

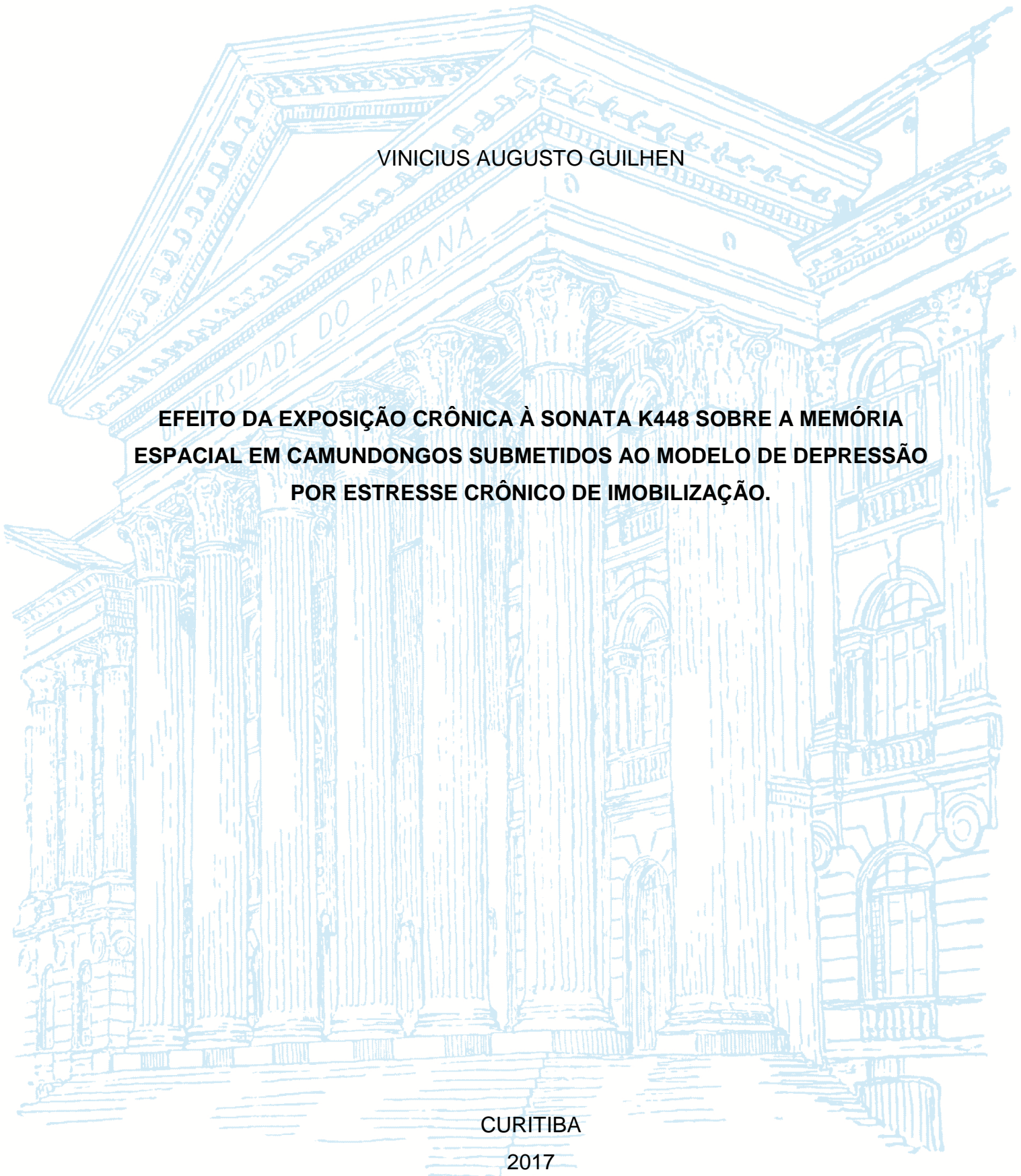
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VINICIUS AUGUSTO GUILHEN

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À SONATA K448 SOBRE A MEMÓRIA
ESPACIAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO
POR ESTRESSE CRÔNICO DE IMOBILIZAÇÃO.**

CURITIBA

2017



VINICIUS AUGUSTO GUILHEN

EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À SONATA K448 SOBRE A MEMÓRIA
ESPACIAL EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE DEPRESSÃO
POR ESTRESSE CRÔNICO DE IMOBILIZAÇÃO

Monografia apresentada ao departamento de fisiologia da UFPR como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Professor Dr. Bruno Martynhak

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda a dedicação e suporte, seus esforços me permitiram chegar até aqui. Pai, agradeço por todos os seus conselhos e conversas ao longo dessa vida, que me guiaram pelo caminho. Saiba que sempre seguirei seus passos. Mãe, agradeço cada momento que passamos juntos, todo seu carinho, amor, dedicação e paciência ao longo dessa vida, me tornam uma pessoa melhor a cada dia. A vocês eu dedico meu maior agradecimento.

Ao meu orientador Bruno Martynhak, meus mais sinceros agradecimentos. Obrigado pela oportunidade de trabalhar e desenvolver esse projeto ao seu lado. Obrigado por todo o suporte e tempo dedicado. Admiro ainda mais o seu trabalho e levarei para sempre tudo que aprendi com você.

Aos meus professores e mestres, em especial a Luana Fischer, Claudia Sallai, Edson Tanhoffer, Bruno Martynhak, Cristina Stern. Obrigado por despertar em mim o amor pela ciência. Vocês realmente fizeram e fazem a diferença na Universidade. Jamais esquecerei sua contribuição para minha vida pessoal e profissional.

Aos meus colegas de laboratório e amigos Franco e Kamila, sem vocês eu jamais teria conseguido, obrigado por todas as horas de trabalho nas quais eu não pude estar presente, por todo empenho dedicação e seriedade nos experimentos.

Aos meus amigos Bruno Nakayabu, Franco de Souza Cabral, Mateus Peressuti, Rafael Reis, Isabela Duarte, Tacyany Lima, Fabiele Pereira, Glaucia Tobaldini, Dabna Tomin, Natalia Sardi, e a tantos outros que não caberiam em uma simples folha. Obrigado por todos os momentos, experiências e aprendizagem, certamente vocês tornaram os dias melhores.

A você Priscila Palucoski, por toda ajuda, nos melhores e nos piores dias, pelas conversas sinceras. Agradeço o seu carinho e dedicação. Obrigado por tornar meus dias mais felizes.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Eu não quero acreditar, eu quero saber”.

Carl Sagan

RESUMO

Diversos estudos demonstraram que ouvir música clássica, Mozart sonata k.448, melhora a cognição e a memória espacial, tanto em humanos quanto em camundongos, além disso, a música de Mozart mostrou desencadear mecanismos precursores da neurogênese no hipocampo, como o aumento da expressão de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BNDF) e seus receptores de tropomiosina quinase B (TrkB). Porém pouco se sabe sobre o efeito da música na memória de animais adultos submetidos ao modelo depressão por estresse crônico. Uma vez que a depressão e o estresse crônico levam a morte de neurônios e a redução da neurogênese hipocampal, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da música sobre a memória espacial de camundongos submetidos ao modelo de depressão por estresse crônico, como indicador de neurogênese hipocampal. Para isso utilizamos 50 camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) previamente submetidos ao modelo de depressão por imobilização crônica, e os expusemos à música de Mozart: Allegro con spirito of Mozart's Sonata for two pianos in D major K448, por uma hora, durante três semanas. A memória espacial foi avaliada através do teste de localização de objetos e do labirinto em Y. Nossos resultados demonstram que os animais expostos à música no geral tiveram um melhor desempenho no teste de localização de objetos comparado com os animais submetidos ao ruído branco, indicando um possível efeito sobre a memória, embora a música sozinha não tenha sido capaz de reverter os danos cognitivos provocados pelo protocolo de estresse. É possível que alterações no protocolo como, o aumento do tempo de exposição à música, a exposição precoce, ou o período de exposição melhorem a memória espacial em camundongos, no entanto novos estudos são necessários para comprovar a eficácia da música como adjuvante no tratamento de doenças que causam déficits cognitivos, como a depressão e o Alzheimer.

Palavras-chave: Música. Memória. Memória Espacial. Depressão. Estresse. Neurogênese. Estresse crônico. Hipocampo.

ABSTRACT

Several research has shown that listening to music improves cognition and spatial learning, both in humans and in mice. Mozart's music seems to trigger neurogenesis in the hippocampus, such as increased expression of brain-derived neurotrophic factors (BNDF) and tropo-myosine-related kinase B (TrkB). However the effect of music on the memory of adult animals submitted to the chronic stress depression model is unknown. knowing that depression and chronic stress lead to the death of neurons and the reduction of hippocampal neurogenesis. In the present study we evaluated the effect of music on the spatial memory of mice exposed to the chronic stress depression model, as an indicator of hippocampal neurogenesis. For this, we used 50 swiss mice (*Mus musculus*) previously submitted to the chronic immobilization depression protocol, and exposed them to Mozart's music: Allegro con spirito of Mozart's Sonata for two pianos in D major K448, for one hour, for three weeks. Spatial memory was evaluated through the object localization and the Y-maze test. We showed that the animals treated with music had a better performance in the object localization compared to the animals treated with white noise, indicating a possible effect on memory, although music alone has not been able to reverse the cognitive damage caused by the stress protocol. It is possible that changes in the protocol such as increased exposure to music, early exposure or changes in the exposure period improves spatial memory in mice, however, new studies are needed to prove the effectiveness of music as a complement in treating diseases that cause cognitive deficits such as depression or Alzheimer's disease.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| FIGURA 1: ESQUEMA REPRESENTANDO O TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS..... | 18 |
| FIGURA 2: MODELO ESQUEMÁTICO DO TESTE DO LABIRINTO EM Y..... | 19 |
| FIGURA 3: TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS. (A) TREINO; (B) TESTE (C) ÍNDICE DE DISCRIMINAÇÃO | 22 |
| FIGURA 4: TESTE DO LABIRINTO EM Y, TEMPO GASTO EM CADA BRAÇO..... | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS

BDNF – Fatores Neurotróficos Derivados do Cérebro

CA3 – Região 3 do corno de Amon

DI – Índice de Discriminação

LTP – Potenciação de longa duração

NMDA – N-metil D-Aspartato

PVC – Policloreto de polivinila

SEM – Erro padrão médio

TrkB – Tropomiosina quinase B

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 11 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 13 |
| 4.1 ANIMAIS..... | 13 |
| 4.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE | 13 |
| 4.3 TRATAMENTO..... | 14 |
| 4.3.1 MÚSICA | 14 |
| 5. TESTES COMPORTAMENTAIS | 14 |
| 5.1 CAMPO ABERTO..... | 14 |
| 5.2 LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS..... | 15 |
| 5.3 Y-MAZE..... | 16 |
| 5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 17 |
| 6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 17 |
| 7. RESULTADOS | 18 |
| 7.1 CAMPO ABERTO..... | 18 |
| 7.2 TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS | 19 |
| 7.3 TESTE DO LABIRINTO EM Y | 20 |
| 8. DISCUSSÃO | 21 |
| REFERÊNCIAS | 24 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo Kandel (1990), um dos aspectos mais importantes para a vida animal é a capacidade de modificar seu comportamento através da aprendizagem. Ao longo da evolução a memória surgiu como um processo fundamental para o armazenamento de informações, e é resultado da plasticidade sináptica gerada por mecanismos moleculares e bioquímicos (KANDEL, 2001). Nos mamíferos, o hipocampo é uma das estruturas primordiais para a aquisição e consolidação da memória declarativa, sendo que lesões nessa estrutura provocam uma redução na capacidade de armazenar novas informações (BROOKS, 2000; MORRIS, 1990).

A memória responsável por guardar informações ambientais espaciais e temporais é conhecida como memória espacial que é classificada como parte da memória declarativa de longo prazo, sendo dependente do hipocampo. Uma vez que o hipocampo é lesionado a capacidade de aprendizado e a realização de tarefas dependentes da memória espacial são afetadas (CLARK, 2007; O'KEEFE; NADEL 1978; SORIANO; KANDEL 1992).

Os mecanismos por trás da aquisição de uma nova memória estão relacionados com a capacidade de alterações na plasticidade neuronal e modificações de potenciação de longa duração (LTP). A LTP é induzida pela ativação pós sináptica de um receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) pelo glutamato, reforçando e aumentando a capacidade sináptica e a memória (SORIANO; KANDEL, 1992; KANDEL, 2001).

O estresse crônico pode causar alterações neuroanatômicas no hipocampo, como a atrofia de dendritos na região CA3 (CONRAD, 1996). Somado a isso, o estresse diminui a LTP e a neurogênese no hipocampo tornando-se prejudicial a memória e ao processo de aprendizagem (SHORS; THOMPSON 1992).

Um dos principais sintomas da depressão em humanos a partir dos 40 anos é a redução de funções cognitivas como a memória (GARCIA, 2006; RAVIKINDLE, 2002). O mesmo efeito é observado em camundongos submetidos a modelos de depressão (SONG LI, 2006).

O estresse é um dos principais fatores ambientais que predis põem um indivíduo a depressão. Alguns estudos sugerem que o estresse pode provocar alterações plásticas no hipocampo como alterações sinápticas e redução da neurogênese (JOCA, 2003). Em humanos, o estresse crônico ao longo da vida pode

provocar a atrofia hipocampal gerando uma redução significativa da memória (LUPIEN, 1998). Tratamento com antidepressivos revertem a atrofia hipocampal e aumenta a expressão de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BNDF), reduzindo os prejuízos cognitivos apresentados por pacientes com depressão (SHELIN, 2003; SONG LI, 2006).

Já se sabe que o enriquecimento ambiental provoca neurogênese no hipocampo de camundongos (ROSSI C. 2006). Além disso, experimentos demonstram que o enriquecimento ambiental favorece a LTP no hipocampo (FOSTER, et al. 2000). Assim, a música também pode ser considerada um fator de enriquecimento ambiental.

Rauscher (1993), correlacionou a música com a melhora em atividades dependentes de raciocínio espacial e memória, demonstrando um aumento significativo do desempenho logo após a exposição a música de Mozart. O tratamento com o silêncio teve um resultado pior na execução das mesmas atividades. Rauscher (1998) tratou animais ainda no útero de suas mães, mais 60 dias após o seu nascimento com a música de Mozart sonata k.448, demonstrando que essa música tem um efeito benéfico para o hipocampo de animais, semelhante ao que ocorre quando recebem enriquecimento ambiental. Além disso, os animais tratados com ruído branco ou barulho tiveram uma piora da memória espacial. Esse resultado também foi observado em humanos. Pesquisas semelhantes demonstraram que o mesmo resultado pode ser obtido com a exposição à música durante uma hora por dia no período pré-natal (KIM et al. 2006).

Experimentos utilizando a música de Mozart sonata 10, em B maior KV361 Largo, provocou mudanças na atividade motora de camundongos reduzindo significativamente a imobilidade no nado forçado e no campo aberto. (DA CRUZ, 2010).

O tipo de música e o ritmo, parecem estar diretamente relacionados com o seu efeito sobre a memória. Camundongos tratados com a música de Beethoven cometeram mais erros e levaram mais tempo para completar o labirinto múltiplo em T do que os animais tratados com a música de Mozart (AOUN et al, 2005).

Xing (2016) demonstrou que a exposição precoce à música provoca uma melhora da memória espacial em ratos, além de aumentar da expressão de BNDF e receptores de tropomiosina quinase B (TrkB) no hipocampo. Ele demonstrou também que apenas o ritmo da música de Mozart k448 foi capaz de provocar uma

melhoria no desempenho dos animais no teste do labirinto aquático de Morris. Em humanos houve também uma melhora na performance de tarefas espaciais. O ritmo retrógrado da mesma música provoca uma piora na realização destes testes. Análises de imuno-histoquímica confirmaram o aumento da neurogênese e da expressão de BDNF e seus receptores no giro denteado do hipocampo, indicando que a natureza do efeito Mozart dependa em grande parte do tipo rítmico da música k.448.(XING, 2016).

Foram levantadas hipóteses com base em estudos anteriores, de que ouvir música pode facilitar a neurogênese e ajudar no processo de reparo do hipocampo (Fukui, H. 2008). Com isso, a terapia musical poderia ser utilizada como adjuvante para o tratamento de algumas doenças como a depressão e o Alzheimer, dessa forma melhorando a memória e a qualidade de vida (HSU et al. 2017).

Muitos avanços na ciência, tem proporcionado uma melhora na qualidade de vida de indivíduos com doenças que levam a perdas cognitivas e mnemônicas, como depressão e o Alzheimer, dessa forma, a música pode vir a ser usada como tratamento adjuvante para melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da música sobre a memória espacial em camundongos adultos submetidos ao modelo de depressão por estresse crônico de imobilização, verificando a eficácia da exposição à música de Mozart k448, durante uma hora por dia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da exposição crônica à música sobre a memória espacial em camundongos submetidos ao modelo de depressão por estresse por imobilização.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a performance dos camundongos na realização de tarefas depende de memória espacial.

Testar e avaliar a música como adjuvante para o tratamento do estresse induzido por imobilização crônica em camundongos adultos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Já se sabe que a música tem a capacidade de provocar alterações no humor e evocar sentimentos em seres humanos (Kanda e Levitin, 2013). Ao longo da história, a música foi amplamente utilizada em rituais de cura e cultos religiosos, podendo também aumentar a concentração e a motivação, e reduzir o estresse e a dor (Nisson, 2005; Hanser 1985). A música está relacionada com funções cognitivas e melhora o desempenho na realização de tarefas matemáticas e de raciocínio espacial (RAUSCHER, 1993). Foi demonstrado que crianças expostas à música, tem uma melhora significativa da memória verbal comparado a crianças que não ouvem música (HO, et al. 2003). O mesmo efeito sobre a memória espacial também foi demonstrado em ratos jovens. Rausher (1998) utilizou a música de Mozart Sonata k448 para tratar ratos do período pré-natal e até 60 dias após o nascimento, e observou que os animais completaram o labirinto múltiplo em T de forma mais rápida e com menos erros do que o grupo que não recebeu nenhum estímulo quando jovem. Assim é evidente que durante as primeiras fases do desenvolvimento, a música desempenha um papel importante na memória. Seguindo essa mesma abordagem, filhotes recém nascidos que tiveram seu ambiente enriquecido por música ainda no útero da mãe tiveram sua habilidade de aprendizado espacial melhorada, além de ocorrer um aumento da neurogênese no giro denteado do hipocampo e em células piramidais da região CA3. Por outro lado, durante o período pré-natal quando expostos ao estresse por barulho, as ratas grávidas apresentam altos níveis de corticosterona que levam a prejuízos cognitivos dos filhotes na realização de tarefas dependentes de memória espacial, juntamente com quadros de redução da neurogênese hipocampal (KIM et al. 2006). Camundongos submetidos ao estresse crônico tem uma perda cognitiva da memória espacial que pode ser observada através da redução da busca pela novidade no labirinto em Y (WRIGHT, 2005). O estresse também induz a produção de glicocorticóides, que são potencialmente danoso para a proliferação de células granulares do giro denteado do hipocampo (TANAPAT, 1998). Recentemente, Xing et al. (2016) demonstrou que a melhora provocada pela exposição precoce à música está associada com o

aumento da expressão de BDNF e TrkB na região CA3 dorsal do hipocampo e no giro denteado, sendo que a expressão de BDNF e TrkB na região CA1 dorsal, não é afetada pela música. Já foi demonstrado que o BDNF e seus receptores TrkB declinam na fase adulta em algumas regiões do cérebro, no entanto a sua expressão continua a ocorrer no hipocampo, no córtex auditivo e no cerebelo (MAZANA et al. 1993). A grande maioria dos experimentos realizados utilizam a música de Mozart como parâmetro, e seu efeito já é bem estabelecido na literatura desde 1993. A música de Mozart k.448 provocou um aumento da expressão de BDNF e TrkB no córtex auditivo e no hipocampo de ratos recém-nascidos, melhorando o desempenho em tarefas dependentes de memória espacial. O mesmo acontece quando apenas o ritmo da música de Mozart k.448 é utilizado. Por outro lado, a música retrógrada de Mozart k.448, provocou a redução em habilidades dependentes da memória espacial no teste do labirinto aquático de Morris. Isso mostra que esse padrão musical produz efeito importante no córtex auditivo que leva a neurogênese hipocampal (XING et al. 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 50 camundongos machos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas, com 60 dias de idade. Foram mantidos em ambiente de luminosidade controlada, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h (07:00/19:00). Os animais foram alocados em gaiolas individuais, com ração e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados após a aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR). Os animais que tiveram baixa preferência por sacarose na medida basal com foram excluídos posteriormente.

4.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE

Para o protocolo de estresse foi utilizado o modelo de imobilização crônica, esse modelo provoca anedonia nos animais, reduzindo a performance no teste de natação forçada (Strekalova T. et al 2004) . Para isso, os camundongos eram

colocados em tubos falcon de 50 mL previamente furados em toda sua extensão, permitindo assim uma respiração adequada. Eles permaneciam neste aparato por duas horas, durante 4 semanas. Tempo necessário para os animais expressarem sintomas tipo depressivo.

Os animais foram separados em dois grupos, estresse e controle. No primeiro, os animais foram submetidos ao estresse de imobilização, enquanto que os animais do grupo controle passavam as duas horas em suas gaiolas na mesma sala que os animais estressados.

4.3 TRATAMENTO

4.3.1 MÚSICA

Uma semana após o início da imobilização, os grupos controle e imobilização foram subdivididos em dois grupos cada. Os animais foram divididos nos música e o seu controle ruído branco. O primeiro foi exposto à música “Allegro con spirito of Mozart’s Sonata for two pianos in D major K.448” na intensidade de 65 dB por 1 hora durante três semanas. O segundo passou pelo mesmo procedimento no entanto foi exposto ao ruído branco. Os grupos foram alocados em salas diferentes para que não houvesse sobreposição da música e do ruído branco. A exposição foi realizada na fase clara dos animais, entre 8:30 e 12:00

5. TESTES COMPORTAMENTAIS

5.1 CAMPO ABERTO

O campo foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. Consiste de uma arena circular feita de PVC (40 cm de diâmetro e 28 cm de altura). A base da arena foi dividida em 4 quadrantes. Os camundongos foram colocados no centro do campo aberto e seu padrão de movimentação e o número de quadrados cruzados com as quatro patas foi avaliado durante 10 minutos.

5.2 LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

A localização de objetos é um teste de memória espacial que depende do mapeamento cognitivo do ambiente (Chapillon and Rouillet 1997; Thinus-Blanc and Ingle 1985). O teste foi baseado em protocolos anteriores contendo algumas adaptações (Wang, et al. 2009). Consiste em um campo aberto no qual são posicionados dois objetos idênticos. Na fase de habituação/exploração o camundongo é posicionado no centro do campo aberto e passa cinco minutos explorando os objetos. Uma hora após essa etapa, na fase de teste, um dos objetos é reposicionado em um quadrante inferior de forma que o objeto fique diagonalmente paralelo ao outro, causando uma mudança no ambiente explorado inicialmente. O animal é colocado no centro do campo aberto, são contabilizados então o tempo gasto de exploração em cada objeto: 1. Número de vezes que o animal se inclina no objeto; 2. Número de vezes que aproxima o focinho a menos de 2 centímetros do objeto. A medida do tempo gasto em cada objeto foi realizada por um percentual do tempo total de exploração em segundos. Para minimizar a influência do cheiro, os objetos eram limpos com etanol 70% a cada seção. Há duas medidas para a discriminação do comportamento (Ennaceur e Delacour 1988). A primeira é (D1) para a fase de habituação, é a diferença entre o tempo de exploração do objeto novo e familiar. Por exemplo, $[D1 = (T_n - T_f)]$ onde (T_n) é o tempo gasto em segundos no objeto novo e o (T_f) é o tempo gasto no objeto familiar. A segunda medida é o índice de discriminação (DI) que permite a discriminação entre o objeto novo e o familiar. Agrupando as duas medidas temos a seguinte fórmula, $DI = (T_n - T_f) / (T_f + T_n)$; $DI = (TR - TL) / (TR + TL)$. (Zhao et al. 2007; De Rosa ET AL 2005). O resultado pode variar de -1 até +1, quando positivo indica maior tempo gasto no objeto novo ou no objeto posicionado do lado direito e quanto mais negativo indica uma maior exploração no objeto familiar ou do lado esquerdo. Para o experimento, a alteração da localização foi realizada de maneira balanceada, para metade dos animais a nova localização foi no lado esquerdo e para a outra metade a nova localização foi no lado direito.

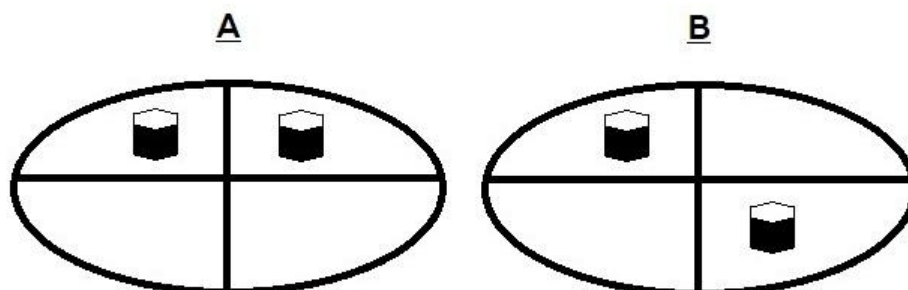


Figura 1. Esquema representando o teste de localização de objetos, (A) fase de treino no qual os animais são posicionados no centro do campo aberto e é analisado o tempo que explora cada objeto. (B) Fase de testes, nessa fase um dos objetos é trocado de posição, é avaliado o tempo que o animal explora o objeto na nova posição comparado com o objeto na mesma posição.

5.3 Y-MAZE

O labirinto em Y é formado por 3 braços longos de 35cm de comprimento e 7cm de largura, dispostos em um ângulo de 120° formando um Y. Foi utilizado pela primeira vez por Conrad para avaliar a memória espacial em animais com o hipocampo lesionado. (Conrad et al. 1996). No primeiro Trial um dos braços está bloqueado com uma placa feita do mesmo material do labirinto, quando o tempo é iniciado o animal explora durante 5 minutos os dois braços disponíveis, quando o tempo acaba ele é retirado do labirinto e permanece por aproximadamente uma hora em repouso. Para metade dos animais o braço livre foi o esquerdo, para a outra metade foi o direito. O labirinto é limpo para retirar qualquer pista olfativa do ambiente. Na segunda trial o camundongo é novamente posicionado em um braço do labirinto, porém nessa fase todo o labirinto pode ser acessado, dessa forma o animal explora durante mais 3 minutos livremente. É calculado o percentual de tempo que o animal explorou cada braço. Utilizamos o índice de discriminação para reduzir o viés, dessa forma excluímos do experimento os animais que obtiveram o maior e o menor resultado em cada grupo.

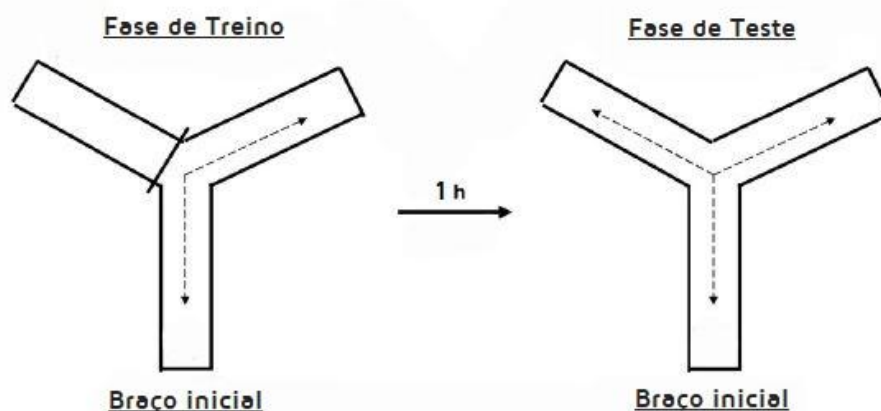


Figura 2. Modelo esquemático do labirinto em y, na fase de treino, um dos braços está bloqueado, o animal então é posicionado na ponta do braço inicial e explora o labirinto durante 5 minutos. Na fase de teste um dos braços não está mais bloqueado, assim o animal pode explorar durante 3 minutos o labirinto completo. É avaliado o percentual de tempo que o animal passa em cada braço.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o software Statistica e os resultados obtidos foram avaliados através de ANOVA fatorial (fatores: música e estresse) ou ANOVA de medidas repetidas (fatores: música, estresse e braço do labirinto ou localização do objeto). Os valores significativos foram expressos quando $p < 0,05$ e as diferenças foram expressas através do erro padrão médio (SEM)

6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Antes do início do experimento os animais foram submetidos ao teste de preferência por sacarose, assim, foram alocados de forma aleatória em 4 grupos da seguinte forma:

TABELA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTO

| Grupo | Estresse | Música ou Ruído branco |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Ruído branco + estresse | 4 semanas 2h/dia | 3 semanas 1h/dia |
| Ruído branco controle | | |
| K.448 + estresse | | |
| K.448 controle | | |

Dois desses grupos compõem o controle negativo, e por isso não passarão por nenhuma forma de estresse. Os outros 2 grupos serão expostos ao modelo de depressão animal por imobilização crônica. Logo após a separação dos grupos, todos os dias os animais eram levados até a sala de procedimentos onde eram submetidos ao modelo de imobilização crônica, durante 2 horas por 4 semanas. Os animais controle também eram levados para o mesmo ambiente, no entanto passaram as 2 horas em suas gaiolas. Durante todo o processo, a preferência à sacarose foi monitorada semanalmente para avaliar a anedonia. Na segunda semana de experimentos os animais iniciaram o tratamento com música ou ruído branco meia hora após o protocolo de estresse para evitar a associação da música ao estresse. Após a terceira semana de exposição à música os animais passaram pelo campo aberto para avaliar sua atividade locomotora.

Para avaliar os efeitos da música sobre a cognição dos animais, 24 horas após a última exposição a música, realizamos dois testes comportamentais, o teste de localização de objetos e no dia seguinte o teste do labirinto em y.

7. RESULTADOS

7.1 CAMPO ABERTO

Com relação a atividade locomotora dos animais, não foi identificado diferença estatística entre os grupos, demonstrando uma distância total percorrida semelhante ($F_{1, 36}=1,0325$, $p=0,31634$). O mesmo ocorre quando avaliamos o número de quadrantes atravessados. Demonstrando que os animais não tiveram sua atividade locomotora afetada ($F_{1, 36}=2,1573$, $p=0,15058$).

7.2 TESTE DE LOCALIZAÇÃO DE OBJETOS

Durante a fase de treino, a análise ANOVA demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos no tempo total de exploração do objeto A e do objeto B ($F_{1, 32}=1,3063$, $p=0,26154$) figura 3A. Na fase de testes, observamos que os animais expostos à música exibem uma preferência maior pela nova localização do objeto do que os animais expostos ao ruído branco, os valores obtidos na ANOVA de duas vias demonstrou uma diferença significativa entre ruído branco x música (**$F_{1, 32}=4,3269$, $p=0,04561$**) figura 3B. O índice de discriminação (DI) não demonstrou diferença estatística entre os grupos ($F_{1,32}=3,3252$, $p=0,07758$, figura 3C. No entanto observamos uma tendência menor da média de exploração do objeto novo no grupo ruído branco estresse, comparado com seu controle. O grupo exposto à música e ao estresse também tem uma média maior de exploração ao objeto novo que o grupo música controle.

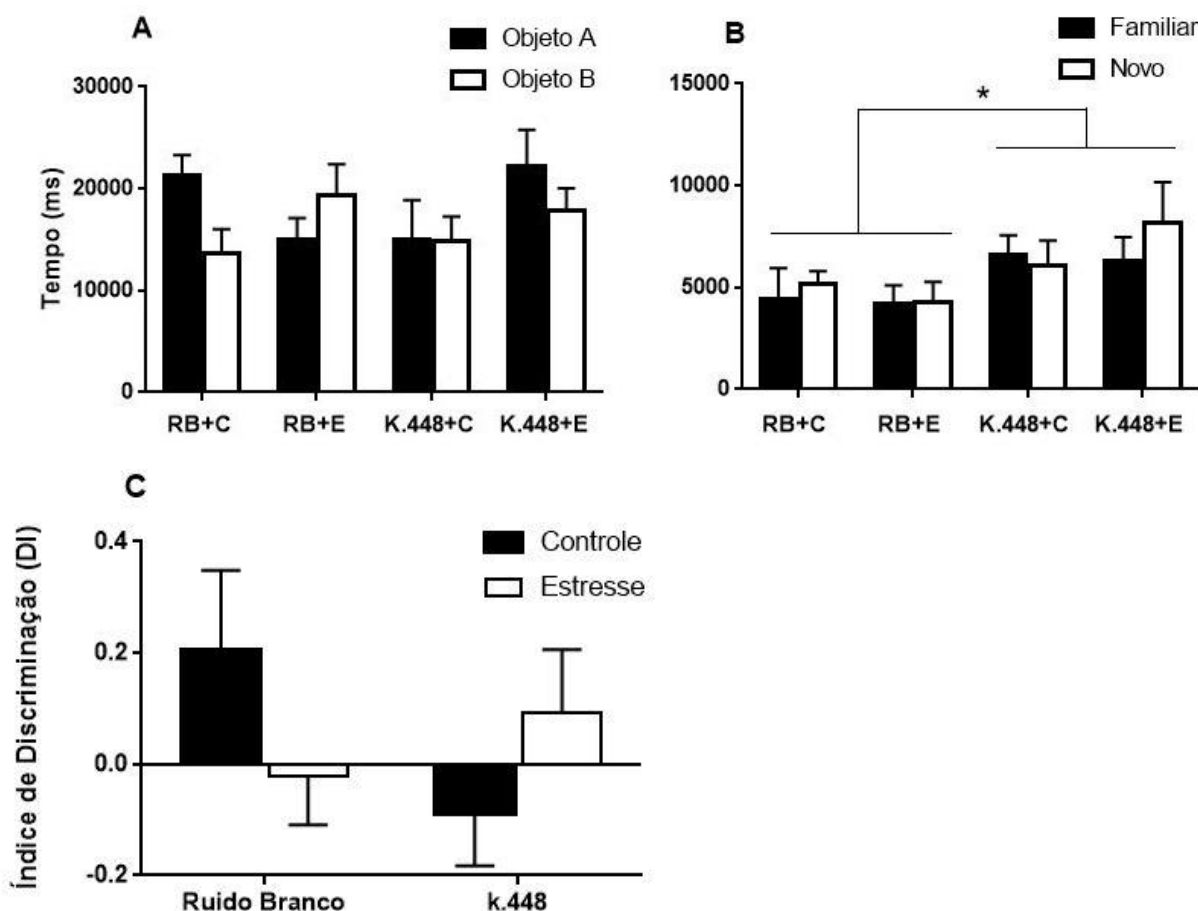


Figura 3. Teste de localização de objetos realizado após 3 semanas após a exposição à música. (A) Performance dos grupos na fase de treino. (B) Performance dos camundongos na fase de teste, o grupo exposto a música permaneceu mais tempo explorando o objeto novo. * música x ruído branco. (C) Índice de discriminação (DI), o resultado obtido foi calculado através da fórmula $DI = (T_n - T_f) / (T_f + T_n)$ indicando a proporção de tempo gasto em cada objeto, quanto maior o índice maior o tempo gasto no objeto novo. Não houve diferença estatística entre os grupos $F(1, 32)=3,3252$, $p=,07758$. RB+C ruído branco + controle; RB+E ruído branco + estresse; K.448+C música + controle; K448+E música + estresse. * $p<0,05$ (efeito do fator música, K.448 vs. ruído branco).

7.3 TESTE DO LABIRINTO EM Y

Após a exposição crônica a música ou ao ruído branco, os animais controle não demonstraram um comportamento natural de exploração de ambientes novos. Análise por ANOVA de duas vias demonstrou que não há diferença significativa entre a exploração do braço novo e do braço familiar entre os grupos ($F(1, 15)=1,1973$, $p=0,29113$). Foi observado também que em todos os grupos os animais permaneceram mais tempo no braço inicial, do que nos outros braços ($F(2, 30)=7,8702$, $p=0,00179$), figura 4.

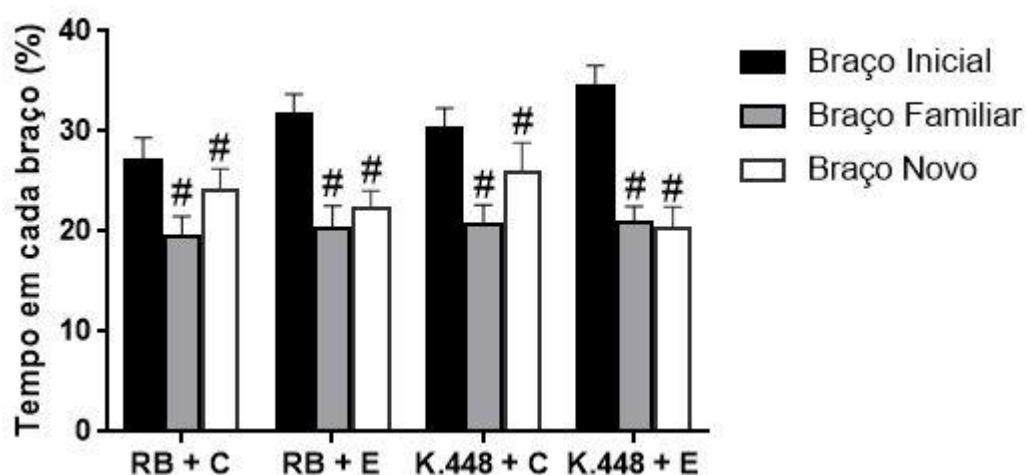


Figura 4. Efeito da música sobre o tempo de exploração no labirinto em Y, medido em percentual do tempo gasto em cada braço do labirinto, # comparado com o braço inicial. Com relação ao tempo de exploração no braço novo, não é possível observar diferença estatística entre os grupos. RB+C ruído branco + controle; RB+E ruído branco + estresse; K.448+C música + controle; K448+E música + estresse. # $P < 0,05$ em comparação com o braço inicial..

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, testamos o efeito da exposição prolongada à música sobre a memória espacial de camundongos submetidos ao modelo de depressão induzida por estresse crônico de imobilização.

Na fase de treino da localização de objetos não observamos diferença estatística entre o tempo total de exploração do objeto nas localizações A e B, indicando que não houve preferência entre as duas localizações seguindo o padrão esperado. Entretanto, é possível observar maior tempo de exploração em ambos os objetos durante a fase de testes dos animais expostos à música, o que pode ser um indicativo de maior comportamento exploratório, reafirmando pesquisas anteriores que demonstram que animais submetidos à música tem um desempenho melhor em atividades dependentes de memória espacial que os animais submetidos ao barulho ou ao ruído branco (RAUSCHER, 1998). Através do índice de discriminação observamos que os animais submetidos à música e ao estresse passaram mais tempo explorando o objeto novo que os animais controle, ao contrário do encontrado na literatura, uma vez que o estresse crônico provoca redução da capacidade cognitiva e piora a performance em atividades dependentes de memória, além de reduzir a LTP no hipocampo (BAKER; KIM, 2002).

Os camundongos possuem a tendência natural de explorar ambientes novos, no teste do labirinto em y, embora não seja estatisticamente significativo, os

animais controle demonstraram uma tendência média maior para esse comportamento, indo de encontro com os dados da literatura (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Por outro lado, os animais permaneceram mais tempo no braço inicial, indicando um possível comportamento tipo-ansioso em todos os grupos. Assim, a música não foi capaz de reduzir os efeitos deletérios do estresse por imobilização.

O efeito benéfico da música para a memória está associado com o aumento da expressão de BDNF e TrkB no hipocampo, animais com knockout de BDNF, bem como animais submetidos a estresse crônico, tem uma redução na capacidade de executar tarefas dependentes de memória, como o labirinto aquático de Morris (XING Y, 2016; HELDET et al. 2007). O hipocampo torna-se uma região sensível a alterações induzidas pelo estresse crônico. Além disso, o estresse causa a redução de dendritos apicais na área CA3 do hipocampo (CONRAD, 1996). É possível que esses fatores tenham influenciado o teste de localização de objetos, uma vez que animais tratados com o ruído branco e estresse tiveram um baixo desempenho na exploração do objeto novo, e o grupo tratado com música teve um desempenho melhor. Neste último caso, a música pode estar relacionada um aumento da expressão de BDNF, TrkB, que por sua vez auxiliam na sobrevivência de novos neurônios provindos da neurogênese.

No entanto, ainda são necessários novos estudos para esclarecer de fato se a música pode melhorar a memória espacial em camundongos submetidos ao modelo de depressão por estresse de imobilização. Para futuras pesquisas se faz necessário a replicação dos experimentos, aumentando o n amostral, além disso, a posição à música foi realizada durante uma hora por dia na fase clara, ao contrário de outros estudos pré-clínicos em que a exposição à música ocorreu durante a fase escuro, ou seja durante a fase de atividade dos animais e por um maior período de tempo. Aumentar o tempo de exposição à música ou alterar o período em que ela é executada poderiam nos levar a novos resultados.

Os resultados da localização de objetos e do labirinto em y não foram robustos, indicando que alterações nos protocolos e uma melhor validação dos testes deve ser realizada. A utilização de novos testes de memória como o labirinto aquático de Morris, ou mesmo o teste de reconhecimento de objetos foram avaliados para novas pesquisas.

Por fim quando o efeito comportamental induzido pela música estiver melhor estabelecido, os mecanismos moleculares poderão ser melhor investigados.

REFERÊNCIAS

AOUN, Peter et al. Long-term enhancement of maze learning in mice via a generalized Mozart effect. **Neurological research**, v. 27, n. 8, p. 791-796, 2005.

BAKER, K. B.; KIM, J. J. Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. **Learning & Memory**, v. 9, n. 2, p. 58-65, 2002.

BROOKS, AL.; CORY-SLECHTA, D.A.; MURG, S.L.; FEDEROFF, H.J. Repeated acquisition and performance chamber for mice: a paradigm for assessment of spatial learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory** 74 (3), 241–258, 2000.

CHANDA, M. L.; LEVITIN, D. J. The neurochemistry of music. **Trends in cognitive sciences**, v. 17, n. 4, p. 179-193, 2013.

CHAPILLON, P.; ROULLET, P. Habituation and memorization of spatial objects' configurations in mice from weaning to adulthood. **Behavioural processes**, v. 39, n. 3, p. 249-256, 1997.

CHERYL, D.; Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. **Neurobiol Learning and Memory**, Jan; 79(1): 32–40, 2003.

CLARK, R.E.; BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R.; The hippocampus and spatial memory: findings with a novel modification of the watermaze. **The Journal of neuroscience**, 6647–6654, 2007.

CONRAD CD. GALEA L, A. KURODA Y. MCEWEN BS. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. **Behavioral neuroscience**, v. 110, n. 6, p. 1321, 1996.

CONRAD, CHERYL D. et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine treatment. **Behavioral neuroscience**, v. 110, n. 6, p. 1321, 1996.

DA CRUZ, J.G.P.; MAGRO, D.D.D.; DA CRUZ, N.J.; Efeitos da música clássica como elemento de enriquecimento ambiental em *Mus musculus* em cativeiro (Rodentia: Muridae). **Biotemas**, 23 (2): 191-197, 2010.

DELLU, F.; et al. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. **Neurobiology of learning and memory** 73.1 31-48, 2000.

ENNACEUR, A. DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. **Behav Brain Res** 31:47–59, 1988.

FOSTER, T. C.; FUGGER, H. N. CUNNINGHAM, S. G. Receptor blockade reveals a correspondence between hippocampal-dependent behavior and experience-dependent synaptic enhancement. **Brain Research** 871 (1), 39–43, 2000.

FUKUI, H.; TOYOSHIMA, K.. Music facilitate the neurogenesis, regeneration and repair of neurons. **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 71, n. 5, p.765-769, nov. 2008.

GARCIA, A.; et al. A depressão e o processo de envelhecimento. **Ciências & Cogni o**, v. 7, n. 1, p. 111-121, 2006.

HANSER, S. B. Music therapy and stress reduction research. **Journal of Music Therapy**, v. 22, n. 4, p. 193-206, 1985.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 7, p. 656-670, 2007.

HO, Y.; CHEUNG, M.; CHAN, A. S. Music training improves verbal but not visual memory: cross-sectional and longitudinal explorations in children. **Neuropsychology**, v. 17, n. 3, p. 439, 2003.

HSU, TING-JUNG.; et al. Predictors of non- pharmacological intervention effect on cognitive function and behavioral and psychological symptoms of older people with dementia. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 17, n. S1, p. 28-35, 2017.

JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S.; Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 25(Supl II):46-51, 2003.

KANDEL, E. R; The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

KIM, H.; et al. Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. **Brain Development**, 28:109, 2006.

LUPIEN, S.J.; et al. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. **Nature Neuroscience**, 1(1):69-72, 1998.

MASANA, Y. et al. Localization of trkB mRNA in postnatal brain development. **Journal of neuroscience research**, v. 35, n. 5, p. 468-479, 1993.

MORRIS, R. G. M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N. P.; O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297, 681-683, 1982. **Neuroscience** 110 (6), 1321–1334, 1996.

NILSSON, U.; UNOSSON, M.; RAWAL, N. Stress reduction and analgesia in patients exposed to calming music postoperatively: a randomized controlled trial. **European journal of anaesthesiology**, v. 22, n. 2, p. 96-102, 2005.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. The Hippocampus as a Cognitive Map. **Clarendon Press**, Oxford, 1978.

RAUSCHER, F.H.; ROBINS, K. D.; JENS, J.J.; Improved maze learning through early music exposure in rats. **Neurological Research**, 20:427–432, 1998.

RAUSCHER, F.H.; SHAW, G.L.; KY, K.N.; Music and spatial task performance. **Nature Neuroscience**, 365: 611, 1993.

RAVNKILDE, B. et al. Cognitive deficits in major depression. **Scandinavian journal of psychology**, v. 43, n. 3, p. 239-251, 2002.

ROSA RD, GARCIA AA, BRASCHI C, CAPSONI S, MAFFEI L, BERARDI N, CATTANEO A. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 102 (10), 3811–3816, 2005.

SHARMA, S. et al. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences** 87 521–536, 2010.

SHELINE, Y.; GADO, M.; KRAEMER, H. C.; Untreated depression and hippocampal volume loss, **The American Journal of Psychiatry**, 160:1516-8, 2003.

SHORS TJ, FOY MR, LEVINE S, THOMPSON RF. Unpredictable and uncontrollable stress impairs neuronal plasticity in the rat hippocampus. **Brain Research** 24 (5), 663–667, 1990.

SONG, LI.; et al. Impairment of the spatial learning and memory induced by learned helplessness and chronic mild stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 2, p. 186-193, 2006.

SORIANO, P.; KANDEL, E. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. **Science**, v. 258, p. 18, 1992.

TANAPAT, P.; GALEA, L. A.; GOULD, E. S. Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 235-239, 1998.

THINUS-BLANC, INGLE D. Spatial behavior in the gerbil. **Journal of Comparative Psychology** 99, 311–315, 1985.

WANG W.; et al. Differential impairment of spatial and nonspatial cognition in a mouse model of brain aging. **Life Sciences** 127–135 doi:10.1016/j.lfs.2009.05.003, 2009.

WRIGHT, R. L.; CONRAD, C. D. Short Communication Chronic stress leaves novelty-seeking behavior intact while impairing spatial recognition memory in the Y-maze. **Stress**, v. 8, n. 2, p. 151-154, 2005.

XING, Y.; et al. Music exposure improves spatial cognition by enhancing the BDNF level of dorsal hippocampal subregions in the developing rats. **Brain research Bulletin**, 121, pp. 131-137, 2016.

XING, Y.; XIA, Y.; KENDRICK, K.; LIU, X.; WANG, M.; WU, D.; et al. Mozart, mozart rhythm and retrograde mozart effects: evidences from behaviours and neurobiology bases. **Scientific Reports**, 6:18744 DOI:10.1038/srep18744, 2016.

ZHAO Q, MURAKAMI Y, TOHDA M, OBI R, SHIMADA Y, MATSUMOTO K. Chotosan, a Kampo formula, ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced deficits in object recognition behaviors and central cholinergic systems in mice. **Journal of Pharmacological Science** 103 (4), 360–373, 2007.