

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO: “Processos de aprendizagem e memória dependentes da formação hipocampal seriam modulados pela ritmicidade circadiana”

PESQUISADORA: Verônica Sandra Valentinuzzi

ORIENTADOR: Gilbert F. Xavier

INSTITUIÇÃO: Instituto de Biociências - Departamento de Fisiologia

FINALIDADE: Pós - Doutorado

PARTICIPANTES: Antonio Carlos Pedroso Lima

Carmen Diva Saldiva

Gilbert F. Xavier

Verônica Sandra Valentinuzzi

Silvio Teruo Watanabe

DATA: 11/09/01

FINALIDADE DA CONSULTA: Sugestão para análise estatística

RELATÓRIO ELABORADO POR: Silvio Teruo Watanabe

1. Introdução

Todo animal manifesta variações regulares ao longo do dia nas suas variáveis bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, ou seja, ritmos circadianos (variações com períodos de aproximadamente 24h). Esses ritmos não são apenas reações a ciclos ambientais (ciclos claro-escuro); a maioria destes ritmos são controlados por relógios biológicos (os núcleos supraquiasmáticos) localizados numa estrutura cerebral: o hipotálamo. Uma variável comportamental que tem sido pouco estudada do ponto de vista temporal é a capacidade de aprender (aprendizagem e memória) . Os poucos estudos existentes sugerem que o nível de aprendizagem também manifesta ritmicidade circadiana, embora este fato nunca tenha sido confirmado categoricamente, uma vez que diversos fatores não relacionados à aprendizagem podem mascarar os resultados. Supõe-se que os relógios biológicos, de alguma forma, se conectam (por vias neurais e/ou químicas) às estruturas cerebrais responsáveis pelos processos de aprendizagem, transmitindo assim, informação sobre a hora do dia, de tal forma que o funcionamento destas estruturas se altere, e portanto, a capacidade de aprender.

2. Descrição do Estudo

Foi utilizado um teste de aprendizagem denominado Labirinto Aquático de Morris, onde utiliza-se uma piscina redonda, com 200cm de diâmetro e 50cm de altura, preenchida com água até 25cm. Para que a água fique opaca, é acrescentado leite à água. Aproximadamente 2cm abaixo da superfície da água, é colocada uma plataforma móvel, de acrílico transparente, com 9cm de diâmetro e cuja posição depende do procedimento do teste comportamental. Neste estudo ratos submetidos a diferentes ritmos circadianos são colocados em pontos pré-especificados na piscina e treinados a encontrar a plataforma.

Uma câmera de vídeo foi montada aproximadamente 290cm acima do centro da piscina e foi conectada a um aparelho digitalizador a fim de traçar o caminho do animal no vídeo. Em seguida, foi utilizado um programa de computador que analisou o trajeto dos animais.

A piscina foi dividida em quatro quadrantes com a mesma área, formados por linhas imaginárias, as quais se cruzavam no centro da piscina, formando ângulos de 90°. O animal deveria formar um mapa espacial da sala onde estava localizada a piscina, ou seja, estabelecer relações espaciais entre os distintos objetos da sala (janelas, portas, estantes, etc.) e a plataforma da piscina. A formação desta memória espacial depende da participação de uma estrutura cerebral, chamada hipocampo-dependente.

Os animais foram treinados vários dias e algumas vezes em cada dia. O tempo para o animal encontrar a plataforma foi medido, o que permitiu uma avaliação da rapidez com que o animal aprendia a localização da plataforma. Ao longo dos sucessivos dias de treinamentos, o tempo foi diminuindo até se estabilizar. Uma vez atingido este nível, a plataforma foi retirada e mensurado o tempo que o animal permanecia dentro do quadrante em que anteriormente estava localizada a plataforma, e também o tempo percentual que permaneceu em cada quadrante (em relação às três áreas neutras de igual tamanho e simetricamente localizadas). Foi mensurado o número de vezes em que o animal passou próximo do local onde

anteriormente estava posicionada a plataforma e também o percurso total de cada tentativa (cm). Desta forma, verificou-se a capacidade dos animais em aprender e lembrar a localização espacial da plataforma.

Segundo os pesquisadores, os seguintes fatores podem influenciar nas medidas descritas:

- ✓ a capacidade de estabelecer associações simples, isto é, ao invés de formar um mapa espacial do contexto, necessário para encontrar a plataforma, o animal poderia estar tomando como referência só uma das pistas, estabelecendo desta forma uma associação simples entre essa pista e a plataforma;
- ✓ a capacidade de ver e atentar pistas distais;
- ✓ a motivação de nadar e encontrar a plataforma para escapar da água;
- ✓ a coordenação motora também poderia variar ao longo do dia resultando numa eficiência natatória diferente.

Para avaliar estas influências, foram empregados outros testes:

- *Versão não-espacial (“plataforma visível”)*

Neste teste, procurou-se tornar a estimulação espacial irrelevante e associar a solução da tarefa a um estímulo visual (plataforma) movimentado aleatoriamente no labirinto. Para solucionar a tarefa, os animais deveriam identificar visualmente a plataforma e direcionar-se a ela.

O aparelho foi o mesmo; a plataforma foi localizada 1cm acima da superfície da água. Adicionalmente uma pista conspícua localizada acima da plataforma indicou sua posição. A localização da plataforma foi alterada aleatoriamente de uma sessão para outra, de modo que os estímulos visuais distais tornaram-se irrelevantes para o desempenho da tarefa. Assim, requer-se do animal apenas a visualização da plataforma e o direcionamento para a mesma.

Desta forma, foi possível avaliar de forma direta o impacto de fatores temporais sobre a coordenação motora e motivação.

- *Versão não-espacial (“pista distal única”)*

A hora do dia poderia também influenciar a visão à distância e/ou atenção a estímulos distais, o que por sua vez afetaria o desempenho neste teste de aprendizagem. Para avaliar essa possibilidade, foi feito um teste, em que os animais partiam sempre do mesmo ponto da borda da piscina e à plataforma submersa foi associada apenas um estímulo distal. Esta versão foi similar à versão envolvendo a “plataforma visível” na medida em que os animais deviam associar um estímulo à plataforma; porém diferiu no sentido de que na versão com plataforma visível a pista indicadora da localização da plataforma foi próxima, enquanto na presente versão foi distal. Assim, o desempenho desta tarefa requer que o animal visualize a pista distal, preste atenção à mesma e estabeleça uma associação simples com a plataforma.

O aparelho utilizado foi o mesmo. Porém, cortinas pretas foram penduradas ao redor do labirinto de modo a minimizar o acesso visual da sala; apenas uma referência foi colocada (marca) nas cortinas. O ponto de partida do animal dependia da localização da referência na cortina, de modo que se o animal nadasse em linha reta em direção à referência, deveria interceptar a plataforma ao longo do trajeto.

Para a execução do experimento acima descrito foram utilizados ratos da linhagem Wistar. Cada grupo foi constituído de 12 animais.

Os animais foram colocados em gaiolas individuais contendo rodas de atividade que permitiram registrar, de forma contínua, o ritmo de atividade locomotora. Essa atividade foi registrada 24 horas por dia através de um sistema computacional. Essas gaiolas foram mantidas em caixas de isolamento e controle de iluminação nas quais, durante os primeiros 10 dias, o ciclo claro-escuro foi de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com as luzes acendendo às 6:00h. Depois deste período, a fase escuro foi substituída por 12 horas de luz tênue (≤ 1 lux) vermelha; esta condição foi continuada por dois dias. Imediatamente depois foram expostas à luz intensa (200-300 lux) branca durante 15 minutos e depois substituída por luz tênue vermelha (≤ 1 lux) durante 11h e 45min. Esta condição foi mantida até o final dos experimentos.

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, cada qual testado

em diferentes fases do fotoperíodo. Um grupo foi treinado durante a fase ativa dos animais (noite) e o outro durante a fase inativa (dia). Note que as condições básicas de iluminação nessas duas fases foram idênticas; portanto, os grupos diferiram apenas em relação à fase de atividade ou inatividade dos animais.

3. Descrição das Variáveis

Variáveis controladas no estudo (fatores):

- ✓ Fase de realização do experimento: ativa (noite) e inativa (dia).
- ✓ Tempo: medido em dias.
- ✓ Repetição do teste no mesmo dia: são feitas 2 repetições em cada tempo.

Variáveis medidas no experimento

- ✓ Latência, isto é, o tempo gasto para que o rato chegue à(s) plataforma(s).
- ✓ Comprimento do trajeto percorrido pelo rato com objetivo de chegar à plataforma (cm).
- ✓ Percentual do tempo total que o rato permaneceu no quadrante correto, ou seja, no quadrante em que está plataforma real.
- ✓ Percentual de tempo total que o rato permaneceu próximo da plataforma.
- ✓ Número de vezes que o rato passou próximo da plataforma.

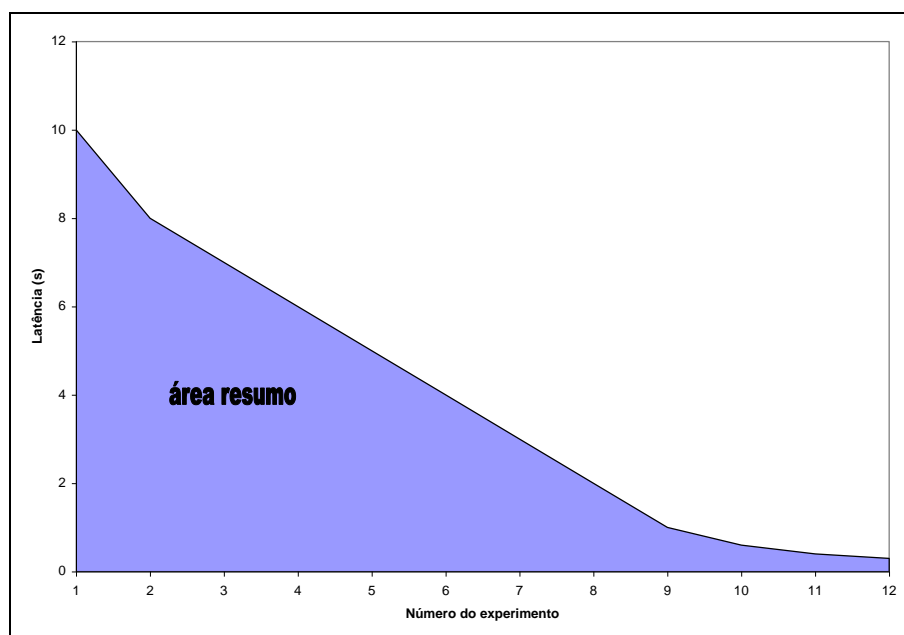
4. Objetivo

Objetivo do estudo é avaliar a capacidade de aprender as relações espaciais de um contexto (formação de um mapa cognitivo) durante dois horários opostos do dia (durante a fase de atividade e durante a fase de inatividade dos animais), com intuito de detectar alguma variação temporal em processos de aprendizagem.

5. Sugestão do CEA

Primeiramente, para que possa resumir a performance do rato por um período de experimento, foi sugerido o cálculo da área sob a curva formada (GráficoA.1).

Gráfico A.1: Exemplo da área resumo.



Neste experimento, os ratos que tiveram menor área são aqueles que apresentaram aprendizado mais rápido.

Para comparar os dois grupos de estudo (manhã e noite) quanto às médias das variáveis medidas no experimento, foi sugerida a técnica de análise de variância com três fatores fixos: grupo, tempo e repetição dentro de cada tempo, sendo que os fatores tempo e repetição envolvem medidas no mesmo animal (ver, por exemplo, Neter et al, 1996). Para o emprego desta técnica deve-se verificar a validade das suposições de homocedasticidade (variâncias iguais) e a normalidade das variáveis no experimento. A suposição de esfericidade da matriz de variância e covariância dentro de cada grupo também deve ser checada.

Outra técnica sugerida é a análise de sobrevivência, utilizando-se modelos de efeitos aleatórios (modelos de fragilidade – ver Chicarino (1999)). Nesta abordagem, pode-se modelar o tempo gasto pelos animais através de modelos paramétricos (exponencial ou Weibull, por exemplo), ou semi paramétricos (modelos de riscos

proporcionais de Cox). A metodologia para o uso de tais modelos também pode ser vista em Silva (2001).

6. Conclusão

As sugestões do CEA para a análise estatística dos dados é considerar a técnica de análise de variância com três fatores fixos e com medidas repetidas em dois fatores. Também pode ser considerado o emprego de técnicas de análise de sobrevivência (modelos de fragilidade). Ficou estabelecido que os pesquisadores trarão o banco de dados do experimento para ser analisado pela técnica de análise de sobrevivência.

7. Referências bibliográficas

CHICARINO, M. P. Z. (1999). **“Modelo semiparamétrico de fragilidade Gama”**. São Paulo. 77p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Matemática e Estatística - USP.

NETER, J., WASSERMAN, W. and KUTNER, M. H. (1996). **Applied linear statistical models: regression analysis of variance experimental design**. 4.ed. Homewood: Richard D. Irwing. 1408p.

SILVA, G. T. (2001). **“Modelagem de riscos proporcionais para dados de sobrevivência com estrutura hierárquica”**. São Paulo. Instituto de Matemática e Estatística - USP.