foi induzida por radiação ionizante neonatal, portanto, quando as células granulares ainda não haviam estabelecido todas as suas conexões com as demais regiões do sistema nervoso, no estudo de Costa et al. (2005) a perda celular foi induzida na idade adulta e, portanto, as conexões desta população de células com as demais regiões do sistema nervoso já estavam estabelecidas. Assim, apesar de as lesões terem sido produzidas em estágios diferentes de desenvolvimento, podendo haver respostas plásticas distintas, o resultado comportamental foi equivalente. Em conjunto, esses resultados representam uma demonstração do envolvimento das células granulares do giro denteado nas funções requeridas para o desempenho dessa tarefa comportamental.

O fato de a lesão por radiação ionizante ser realizada no período inicial da vida do animal permite considerar a possibilidade de reorganização neural, o que poderia explicar a recuperação comportamental apresentada pelos animais irradiados na tarefa de NMTP na idade adulta. No entanto, Moreira e Bueno (2003) não encontraram projeção das fibras musgosas do giro denteado aos subcampos piramidais hipocampais em animais submetidos ao mesmo procedimento de lesão neonatal por radiação-X. Outra evidência a ser considerada, é a permanência da lesão do giro denteado resultante da radiação-X neonatal até três a cinco meses de idade dos animais, apontada por Czurko et al. (1997).

Freeman e Stanton (1991) mostraram que a destruição mecânica do hipocampo ao longo do eixo septo-hipocampal provocou prejuízo em uma tarefa de alternância espontânea, mas não em uma discriminação simples em um labirinto em T. Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os dados de Freeman e Stanton, pois, embora não tenha sido testada uma discriminação simples, existe uma semelhança entre a tarefa de NMTP e a alternância

espontânea, as duas envolvendo uma discriminação condicional. Animais com lesões hipocâmpais apresentaram prejuízo de desempenho em tarefas de NMTP realizadas tanto em um labirinto radial (Knowlton et al., 1989) como em um labirinto em T (Markowaska, Olton, Murray & Gaffan, 1989). De forma similar, ratos irradiados na fase neonatal por Czurko et al. (1997) apresentaram prejuízo no desempenho de tarefa de discriminação espacial em um labirinto aquático. Nestes estudos, porém, não foi observada melhora de desempenho ao longo das sessões, como a obtida por Costa et al. (2005) e no presente estudo. Tal diferença poderia ser explicada pela extensão das lesões produzidas. Nos estudos de Knowlton et al. (1989) e Markowaska et al. (1989) foram realizadas lesões extensas, que danificaram todos os campos hipocâmpais, assim como fibras de passagem. No trabalho de Czurko et al. (1997), danos causados pela radiação-X a outras estruturas cerebrais, como por exemplo o corpo caloso e córtex visual, ou ainda, a própria complexidade da tarefa, podem ter sido responsáveis pela não recuperação do desempenho dos animais irradiados. Por outro lado, os resultados de Handelmann e Olton (1981) e Emerich e Walsh (1989), onde são produzidas lesões restritas ao CA3 e giro denteado, respectivamente, mostram uma recuperação no desempenho dos animais, semelhante à recuperação encontrada nos trabalhos de Costa et al. (2005) e no presente estudo.

Assim sendo, os resultados do presente estudo são consistentes com os resultados encontrados na literatura: lesões hipocâmpais, independentemente do período de indução da lesão, promovem prejuízos no desempenho de ratos em tarefas espaciais. Além disso, os resultados mostram que a lesão do *giro denteado* do hipocampo provoca prejuízo na *aquisição* de uma tarefa espacial de NMTP e que a lesão induzida por radiação ionizante (que não provoca dano em outras estruturas hipocâmpais) promove o mesmo tipo de prejuízo de desempenho que a lesão por colchicina.

As deficiências encontradas em animais hipocâmpais em tarefas de NMTP, em um labirinto em T ou Y, refletem a inabilidade dos animais em distinguirem entre vários eventos (pistas ou objetos) idênticos, somente em termos da sua localização espacial (O'Keefe & Nadel, 1978). Em uma tarefa de NMTP, os animais aprendem na fase de informação que o LOCAL A é igual a reforço (alimento), enquanto na fase de escolha o LOCAL B é igual a reforço e LOCAL A é igual a não reforço. Neste caso, um evento - reforço - está associado a diferentes locais do ambiente (local A e B); entretanto, os animais hipocâmpais, não podendo utilizar o sistema de mapeamento, teriam dificuldades para solucionar tal problema. Além disso, um mesmo local pode estar associado a reforço ou a não-reforço dependendo da fase do experimento. Na fase de informação o LOCAL A é igual a reforço e na fase de escolha o mesmo local é igual a não-reforço. Neste caso, um mesmo local tem valores (significado, informação) diferentes - ora é um local de reforço, gerando aproximação, ora é um local a ser evitado, pois não é reforçado. Os animais hipocâmpais desprovidos do seu sistema de mapeamento têm dificuldades de resolver prontamente tal ambigüidade.

Mesmo sendo disponível aos animais hipocâmpais o sistema de táxon, o uso das estratégias de guiamento ou orientação dificulta a resolução adequada (resolvem mais lentamente) da distinção entre um evento (reforço) que ocorre em dois locais distintos (local A e B). Por meio destas estratégias, os animais também têm dificuldade de resolverem (resolvem mais lentamente) a ambigüidade da ocorrência de diferentes efeitos, reforço e não-reforço em um mesmo local.

Por outro lado, a tarefa de NMTP realizada em um labirinto em T é considerada uma tarefa onde os animais usam a memória operacional para processarem as informações e realizarem a tarefa adequadamente (Meck, Church & Olton, 1984; Olton, 1986). Neste caso, os animais precisam armazenar na memória operacional a informação sobre o local da caixa com reforço. Na fase de escolha, os animais precisam recuperar essa informação da memória operacional para poderem decidir nesta fase qual é a caixa com o reforço. A resposta adequada em um momento depende da informação obtida em um momento anterior, e esta informação varia de tentativa para tentativa. Esse processamento é realizado na memória operacional. Os animais hipocâmpais apresentariam um prejuízo de desempenho nesta tarefa, pois estão impossibilitados de processarem informações na memória operacional. Portanto, segundo a teoria do mapa cognitivo e a teoria da memória operacional, os animais com lesão da estrutura hipocâmpal apresentariam um prejuízo de desempenho em tarefas de NMTP em um labirinto em T.

Os dados obtidos por Costa et al. (2005) e no presente experimento confirmam um prejuízo na capacidade de utilização de informações espaciais pelos animais lesados ou um prejuízo na capacidade de processamento na memória operacional. Contudo, o desempenho adequado em uma tarefa espacial é recuperado com o treino repetitivo (Costa et al., 2005) ou aprendido após extensivo treino (presente estudo). Esta recuperação de desempenho ou aprendizagem não pode ser explicada pela teoria da memória operacional. Por outro lado, estes resultados podem ser devidos à utilização de uma estratégia de guiamento (teoria do mapa espacial). Mesmo encontrando-se na literatura experimentos que mostram que animais lesados no hipocampo são capazes de realizar tarefas como uma discriminação condicional espacial (Markowaska et al., 1989), a teoria do mapa espacial sustenta que tais tarefas podem estar sendo resolvidas pelo sistema de táxon. Neste caso, o limite entre atribuições exclusivas do hipocampo (sistema de mapeamento) e outras estruturas responsáveis pelo sistema de táxon não se torna claro, pois se permite, sempre, atribuir ao sistema de táxon a resolução da tarefa.

Os dados obtidos sugerem, portanto, que lesões das células granulares do giro denteado, tanto induzidas por radiação ionizante quanto por colchicina, resultam em um prejuízo na utilização de informações espaciais em uma tarefa de discriminação condicional. Contudo, esta deficiência inicial nos animais lesados é superada ao longo dos treinos, o que pode ser explicado pela utilização de uma outra estratégia na solução da tarefa.

Referências

- Ades, C. (1993). Por uma história natural da memória. *Psicologia USP*, 4, 25-48.
- Bayer, S. A., & Peters, P. J. (1977). A method for X-irradiating selected brain regions in infant rats. *Brain Research Bulletin*, 2, 153-156.
- Bueno, J. L. O. (1989). O comportamento animal é mediado por representações. *Ciência e Cultura*, 41, 677-689.
- Costa, V. C. I., Bueno, J. L. O., & Xavier, G. F. (2005). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and performance in temporal and spatial tasks. *Behavioural Brain Research*, 160, 286-303.
- Czurko, A., Czeh, B., Seress, L., Nadel, L., & Bures, J. (1997). Severe spatial navigation deficit in the Morris water maze after single high dose of neonatal x-ray irradiation in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 2766-2771.
- Emerich, D. F., & Walsh, T. J. (1989). Selective working memory impairments following intradentate injections of colchicine: Attenuations of the behavioral but not the neuropathological effects by gangliosides GM1 and AGF2. *Physiology Behavior*, 45, 93-101.
- Freeman, J. H., & Stanton, M. E. (1991). Fimbria-fornix transections disrupt the ontogeny of delayed alternation but not position discrimination in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 105, 386-395.
- Gallistel, C. R. (1989). Animal cognition: The representation of space, time and number. *Annual Review Psychology*, 40, 155-189.
- Gallistel, C. R. (1990). Representations in animal cognition: An introduction. *Cognition*, 37, 1-22.
- Handelmann, G. E., & Olton, D. S. (1981). Recovery of function after neurotoxic damage to the hippocampal CA3 Region: Importance of postoperative recovery interval and task experience. *Behavioral and Neural Biology*, 33, 453-464.
- Hodges, H., Katzung, N., Sowinski, P., Hopewell, J. W., Wilkinson, J. H., Bywaters, T., & Rezvani, M. (1998). Late behavioural and neuropathological effects of local brain irradiation in the rat. *Behavioural Brain Research*, 91, 99-114.
- Knowlton, B. J., Shapiro, M. L., & Olton, D. S. (1989). Hippocampal seizures disrupt working memory performance but not reference memory acquisition. *Behavioral Neuroscience*, 103, 1144-1147.
- Markowaska, A. L., Olton, D. S., Murray, E. A., & Gaffan D. (1989). A comparative analysis of the role of fornix and cingulate cortex in memory: rats. *Experimental Brain Research*, 74, 187-201.
- Meck, W. H., Church, R. M., & Olton, D. S. (1984). Hippocampus, time, and memory. *Behavioral Neuroscience*, 98, 3-22.
- M'Harzi, M., Jarrard, L. E., Willig, F., Palacios, A., & Delacour, J. (1991). Selective fimbria and thalamic lesions differentially impair forms of working memory in rats. *Behavioral and Neural Biology*, 56, 221-239.
- Moreira, R. C. M., & Bueno, J. L. O. (2003). Conditional discrimination learning and negative patterning in rats with neonatal hippocampal lesion induced by ionizing radiation. *Behavioural Brain Research*, 138, 29-44.
- Moreira, R. C. M., Moreira, M. V., Bueno, J. L. O., & Xavier, G. F. (1997). Hippocampal lesions induced by ionizing radiation: A parametric study. *Journal of Neuroscience Methods*, 75, 41-47.
- O'Keefe, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Olton, D. S. (1986). Hippocampal function and memory for temporal context. In R. L. Isaacson & K. A. Pribram (Eds.), *The hippocampus* (pp. 281-298). New York: Plenum Press.
- Rescorla, R. A., & Holland, P. C. (1982). Behavioral studies of associative learning in animals. *Annual Review of Psychology*, 33, 264-308.
- Rola, R., Raber, J., Rizk, A., Otsuka, S., VandenBerg, S. R., Morhardt, D. R., & Fike, J. R. (2004). Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. *Experimental Neurology*, 188, 316-330.
- Silasi, G., Diaz-Heijtz, R., Besplug, J., Rodriguez-Juarez, R., Titov, V., Kolb, B., & Kovalchuk, O. (2004). Selective brain responses to acute and chronic low-dose X-ray irradiation in males and females. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325, 1223-1235.
- Tada, E., Parent, J. M., Lowenstein, D. H., & Fike, J. R. (2000). X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience*, 99(1), 33-41.
- Vitral, R. W. F., Vitral, C. M., & Dutra, M. L. (2006). Callosal agenesis and absence of primary visual cortex induced by prenatal X rays impair navigation's strategy and learning in tasks involving visuo-spatial working but not reference memory in mice. *Neuroscience Letters*, 395, 230-234.
- Walker, J. A., & Olton, D. S. (1984). Fimbria-fornix lesions impair spatial working memory but not cognitive mapping. *Behavioral Neuroscience*, 98, 226-242.
- Whishaw, I. Q., & Mittleman, G. (1986). Visits to starts, routes and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. *Journal of Comparative Physiology*, 100, 422-431.
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F. J. B., & Santos, A. M. G. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: Difficulties in 'place strategy' because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*, 9, 668-681.

Recebido: 26/12/2005
1ª revisão: 07/05/2006
Aceite final: 04/07/2006