

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Laura Fernanda Jaimes Alvarado

**NOVOS NEURÔNIOS EM DIFERENTES MEMÓRIAS: modulação da neurogênese
adulto e seus efeitos mnemônicos**

Belo Horizonte,

2020

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Laura Fernanda Jaimes Alvarado

NOVOS NEURÔNIOS EM DIFERENTES MEMÓRIAS: modulação da neurogênese adulta e seus efeitos mnemônicos

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Prof^a. Grace Schenatto Pereira Moraes

Coorientador: Prof. Victor Rodrigues Santos

Belo Horizonte,

2020

043

Alvarado, Laura Fernanda Jaimes.

Novos neurônios em diferentes memórias: modulação da neurogênese adulta e seus efeitos mnemônicos [manuscrito] / Laura Fernanda Jaimes Alvarado. - 2020.

126 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes. Coorientador: Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Neurogênese. 2. Memória. 3. Memória coletiva. 4. Memantina. 5. Hipocampo. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Santos, Victor Rodrigues. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências

Biológicas:

Fisiologia e Farmacologia

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 329 DE LAURA FERNANDA JAIMES ALVARADO

Às 13:00 horas do dia 17 do mês de dezembro de 2020, transmitida através da plataforma de Webconferência Google Meet, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Laura Fernanda Jaimes Alvarado**. A presidência da sessão coube à **Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes**, orientadora. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt**, IB/Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Profa. Dra. Alline Cristina de Campos**, FMRP/Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e **Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientadora. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: "**Novos Neurônios em Diferentes Memórias: Modulação da Neurogênese Adulta e seus Efeitos Mnemônicos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, foi **aprovada** e será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2020.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Alberto Quillfeldt, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Cristina de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexander Birbrair, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes, Professora do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Cristina de Campos, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0472377** e o código CRC **386B59C3**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 329 LAURA FERNANDA JAIMES
ALVARADO**

**"Novos Neurônios Em Diferentes Memórias:
Modulação da Neurogênese Adulta e seus Efeitos Mnemônicos"**

LAURA FERNANDA JAIMES ALVARADO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **17 de dezembro de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Alexander Birbrair, ICB/UFMG

Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt, IB/UFRGS

Profa. Dra. Alline Cristina de Campos, FMRP/USP

Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, ICB/UFMG

Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos, ICB/UFMG - Coorientador

Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes, ICB/UFMG-Orientadora

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Alline Cristina de Campos, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grace Schenatto Pereira Moraes, Professora do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Daniele Cristina de Aguiar, Professora do Magistério**



Superior, em 17/12/2020, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorge Alberto Quillfeldt, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexander Birbrair, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0472382** e o código CRC **84018C80**.

AGRADECIMENTOS

Todo agradecimento é um exercício de memória episódica, uma pequena forma de transportar-nos ao passado para pensar naqueles eventos marcantes, e ver neles um dos elementos: o social. Descobrir em nossos labirintos mnemônicos quem são essas pessoas e listá-las com justiça é sem dúvida uma tarefa quase impossível. O principal motivo é que mesmo nossa memória sendo suficientemente boa para lembrar-nos da maioria, suas imperfeições vão ocasionar sempre um esquecimento. Nesse caso, se você participou dessa longa caminhada e não se encontra nessas sinceras palavras desculpe-me e lembre que o esquecimento é tão relevante quanto a memória.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Brasil e todas suas instituições, pois é um país que me deu as oportunidades que não tive na minha terra, um povo que me abraçou e me acolheu, uma universidade que me educou criticamente, um SUS que me atendeu, umas agências que me financiaram, uma pós-graduação que desafiou-me até o final e um laboratório que me formou. Apesar de todos os defeitos e problemas, o Brasil como um todo, seja como nação, experiência, lar, estudo, sociedade ou cultura, deu-me tantas coisas que sempre serei grata por cada dia que passei aqui durante mais de 6 anos.

Estou infinitamente agradecida com a minha mãe. *Gracias mamá por darme todo tu apoyo, por resistir mi ausencia durante los últimos 3 años que hemos pasado sin vernos y sobre todo por todo tu amor y paciencia. No ha sido fácil para nosotras y por eso quiero dedicarte este arduo trabajo que escribí con la pasión que siempre me has enseñado.*

Obrigada a Grace Schenatto minha orientadora por dar-me as condições de trabalho e a formação como doutora. Sempre lembrarei de todas as oportunidades que você me ofereceu desde o início e das coisas que vivemos juntas, ainda mais nesses tempos tão difíceis para ciência. Apesar de tantos anos e do desgaste normal dessa relação estudante-orientador, eu chego até o final tendo grande admiração e amor por você, especialmente pela sua coragem e sua forma efetiva e correta de fazer ciência. Alguma vez você falou que não existe “ex-orientador” porque os orientadores são para sempre, acredito que é verdade e eu estou feliz e orgulhosa porque levo comigo o melhor de Grace. Espero também ter retribuído em algo essa sua excelente formação e deixar um bom pedaço de mim com você.

Gostaria de agradecer a meu coorientador Victor Santos por todo seu apoio e sua orientação nos experimentos de neurogênese e pela sua leitura crítica do meu trabalho. De igual forma, por sempre dar-me ânimo e pelos anticorpos que foram fundamentais para vários experimentos. Também agradeço a professora Silvia Guatimosin e seu aluno Mario Moraes por ceder e fenotipar os animais transgênicos e ao professor Alexander Birbrair por cedê-los tão gentilmente para esse trabalho.

Sou imensuravelmente grata com Ana Flavia Santos Almeida, pois sem ela essa tese seria impossível, quando eu estive no meu pior momento e achei que não conseguiria acabar, foi Ana Flavia que acreditou em mim e me abriu as portas de sua casa para eu encontrar a tranquilidade necessária para terminar este trabalho. Ana Flavia, não existe pessoa no mundo com maior generosidade que você, todos os que moramos no seu coração temos um lar maravilhoso.

Apreendi tanto com você cientificamente e pessoalmente, que não dou conta de enumerar tudo, mas saiba que você será sempre uma inspiração para mim com sua disciplina-quase uma deusa do tempo- e sua praticidade. Além de tudo você decidiu escolher um marido fantástico como André Mello que partilha dessas qualidades e que foi tão bom comigo, trazendo leveza e carinho. Ana você ensinou-me tanto sobre a amizade que gostaria que soubesse que se eu não consegui ser melhor como amiga foi porque não sabia e por ter o defeito de ser medrosa e fechada. Talvez por isso não sei expressar com suficiente clareza o grande amor fraterno que sinto por você e a gratidão com a vida por tê-la conhecido e por nossa amizade. Sei que essa separação nossa vai ser muito difícil, vou sentir saudades todos os dias, mas espero continuar vivendo dentro de você, ecoando na sua cabeça “tranquila Ana Flavia” assim como você na minha sempre fala “Laura vai, anda logo”.

Muito obrigada a Lara Mansk por me apoiar em todos os experimentos, seja nos comportamentos inacabáveis, longas “imunos”, montagens de lâminas, revisão de português, discussões científicas, jornadas de estudo, fotografias, templates lindos e tudo o que eu inventei fazer durante 5 anos de trabalhar juntas. Oscar Wilde dizia “Só há duas tragédias na vida: uma é não conseguir o que se quer, a outra é consegui-lo”, eu tive a grande felicidade de te conhecer e de você ser minha companheira ideal de trabalho. A consequência desse sonho mostrou-se terrível, pois sempre compararei todo mundo com você, e por sua complementariedade comigo estarei fadada a uma insatisfação inacabável. Saiba que em qualquer universo e para qualquer “companhia” eu te escolheria, mas agora que temos que separar-nos, como é natural ao final de toda grande aventura, tenho certeza que uma de minhas partes do tesouro vai ser nossa amizade.

Quero agradecer a dois amigos e companheiros do Grace Team que fizeram possível este trabalho. O primeiro Caio Castro quem fez todos os treinos dos comportamentos de medo, muito deles feitos nas vésperas de Natal e ano novo, em dois anos consecutivos. Caio é pelo seu comprometimento que esse capítulo 3 começou e lembro de todas as coisas que discutimos no início, você me impulsou com suas ações, conhecimentos e atitudes quando eu comecei a trabalhar com memória de medo. Agradeço também a sincera amizade e todo o carinho que você me deu, você é um grande cientista e amigo, espero que continuemos perto. O segundo é Matheus Costa, que foi meu IC pelo último ano, sua chegada trouxe muita alegria e empolgação na minha vida, me sinto muito orgulhosa de conseguir acompanhar um pouquinho de seu processo. Você fez muito por esse trabalho, especialmente pelo capítulo 3, me ajudando em todo o que foi possível e fazendo até o impossível acontecer. Obrigada Matheus por levar sempre um sorriso e fazer com prazer todas as tarefas da iniciação desde encher caixas de ponteiras até estudar transformada de Fourier, sua atitude e sua força de trabalho fez toda a diferença para mim. Saiba que sem sua ajuda teria sido impossível tomar as milhares de fotos (não é exagero, pois entre nós dois tomamos mais de 8000 fotos de microscopia de fluorescência para 3 experimentos distintos em 3 estruturas) e cuidar meticulosamente de tantos animais ao mesmo tempo.

Sou grata com Luciana Melo que me acompanhou no começo do meu doutorado, querida Lu foi algo inesperado e sensacional a entrega gigante com a ciência que vivemos por 4 anos, mesmo que depois você nos deixou e entregou-se ao mundo. Foram diversas coisas que compartilhamos e de tanto falar com você eu animei a trabalhar com memória de medo, porque sua inteligência única me inspira sempre. Obrigada por escutar-me e levar-me de viagem com você pelo telefone

com fotos desfocadas e histórias engraçadas, e sobre tudo, por topar todas as “furadas” do mundo, desde tentar comprar uma máquina de lavar barata de uma esquizofrênica até levar 5 quilos de leite em pó por terra desde Colômbia a Costa Rica para uma familiar com paralisia cerebral. Ser sua amiga é uma experiência única e sei que vou te encontrar pelo mundo o dia menos pensado.

Também agradecer muito a Ana Luiza Lima por ser minha amiga e minha vizinha desde sempre. Dizem que os verdadeiros amigos se conhecem nas mudanças de casa e você foi lá na minha bagunça para me ajudar enfrentando seu medo de centopeia e lagartas, se isso não for amor não sei o que será. Obrigada pelas conversas longas no meio da pandemia que foram terapêuticas e por todas as fotos lindas que temos, nunca esqueça que eu torço por você. Agradeço a leitura crítica de alguns dos capítulos desta tese e por sua disposição para me ajudar a organizar minhas coisas e a perfundir algumas dezenas de animais.

Levo entre meu pulmão e meu coração a Leonardo Guarnieri com quem vivi muitas angústias, alegrias e cigarros. Obrigada Leo por sua ajuda nas longas imunos, por ficar comigo até a madrugada trabalhando nos tecidos, pelas infinitas tentativas de marcar a neurogênese. Adorei seu humor negro e seus comentários sarcásticos sobre a vida e a ciência, foi um grande prazer trabalhar de seu lado e receber os seus cigarros para relaxar-me no meio de incubações e problemas de laboratório. Durante os últimos meses no meio da pandemia pensei sempre em você, desejando sempre que sua saúde esteja forte.

Agradeço ao Professor Marcio Moraes, a Julian Vega e a Flavio Morão pelo apoio nos experimentos da eletrofisiologia, pois foi graças a toda a sua ajuda que essas ideias ficaram mais concretas. Pelo professor Marcio sempre terei a maior admiração, pois demonstra sempre com sua inteligência e liderança que pode mover montanhas e levar-nos a lugares inesperados. Devo agradecer seu grande esforço de construir e implementar inovações tecnológicas ao NNC, sendo que eu tive a grande sorte de usar muitas delas, como a caixa de condicionamento customizável, as máscaras de oxigênio, os *headstages* feitos pela sua equipe, além de todo o sistema de construção de matrizes. Mas além de seu trabalho como engenheiro, os seus maiores aportes nesse processo foram seu raciocínio e sua leitura crítica das ideias por trás desse trabalho, além das maravilhosas aulas que tive o prazer de assistir como sua estudante de doutorado.

A Julian quero dizer-lhe que aprecio o esforço que fez porque tirou tempo para fazer esses registros comigo mesmo tendo que dar aula, terminar seu mestrado e acompanhar a gravidez de sua esposa. Ainda, sou imensamente grata ao Flavio que construiu e melhorou o sistema de registro para camundongos e caixa de condicionamento, e, além disso, processou o registro eletrofisiológico conversando comigo sempre durante várias madrugadas aleatórias para me fazer rir e me dar muitos ânimos. Lindo Flavitcho obrigada por ser uma pessoa genial e um cientista dedicado, todas suas dicas e seu suporte foram muito necessários para mim.

Uma menção super especial a Liliana Mendoza que foi meu suporte pessoal e minha família. O seu apoio para este trabalho foi tão grande como o de qualquer colaborador porque você é um poço de soluções e de amor. Obrigada por todos os pequenos detalhes, por obrigar-me a descansar e por me fazer sonhar as coisas mais inusitadas. Você além de tudo, decidiu adotar o Peter e logo quis ajudar o Boros, e ainda com as mordidas e os episódios de destruição, esses

cachorros foram tudo para mim. Esta viagem de tantos anos perderia muito sentido sem você, e eu sou feliz e grata, porque sei que poucas pessoas têm a alegria de poder contar com alguém de forma sincera e absolutamente incondicional como eu conto com você. Tenho a certeza de que, sem importar nada, você vai estar ali para acolher-me, cuidar-me e defender-me, inclusive se eu cometer o pior dos crimes, ali você ainda estará como minha advogada estrela. Não tenho palavras suficientes para descrever o que você significou para mim e para esse processo.

Também quero mostrar minha gratidão a Lorena Terene que sempre me ajudou com sua energia desbordante. A sua agitação e força é incontível Lorena, e foi muito bom ter essas qualidades perto porque animou discussões frutíferas sobre memória e política, e, ao final, quando as forças me faltaram, você foi uma pessoa que ficou do outro lado do computador no nossos grupos de estudo de pandemia e me contagiou um pouco dessa vibração sua. Adicionalmente, agradeço a Lorena por ajudar-me com as correções de forma e formato de este trabalho e por toda a colaboração nas perfusões.

Agradeço ao resto do Grace Team, primeiro os que foram embora prematuramente e eu desejei que ficassem, como Thais Muniz que é uma fada sensata, Sasha que é uma grande lutadora e Matheus Barbosa uma pessoa de outro planeta e meu quase maridão. Também aos ICs que colocaram seu grão de areia para alguma parte de este projeto: Eduarda, Leonardo Melo, Gabriel e Rodrigo. E claro, sempre agradecer à Ana Raquel, Cristiane, Sasha e Luciana Cosenza cuja partida deixou lembranças de um tempo de empolgação que está cada vez mais longe. Assim mesmo deixo minha gratidão a equipe que veio para renovar Keity, Thaysa, Harrison e Paula por seus aportes e perguntas nas reuniões.

Quero agradecer à Bruna Rezende, Beatriz Codo, Laila Blanc Árabe e Muiara pela lindíssima convivência de tanto anos de laboratório e pela colaboração em coisas de rotina como soluções, limpeza, cuidado de animais, discussões de ciência e porque todas me ajudaram em várias perfusões. Vocês fizeram do meu tempo algo melhor e compartilhar risadas e dividir problemas foi fundamental para mim. Obrigada também ao seu orientador Bruno Rezende de Souza, pelo café, os doces, as palhas italianas e por algumas das melhores noites que tive na cidade de Belo Horizonte, conversando de ciência e me divertindo. Sem importar o prisma com que eu enxergue hoje para o passado, todos esses dias e noites que passei com você foram muito importantes para meu processo de formação e agradeço por preocupar-se sempre pela minha segurança e ser minha carona até a porta de casa em uma quantidade absurda de dias nos que trabalhei mais de 15 horas.

Sou grata também por ter conhecido ao professor André Massensini que apporto com seus comentários em cada seminário, me ajudou sempre com o microscópio e por todas as vezes que confundiu minha cabeça com piadas e “minerases” que eu nunca entendia. Obrigada a toda a sua equipe Massensini, a Gisele Brunch, Beatriz Tecedor, Eduardo Henrique e especialmente a Lorena Fernandes, para quem já falei coisas bonitas durante todos os dias, acredito que Lorena seja a única pessoa que eu elogio e agradeço o suficiente durante o meu trajeto.

Gostaria de agradecer a Professora Juliana Carvalho por sempre ter umas palavras em espanhol para mim, e por toda a confiança e o carinho que mostrou comigo. Também porque por ela tive a grande satisfação de conhecer e compartilhar com Barbara Fernandes, uma pessoa linda que eu liguei sempre quando morria de dores corporais ou quando tinha doenças pulmonares. Barbara

foi sempre uma mulher muito prestativa e disposta. Agradeço também a Leonardo Silva Augusto, por todo o afeto e pelos presentes que levo comigo para Colômbia como uma lembrança do tempo que compartilhamos.

A outros que são e foram integrantes do NNC também sou grata, a Samir pela ajuda com a memantina, Sofia pelas conversas interessantíssimas e ao professor Cleiton pelas caronas e suporte. Agradeço também a: Francisco, Daniel, Larissa Xavier, Vinicius “John”, Marco Túlio, Paula Bertu, Paulinho, Simões, Jessica, Ikaro, Matheus, Alan, Aline e muitos outros que me ajudaram no laboratório em algum momento.

Obrigada a todos companheiros de pós graduação, entre os que gostaria destacar a Sergio Scalzo, Roberta Cristelli, Thais Santana, Nayara Horta, Paola Fernandez e Ana Maria Correa com os quais eu consegui compartilhar um pouquinho a mais e construir momentos maravilhosos de conversas e risadas. Vou sublinhar a Ana Maria por ser minha compatriota, vizinha, amiga, companheira de saudades de nosso país e terapia de apoio, obrigada por tudo Ana. Também agradeço a todos os professores que me formaram e me ajudaram, destacando o professor Cândido e Fabricio que emprestaram sempre a sua balança e outros elementos de infraestrutura para eu realizar meu trabalho. Também a professora Maristela por sua abertura e por emprestar-me vários livros excessivamente agradáveis.

Dessa forma também agradecer a duas famílias que me acolheram. Primeiro, a família de Luciana Melo que foi acolhedora comigo, a sua avó Lourdes, a Renata, Flavio e particularmente a sua mãe Eneida que sempre esteve muito atenta e cuidou de mim. Também a família de Ana Flavia, dona Edna, Alfonso, Isabella e Teresa, pessoas maravilhosas que me abriram sempre as portas de sua casa.

Finalmente, agradeço a meus amigos fora do Laboratório. Primeiro, Monica Giedelmann uma amiga única, a pessoa mais inteligente e clara com a que eu consigo falar, serei sempre grata e feliz por as nossas conversas maravilhosas, sempre aprendo e o nosso e o único e raro caso que eu tenho de conseguir fortalecer uma amizade na distância. Também, Hernan Piñero um argentino que derrubou tudo o que eu pensava dos argentinos, e hoje o considero um amigo de meu coração. Assim mesmo, a minhas amigas Larissa e Heloisa, por muitas noites e risadas que me levaram para um mundo diferente ao do laboratório. Conhece-las foi um outro presente que o Brasil me deu e que espero cuidar para que perdure. E como é dito frequentemente: “the last but not the least” ; quero agradecer a minha família extensa que de forma direta e indireta participou de meu processo. Um agradecimento a minha irmã Diana Carolina Mantilla por sus silêncios e pelas ilusões de tranquilidade sem as quais a escrita teria sido mais difícil. A minha tia Gladys Alvarado também, por sempre me dar dicas de saúde, medicamentos e tratamentos, por ela eu consegui paliar as minhas dores e doenças muitas das quais floresceram na mudança para o Brasil. A minha tia Elizabeth Alvarado por ser uma companhia constante e um grande apoio para minha mãe durante todos estes anos. Também a meu tio Dario Alvarado por cuidar com nobreza de todas as necessidades de minha mãe durante a pandemia.

Acredito que minha gratidão é longa e ainda assim não faz justiça a todos, porque com cada nome vem uma história de vida e muitas anedotas. Gostaria de dizê-las todas e de manter essas lembranças em mim por muitos anos, por isso espero que este exercício de escrita de

agradecimentos, mesmo que incompleto, me ajude nas evocações futuras. Assim, quando chegue o momento de viajar de novo no tempo para o meu doutorado, eu possa encontrar estas memórias ainda persistentes.

RESUMO

A neurogênese adulta compreende o nascimento, amadurecimento e a integração de novos neurônios no cérebro. No hipocampo, a manipulação desse processo interfere na duração de memórias. Entretanto, os mecanismos subjacentes a esses efeitos ainda precisam ser desvendados. No presente estudo, utilizamos diferentes abordagens para testar a hipótese geral de que o mecanismo pelo qual modificamos a neurogênese é determinante para o efeito promnésico em memórias emocionais. Testes de reconhecimento social foram utilizados como paradigmas para acessar memórias emocionais não-associativas e não-aversivas. O uso de condicionamento clássico ao contexto, ao som e ao cheiro investigou memórias emocionais associativas e aversivas. Enriquecimento ambiental (EE), memantina (MEM) e andrografolide (AND) foram escolhidos como ferramentas para aumentar os níveis de neurogênese. Como indicadores de seus mecanismos, avaliamos seus efeitos na região do giro denteado do hipocampo (HIP) e/ou na camada granular do bulbo olfatório (BO) no (1) número de células progenitoras (em camundongos transgênicos Nestina-GFP), no (2) número de novos neurônios (BrdU e/ou DCX), na (3) taxa de sobrevivência de novos neurônios e na (4) energia do sinal no HIP, por meio da implantação de eletrodos profundo e análise eletrofisiológica. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o aumento da neurogênese promove a persistência de memória de medo e da memória social, mas seus efeitos são dependentes de variáveis como linhagem e a modalidade sensorial do estímulo condicionado. Dos substratos neurais avaliados, o hipocampo dorsal foi o principal alvo da neurogênese. O EE foi o método que teve o efeito promnésico mais amplo, independentemente do conteúdo da memória. Em conclusão, esta tese propõe que a MEM e o AND são ferramentas adequadas para alterar a produção de novos neurônios, com uma alta resolução temporal e alvos menos esparsos, o que é ideal em estudos que busquem por relações de causa-efeito entre neurogênese e memória. Entretanto, sob uma perspectiva translacional, mudanças sutis no ambiente e no dia-a-dia das pessoas que impactem na sua cognição são mais promissoras, e é nesse cenário que o presente estudo contribui, ao demonstrar a robustez dos efeitos do EE sobre a persistência de memórias.

Palavras chaves: neurogênese, memória, memória social, memória de medo, ambiente enriquecido, memantina, andrografolide

ABSTRACT

Adult neurogenesis encompasses the born, maturation and integration of new neurons in the brain. In the hippocampus, the manipulation of this process interferes with the duration of memories. However, the mechanisms underlying these effects have yet to be unraveled. In the present study, we use different approaches to test the general hypothesis that the mechanism by which we modify neurogenesis is pivotal for its promnesic effect on emotional memories. Social recognition tests were used as paradigm to access non-associative and non-aversive emotional memories. The use of classical conditioning to context, sound and smell investigated associative and aversive emotional memories. Environmental enrichment (EE), memantine (MEM) and andrographolide (AND) were chosen as tools to increase levels of neurogenesis. As mechanisms we measured (1) the number of progenitor cells (in transgenic mice Nestina-GFP), (2) the number of newborn neurons (BrdU and / or DCX), the (3) survival of newborn neurons and (4) the signal energy in the hippocampus, through the implantation of deep electrodes and electrophysiological analysis. Altogether, our results suggest that increasing neurogenesis promotes the persistence of fear and social memories, though its effects are dependent on variables such as mice strain and the sensory modality of the conditioned stimulus. Of the neural substrates evaluated, the dorsal hippocampus was the main target of neurogenesis. The EE was the method that had the wider promnesic effect, regardless of the content of the memory. In conclusion, this thesis proposes that MEM and AND are adequate tools to alter the production of newborn neurons with a high temporal resolution and less sparse targets, which is ideal in studies of cause-effect relationships between neurogenesis and memory. However, from a translational perspective, subtle changes in the environment and in the daily lives of people that may impact their cognition are more promising, and it is in this scenario that this study contributes, by demonstrating the robustness of the effects of EE on the persistence of memories.

Keywords: neurogenesis, memory, social memory, fear memory, enriched environment, memantine, andrographolide

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	1.1.	Formação	do
Engrama.....			7
FIGURA 1.2.	Resumo das estratégias genéticas para visualizar ou manipular neurônios previamente ativados.....		
			9
FIGURA 1.3.	Esquema do processo mnemônico.....		
			16
FIGURA 1.4.	Esquema da dinâmica de persistência e esquecimento no processo da memória.....		
			19
FIGURA 1.5.	Esquema das regiões com neurogênese no cérebro de roedores.....		
			22
FIGURA 1.6.	Desenvolvimento de neurônios novos durante a vida adulta no bulbo olfatório e no giro denteado.....		
			24
FIGURA	2.1.	Condições	de
alojamento.....			33
FIGURA 2.2.	Esquema representativo da tarefa de reconhecimento social.....		
			34
FIGURA 2.3.	Figura esquemática da tarefa de três compartimentos.....		
			35
FIGURA 2.4.	Figura esquemática da tarefa de discriminação social na caixa grande.....		
			36
FIGURA 2.5.	Memória social em diferentes linhagens de camundongos.....		
			42
FIGURA 2.6.	Persistência da MRS após um treino de 5 minutos.....		
			43
FIGURA 2.7.	Persistência da MRS após treinos com diferentes durações.....		
			44
FIGURA 2.8.	Discriminação social do C57BL/6 na caixa grande.....		
			45
FIGURA 2.9.	Discriminação social do C57BL/6 no teste de três compartimentos.....		
			46
FIGURA 2.10.	Efeitos do aumento da neurogênese sobre a memória de reconhecimento social do C57BL/6.....		
			47
FIGURA 2.11.	O ambiente enriquecido induz 10 dias de persistência da memória social em camundongos swiss.....		
			48

FIGURA 2.12. O estímulo social durante o treino aumenta a exploração.....	49
FIGURA 2.13. Efeitos do encontro social e do enriquecimento ambiental sobre a sobrevivência de novos neurônios no HD.....	50
FIGURA 2.14. Efeitos do encontro social e do enriquecimento ambiental sobre a sobrevivência de novos neurônios no HV.....	51
FIGURA 2.15. Efeitos do encontro social na sobrevivência de células novas no bulbo olfatório adulto.....	52
FIGURA 2.16. Representação esquemática dos modelos de estudo da memória social.....	55
FIGURA 3.1. Esquema do protocolo de condicionamento ao contexto.....	64
FIGURA 3.2. Esquema do protocolo de condicionamento ao som.....	65
FIGURA 3.3. Esquema do protocolo de condicionamento ao olfato.....	66
FIGURA 3.4. Registro de LFP.....	69
FIGURA 3.5. Esquema representativo do protocolo de registro.....	70
FIGURA 3.6. Efeitos dos tratamentos nas células Nestina positivas no hipocampo.....	75
FIGURA 3.7. Desenho experimental do protocolo de obtenção de tecidos que foram utilizados na imunofluorescência BrdU/DCX/DAPI.....	76
FIGURA 3.8. Efeito dos tratamentos sobre a neurogênese no HD.....	77
FIGURA 3.9. Efeito dos tratamentos sobre a neurogênese do HV.....	78
FIGURA 3.10. LFP representativo.....	79
FIGURA 3.11. Espectrogramas ilustrativos dos períodos experimentais no DG e CA1.....	80
FIGURA 3.12. Energia de <i>slow</i> Gamma, <i>fast</i> Gamma e Theta no registro LFP agudo e crônico no DG de animais tratados com SAL, MEM e AND.....	82
FIGURA 3.13. Energia de <i>slow</i> Gamma, <i>fast</i> Gamma e Theta no registro LFP agudo e crônico em CA1 de animais tratados com SAL, MEM e AND.....	85
FIGURA 3.14. Padronização de um modelo de memória de medo contextual de longa duração com transiência de 10 dias.....	87
FIGURA 3.15. Padronização de um modelo de memória de medo condicionado ao som de longa duração com transiência de 10 dias.....	88

FIGURA 3.16. Padronização de um modelo de memória de medo condicionado ao cheiro de longa duração com transiência de 10 dias90

FIGURA 3.17. Aumento da neurogênese hipocampal promove a persistência da memória de medo contextual91

FIGURA 3.18. O enriquecimento promove a persistência da memória de medo condicionado ao som92

FIGURA 3.19. O enriquecimento melhora a aquisição da memória de medo condicionado ao cheiro, mas não promove a persistência94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - <i>Score</i> de reação ao choque	67
TABELA 2 - Resumo dos mecanismos estudados dos tratamentos MEM, END e EE	86

LISTA DE ABREVIACÕES

AMPA – ácido α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepro- piônico	MEM - Memantina
AND – <i>Andrographolide</i>	MMCC – Memória de condicionamento ao contexto
BrdU – <i>Bromodeoxyuridine</i>	MMCO – Memória de condicionamento ao olfato
CA1 – <i>cornuAmmonis 1</i>	MMCS – Memória de condicionamento ao som
CA2 – <i>cornuAmmonis 2</i>	MRS – Memória de reconhecimento social
CA3 – <i>cornuAmmonis 3</i>	MS – Memória social
CREB – Elemento de resposta do AMPc	NeuN – <i>Neuronal Nuclei</i>
CS – Estímulo Condicionado	NMDA – N-methyl-D-aspartato
DCX – Doublecortina	OB – Bulbo olfatório
DNA – Ácido desoxirribonucleico	PBS – Tampão de fosfato-salino
DOX – Doxiciclina	PFA – Paraformaldeído
EE – Ambiente enriquecido	PVPI – Iodopovidona
GABA – Ácido Gama-aminobutírico	RI – Representação Interna
DG – Giro Denteado	RMS – Via migratória rostral
HD – Hipocampo dorsal	RNA – Ácido ribonucleico
HV – Hipocampo ventral	SE – Ambiente padrão
I.P. - Intraperitoneal	SMT – Treino de memória social
IEG – Gene de resposta imediata	STFT – Transformada rápida de Fourier
IRS – Índice de reconhecimento social	STM – Memória de longa duração
LFP – Potencial de campo local	SVZ – Zona subventricular
LTD – Depressão de longa duração	SWR – <i>Sharp waveripple</i>
LTM – Memória de longa duração	TT – Treino não social
LTP – Potenciação de longa duração	US – Estímulo não condicionado
MDS – Memória de discriminação social	

PREÂMBULO

Quanto tempo duram as obras? Tanto
 Quanto o preciso pra ficarem prontas.
 Pois enquanto dão que fazer
 Não ruem.

Convidando ao esforço
 Compensando a participação
 A sua essência é duradoura enquanto
 Convidam e compensam.

As úteis
 Pedem homens
 As artísticas
 Têm lugar pra a arte
 As sábias
 Pedem sabedoria
 As destinadas à perfeição
 Mostram lacunas
 As que duram muito
 Estão sempre para cair
 As planejadas verdadeiramente em grande
 Estão por acabar

Bertolt Brecht

Todo doutorado é uma grande obra, quando feito com compromisso, ética, honestidade e trabalho duro. Eu cheguei ao final deste caminho ainda convencida que a construção de um doutorado é sempre um convite ao esforço, mas também ao convívio e à participação. Dificilmente a ciência se faz na solidão, e mesmo que escreva esta tese no auge do isolamento social no mundo, eu acredito que é no fazer comunitário constante que a ciência toma forma. Nesse sentido, este segmento estará dedicado ao ato simples da retrospectiva dos anos e do próprio processo de doutoramento com os outros que não podem ser nomeados nos agradecimentos como colaboradores, amigos ou familiares, e que também não devem ser citados nos limites da escrita científica e crítica.

Como todo cientista, sempre vem a mim os questionamentos sobre a pertinência e a necessidade das coisas, inclusive a de um preâmbulo para a própria tese doutoral. A palavra preâmbulo vem do *preambulus*, “o que caminha à frente”, de *prae-*, “antes”, mais *ambulare*, “caminhar”, nesse sentido eu quis escrever esta breve reflexão antes de caminhar, mesmo porque o que se encontrará depois é a obra pronta, ela dá conta da ciência, mas não do processo. Outro motivo, é

porque quero que em algum momento, antes de andar a difícil estrada do doutorado, alguém encontre nestas linhas força, esperança, consolo e realidade. Especialmente, o escrevo porque a particularidade da escrita científica e de seu processo nos deixa presos entre a necessidade da subjetividade e o rigor da cientificidade. Particularmente, meu desejo é o respeito ao gênero da escrita científica, por isso, separadamente, escrevo este ensaio à dificuldade e felicidade do doutorado como uma forma de fazer meu, um trabalho que, na sua linguagem e forma já pertence à humanidade, como toda a ciência.

Quando uma pessoa imagina um doutorado acabado, iluminado e idealizado, está invocando um mal, porque, quem quer submeter o real ao ideal, está construindo seu sofrimento. Por isso, quando na ingenuidade sofri, ou quando na realidade desse caminho encontrei espinhos ou rosas, fui sempre ao refúgio das palavras. Me referirei então a essas letras, as quais eu contei e refleti incontáveis vezes ao longo dos 4 anos e que foram um alicerce.

São três textos, pois como um deles bem afirma “o número três fecha as coisas. Dois é apenas uma coincidência, três, uma confirmação”¹. E no preâmbulo sempre se faz necessária uma confirmação. O primeiro deles, o Poema de Bertol Bretch que abre essa sessão, eu levei como um mantra contra duas das armadilhas mais poderosas da academia: a genialidade e o perfeccionismo. A genialidade tem dentro de si a individualidade, egoísmo e egocentrismo, todos esses valores contrários ao companheirismo, generosidade e solidariedade, sem os quais é impossível fazer ciência, pelo menos no terceiro mundo.

Além disso a ideia de identificar-se como um gênio é, na maioria dos casos, uma fantasia que leva à dissociação do sujeito e quem se vê com frequência nessa realidade ficcional acaba permanecendo nela. A consequência mais óbvia é o isolamento de seus mentores e colegas, pois como eles poderiam compreender suas ideias “geniais”? O suposto gênio se embriaga de narcisismo, e esse grande veneno gesta a falta de autocrítica tão necessária para fazer uma ciência de qualidade.

O destino do gênio verdadeiro não fica muito diferente do impostor quando assume esse título para si mesmo e/ou para os outros. Finalmente ele também acaba isolado, embora esteja rodeado de pessoas, porque no fundo nenhuma delas o suporta – já que todos os gênios são insuportáveis,

¹“Aquí aparece el número tres, que cierra las cosas. Dos es una mera coincidencia; tres, una confirmación. Una confirmación de orden terrenal, una confirmación divina o teológica.”(BORGES,2004, p.60)

inclusive os que saem de lâmpadas mágicas - e só procuram beneficiar-se de suas qualidades e de sua obra. Esse caminho levará os gênios a viverem as amarguras da traição e falsidade, e se verem como mártires ou loucos, sendo que qualquer dessas duas identidades do “gênio” acabaria por destruí-lo.

Por isso, a salvação dos homens e mulheres geniais é a de renunciar o seu título e todas a vaidades e bajulações que ele traz em troca de construir uma obra “grandiosa”. Esse ato de sabedoria é o que pedem as obras sábias e, além disso, atrai a massa crítica fundamental para o trabalho científico, tornando-as também úteis. As grandes obras, nesse lado do mundo, não podem ser construídas por gênios, então elas necessitam do trabalho conjunto, elas requerem da comunidade pois a força do trabalho é a aposta por cima da tecnologia e do financiamento. Os gênios impostores fazem do seu ego sua própria obra, mas verdadeiros gênios podem conseguir a coletividade e fazer dela o olimpo ou o inferno, dependendo de suas escolhas sobre a “genialidade”.

Assumir a incompletude de si mesmo e do próprio trabalho é o convite de Brecht nesse belo poema, por isso também é uma arma contra o perfeccionismo, uma enfermidade para qualquer trabalho. Eu particularmente sofri desta doença com tanta frequência que se tornou fonte de autosabotagem e procrastinação. Podemos passar dias ou meses em um texto, slide ou gráfico e ele nunca estará perfeito. Nunca conseguiremos ver o completo de nós mesmos e nossas próprias coisas, e existe nisso uma grande beleza: a da procura por uma melhora constante (algo também contrário à ideia de genialidade, que é a do produto já completo de fábrica, que pode levar ao ócio e confiança excessiva). Enfim, não podemos renunciar a essa sensação, mas podemos aceitar que no final nossa obra tenha defeitos, pois “As destinadas à perfeição, mostram lacunas”.

A vida com muita frequência obriga-nos a renunciar à perfeição, pois os trabalhos planejados perfeitamente “estão por acabar”, eles são estrelas fugazes, meteoritos que ao entrar em contato com a atmosfera da realidade se desintegram. Ao final, existe uma coisa nova que nasce como um filho deformado daquela outra que só é perfeita por encontrar-se no mundo das ideias. Esse processo de dar as costas aos planos originais ou de ver como coisas se findam é extremamente sofrido para algumas pessoas. Aqui entra o belíssimo texto de Borges “La Ceguera”, um dos que manteve minha mão firme quando, na renúncia, senti-me desfalecer. Borges, que ficou cego enquanto vivia em seu paraíso como diretor da Biblioteca Nacional, descreve sua situação de

maneira magnífica no poema dos dons “*Nadie rebaje a lágrima o reproche / Esta declaración de la maestría / De Dios que con magnífica ironía / Me dio a la vez los libros y la noche.*”

O doutorado é uma trajetória cheia dessas ironias “divinas”, mas também cheia de percalços que podem entender-se como uma fulminação. Sempre então voltei às belíssimas palavras de Borges:

Cuando comprobé que ahí estaban los libros, que tenía que preguntar a mis amigos el nombre de ellos, recordé una frase de Rudolf Steiner en su libro sobre antroposofia (que fue el nombre que dio a la teosofia). Dijo que cuando algo concluye, debemos pensar que algo comienza. El consejo es saludable, pero es de difícil ejecución, ya que sabemos lo que perdemos, no lo que ganaremos. Tenemos una imagen muy precisa, una imagen a veces desgarrada de lo que hemos perdido, pero ignoramos qué lo puede reemplazar, o suceder (BORGES, 2004, p.59).

Assim, em cada momento dilacerante de renúncia ou dificuldade, pensei que aquele fim era o começo de algo novo e desconhecido, e que devia encará-lo como uma aventura. Eu nunca me senti diferente de todos que passam por um doutorado. Assim como eles, tive que tomar decisões difíceis entre o pessoal e o profissional, e as assumi como o que eram: a criação de novas vidas (boas, maravilhosas, más ou terríveis). Conseguir me fortalecer lembrando sempre aquela situação de Borges quando em sua cegueira decidiu aprender o Anglosaxon²:

Tomé una decisión. Me dije: ya que he perdido el querido mundo de las apariencias, debo crear otra cosa: debo crear el futuro, lo que sucede al mundo visible que, de hecho, he perdido... Pensé: he perdido el mundo visible pero ahora voy a recuperar otro, el mundo de mis lejanos mayores, aquellas tribus, aquellos hombres que atravesaron a remo los tempestuosos mares del Norte y que desde Dinamarca, desde Alemania y desde los Países Bajos conquistaron a Inglaterra; que se llama Inglaterra por ellos, ya que “Enga-land”, tierra de los anglos, antes se llamaba “tierra de los britanos”, que eran celtas(BORGES,2004,p.60).

Mas sem dúvida as decisões mais difíceis não estiveram, para mim, na criação do mundo e sim na decisão perdida, como no mesmo texto Borges exemplifica “*Demócrito de Abdera se arrancó los ojos em um jardín para que el espectáculo de la realidad exterior no lo distrajera*”. Vale essa metáfora da cegueira auto infringida não a nossa realidade social, mas sim as nossas misérias pessoais, para as quais temos que “ficar cegos” para entregar nossa força de trabalho à ciência, evitando as distrações. Um sacrifício que quando feito ocasionalmente vale a pena (quando é só

² Quero que leitor entenda que esta é uma mera analogia e uma apropriação apenas, porque jamais teria a ousadia de colocar meu nome pequeníssimo ao lado do Borges. Estas passagens, são mais uma admiração à obra do argentino e talvez uma prova de como a literatura universal é assim denominada porque pode falar sobre um cego em Buenos Aires, mas as também sobre uma doutoranda Colombiana no Brasil mais de 20 anos depois.

um fechar de olhos), mas nunca será compensado por nenhum reconhecimento quando significa perder os olhos para sempre.

Poucas pessoas sabem, mas o caminho para o doutorado encontra-se saturado com esses cegos, apenas observando-os podemos entender que a produtividade não vale o preço da imbecilidade ou da maldade. E é nessa última que entra o livro que me acompanhou nos últimos dois anos: *Eichmann em Jerusalém* de Hanna Arendt. Até esse livro, sempre supervalorizei o trabalho e o esforço (assim como até agora neste preâmbulo), mas com ele entendi o quanto a nossa atenção estreita numa única atividade pode prejudicar nosso julgamento sobre as questões éticas. A ciência é uma atividade humana e para mim, a mais especial de todas as que possam ser feitas pelo homem, mas nela encontraremos todas as virtudes e vícios da humanidade.

Assim, no treinamento do pensamento científico, devemos também pensar no humano para não virarmos máquinas que não conseguem julgar além da ciência ou da técnica. Não é possível, no final do caminho, romantizar a ciência com as figuras do renascimento ou da época vitoriana, é necessário entender que o aparelho burocrático e a organização hierárquica das instituições por trás da ciência hoje podem fazê-la vítima do autoritarismo. Hanna Arendt (1993) faz essa colocação maravilhosamente bem com o exemplo extremo do burocrata alemão que envia a morte a milhões de judeus, fazendo seu trabalho eficientemente: “Lo más grave, en el caso de Eichmann, era precisamente que hubo muchos hombres como él, y que estos hombres no fueron pervertidos ni sádicos, sino que fueron, y siguiéndose, terrible y terroríficamente normales.”

Não é suficiente fazer um bom trabalho científico, o doutorado deve servir para ir além. Quem faz o mal, inclusive na ciência, é um ser normal e pode ser você mesmo. O próprio Nietzsche (2016) afirmava: “quem luta com monstros deve velar para que, ao fazê-lo, não se transforme também em monstro. E se tu olhares, durante muito tempo, para um abismo, o abismo também olha para dentro de ti”. O sucesso, então, do trabalho de doutorado encontra-se também na luta por permanecer humano e sensível para evitar cair no abismo da inumanidade ou na operacionalidade técnica. O mal na estrada da ciência, como em tantas outras, encontrei na banalidade e não na monstruosidade.

Então, é uma batalha silenciosa essa de persistir em sermos nós mesmos e conservar os nossos valores, e nesse contexto temos de encarar o silêncio como uma ação valente³. Só quando as palavras vêm a nós, somente quando o tempo torna as palavras nítidas, somos capazes de pronunciá-las corretamente e dizê-las para que possam chegar a tocar a alma dos outros. Não deixemo-nos enganar por uma forma de vida silenciosa, pois aprender a falar é tão importante e difícil como aprender a calar para quem anseia uma posição na ciência.

Para mim foi esse o caminho. Marchar do silêncio à palavra, que é algo como ir da valentia em direção à coragem. Durante essa caminhada fui feliz em infinitos momentos, quando compartilhei minha palavra com os outros, como quem partilha de doces no fim de tarde, mas dessa felicidade pouco ou nada tenho para dizer. Como Borges fala, a felicidade é um fim em si mesma e são as outras coisas as que se convertem em palavras⁴.

Acredito então que qualquer narrativa que se procure inserir a felicidade será sempre insuficiente. Por isso, nesse início do caminho, não deixo para mim mesma nem para os outros um tapete de flores e amores para pisar ou para voar. Deixo a humilde recomendação de três textos maravilhosos que abraçam, acolhem e apunhalam. Considero que as vezes é preciso morrer para o renascimento, pois se de algo serve a longuíssima tradição judaico-cristã que está tão inserida na nossa cultura, que seja como incentivo para a resistência e a resiliência.

Não podemos confundir a resistência com a rigidez, pois a inflexibilidade, como o perfeccionismo, é geradora de sofrimento. Por isso, sempre quando me deparar com este texto, gostaria de lembrar o doutorado como o que é: uma transformação. Acredito que se o cientista pensa assim está salvo, pois:

³ Esta ideia também vem de minha reflexão sobre o texto de Borges que, ao falar de outros escritores cegos ou inclusive de sua própria família, ressalta como eles jamais falaram de sua própria cegueira, e como isso os fazia mais valentes que ele mesmo. Duas passagens expressam isso com bastante clareza, a primeira quando ele fala de Groussac *“Imaginé autor del poema a Groussac, porque Groussac fue también director de la Biblioteca y también ciego. Groussac fue más valiente que yo; guardó silencio. Pero pensé que, sin duda, había instantes en que nuestras vidas coincidían, ya que los dos habíamos llegado a la ceguera y los dos amábamos los libros”* (BORGES, 2004, p.59). E a segunda referindo-se a sua própria família *“El mundo del ciego no es la noche que la gente supone. En todo caso estoy hablando en mi nombre y en nombre de mi padre y de mi abuela, que murieron ciegos; ciegos, sonrientes y valerosos, como yo también espero morir. Se heredan muchas cosas (la ceguera, por ejemplo), pero no se hereda el valor. Sé que fueron valientes”*. (BORGES, 2004, p.59).

⁴ Em outra passagem do texto *7 noites* BORGES (2004) expresa: *“Siempre he sentido que mi destino era, ante todo, un destino literario; es decir, que me sucederían muchas cosas malas y algunas cosas buenas. Pero siempre supe que todo eso, a la larga, se convertiría en palabras, sobre todo las cosas malas, ya que la felicidad no necesita ser transmutada: la felicidad es su propio fin.”* (p.60).

Todo hombre, debe pensar que cuanto le ocurre es un instrumento; todas las cosas le han sido dadas para un fin... Todo lo que le pasa, incluso las humillaciones, los bochornos, las desventuras, todo eso le ha sido dado como arcilla, como material para su arte; tiene que aprovecharlo. Por eso yo hablé en un poema del antiguo alimento de los héroes: la humillación, la desdicha, la discordia. Esas cosas nos fueron dadas para que las transmutemos, para que hagamos de la miserable circunstancia de nuestra vida, cosas eternas o que aspiren a serlo. (BORGES, 2004, p.65)

Particularmente, decidi há tempos que não deixaria que as dores me mudassem e que eu as modificaria, e levei a direção do doutorado para uma transformação criadora. Isso não significa que me empanturrei de ambrosia durante todo este tempo, ao contrário, eu experimentei o alimento dos heróis, e o transformei em palavras. Algumas estão presentes nesse preâmbulo, outras escritas nos três capítulos desta tese, e algumas mais, ainda obscuras dentro de mim, pois precisam mais tempo ou distância para serem esclarecidas. Por isso, tomei palavras emprestadas, porque nelas, como em toda arte, encontrei aquilo que a ciência me negou, um conhecimento que toca a subjetividade.

Eu comecei a escrever esta tese em tempos terríveis, por isso acho oportuno propor a arte como a tabela de salvação junto à ciência. O contato com esses 3 textos teve a capacidade de me transportar. Isso não é pouca coisa nesse tempo de confinamento, pois o avivamento da imaginação tem sido parte da salvação dessa solidão. Porém, a imaginação não pode em si mesma, com seu poder criador, apartar-nos da triste circunstância histórica. Precisamos da memória. Eu consegui escrever esta tese no ideal do convívio e da discussão com os outros, ao tê-los a todos (colegas, amigos, mestres, mentores, etc) em minha memória. O reavivamento da troca científica foi o que me permitiu viajar no tempo para aqueles momentos de discussão e transformar o passado nesse texto.

Nesse sentido, a memória episódica foi minha ajudante, igual que a memória prospectiva, aquela dos planos jamais feitos, dos experimentos que jamais chegaram a ser, das ideias as quais renunciei, das viagens científicas que nunca se converteram em realidade e que vivi com uma intensidade única, que finalmente me levou a viajar no espaço⁵. Essa memória prospectiva foi o veículo que me levou a muitos lugares que talvez eu não esteja jamais, e a sua reconstrução prova que o meu caminho e meus sonhos não cabem nessa tese e estão:

⁵ Esta ideia de viajar no espaço como uma forma de transporte no meio das circunstâncias difíceis da pandemia veio a mim numa carta que escrevi para Lara no dia 24 de abril de 2020, quando enviei para ela uma das lembranças de nossas memórias prospectivas sobre Paris.

Incompletas ainda
Como o muro à espera da hera
(Esse esteve um dia inacabado
Há muito tempo, antes de vir a hera, nu!)
Insustentável ainda
Como a máquina que se usa
Embora já não chegue
Mas promete outra melhor.
Assim terá de construir-se
A obra pra durar como
A máquina cheia de defeitos.

(Bertold Brecht)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. DA MEMÓRIA AO ESQUECIMENTO: a neurogênese nos labirintos da persistência e da transiência	1
1.1. A memória como representação interna: procurando o engrama	3
1.2. A memória como processo: aquisição, consolidação e evocação	10
1.3. Persistência das memórias: permanecer ou esquecer, isso é um dilema?	16
1.4. Hipóteses da modulação da neurogênese na duração das memórias	20
CAPÍTULO 2. AMBIENTE ENRIQUECIDO, MEMÓRIA SOCIAL E NEUROGÊNESE: entre a persistência e a transiência	28
2.1. A memória social e suas particularidades	28
2.2. Neurogênese: Modulação do ambiente enriquecido na memória social	30
2.3. Objetivos	32
2.3.1 Objetivo Geral	32
2.3.2 Objetivos Específicos	32
2.4. Materiais e Métodos	32
2.4.1. Animais	32
2.4.2. Condições de Alojamento	32
2.4.3. Tarefa de Reconhecimento Social	33
2.4.4. Tarefa de Discriminação Social na caixa de três compartimentos	34
2.4.5. Tarefas de discriminação social na caixa grande	36
2.4.6. Tratamentos farmacológicos	36
2.4.7. Marcação da neurogênese, obtenção dos tecidos e imunofluorescência	37
2.4.8. Microscopia	39
2.4.9. Quantificação da imunofluorescência	39
2.4.10. Análises Estatísticas	41
2.5 Resultados	41
2.5.1. Camundongos C57/BL6 não apresentaram esquecimento fisiológico da memória de reconhecimento social	41
2.5.2. Protocolos onde a diferenciação social predomina não produzem comportamentos compatíveis com MS de longa-duração	44
2.5.3. Aumento da neurogênese prévio à aquisição da MS não promove seu esquecimento	46

	22
2.5.4. A modulação do Ambiente Enriquecido (EE) na memória social: Sobrevivência de novos neurônios.	48
2.6. Discussão	52
CAPÍTULO 3. EFEITOS DA NEUROGÊNESE NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO	58
3.1. A memória do medo e suas particularidades	58
3.2. Neurogênese e memória de medo	61
3.3. Objetivos	62
3.3.1 Geral	62
3.3.2 Específicos	62
3.4. Materiais e Métodos	63
3.4.1. Animais	63
3.4.2. Condições de Alojamento (Ver capítulo 2, item 2.4.2 - Condições de Alojamento)	63
3.4.3. Condicionamento ao Medo Contextual	63
3.4.4. Condicionamento ao Som	64
3.4.4. Condicionamento Olfativo	65
3.4.5 Análises dos treinos e da reação ao choque	66
3.4.5. Administração de Drogas	67
3.4.6. Métodos para o aumento da neurogênese	67
3.4.7. Registro eletrofisiológico de potencial de campo (<i>Local Field Potential</i> , LFP)	68
3.4.8. Marcação da neurogênese, obtenção dos tecidos e imunofluorescência	71
3.4.9. Microscopia	72
3.4.10. Quantificação	73
3.4.11. Análise estatística	74
3.5. Resultados	74
3.5.1. Memantina (MEM), andrographolide (AND) e ambiente enriquecido (EE) não alteram nicho neurogênico no hipocampo	74
3.5.2. Efeito agudo e de longa duração da MEM e AND nas oscilações hipocampais	79
3.5.3. Modelos de memória de medo para o estudo da modulação da neurogênese	86
3.5.4. Efeitos do aumento da neurogênese na persistência da memória de medo	91
4.0. Discussão	95
4. CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

CAPÍTULO 1. DA MEMÓRIA AO ESQUECIMENTO: a neurogênese nos labirintos da persistência e da transiência

No está en el tiempo sucesivo
sino en los reinos espectrales de la memoria.
Como en los sueños
detrás de las altas puertas no hay nada,
ni siquiera el vacío.
Como en los sueños,
detrás del rostro que nos mira no hay nadie.
Anverso sin reverso,
moneda de una sola cara, las cosas.
Esas miserias son los bienes
que el precipitado tiempo nos deja.
Somos nuestra memoria,
somos ese quimérico museo de formas inconstantes,
ese montón de espejos rotos.

Jorge Luis Borges

Ao tentar uma definição de memória encontra-se um aspecto central: o tempo. A noção de temporalidade é crucial não só para a classificação de memórias, mas também para os processos que ela experimenta. Assim, a experiência da lembrança das diferentes memórias toma o seu sentido também no tempo e, a partir dele, podemos ter características diferentes desde um ponto de vista funcional, semântico e subjetivo. Neste trabalho será abordado um único aspecto dessa temporalidade: a duração das memórias. Podemos acessá-la de forma experimental através da avaliação comportamental, sendo a memória um conceito teórico que ajuda a explicar o fato de existirem mudanças duradouras no comportamento que resultam da experiência (DUDAI, 2002a).

Longe do que o senso comum prega, nós não vivemos majoritariamente o presente, na verdade o presente é uma porção pequena da nossa existência. Somos definidos na maior parte por nossas memórias, e passamos a maior parte do tempo reencenando o passado e imaginando o futuro, confiando em nossas lembranças (DUDAI; EDELSON, 2016).

Por mais de um século, os cientistas têm se interessado pela metade de um mesmo quadro, ou seja, unicamente na persistência das memórias e não em como as esquecemos (FLYNN, 2005; IZQUIERDO, 2015). Porém, a ideia que esquecer e lembrar são duas faces de um mesmo

processo, com igual importância, não é exatamente uma novidade das últimas décadas como alguns afirmam (FLYNN, 2005; IZQUIERDO, 2015). A noção dessa dualidade e complementariedade dos dois processos são encontradas na mitologia grega. Mnemosyne, a Titânide, que personifica a memória e é mãe de todas as musas (HESIODO, 2007), dá seu nome também ao rio no Hades onde os mortos bebem para recuperar suas lembranças. Paralelamente a ele corre o rio Lete, onde os moradores do submundo ingerem seu líquido para esquecer. As almas precisam sempre das duas: memória e esquecimento (LINCOLN, 1982).

Numerosas são as menções a esses cursos d'água dentre os textos da Grécia antiga, que mesmo sem o rigor científico, constituem uma importante referência literária sobre o entendimento da cognição naquela época (KARAKIS, 2019). Por um lado, os gregos compreendiam a centralidade da memória, pois dela vinham todas as artes: a inspiração é uma espécie de lembrança que traz as musas para o artista (HESIODO, 2007). A respeito disso, Alcmaeon de Croton (500-450 a.C.) aponta que “o poder do cérebro de sintetizar sensações faz dele também a sede do pensamento: o armazenamento das percepções dá memória e crença e, quando estas são estabilizadas, você obtém o conhecimento” (CASTRO; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2011), ou seja, a memória é um pilar para o pensamento.

Apesar das numerosas ideias propostas pela filosofia e literatura grega para explicar a etimologia da memória (CASTRO; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2007, KARAKIS, 2019), o paralelismo entre a permanência das lembranças e o esquecimento permaneceu negligenciado. Foi a neurociência moderna que passou a propor que a combinação entre persistência e transiência permite a adaptação e flexibilização de comportamentos (RICHARDS; FRANKLAND, 2017).

Contudo, para poder entender ambas as características da memória (persistência e transiência) é necessário primeiro defini-la. Não é uma tarefa fácil definir um termo de múltiplos usos. Tulving descreve ao menos 6 significados do termo memória:

- 1) processo;
- 2) armazenamento hipotético no qual informação é guardada;
- 3) informação que é armazenada;
- 4) propriedade da informação;
- 5) componente do processo de evocação da informação;
- 6) fenômeno individual do ato consciente de lembrar alguma coisa (TULVING, 2002, p.66).

A discussão sobre cada um desses significados fugiria do escopo desta tese. Portanto, este trabalho vai se restringir à discussão de dois conceitos: 1) a memória como processo e 2) memória como conhecimento. Especificamente, é necessária a observação que neste caso a palavra “conhecimento” deve ser entendida como representação interna (DUDAI, 2007) que, por sua vez, está estreitamente vinculada ao conceito de engrama. Ambas as noções de memória não são contrárias - como poderá ser visto mais para frente -, mas sim complementares.

Embora possamos fazer o agrupamento didático dessas noções de memória, é difícil acessar o termo sem levar em conta o contexto que varia desde o coloquial até o especializado na ciência computacional. Inclusive, as abordagens que são restritas ao campo da neurociência conseguem entender que qualquer revisão conceitual sobre memória estará sempre inacabada.

1.1.A memória como representação interna: procurando o engrama

A memória pode ser definida como a capacidade de retenção e reativação/reconstrução de representações internas dependentes da experiência (DUDAI, 2002a). Em outras palavras, a memória é uma representação interna e duradoura, total ou parcial, de um evento ou experiência passada que persiste ao longo do tempo⁶ (MOSCOVITCH, 2007). Quando se assume a memória nessa estreita relação com a representação, não se admite que ela seja uma entidade singular (MORRIS, 2007).

Basicamente, a memória pode ser entendida a partir de uma relação temporal, ou seja, existe uma mudança neural que acompanha uma experiência (tempo 1) permitindo que mais tarde (tempo 2) o indivíduo tenha uma outra experiência (mental e/ou comportamental) que não seria possível sem o traço da memória (TULVING, 2007). É importante sublinhar que esse traço – também denominado de engrama – não é a memória em si, mas sim o seu suporte físico e, conseqüentemente, suas propriedades estão intrinsecamente ligadas (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020)

Ainda se discute se o engrama é uma representação da memória (MORRIS, 2007). Algumas interpretações do trabalho de Richard Semon apontam que o engrama é sim uma representação neural da memória (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020), porém essa interpretação pode surgir dos

⁶ É importante sublinhar que nesse caso específico estamos referindo-nos ao tempo de uma forma genérica, sendo que podemos estar nos referindo a minutos, horas, dias e inclusive anos. Nesse sentido, algumas memórias, como a memória de trabalho, poderiam não ser totalmente englobadas pelo conceito de Moscovitch.

múltiplos significados que a palavra “representação” evoca (DUDAI,2002a). Por isso, as representações devem ser entendidas no seu sentido mais reducionista, ou seja, como uma mudança de linguagem que conserva as características distintivas das “coisas” representadas (*pairsing*) e as relações das mesmas (*structure*) (DUDAI, 2002a,2007).

A noção de representação interna (RI) ajuda a esclarecer alguns dos usos do termo memória (Ver acima as definições 2,3, 4 e parcialmente a 5, propostas por Tulving), particularmente uma RI é uma espécie de mapa de experiências no espaço de codificação neuronal, ou seja, uma versão estruturada do mundo que é codificada nos neurônios (DUDAI, 2002a, 2007). As RI⁷ da memória estão codificadas em um código neural (TREVES, 2007).

Mas de onde surgem as representações? Segundo a teoria da informação proposta por Shannon⁸, o primeiro passo é a codificação das mensagens para a forma (representação) que pode ser transmitida através do canal (por exemplo, o famoso código Morse com caracteres codificados em sequências de pontos e traços para posterior transmissão por pulsos de corrente através de fios elétricos) e, finalmente, restaurada pelo receptor ao seu significado original (TSDODYKS, 2007). Da mesma forma, as RI da memória passam por um processo de codificação, transmissão e finalmente de recuperação, que usualmente é expressa em comportamentos.

Entretanto, apesar da teoria da informação prover alguns *insights* importantes para o entendimento das RI, existem limitações no uso das referências teóricas da engenharia para o entendimento dos fenômenos biológicos, como a memória, o que pode levar a desacertos, visto que frequentemente os neurocientistas fazem um uso errado das ideias de Shannon (NIZAMI, 2017). Particularmente, a ideia de codificação neural como parte da formação da memória é bem estabelecida na literatura (GALLISTEL, 2017; WIXTED et al., 2018). Em resumo, pode-se afirmar que:

"Representação interna" é, portanto, um termo genérico que se refere à propriedade funcional mais fundamental dos sistemas nervosos. De fato, com a evolução, ele se manifestou de muitas formas e se realizou em uma variedade de códigos. Mas como um termo guarda-chuva, ele é altamente valioso. Em nível conceitual, ele concentra nossa atenção na essência da função cerebral. Em nível prático, ele nos orienta na busca de códigos representativos e na busca das mudanças mais importantes, ou seja, as

⁷ As representações internas (RI) na ciência da computação podem ser distinguidas das meras representações, porém no campo da investigação da memória em seres vivos não é possível, uma vez que elas acontecem sempre num sistema nervoso – por mais simples que esse seja – e, por isso, se dão de forma interna (DUDAI, 2002a).

⁸A teoria da informação descreve a linguagem matemática da transmissão e armazenamentos de mensagens em termos de diferentes símbolos ou combinações de símbolos (TREVES, 2007).

representacionais, nos sistemas que aprendem. É certo que ainda nos falta um minidicionário que traduza a atividade neuronal do código representacional em mudança de comportamento. Mas esse dia logo chegará (Tradução livre de DUDAI,2002a, p. 134).

Enquanto esperamos o futuro, ainda não é possível responder de forma definitiva qual é o código neural usado para a formação e manutenção dos diferentes tipos de memórias (GALLISTEL, 2017). Porém, hoje já é possível distinguir diversas características do traço da memória que podem levar a esse frutífero caminho que é a união entre a pesquisa da memória com o enigma das representações, o código neural e suas operações (DUDAI,2007). Efetivamente, quando pensamos a memória nesses termos, tentamos entender como é possível a transmissão e manutenção da informação, e com isso compreender os canais específicos (neurônios) que a processam, sendo que, o engrama resulta em uma aproximação desse processo de codificação do evento que será posteriormente decodificado. Em outras palavras, o engrama é necessário para a memória, mas não suficiente para sua materialização. A memória vai emergir como produto da interação entre o engrama e a evocação (MOSCOVICI, 2007).

Alguns dos avanços em referência ao engrama se remetem aos princípios do século XIX, com os trabalhos de Semon (1921), nos quais ele determinou 4 características: persistência, esforço, conteúdo e dormência. Conseqüentemente, é possível dizer que o engrama é uma mudança persistente no cérebro produzida pela experiência que pode permanecer dormente até ser recuperado com pistas, sendo que o conteúdo do traço mnemônico reflete um processo de codificação dessa experiência (JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015).

Vários pesquisadores como Lashley, Sherrington e James contribuíram para o estabelecimento da ideia moderna de engrama (para ver com mais detalhes JOSSELYN *et al.*, 2017). Contudo, foi Donald Hebb que levantou como hipótese que:

Quando um axônio da célula A está próximo o suficiente para excitar uma célula B e participar repetida ou persistentemente do disparo, algum processo de crescimento ou mudança metabólica ocorre em uma ou ambas células de modo que a eficiência de A, como uma das células que dispara B, é aumentada (Tradução livre de HEBB,1949, p.62).

Nesse sentido, a atividade ou experiência teria uma relação íntima com as mudanças entre as células, assim uma célula A e outra B, que no início tem uma conexão estocástica, podem, pelo produto da atividade, desenvolver mecanismos que as levem a estar associadas com o processamento de um evento (Ver figura 1.1). De forma resumida, Hebb (1949) postulou a ideia de assembleia neural como um sistema que possui algum grau de equipotencialidade envolvendo

os aspectos fundamentais: a sincronização do disparo de duas ou mais células convergentes e convergência anatômica das fibras (sinapses)⁹. As duas coisas levam a mudanças graduais e a uma espécie de fracionamento e recrutamento dos neurônios que formam a assembleia neural (HEBB, 1949).

As ideias de Hebb eram muito próximas da “lei elementar de associação”, proposta por William James, que enunciava: “Quando dois processos cerebrais elementares têm estado ativos juntos ou em sucessão imediata, um deles, ao reincidir, tende a propagar sua excitação no outro” (Tradução livre de JAMES, 1890, p.566). Porém, diferente de James, Hebb optou por uma explicação fisiológica desses processos, adiantando-se, com suas especulações, a décadas de pesquisa em neurociência básica. Outra importante diferença do trabalho de Hebb é que sua ideia de assembleia neuronal é pensada como uma forma de funcionamento do cérebro que não estaria vinculada unicamente com o aprendizado, mas também com processos como a percepção (HEBB, 1949).

Basicamente, as assembleias neuronais são grupos de células que tem conexões entre si e conformam um sistema que está estabelecido e que responde a experiências, sendo que, quando o “evento” acontece, algumas células “disparam juntas” (Figura 1.1). Isso, dentro de uma população suficientemente grande de células, pode se tornar um fenômeno frequente (HEBB, 1946). Resumidamente, o engrama é uma assembleia celular que codifica uma experiência de aprendizado e consegue, depois de um tempo, reconstruí-la de novo durante a evocação por meio da reativação (JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015).

A partir da definição de engrama podemos encontrar diversos termos como “células do engrama”, “via celular do Engrama”, “componentes do engrama”, etc (para maior informação ver TONEGAWA *et al.*, 2015a). Embora essas aproximações conceituais específicas sejam necessárias dentro da especialidade da área, são novas adequações linguísticas do próprio trabalho de Hebb, que já visualizava que “quanto maior o sistema com um determinado padrão

⁹ Note-se que no momento da escrita do “The Organization of Behavior” pouco se sabia em termos experimentais sobre sinapse, mesmo que o termo já tinha sido introduzido por Sherrington em 1897 não existia a ampla evidência em termos neuroanatômicos e neurofisiológicos sobre botões sinápticos que pudesse ser citada pelo Hebb. Assim, Donald Hebb escreveu um texto especulativo usando os termos que tinha para o momento, por isso no texto original ele sempre fala de “atividade sináptica”, “conexão sináptica” “boton sináptico” (Synaptic knobs) em termos bastante genéricos. Particularmente, quando ele define assembleia neural ele parte da ideia que existem conexões estocásticas entre fibras espacialmente próximas, por isso nessa frase foi colocado sinapse entre parêntesis para poder transmitir essa ideia e não como um sinônimo de fibras.

geral de ativação, mais prontamente uma associação poderá ser formada com outro sistema” (HEBB, 1949).

Atualmente, sabe-se diversos detalhes sobre os mecanismos moleculares por detrás do que Hebb denominava de “mudanças estruturais nas sinapses”. Alguns dos exemplos mais consolidados na literatura são os processos de *long term potentiation* (LTP), uma alteração duradoura da transmissão sináptica que, desde que foi descrito no importante trabalho de Bliss e Gardner (BLISS; GARDNER-MEDWIN, 1973), têm se mostrado como um mecanismo importante para memória e a cognição (HOLTMAAT; CARONI, 2016). Diversas descobertas permitiram estabelecer que a LTP é dependente da incorporação de receptores *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) e da dinâmica dos receptores *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) (NICOLL, 2017). A dinâmica de tráfico de receptores está atrelada a uma complexa maquinaria molecular, sendo que a LTP tardia (associada com as memórias duradouras) depende da ativação e fosforilação do elemento de resposta do AMPc (CREB) para a transcrição de genes que medeiam as alterações na estrutura e função das sinapses (PATTERSON *et al.*, 2001).

Está bem estabelecido que as células com maior expressão de CREB têm mais probabilidade de fazer parte do engrama (ASOK *et al.*, 2019; HAN *et al.*, 2007; HAN *et al.*, 2009; SEKERES *et al.*, 2012; HSIANG *et al.*, 2014; JOSSELYN; FRANKLAND, 2018; TONEGAWA *et al.*, 2015). As células com altos níveis de CREB, em comparação com a suas vizinhas, apresentam altos níveis de excitabilidade, o que aumenta a probabilidade de disparo (RASHID *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2016; YIU *et al.*, 2014) e facilita o recrutamento dessas células (Figura 1.1).

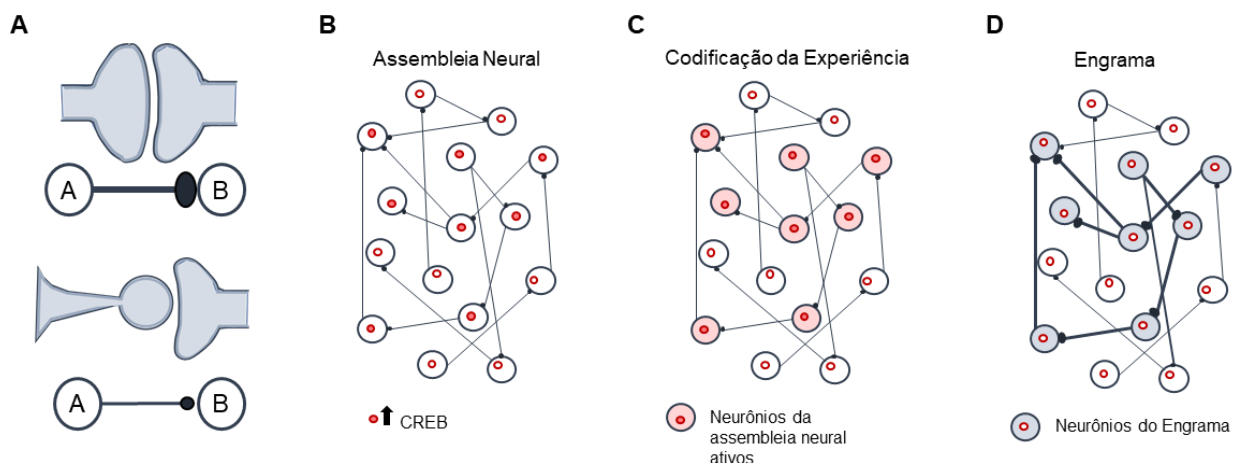


FIGURA 1.1. Formação do Engrama. (A) Esquema que mostra dois tipos de sinapses, uma mais fortalecida (parte superior) e uma mais enfraquecida (Parte inferior). De acordo com Hebb o fortalecimento sináptico estaria por trás do engrama. (B) Esquema da assembleia neural, as células com o núcleo rosa representam aquelas células com maior expressão de CREB. (C) Quando acontece uma experiência que é processada pela assembleia neural, são recrutados preferencialmente os neurônios que tinham maior expressão de CREB. (D) Finalmente, mostra-se o engrama com as sinapses hebbianas.

O desenvolvimento de tecnologias tem permitido a construção de metodologias e, com elas, o estudo mais refinado do engrama. Hoje existe uma variedade de ferramentas metodológicas baseadas na expressão de genes de expressão imediata (*Immediate expression genes*, IEG) ou em sistemas virais que usam promotores sintéticos (Figura 1.2.). Além desses, é importante mencionar o sistema “teg-tag” (tTA-dox-cFos system), desenvolvido pelo laboratório do Professor Susumu Tonegawa (DE NARDO; LUO, 2017). Mas foi com a optogenética que o salto na produção de conhecimento acerca do engrama ocorreu. Combinando a expressão de proteínas sensíveis à luz (entra as mais usadas está a ChR2) com a presença de promotores que codificam a expressão de IEGs (como o c-Fos), tem sido possível não só visualizar o engrama, mas manipulá-lo *in vivo* (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; KITAMURA et al., 2017; LIU et al., 2014; LIU; RAMIREZ; TONEGAWA, 2014; NAKAZAWA et al., 2004; OKUYAMA et al., 2016; POO et al., 2016; REDONDO et al., 2014; ROY et al., 2017a, 2017b; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018)

Por um lado, essa “nova era do estudo do engrama” tem trazido grandes avanços sobre o entendimento da codificação (YOKOSE et al., 2017) e valência (OKUYAMA et al., 2016; REDONDO et al., 2014) de memórias, assim como a possibilidade de desvendar as bases biológicas de memórias falsas (LIU et al., 2012; VETERE et al., 2019). Por outro, alguns desses estudos desafiam o postulado de Hebb, que coloca a plasticidade sináptica como base da formação de todos os engramas. Por exemplo, mesmo inibindo a síntese proteica com anisomicina (e, conseqüentemente, os processos de fortalecimento sinápticos derivados dela) é possível a recuperação da memória pela reativação artificial do engrama, dissociando então o engrama dos processos de plasticidade sináptica (ROY et al., 2017b).

Nesse sentido, existem muitas evidências acumuladas sobre formas alternativas de comunicação entre as células do engrama que não estão relacionadas diretamente com a plasticidade sináptica. Os achados mais relevantes são dos estudos de epigenética com ácido ribonucleico (RNA) não codificante, muitos dos quais propõem que a memória poderia ser, inclusive, alocada em uma única célula (ABRAHAM; JONES; GLANZMAN, 2019; FEDERMAN et al., 2014). Essa

hipótese, mesmo que atraente, não consegue explicar de forma absoluta os fatos registrados na pesquisa da plasticidade sináptica, o que sugere uma possível comunicação entre os dois processos (ABRAHAM; JONES; GLANZMAN, 2019). Finalmente, os intrigantes resultados de Becarrats (2018) que mostram a transferência de uma memória de uma *Aplysia* treinada a uma não treinada por RNA (BÉDÉCARRATS et al., 2018) constituem uma nova perspectiva para pensar a conectividade do engrama além das sinapses hebbianas.

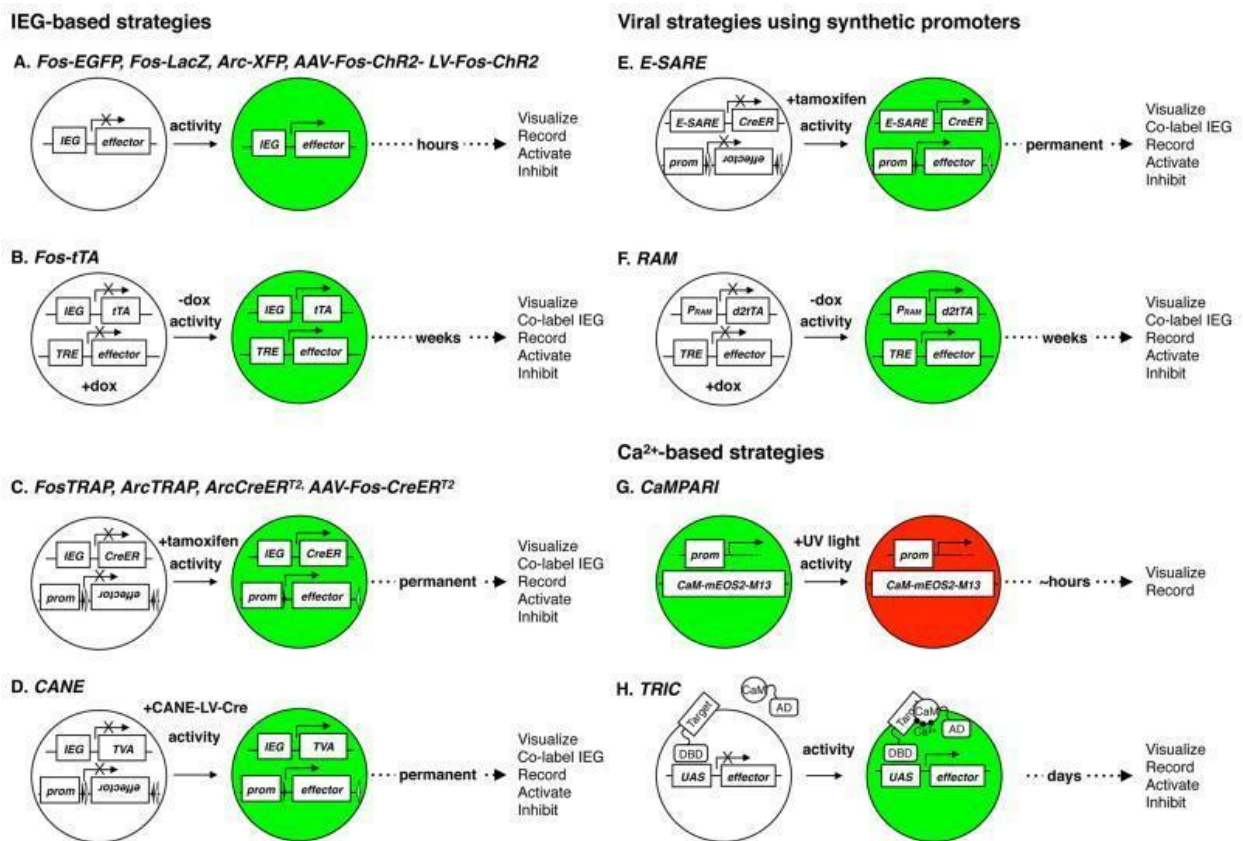


FIGURA 1.2.- Resumo das estratégias genéticas para visualizar ou manipular neurônios previamente ativados. (A) Os promotores Fos e Arc carregam proteínas fluorescentes ou ferramentas optogênicas tanto em animais transgênicos, como em vírus. Tipicamente, a rotulagem dos picos ocorre algumas horas após uma experiência e as proteínas efetoras duram menos de um dia. **(B)** Em ratos transgênicos Fos-tTA, a atividade neural na ausência de Doxiciclina (DOX) leva à expressão de efetores TRE, incluindo LacZ, ferramentas quimiogênicas, e ferramentas ontogênicas durante dias após uma experiência. **(C)** Nos ratos TRAP e ArcCreERT² transgênicos, os promotores Fos e Arc levam CreERT² a alcançar a expressão permanente de proteínas efetoras dependentes de CreERT² em neurônios previamente ativados. **(D)** Em CANE, Fos impulsiona a TVA. A injeção de EnvA-pseudotipagem de lentivírus fornece Cre aos neurônios recentemente ativados, resultando na expressão permanente de genes efetoras dependentes de Cre. **(E)** Nos vírus E-SARE, um promotor sintético conduz efetores ou CreERT² para obter expressão permanente de proteínas efetoras dependentes de Cre em neurônios com S/N elevado. **(F)** Nos vírus RAM, um promotor sintético conduz tTA desestabilizada (d2tTA) que pode conduzir a expressão de efetores dependentes de TRE quando a atividade ocorre na ausência de Dox. **(G)** CaMPARI integra um indicador

verde fluorescente Ca^{2+} com uma proteína fotoconvertível. Com a intersecção da atividade neural e a luz UV fornecida pelo utilizador, é possível visualizar os neurônios recentemente ativados em vermelho até que a proteína fotoconvertida seja virada. **(H)** O TRIC utiliza Ca^{2+} para juntar domínios de DNA (DBD) e ativação (AD) de um ativador de transcrição para impulsionar genes efetores para visualizar ou manipular previamente (DENARDO; LUO, 2017).

Nas suas ideias originais, Hebb entendia que era possível existir outros mecanismos da memória e que isso não excluía as mudanças estruturais das sinapses que ele estava propondo. Entretanto, suas ideias estavam sustentadas pelo contexto específico dos achados fisiológicos e anatômicos da época. A ideia hebbiana do engrama estava vinculada à conectividade celular e foi concebida como uma “instância simples” das RI (HEBB,1949). Estudos recentes mostram que as representações de uma tarefa podem ser codificadas e “armazenadas” na atividade síncrona de grupos de neurônios em regiões como *cornu Ammonis 1* (CA1) e, embora a atividade de neurônios individuais mude, é a manutenção dessa atividade sincrônica o que mantém a persistência das representações (GONZALEZ et al., 2019).

Toda a evidência apresentada sobre a memória como representação está vinculada à ideia de que as RI estão sendo processadas por um sistema que tem como suporte físico o engrama, porém, nem as RI nem o engrama são a memória *per se*. Nesse sentido, a performance da memória é uma função de processamento profundo (CRAIK, 2020), que apresenta vantagens evolutivas desde os organismos mais simples até os mais complexos (MURRAY; WISE; GRAHAM, 2017). Consequentemente, podemos pensar que a memória é suficientemente boa, embora não seja perfeita, no seu papel de fornecer uma espécie de registro para guiar o comportamento (MORRIS, 2007; MOSCOVICI, 2007). As suas virtudes e deficiências são consequências naturais da operação dos processos e mecanismos nos quais ela se baseia (SCHACTER, 2007). Por tanto, a memória sem processo é impossível, mas sem representação é incompleta.

1.2.A memória como processo: aquisição, consolidação e evocação

Tradicionalmente, a memória tem se definido como um processo que envolve aquisição, consolidação e evocação (TULVING,2000). Este tipo de definição tem sido particularmente útil devido à possibilidade de analisar a memória em termos de operações distintas (KANDEL,2014). Cada fase da memória tem diferentes características que indubitavelmente se superpõem entre si, mas isso não faz dela um processo sem alguns componentes estruturais. Não obstante, a memória

não pode ser entendida unicamente a partir de sua decomposição, pois não é um registro do passado que pode ser acessado. Ao contrário, é uma modificação do sistema analítico que interpreta novas entradas e emerge dessa dinâmica de interação entre o traço e as pistas (CRAIK, 2020; JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2017).

A aquisição da memória envolve um processo perceptual e um processo de codificação, ou seja, pode ser definida como o processamento inicial de informações (experiência) dentro de um conjunto neuronal (ASOK et al., 2019; DUDAI, 2002a). Se as memórias fossem pessoas, a aquisição seria o momento do nascimento (DUDAI, 2002a). Não há consenso quanto à duração exata do processo de aquisição (ASOK et al., 2019; DUDAI, 2002a). Entretanto, considerando a natureza dinâmica da memória como processo, delimitações de tempo são mais úteis para o estabelecimento de protocolos experimentais do que para a compreensão do processo em si.

Basicamente são nos primeiros momentos que acontece a formação do traço da memória, levando à geração ou modificação das RI (DUDAI, 1989, 1993). Durante essa primeira fase acontece uma série de processos moleculares que são importantes para a formação de memórias de longa duração (*long-term memory*, LTM). Em se tratando da LTM, sabe-se que este processo está vinculado à ativação dos receptores NMDA e AMPA. Como consequência da atividade glutamatérgica, alterações plásticas na sinapse podem ocorrer, semelhante ao observado na indução da LTP (ABRAHAM; JONES; GLANZMAN, 2019; ASOK et al., 2019; BEVILAQUA et al., 2008b; BLISS; COLLINGRIDGE, 2019; KESSELS; MALINOW, 2009; SANTOS et al., 2009). Resumidamente, a aquisição da memória vai estar sustentada nos primeiros momentos das sinapses excitatórias, ou seja, na atividade de receptores excitatórios, canais iônicos, cascatas de sinalização intracelular e particularmente aumento da expressão e fosforilação de CREB (ABEL; LATTAL, 2001; ASOK et al., 2019; DUDAI, 2002a; JOSSELYN; FRANKLAND, 2018; TONEGAWA; PIGNATELLI et al., 2015) (Figura 1.3.). Aqui as LTM se diferenciam das memórias de curta duração (*short term memory*, STM), sendo que as primeiras apresentam processos de plasticidade sináptica desencadeados pela atividade de CREB (ASOK et al., 2019; BAILEY; KANDEL; HARRIS, 2015; FIORITI et al., 2015; KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014), enquanto as STM não apresentam síntese proteica na aquisição (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014).

Seguida da aquisição ocorre a consolidação, que pode ser entendida como um processo de estabilização do engrama que permite a persistência da memória (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; DUDAI, 2002a; IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000). O conceito de consolidação tem se transformado ao longo dos anos (MULLER; PILZCKER, 1900). A consolidação sináptica (DUDAI, 2004a; DUDAI; KARNI; BORN, 2015; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; TAKEHARA-NISHIUCHI, 2020) ocorre a partir de processos moleculares que ocorrem num período restrito após a aquisição (LEDOUX, 2007) e depende de síntese de proteínas, particularmente daquelas vinculadas ao fortalecimento sináptico (ALBERINI; KANDEL, 2015; ASOK *et al.*, 2019; BAILEY; KANDEL; HARRIS, 2015; DUDAI, 1996, 2002a; KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014). De fato, agentes inibidores de síntese proteica administrados em janelas temporais de até 3h pós-aquisição consistentemente mostram um quadro de amnésia retrógrada, evidenciando a importância de ondas de síntese proteica para a consolidação sináptica (ABEL; LATTAL, 2001; LYNCH; KRAMÁR; GALL, 2015; NADEL, LYNN; BOHBOT, 2001; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018) (Figura 1.3.).

A consolidação sistêmica envolve mudanças estruturais em vários sistemas (DUDAI, 2004,2012; MCGAUGH, 2015). Os processos de consolidação sistêmica estão vinculados a diversos mecanismos nos quais se destaca a repetição (*replay*) em fases tardias durante estados de consciência e, principalmente, no sono, por meio de *Sharp Wave Ripples* (SWR) (DUDAI; KARNI; BORN, 2015; SAMANTA; ALONSO; GENZEL, 2020). Apesar da visão tradicional da consolidação sistêmica propor que as informações devem passar primeiro pelo hipocampo e de forma tardia pelo córtex, achados recentes mostraram que os engramas do córtex e do hipocampo são formados simultaneamente, mas o cortical é silenciado até a memória “amadurecer” e ser expressa no córtex (KITAMURA *et al.*, 2017; ROY; KITAMURA; *et al.*, 2017; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018). Apesar dessas evidências, as contradições em referência ao papel do hipocampo em memórias remotas dificultam uma unificação das perspectivas da consolidação (TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018).

Um olhar crítico aos conceitos de aquisição e consolidação nos faz perceber a difícil questão: quando começa e quando termina, se é que termina, a consolidação? Uma possível resposta é que os processos de consolidação começariam imediatamente depois da resposta de *replay* do hipocampo subsequente ao estímulo (DUDAI; KARNI; BORN, 2015). Essa perspectiva não

responde exatamente a diferença entre aquisição e codificação, ou entre aquisição e percepção. Para alguns autores o conceito de aquisição pode perfeitamente ser substituído pelo de codificação (NADEL, *et al.*, 2012), mas isso não é um acordo dentro da literatura.

Bem mais complexas são as discussões entorno do conceito de consolidação. Um dos principais problemas é que as teorias convencionais sobre consolidação a apresentam como um evento que acontece apenas uma vez (MCKENZIE; EICHENBAUM, 2011), o que parece ser equivocado levando em conta que os fenômenos de consolidação sistêmica podem apresentar-se em períodos tardios (SAMANTA; ALONSO; GENZEL, 2020). Certamente, o principal problema do conceito de consolidação encontra-se na ideia de estabilização da memória e aqui cabe a pergunta: quando uma memória se converte em estável? Ou ainda, a memória é estável? A resposta a primeira pergunta é que uma memória poderia ser consolidada em “meses ou anos”(SQUIRE; ALVAREZ 1995, p. 171) uma visão bastante improvável, levando em conta a demanda de processamentos e recursos energéticos (CRAIK, 2020). A resposta à segunda pergunta está mais bem sustentada, pois existe uma variedade importante de evidências que mostram que a memória não é estável nem confiável, e que a suas propriedades dinâmicas, construtivas e metamórficas não cabem dentro da ideia mais clássica de consolidação (SILVA, 2007).

Embora estes questionamentos pareçam atacar os fundamentos da consolidação, ninguém pode negar que existem processos moleculares e sistêmicos no período após a codificação (SARA, 2007). Uma unificação da teoria que explique melhor os fenômenos tem sido procurada, sem ainda conseguir uma ideia de consolidação que agrupe todas as evidências (RUNYAN; MOORE; DASH, 2019). Se o conceito não permite um marco adequado, o mais lógico seria o surgimento de um novo paradigma, que incorpore a memória como uma função de processamento para a obtenção de conhecimento (NADEL, 2007). Nesse sentido, a ideia de que a consolidação é “um processo dinâmico contínuo que permite a um organismo vivo atualizar continuamente a informação para organizar o comportamento adaptativo” (SARA, 2007, p. 189) seria muito mais realista.

A terceira fase da memória amplamente estudada é a evocação, que pode ser definida como o acesso, seleção, reativação ou reconstrução das RI produzidas por experiências passadas (DUDAI, 2002a). A evocação é um aspecto chave para o entendimento do funcionamento da memória (BEN-YAKOV; DUDAI; MAYFORD, 2015). De acordo com Moscovitch (2007, p.

17), “a memória não existe até que seja evocada”, o que faz da evocação uma questão central no processamento mnemônico.

O conceito de evocação emerge da *ecforia* descrita por Semon como “despertar do traço de memória ou engrama do seu estado latente para um de atividade manifesta” (SEMON, 1904). Recentes achados experimentais com a reativação artificial dos engramas têm provado que as intuições de Semon foram corretas. Por um lado, existe uma linha de pesquisa muito prolífica focada nos engramas silenciosos para entender suas características (FRANKLAND; JOSSELYN; KÖHLER, 2019; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; KITAMURA *et al.*, 2017; ROY; MURALIDHAR; *et al.*, 2017). Por outro lado, os estudos com a combinação de optogenética e animais transgênicos permitiram provar que a reativação do engrama pode inclusive produzir a evocação de memórias que já estariam indisponíveis (GUSKJOLEN *et al.*, 2018; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; ROY; MURALIDHAR, 2017).

Até pouco tempo atrás a pesquisa com a evocação era relativamente limitada no aspecto molecular (SWEATT, 2007). No entanto, hoje sabe-se sobre o envolvimento dos IEG, PKA1, PKC e alguns mecanismos epigenéticos de metilação nas áreas de processamento da memória (ALBO; GRÄFF, 2019; BEN-YAKOV; DUDAI; MAYFORD, 2015; FRANKLAND; JOSSELYN; KÖHLER, 2019; KYRKE-SMITH; WILLIAMS, 2018; TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018). Em linhas gerais, todos os achados apontam que a evocação é como uma reativação da assembleia neuronal ou reinstalação da atividade do engrama (BEN-YAKOV; DUDAI; MAYFORD, 2015; FRANKLAND; JOSSELYN; KÖHLER, 2019; JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; JOSSELYN; KÖHLER; FRANKLAND, 2015; SHULZ, 2000). Outros achados sugerem ainda que a evocação é processada por outros circuitos adicionais que não envolvem unicamente o do engrama, sendo esses necessários para as respostas comportamentais dependentes do traço de memória e sua atualização (ROY; KITAMURA; *et al.*, 2017).

A reativação do engrama produz um período de labilidade da memória que foi denominado de reconsolidação (BESNARD; CABOCHE; LAROCHE, 2012; BEVILAQUA, 2008; DUDAI, 2004b; DUDAI; EISENBERG, 2004; GISQUET-VERRIER; RICCIO, 2019; INDA; MURAVIEVA; ALBERINI, 2011; PHELPS; HOFMANN, 2019). Nesse sentido, a reconsolidação é uma possibilidade de atualização das memórias que funciona como gatilho de

um novo processo de consolidação. De acordo com Dudai e Eisenberg, a reconsolidação é uma experiência modificadora, mas no fundo uma espécie de “boa e velha consolidação disfarçada” (DUDAI; EISENBERG, 2004).

Mesmo que a reconsolidação apareça como uma descoberta recente no campo da memória, o próprio Hebb já previa que esse tipo de fenômeno aconteceria:

Não houve qualquer suposição quanto à permanência das conexões sinápticas estabelecidas pelo aprendizado. Isto porque até agora, pelo menos, não houve nenhuma razão decisiva para supor que os botões sinápticos uma vez formados sejam permanentes ou que se deteriorem com o desuso. Se (1) eles são permanentes, tem-se contabilizado diretamente os efeitos permanentes do aprendizado precoce, e pode-se supor que o esquecimento ocorre como um acréscimo de novo aprendizado: o estabelecimento de novas conexões alterando as propriedades de tempo da função de montagem e, assim, mudando a facilitação entregue a outros sistemas cerebrais. As conexões originalmente estabelecidas ainda estariam lá, mas o hábito original desapareceria, substituído por um novo. Alternativamente, (2) pode-se supor que um botão desaparece com desuso, o que explica diretamente o esquecimento [...] para pensar que o novo aprendizado incorpora o aprendizado anterior como efeito de "transferência", a persistência da memória precoce pode ser contabilizada porque a maioria das conexões iniciais é mantida pelo exercício que elas recebem ao participarem do aprendizado da maturidade. Qualquer uma destas duas suposições pode, portanto, ser feita sem perturbar a estrutura principal da teoria (HEBB, 1949, p.228).

As suposições de Hebb foram muito reveladoras porque nenhuma aquisição ocorre sobre um cérebro vazio, ou seja, existem já aprendizados prévios nessas mesmas assembleias neuronais, a memória vai acontecendo como uma modificação no sistema, umas e outras conexões vão se formando e modificando o sistema de processamento. Em outras palavras:

A reconsolidação é o processo de consolidação sem fim. Quando nos referimos à consolidação, não podemos considerar que uma nova aprendizagem ocorra numa tábula rasa. Pelo contrário, a consolidação de novas aprendizagens, a primeira vida de uma memória, é uma reorganização (e, portanto, uma "re"-consolidação) do esquema existente. Correspondentemente, após a nova aprendizagem ter sido consolidada no esquema existente, lembretes e novas experiências relacionadas normalmente constituem memórias que devem ser consolidadas através de uma reorganização adicional do esquema atual relevante. Por esta visão, a conclusão fundamental aqui é que a nova informação está continuamente a ser integrada e, portanto, consolidada repetidamente numa reorganização sem fim das redes de memória (MCKENZIE; EICHENBAUM, 2011, p. 230).

A memória é um conjunto de operações de processamento, sendo que cada uma das suas fases é dinâmica (CRAIK, 2020). Por isso, é possível falar que a divisão em operações é majoritariamente uma vantagem pedagógica que permite aos pesquisadores entenderem a memória a partir da operacionalização experimental. Nesse trabalho entende-se que as fases têm uma utilidade prática interpretativa e comparativa com outros estudos, mas que a memória como

processo é essencialmente algo contínuo e em constante modificação e atualização de RI e dos engramas, os quais têm os seus fundamentos nos processos moleculares e estruturais discutidos durante essa sessão (Figura 1.3.).

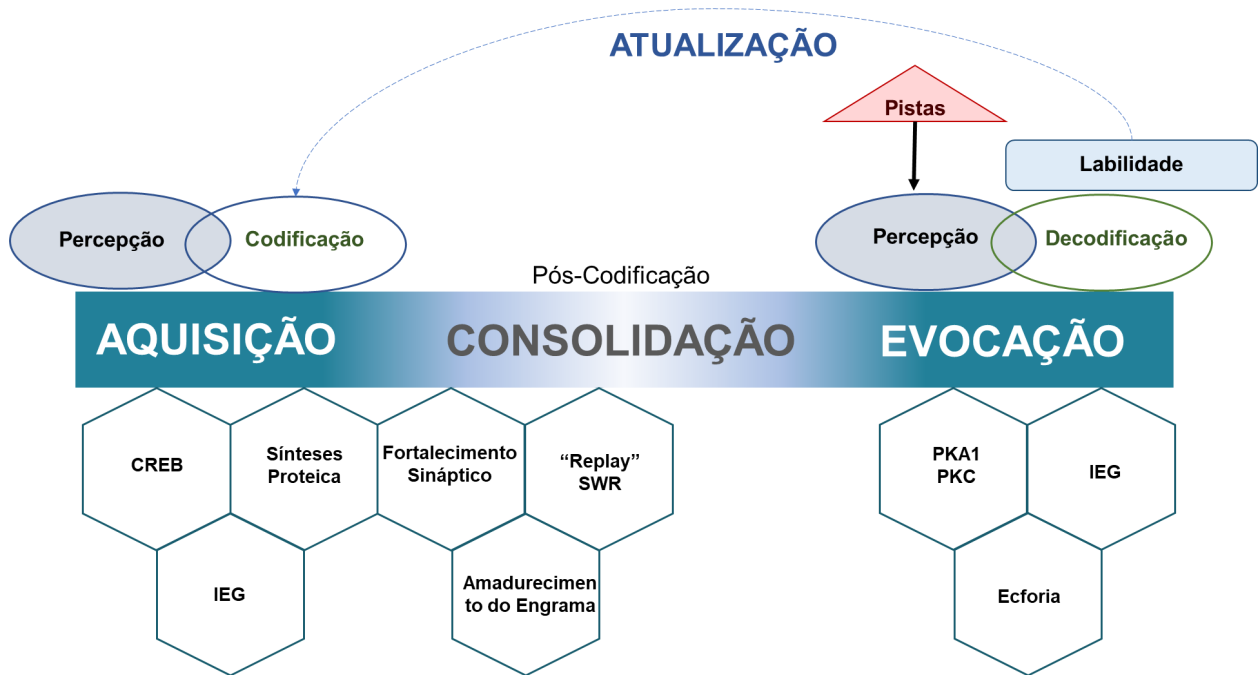


FIGURA 1.3. Esquema do processo mnemônico. Quando uma nova informação é adquirida, seu conteúdo é percebido e codificado durante a aquisição, o que está atrelado a maior expressão de IEG e CREB. No caso das LTM, também se desencadeiam processos de síntese proteica que, com o tempo, vão gerar diferentes processos de plasticidade sináptica para fortalecer a memória (Consolidação). A memória consolidada pode ser evocada no futuro quando o engrama for reativado por pistas. Uma vez que uma memória é evocada, seu traço se torna lábil e novas informações podem ser adicionadas ou modificadas.

1.3. Persistência das memórias: permanecer ou esquecer, isso é um dilema?

Qualquer que seja a definição de memória, nela sempre está contida a noção de permanência no tempo (com independência da duração). Por isso, estudar memória é, mesmo que indiretamente, estudar persistência, uma vez que persistir (*per + sistere*, latim para permanecer) é um atributo mnemônico central (DUDAI, 2002a). A maioria das pessoas, inclusive dos cientistas, tem pensado na ideia de um sistema mnemônico perfeito com uma persistência infinita, sem equívocos nem esquecimentos (RICHARDS; FRANKLAND, 2017). Porém, uma das qualidades mais adaptativas da memória é sua maleabilidade, que permite não unicamente sua atualização - como foi comentado na sessão passada - mas também a sua capacidade de simplificação. De fato, o processo de consolidação sistêmica promove essa versão comprimida da RI (DUDAI, 2004b).

Então isso quer dizer que mesmo na permanência das LTM podemos encontrar a perda de informação. Este fenômeno passa geralmente despercebido pela alegria de uma lembrança, que sem ser tão detalhada conserva uma identidade. Não obstante, uma boa parte de nossas RI são esquecidas, porque a memória está muito longe de ser uma simples e precisa reprodução. Esquecer é a incapacidade de recordar algo nesse momento, que antes (depois da aquisição) poderia ser recordado, dadas as mesmas pistas de recuperação (TULVING, 1974; WIXTED, 2007; FRANKLAND et al., 2013). A respeito disso, as ideias de Tulving podem distinguir duas questões chaves: a acessibilidade e a disponibilidade. A primeira refere-se à facilidade com que uma memória armazenada pode ser recuperada num dado momento, enquanto disponibilidade refere-se à distinção binária que indica se um traço está ou não armazenado (BADDELEY; EYSENCK; ANDERSON, 2015). Os engramas podem, também, se encontrar danificados, ficando então indisponíveis ou inacessíveis, ou seja, não conseguem ser evocados por pistas naturais (Figura 1.4.) (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020).

Os mecanismos subjacentes ao esquecimento são múltiplos, podendo ser divididos, basicamente, em ativos e passivos (para ver com mais detalhes ver DAVIS; ZHONG, 2017). Apesar do esquecimento parecer um fenômeno delimitado, sua definição pode chegar a ser polêmica (ROEDIGER; DUDAI; FITZPATRICK, 2007). Alguns autores preferem substituí-lo pela palavra transiência que pode ser mais facilmente ligada ao processo dinâmico que efetivamente acontece e, talvez, mais próxima ao que frequentemente é denominado como esquecimento natural. Transiência também pode ser adjetivo para memórias não persistentes (RICHARDS; FRANKLAND, 2017).

Em suma, o aumento da persistência envolve o fortalecimento sináptico e sistêmico, enquanto a transiência se refere aos mecanismos de “desestabilização” da memória como a depressão de longa duração (*long term depression*, LTD), eliminação sináptica, neurogênese¹⁰ entre outras (RICHARDS; FRANKLAND, 2017).

Nem todas as memórias são feitas para durar, ou seja, existem algumas que tem um processamento guiado pela transiência. Neste ponto, cabe sublinhar que memórias podem diferir

¹⁰Aqui estamos referindo-nos especificamente aos casos dos efeitos retrógrados do aumento da neurogênese, ou seja, do número de neurônios que pode induzir o esquecimento da memória de medo que inclusive explicam amnésia infantil (AKERS et al., 2014; GOODWIN, 2018b; JOSSELYN; FRANKLAND, 2012).

quanto à duração e ao conteúdo. As STM são aquelas que só podem ser evocadas após um intervalo de minutos ou horas e cujos mecanismos envolvem a facilitação sináptica de áreas de codificação sensorial (EMPTAGE; CAREW, 1993). As LTM, por outro lado, são memórias duradouras que estão sustentadas em processos de fortalecimento sináptico e sistêmico, podendo perdurar por dias, semanas, meses ou anos (ASOK et al., 2019). A sustentação de memórias distintas em processos diferenciais já foi prevista por Hebb, que afirmou:

Para explicar a permanência, algumas mudanças estruturais parecem necessárias, mas um crescimento estrutural presumivelmente exigiria um tempo apreciável. Se for possível encontrar alguma forma de supor que um traço reverberante possa cooperar com a mudança estrutural e levar a memória até que a mudança de crescimento seja feita, devemos ser capazes de reconhecer o valor teórico do traço que é apenas uma atividade, sem ter que atribuir toda a memória a ela. A concepção de um traço reverberatório transitório e instável é, portanto, útil se for possível supor também que alguma mudança estrutural mais permanente a reforce. Não há razão para pensar que uma escolha deve ser feita entre as duas concepções; pode haver traços de ambos os tipos, e memórias que são dependentes de ambos (Hebb, 1949, p 42)

De fato, temos a STM sustentada em uma atividade reverberante sem mudanças plásticas de longo prazo, enquanto a LTM apresenta essas transformações. Particularmente, nesse trabalho nos referiremos exclusivamente às LTM e aos mecanismos que as subjazem. Ressaltamos também que pela dificuldade de medir o esquecimento, uma forma recorrente de abordar essa dinâmica de transiência e persistência é o estudo da persistência das memórias em diversos paradigmas e condições (BADDELEY; EYSENCK; ANDERSON, 2015). Unicamente, os estudos mais modernos da “nova era do engrama” têm permitido sair dessa restrição metodológica para focar exatamente nas condições dos engramas inacessíveis. Os últimos podem ser reativados por optogenética, mostrando que os traços de memória podem permanecer sem conseguir ser ativos por pistas naturais, e que na interação evocação-engrama pode estar a chave para desvendar a amnésia (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020). Porém, conseguir uma persistência por meio de evocações artificiais gera dilemas inevitáveis sobre a nossa futura capacidade na edição de memórias (PHELPS; HOFMANN, 2019). Por isso, a abordagem tradicional do estudo da persistência ainda é uma perspectiva valiosa para o entendimento da temporalidade nas memórias.

Em geral, a literatura na área considera que a persistência é uma característica das memórias de longo prazo (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007, 2010; DUDAI, 2002b, 2004a; FIORITI *et al.*, 2015; KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). Mesmo sem a duração da LTM estar definida com exatidão (DUDAI, 2002b), é possível e necessário um estudo aprofundado dessas memórias, pois

essas fornecem marcos estruturais para o entendimento do mundo (LAZAROV; HOLLANDS, 2016). Particularmente, dependendo de processos plásticos (IZQUIERDO *et al.*, 2005; ORTEGA; FRANCO, 2010) que ocorrem nas diferentes fases de seu processamento (Figura 1.4.).

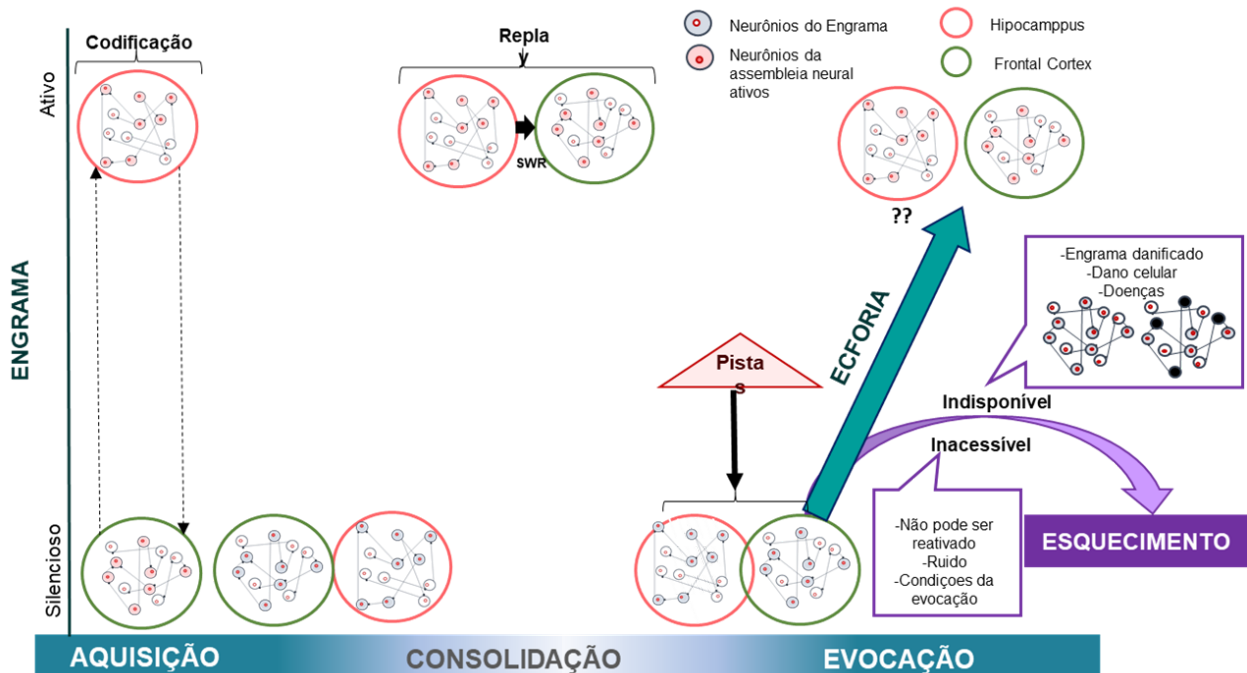


FIGURA 1.4. Esquema da dinâmica de persistência e esquecimento no processo da memória. A formação do engrama é um processo que acontece em diversas assembleias neuronais, sendo que alguns engramas ficam em um estado silencioso até passar pelos processos de consolidação (ver engrama em córtex pré-frontal, círculo de cor verde). Durante a consolidação o engrama pode estar ativo ou silencioso dependendo de diversos processo moleculares. Nesse esquema se mostra unicamente um dos fenômenos de reativação que é o *replay*. Com as pistas, o engrama pode ser reativado (Euforia) ou se encontrar indisponível ou inacessível, o que conduz a um esquecimento total ou momentâneo respectivamente. O papel do hipocampo na evocação ainda permanece em debate, sendo que vários autores afirmam que não é necessária sua reativação para as LTM, mas outras evidências contradizem estas afirmações.

As memórias consolidadas são modificadas por diversos mecanismos (DAVIS; ZHONG, 2017; HARDT; NADER; NADEL, 2013; KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014a). Diante das constantes alterações, surge a pergunta: como uma memória pode conservar a sua identidade no tempo, apesar do *turnover* molecular? (DUDAI, 2002a, 2002b). Essa resposta constitui o maior enigma da persistência. As representações internas, que após a consolidação, são consideradas uma “memória estável” sofrem múltiplas mudanças que, finalmente, podem gerar o esquecimento.

A dinâmica da transiência e persistência é complexa, hoje sabe-se que é o balanço entre as duas que pode levar a melhores adaptações por produzir um comportamento com maior flexibilidade (RICHARDS; FRANKLAND, 2017). Em outras palavras, a memória funciona como uma receita para o futuro, por isso as condições da evocação são muito determinantes, tanto quanto as propriedades intrínsecas do engrama (TULVING, 2007). O aspecto prospectivo da memória é um dos caminhos futuros da pesquisa na área (DUDAI; MORRIS, 2013), mas precisa do entendimento da pergunta: Porque umas memórias perduram enquanto outras são esquecidas?

Devido ao fato de que a permanência das memórias e o esquecimento serem “duas caras” de um mesmo processo, eles compartilham alguns mecanismos, sendo um deles o principal interesse desse trabalho: a neurogênese. A capacidade de gerar novos neurônios na vida adulta é uma questão fundamental no entendimento do problema da estabilidade do engrama, particularmente, quando pensamos no papel relevante do hipocampo na formação de memórias. Como no paradoxo do barco de Teseu, a adição de novos elementos poderia modificar a identidade do barco. Depois das sucessivas reposições e reparações, ele ainda é o barco de Teseu? Ou, em outras palavras, depois da adição de células novas, como o circuito cerebral é capaz de sustentar a “velha memória” (DUDAI, 2002a)? Como podemos ter uma memória funcional após as sucessivas modificações do sistema?

1.4. Hipóteses da modulação da neurogênese na duração das memórias

De acordo com Ramon y Cajal o cérebro estava finalizado após o desenvolvimento. Em suas palavras “tudo pode morrer, nada renascer” (CAJAL, 1928). Porém nos anos sessenta, Altman mostrou uma série de evidências da existência de neurogênese no hipocampo adulto e da migração de novos neurônios (ALTMAN; DAS, 1965; ALTMAN, 1963), além de descrever a via rostral migratória (RMS – *rostral migratory stream*) (ALTMAN, 1969). Paulatinamente, no final dos anos oitenta os trabalhos sobre a neurogênese começaram a ser aceitos a partir de evidências acumuladas em estudos com roedores (ALTMAN, 1962; ALTMAN; DAS, 1965; ALTMAN, 1962, 1963, 1969; ALTMAN; DAS, 1966; SMART, 1961; SMART; LEBLOND, 1961) e pássaros (ALVAREZ-BUYLLA; NOTTEBOHM, 1988; ALVAREZ-BUYLLA; BUSKIRK; NOTTEBOHM, 1987). Porém, os estudos pioneiros em primatas mostravam que não existia neurogênese adulta, e que nos cérebros “avançados” a conservação da estabilidade sobrepuja a plasticidade (RACKI, 1985). Nesse cenário de contradições, aconteceram três descobertas que

contribuíram para uma aceitação geral da neurogênese adulta por parte da comunidade científica: a produção de anticorpo monoclonal para a *bromodeoxyuridine* (BrdU) (GRATZNER, 1982), a geração de células nervosas a partir de células isoladas do cérebro de animais adultos (REYNOLDS; WEISS, 1992) e a identificação de neurogênese em humanos (ERIKSSON *et al.*, 1998).

Quanto à neurogênese em humanos, a polêmica tem se mantido até hoje. Recentemente um estudo mostrou que depois da adolescência, a formação de novos neurônios não chegava a níveis detectáveis, o que fez supor que esse não é um fenômeno relevante no hipocampo de humanos (SORRELLS *et al.*, 2018). Não obstante, esse estudo apresenta inúmeras limitações, por exemplo, número amostral reduzido, falta de clareza no tratamento dos tecidos humanos durante as primeiras 48 horas, dificuldade na expressão de marcadores clássicos de neurogênese em diferentes tipos de tecido, exclusão de tecidos e de área de contagem (excluindo zonas subgranulares), entre outras. Poucos meses após essa publicação arrebatadora, uma nova publicação mostrou que existe neurogênese em humanos, sendo essas novas evidências mais robustas (BOLDRINI *et al.*, 2018).

Em conjunto, a literatura sugere que a neurogênese em humanos é controversa, sendo necessária abordagem tecnológica mais profunda (KUMAR *et al.*, 2019; OPPENHEIM, 2019a), a implementação de protocolos padronizados para a avaliação da neurogênese em humanos e o uso dos marcadores adequados (FLOR-GARCÍA *et al.*, 2020). Porém, parece pouco provável que um evento fisiológico importante para a plasticidade do centro vocal superior de pássaros (BARNEA; PRAVOSUDOV, 2011), bem como para a renovação do sistema nervoso inteiro em planárias (BROWN; PEARSON, 2017), tenha se perdido ao longo do processo evolutivo. Portanto, a neurogênese deve ser entendida à luz da evolução, com mecanismos neurogênicos conservados, mas funções não necessariamente semelhantes (BONFANTI, 2016; KEMPERMANN, 2016; LA ROSA; PAROLISI; BONFANTI, 2020; PAROLISI; COZZI; BONFANTI, 2018). Nesse sentido, o antropocentrismo da ciência faz os pesquisadores perder a perspectiva evolutiva que é orientadora, e basicamente mostra que as observações nos modelos

animais têm limitações sendo necessário elaborar uma perspectiva geral do fenômeno e da evidência para não entrar em um análise limitado de um único artigo¹¹.

Dessa forma, é importante delimitar as regiões com neurogêneses e os nichos neurogênicos¹². Em mamíferos, o bulbo olfatório é uma zona neurogênica “antiga” bem conservada. Já o giro dentado é uma região mais “nova” e não tem uma contrapartida clara em outros vertebrados (FRANÇA, 2018; KEMPERMANN, 2016), assim como a zona subventricular (Figura 1.5.). A relação entre bulbo olfatório e hipocampo não está completamente estabelecida, e a principal característica comum que compartilham é que tanto o hipocampo quanto o bulbo olfatório codificam em um espaço semântico ilimitado ou que muda drasticamente (AIMONE; WISKOTT, 2008), porém essas condições são específicas para mamíferos, sendo que outras espécies têm variadas áreas neurogênicas, nas quais essa relação de codificação é apenas uma hipótese suportada pela evidência em tarefas de padrões de separação [*pattern separation*].

¹¹ Para ver uma revisão recente e crítica dos artigos em humanos que mostra com mais detalhes as particularidades das diferenças entre os resultados de **SORRELLS et al.**, e **BOLDRINI et al.**, (LUCASSEN et al., 2020)

¹² Um nicho neurogênico é uma região caracterizada pela presença de células tronco neurais (Neural Stem Cells) (KAZANIS, 2012). Na neurogênese adulta são observadas habitualmente duas regiões neurogênicas, a zona subventricular (SVZ) e o giro dentado (GD). Se bem nesta tese falaremos também do bulbo olfatório (BO) como uma região com a presença de neurogênese, ainda é discutível se o BO seria ou não um nicho pois mesmo que aparece ter a presença de células tronco as mesmas provêm da SVZ.

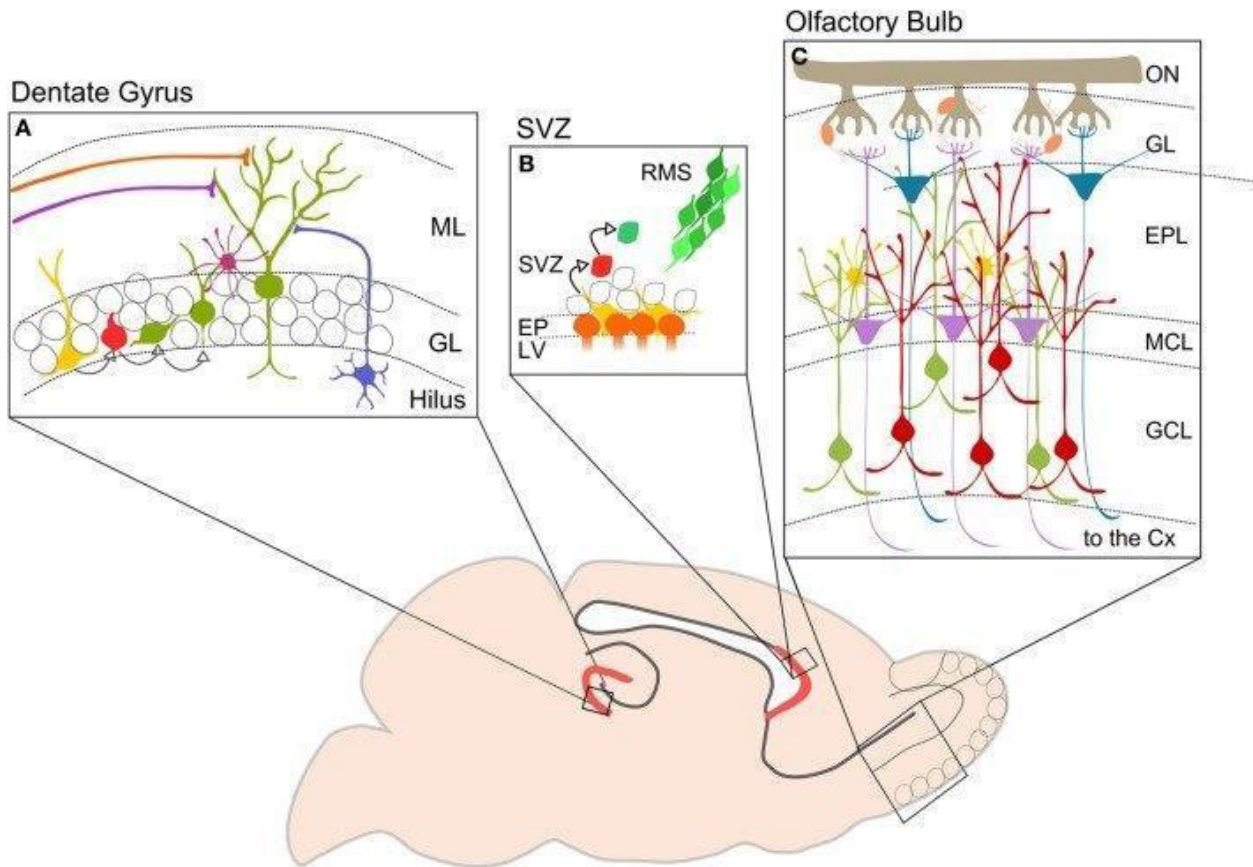


FIGURA 1.5. Esquema das regiões com neurogênese no cérebro de roedores. Reprodução de PALLOTTO ; DEPRez (2014). A foto mostra em vermelho os dois nichos neurogênicos: **(A)** O DG do hipocampo. As células tipo I (amarelo, célula progenitora radial tipo glia) se dividem para gerar células tipo II (vermelho, célula precursora) que se diferenciam em neurônios imaturos (verde). Os células granulares do DG recebem entradas GABAérgicas de interneurônios hilares (azul) e células de cesta (roxo), e entradas glutamatérgicas de vias performativas laterais e mediais (laranja e violeta). **(B)** Zona Subventricular. Neste nicho neurogênico encontram-se as células progenitoras ou tipo B (amarelo) próximas às células ependémicas (laranja). As células tipo b mergulham lentamente e dão origem às células tipo C (vermelhas) que se dividem novamente em neuroblastos ou tipo A (verdes). Os neuroblastos migram em cadeias ao longo do RMS. **(C)** Esquema representativo mostrando os tipos de células OB e circuitos. Os eixos de OSNs são coletados no ON e chegam ao GL onde fazem sinapses em neurônios de projeção OB: MCs (violeta) e TCs (azul). As células de projeção são moduladas por interneurônios, PGCs (laranja) localizados no GL, e GCs perinatais e adultos (verde e vermelho) localizados no GCL. Os GC também são regulados por interneurônios EPL (amarelo). Axônios de MCs e TCs projetam para centros corticais olfatórios superiores. ML, camada molecular; GL, camada granular; SVZ, zona subventricular; RMS, fluxo migratório rostral; EP, camada celular ependimal; LV, ventrículo lateral; ON, nervo olfativo; ONS, neurônio sensorial olfatório; GL, camada glomerular; EPL, camada plexiforme externa; MCL, camada celular mitral; GCL, camada celular granular; CX, córtex (PALLOTTO; DEPRez, 2014).

Mesmo que hoje sabe-se que existem uma variedade muito ampla de marcadores de neurogênese é importante levar em conta que eles não podem por se mesmos determinar de forma definitiva a identidade de uma célula, assim, as considerações que contem o presente trabalho ao respeito da marcação celular de novos neurônios deve ser lida de forma critica pois a mesma representa apenas certo acordos da literatura em roedores.

O hipocampo é uma das regiões que mais apresenta neurogênese (ARIAS CARRIÓN; OLIVARES BUÑUELOS; DRUCKER COLÍN, 2007). Os neurônios novos que se produzem ali são células granulares derivadas de uma célula precursora (DRANOVSKY et al., 2011; ENCINAS et al., 2011). Esta célula pode ser marcada através da expressão de Nestina, SOX2, Pax6 e GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (KUMAR et al., 2019), mas esta última marcação deve ter uma análise morfológica ou confirmatória com outro marcador para distinguir as células progenitoras de outras células gliais.

Durante o processo de divisão celular e de multiplicação das células progenitoras, ou seja, durante as fases G1, G2, S e M, ocorre a expressão da proteína Ki67, que tem sido utilizada como um marcador endógeno de proliferação celular (DRANOVSKY et al., 2011; ROSS; HALL; PA, 1995; SCHLUTER et al., 1993; SCHOLZEN, 2000). Outros marcadores da proliferação, como BrdU, têm sido considerados um padrão ouro na pesquisa de neurogênese por ter como principal vantagem a incorporação no DNA durante as 24 horas após injeção intraperitoneal, podendo marcar a proliferação celular temporalmente (HALBACH, 2007; KEE et al., 2002).

Após essa primeira mitose, as células tipo 2 (progenitoras) começam a expressar PSA-NCAM Doublecortina (DCX) e continuam fazendo-o enquanto a célula granular é imatura (LA ROSA; PAROLISI; BONFANTI, 2020). As células do tipo 2 progenitoras têm apenas um corpo definido e um pequeno axônio (PLÜMPE et al., 2006) e com o tempo passam a ser do tipo 3, ou seja, células granulares imaturas (BRANDT et al., 2003; KEMPERMANN et al., 2004). Em estágios pós-mitóticos mais avançados, as células DCX positivas também expressam marcadores de neurônios maduros, como o NeuN (PLÜMPE et al., 2006; RAO; SHETTY, 2004) e a calretinina (BRANDT et al., 2003; LIU; FUJISE; KOSAKA, 1996).

Mesmo antes de atingir a maturidade, os novos neurônios imaturos fazem conexões com neurônios maduros (AMBROGINI et al., 2004; OVERSTREET-WADICHE et al., 2005; TONI et al., 2007). Os neurônios imaturos mostram um perfil eletrofisiológico diferenciado, caracterizado pela redução da transmissão de ácido gama-aminobutírico (GABA), alta excitabilidade e um baixo limiar para a indução da LTP (GE et al., 2006, 2007; KIRSCHEN; SAILOR; GE, 2017; MARKWARDT; WADICHE; OVERSTREET-WADICHE, 2009; MONGIAT et al., 2009; MONGIAT; SCHINDER, 2014; OVERSTREET WADICHE et al., 2005; SCHMIDT-HIEBER;

JONAS; BISCHOFBERGER, 2004; SNYDER et al., 2009; WANG; SCOTT; WOJTOWICZ, 2000).

Apesar da neurogênese apresentar características comuns entre as regiões mencionadas, existem também diferenças importantes entre elas. No caso do bulbo olfatório, as células granulares provêm de células progenitoras que vem do fluxo migratório rostral (RMS) e participam no processamento do odor (SAILOR; SCHINDER; LLEDO, 2017). Como pode se observar na figura 1.6., existem diferenças nas características dos neurônios novos do hipocampo e do bulbo olfatório, sendo que o tempo de integração dos neuroblastos nos circuitos pré-existente é distinto (PALLOTO:DEPREZ, 2014).

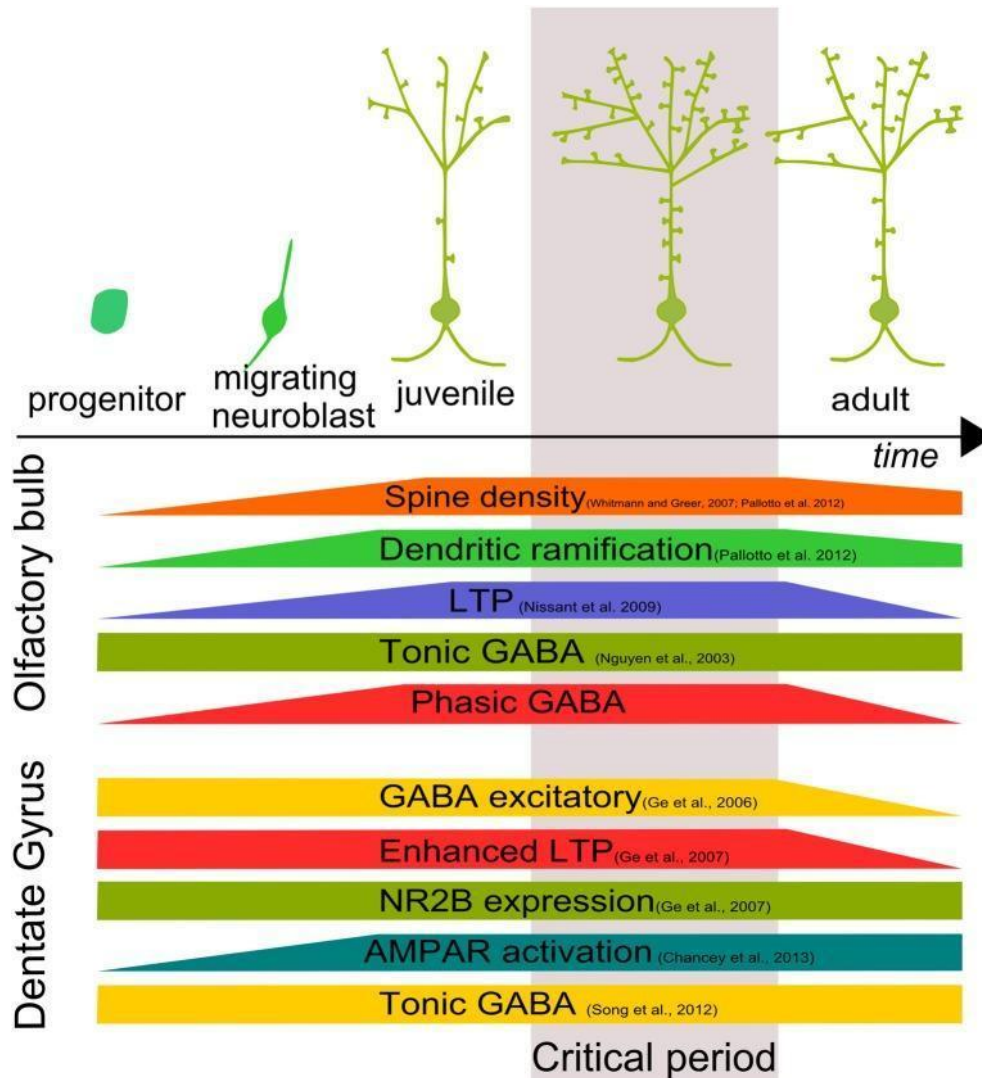


FIGURA 1.6. Desenvolvimento de neurônios novos durante a vida adulta no bulbo olfatório e no giro denteado. Reprodução de PALLOTO ; DEPREZ (2014). O crescimento de GC adulto é caracterizado por uma janela de tempo na qual as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas são afinadas tanto no OB como no DG,

definindo um "período crítico" para o desenvolvimento de células nascidas no adulto. Nesse período crítico acaba definindo-se a integração da célula nova por diferentes processos, sendo a atividade de GABA, Glutamato (e os seus receptores AMPA e NMDA) e de sinalizadores de mudanças plásticas estruturais (CREB e Pk13 por exemplo) essenciais para a maturação e integração na circuitaria (PALLOTTO; DEPREZ, 2014)

Em geral, considera-se que os novos neurônios chegam ao estágio maduro quando não há diferenças eletrofisiológicas entre eles e as outras células granulares (GE *et al.*, 2007), um período que se calcula durar entre 6 e 8 semanas (DENG; AIMONE; GAGE, 2010). Porém, achados recentes mostraram que neurônios novos de 6 semanas que estavam integrados na rede, tinham uma maior atividade do que as células granulares maduras durante uma tarefa de codificação de contexto (DANIELSON *et al.*, 2016). O que junto com dados mais recentes, sugere que as propriedades dos neurônios novos podem durar até 6 semanas (MILLER; SAHAY, 2019). O silenciamento por optogenética desses neurônios novos resultou em um prejuízo na discriminação contextual (DANIELSON *et al.*, 2016). Os resultados sugerem que para sua influência direta na memória, o neurônio precisa estar em um estágio mais amadurecido e que suas contribuições no circuito hipocampal vão ser diferentes daquelas dos neurônios maduros (GONÇALVES; SCHAFER; GAGE, 2016; RAMSARAN; FRANKLAND, 2016). Apesar dessas evidências, a forma como os neurônios novos participam do processo de aquisição, manutenção e perturbação da memória ainda é desconhecida e claro os estudos como o do DANIELSON *et al.*, 2016 tem como limitação que estão ligados aos marcadores e tem que assumir essa equiparabilidade entre marcadores e tipologia de células¹³. Nas palavras de Kempermann (2011, p.64), “os neurônios novos são um investimento a longo prazo, porém eles também respondem às necessidades computacionais de curto prazo”, ou seja, é possível que os neurônios novos possam ter diferentes funções ao longo de seu amadurecimento e integração.

Vários estudos têm mostrado que o aumento da neurogênese após a aquisição pode causar esquecimento (AKERS *et al.*, 2014; GASCON; VUTSKITS; KISS, 2007; GOODWIN, 2018a). Do mesmo jeito, existe uma extensa literatura que mostra que o aumento da neurogênese¹⁴ prévio à aquisição das memórias pode melhorar o aprendizado (AIMONE; DENG; GAGE, 2011;

¹³ Como já fizemos referência este é um problema intrínseco do estudo da neurogênese na medida que a metodologia de acesso aos novos neurônios envolve o uso de marcadores. A maioria dos marcadores que expressam proteínas intrínsecas são enigmáticos pois muitas dessas proteínas ainda não tem sua função delimitada, ou seja, o motivo pelo qual ditas proteínas se expressam exclusivamente em certos neurônios durante determinadas fases do desenvolvimento ainda não está esclarecido totalmente.

¹⁴ Durante todo este trabalho entenderemos aumento de neurogênese como aumento de número de neurônios normalizado de diferentes formas.

ANACKER; DENNY; HEN, 2015; ARRUDA-CARVALHO *et al.*, 2014; BISCHOFBERGER; SCHINDER, 2008; CAMERON; GLOVER, 2015 ; DALLA *et al.*, 2007; DREW; FUSI; HEN, 2013; EPP; SPRITZER; GALEA, 2007; GOODMAN *et al.*, 2010; HUCKLEBERRY *et al.*, 2018; MARÍN-BURGIN; SCHINDER, 2012; MARRONE *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018; VUKOVIC *et al.*, 2013a). Apesar disso, não está totalmente elucidado como os neurônios novos melhoram a memória, sendo que os efeitos promnésicos parecem diferir mesmo dentro das memórias hipocampo dependentes.

Parece que, para alguns tipos de memória, os neurônios novos podem ter uma maior relevância, sendo mais sensíveis àquelas memórias que requerem uma maior demanda de separação de padrões (CLELLAND *et al.*, 2009; KHEIRBEK; TANNENHOLZ; HEN, 2012; NAKASHIBA *et al.*, 2012; SAHAY *et al.*, 2011; TRONEL *et al.*, 2012; VUKOVIC *et al.*, 2013a). Por isso, tarefas como o labirinto aquático de Morris podem não ser tão sensíveis quanto o labirinto de Barnes ou de oito braços, sendo os últimos considerados como tarefas de *pattern separation* (AIMONE; DENG; GAGE, 2011; BEKINSCHTEIN *et al.*, 2011; DENG; AIMONE; GAGE, 2010; SCHMIDT; MARRONE; MARKUS, 2012). Assim, é possível sugerir que o nível de envolvimento do giro denteado nas tarefas mnemônicas poderia determinar a “sensibilidade” de cada tipo de memória à modulação da neurogênese.

Trabalhos prévios mostraram que manipulações farmacológicas que aumentam a neurogênese no período pós consolidação, produzem esquecimento de memórias hipocampo-dependentes, mas não de memórias dependentes de amígdala (ISHIKAWA *et al.*, 2016). Adicionalmente, as evidências sugerem que existem diferenças no papel da neurogênese ao longo das fases da memória. Algumas pesquisas afirmam que seu papel é fundamental na aquisição, porém não na evocação (MOURET *et al.*, 2008; OPENDAK; BRIONES; GOULD, 2016; OPENDAK; GOULD, 2015; VUKOVIC *et al.*, 2013b). Paralelamente, outros resultados mostram que os neurônios novos podem ser cruciais para a codificação (EPP; FRANKLAND, 2016; FRANKLAND; KO; JOSSELYN, 2013), mas como uma forma extraordinária de plasticidade conferem também instabilidade aos circuitos já consolidados, produzindo um esquecimento (AKERS *et al.*, 2014; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; GOODWIN, 2018a; ISHIKAWA *et al.*, 2016; KEMPERMANN *et al.*, 2018; OPPENHEIM, 2019b).

A maioria dos estudos carece de precisão da idade dos neurônios novos e muitas vezes é difícil determiná-la baseada nos marcadores propostos. Mas a função dos neurônios novos tem sido majoritariamente estudada em estágios mais desenvolvidos, ou seja, de 3 a 6 semanas. É provável que esses neurônios novos possam ser componentes do engrama pelo seu estágio de maturação e sua maior excitabilidade. Consequentemente, a literatura tem muito bem estabelecido que os efeitos da neurogênese antes da aquisição são promnésicos (AIMONE; DENG; GAGE, 2011; ANACKER; DENNY; HEN, 2015; ARRUDA-CARVALHO *et al.*, 2014; BISCHOFBERGER; SCHINDER, 2008; CAMERON; GLOVER, 2015; DALLA *et al.*, 2007; DREW; FUSI; HEN, 2013; EPP; SPRITZER; GALEA, 2007; GOODMAN *et al.*, 2010; HUCKLEBERRY *et al.*, 2018; MARÍN-BURGIN; SCHINDER, 2012; MARRONE *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018; VUKOVIC *et al.*, 2013a). Seguindo esse raciocínio, os neurônios jovens e excitáveis que fazem conexões com traços de memória prévios podem introduzir ruído à assembleia neuronal, fazendo dessa memória um processo mais transiente (RICHARDS; FRANKLAND, 2017). Esse ruído poderia dificultar a evocação ou ser um gatilho de outros mecanismos que fariam o engrama inacessível. Contudo, não fica claro quais são os neurônios novos que se envolvem na formação do engrama para produzir maior persistência. Por isso ainda permanecem perguntas como: os efeitos promnésicos da neurogênese na aquisição estão restritos a algum tipo de tarefa mnemônica? Ou esses efeitos são dependentes das mudanças no nicho neurogênico? Ou no perfil celular desses novos neurônios? Nesse trabalho abordaremos parcialmente algumas dessas perguntas.

CAPÍTULO 2. AMBIENTE ENRIQUECIDO, MEMÓRIA SOCIAL E NEUROGÊNESE: entre a persistência e a transiência

"Uma única boa relação constitui uma corda salva-vidas nas dificuldades, uma estrela polar e uma bússola num oceano de percalços."

Oliver Sacks

2.1. A memória social e suas particularidades

É consenso que relações sociais são importantes para a sobrevivência (KROPOTKIN, 1902), o que por si só é uma motivação para estudá-las (MCCALL, 2017). Podemos definir comportamento social como qualquer modalidade de comunicação e/ou interação entre dois indivíduos de uma mesma espécie. Esses comportamentos podem ser observados desde microrganismos unicelulares a espécies tão complexas quanto os seres humanos (CHEN; HONG, 2018). Especialmente quando pensamos no comportamento social dos mamíferos, como homens e camundongos, é possível observar que as interações sociais estão no centro da experiência da vida cotidiana.

O estudo do comportamento social em laboratório desenvolveu-se em três estágios principais: (1) domesticação e estabelecimento de modelos animais; (2) estabelecimento do estudo experimental por meio de aparelhos específicos (como um contraponto à observação natural) e (3) o estreitamento do foco no comportamento de machos (ZILKHA et al., 2016). Cada um desses estágios impôs limitações para os estudos sobre comportamento social. Por exemplo, ratos e camundongos compreendem a espécie de escolha da maioria dos estudos em neurociência básica (BERDOY; DRICKAMER, 2007), porém, cada linhagem de camundongo e/ou rato tem suas particularidades, o que pode modificar o repertório de comportamentos sociais (CHALFIN et al., 2014; SHAMESH et al., 2013). Sendo assim, a compreensão das peculiaridades quanto aos comportamentos sociais de cada linhagem é essencial para que perspectivas translacionais sejam consideradas (BLANCHARD, 2010).

Se os encontros sociais entre indivíduos são realizados em diferentes momentos, é necessário que um registro da identidade destes indivíduos esteja disponível para guiar comportamentos

subsequentes durante esses encontros. Esse registro é denominado de memória social (MS) (THOR; HOLLOWAY, 1982).

Em se tratando de neurobiologia da memória, o paradigma mais utilizado é o de condicionamento clássico, mais especificamente o que gera a memória de medo condicionado (AKERS *et al.*, 2014; GUSKJOLEN *et al.*, 2018b; LEDOUX, JOSEPH, 2003; LIU, XU *et al.*, 2012, 2014; MAREN, 2001; MAREN; QUIRK, 2004; PAN *et al.*, 2020; QUINN *et al.*, 2008; ROY; KITAMURA *et al.*, 2017b; SAH, 2017; SAHAY *et al.*, 2011; SUZUKI *et al.*, 2011). Os aspectos positivos deste paradigma são vários, porém, a memória de medo condicionado distancia-se do conceito de memórias episódicas em humanos¹⁵. É neste cenário que a MS oferece vantagens. Comparada aos demais tipos de memórias, a MS poderia ser considerada como o componente “quem” de uma memória episódica, que abarca também o “quê”, “onde” e “quando” um evento autobiográfico ocorreu.

A avaliação da MS em animais de laboratório pode ser feita por meio de diferentes protocolos. Entretanto, independentemente do protocolo de escolha, todos eles quantificam o tempo de investigação olfativa e utilizam esse valor como o indicador comportamental de que o animal experimental identifica/reconhece um animal estímulo como sendo familiar ou novo (DUDAI, 2002; NORMAN; O'REILLY, 2003; SQUIRE; WIXTED; CLARK, 2008). Se o protocolo envolver a apresentação simultânea de dois animais estímulos, além do reconhecimento (*recognition*), será demandado do animal experimental a diferenciação (*discrimination*) entre os estímulos (BIRD, 2017). Além disso, tarefas de MS também permitem inferir a sociabilidade, já que se espera que um animal controle explore um coespecífico novo e prefira um estímulo social a um não-social (FERGUSON; YOUNG; INSEL, 2002; KOOIJ; SANDI, 2012; MARKHAM; JURASKA, 2007; PERNA; ENGELMANN, 2015; WINSLOW, 2003; ZIMPRICH *et al.*, 2017). No entanto é preciso salientar que a memória social, assim como qualquer memória, é um processo complexo e dinâmico, sendo praticamente impossível dissociar completamente os

¹⁵ Existe uma divisão tradicional das memórias em declarativas e não declarativas, sendo que entre as memórias declarativas encontra-se a memória episódica, a qual precisa ter 3 elementos: o quê, onde e quando (conhecida como a WWW da memória episódica What, Where; When) (CHENG; WERNING, 2014; CLAYTON; RUSSELL, 2009; DUDAI, 2002a; GERSHMAN; DAW, 2016)

componentes sociabilidade, reconhecimento e diferenciação social quando a estamos avaliando em animais de laboratório.

Desde a publicação do trabalho pioneiro de Thor e Holloway (1982), poucos são os estudos que avaliam a persistência da MS. De fato, a persistência da MS é extremamente sensível a manipulações do ambiente, especialmente se o animal é isolado socialmente, caso esse em que a MS não dura mais que algumas horas (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2018; SIMPSON; KELLY, 2012). Provavelmente a escolha pelo isolamento social prévio aos testes de memória social pode ter contribuído para a presença de poucos estudos sobre MS de longa duração.

Particularmente em ratos, um único grupo tem observado a presença de MS de 24 horas, depois de um treino prolongado que dura 60 minutos (GARRIDO *et al.*, 2016; CAVALCANTE *et al.*, 2017). Em camundongos, existem cinco protocolos que produzem memórias persistentes por mais de 24h: dois de diferenciação social (MDS) (DENG *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2018) e outros 3 de reconhecimento social (MRS) (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2019; GUSMÃO *et al.*, 2012; KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018).

É possível também prolongar a MS. Nosso laboratório tem demonstrado que a MRS pode persistir por até 10 dias em camundongos de linhagem Swiss quando os animais são alojados por uma semana em ambiente enriquecido (JAIMES *et al.*, 2020; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018). Em boa parte dos nossos estudos utilizamos um protocolo comportamental onde o reconhecimento, mais do que a diferenciação, predomina. Além disso, temos usado a linhagem Swiss para o estudo da MS. No presente estudo nos propusemos a ampliar o conhecimento sobre as particularidades da MS de longa duração, testando o efeito das variáveis independentes: linhagem e tipo de protocolo para induzir MS (ZILKHA *et al.*, 2016).

2.2. Neurogênese: Modulação do ambiente enriquecido na memória social

Os substratos neurobiológicos da MS envolvem áreas neurogênicas como bulbo olfatório (ALMEIDA-SANTOS *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2016; PENA *et al.*, 2014) e hipocampo (CHIANG *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2016; GUSMÃO *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2018; MEIRA *et al.*, 2018a; OKUYAMA *et al.*, 2016; PENA *et al.*, 2014; TANIMIZU *et al.*, 2017), além de

outras não neurogênicas, como a amígdala basolateral (DIAS *et al.*, 2016; TANIMIZU *et al.*, 2017).

Nosso laboratório tem demonstrado que a MS é um tipo de memória sensível à neurogênese. Em um primeiro trabalho Gusmão e colaboradores (2012) demonstraram que a MS é sensível a mudanças ambientais, particularmente ao enriquecimento por odores sociais que foi suficiente para reverter os prejuízos do isolamento social (GUSMÃO *et al.*, 2012). Com o objetivo de investigar os mecanismos envolvidos nos efeitos do enriquecimento, demonstramos que o enriquecimento ambiental pode recuperar a persistência de memórias de longa duração em animais isolados via mecanismos dependentes de neurogênese (MONTEIRO *et al.*, 2014).

Seguindo essa linha, Dias e colaboradores mostraram que existe maior ativação das áreas neurogênicas como bulbo olfatório e hipocampo, destacando particularmente a camada granular do bulbo olfatório durante a apresentação de um estímulo social e o giro dentado durante a evocação da memória (DIAS *et al.*, 2016). Esses resultados de nosso laboratório foram parcialmente confirmados posteriormente, sendo mostrado que em treinos de mais de 3 minutos, nos quais se produz um MRS de longa duração, ocorre um aumento da atividade do hipocampo (TANIMIZU *et al.*, 2017).

Levando em conta esses achados, Pereira-Caixeta e colaboradores mostraram em dois artigos que a persistência da MS está ligada aos níveis de neurogênese (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018). Em um primeiro momento, foi demonstrado que o enriquecimento ambiental aumenta a persistência da MS para 10 dias, e que esses efeitos promnésicos foram deletados pela injeção de uma droga anti-mitótica que inibe neurogênese (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017). Corroborando esses resultados, a inibição da neurogênese constitutiva no bulbo olfatório e no giro dentado prejudicou a MS de longa duração (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2018). Mais recentemente, observamos que não é unicamente o aumento dos novos neurônios, mas sim o seu nível de amadurecimento, que permite a persistência da MS por 10 dias (JAIMES *et al.*, 2020). Em conjunto, até o momento, sabemos que o ambiente enriquecido aumenta o número de neurônios novos, bem como acelera seu grau de amadurecimento e que tais resultados indicam uma relação de causa-efeito entre ambiente enriquecido e melhora da MS.

No capítulo 1 foram mostradas várias evidências de que o ambiente enriquecido também pode aumentar a sobrevivência de neurônios novos (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999,

2000; VAN PRAAG, 2008; ZHAO *et al.*, 2014) e que esse efeito pode ter uma relação com o poder promnésico do ambiente enriquecido. Entretanto, não há evidências de que o aumento na sobrevivência de neurônios novos seja um mecanismo do ambiente enriquecido sobre a MS.

No presente estudo testamos a hipótese de que, além do número de novos neurônios e de seu grau de amadurecimento, a sobrevivência de neurônios novos também é um mecanismo envolvido nos efeitos do ambiente enriquecido sobre a persistência da MS.

2.3. Objetivos

2.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação das variáveis linhagem, paradigma comportamental e sobrevivência de neurônios novos com o processamento da memória social.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a persistência da MRS em camundongos C57BL/6;
- Estabelecer se os protocolos de discriminação social geram memórias de longa duração em camundongos C57BL/6;
- Avaliar os efeitos do aumento da neurogênese em um protocolo de persistência da MS em animais C57BL/6;
- Avaliar os efeitos do aumento da neurogênese por meio do ambiente enriquecido na sobrevivência de novos neurônios;
- Avaliar os efeitos da aquisição de uma MRS na sobrevivência de novos neurônios.

2.4. Materiais e Métodos

2.4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss (Biotério da Faculdade de Farmácia - UFMG) e C57/BL6 (Biotério Central da UFMG) com idade entre 7 e 8 semanas. Uma vez os animais adultos chegavam ao laboratório do departamento de fisiologia eram aclimatizados por uma semana. Como estímulo social foram utilizados animais juvenis das mesmas linhagens com idade de 21-31 dias. Os animais foram mantidos em gaiolas (no máximo cinco animais por gaiola) dentro de uma estante ventilada com temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade

40-70%. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à ração e água. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG: 356/2015, 46/2017).

2.4.2. Condições de Alojamento

Os animais foram mantidos em dois tipos de ambiente. O ambiente padrão (representado pela sigla SE, do inglês *standard environment*, figura 2.1.A) consistia em manter os animais em caixas com dimensões de 28cm x 17cm x 12cm, enquanto o ambiente enriquecido (representado pela sigla EE, do inglês *enriched environment*, figura 2.1.B) consistia em manter os animais em caixas maiores (40cm x 33cm x 16cm) contendo vários objetos, como rolos de papelão, toca de plástico, fitas e objetos. O EE define-se como uma estimulação complexa inanimada e/ou social (KEMPERMANN, 2019a) e tem sido associado com o aumento da neurogênese, além da promoção de outras alterações plásticas e funcionais (AIMONE, J. B. *et al.*, 2014; KEMPERMANN, 2019b; MONTEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000). É importante sublinhar que o EE realizado dentro do laboratório não contém rodas para a corrida, isso com o intuito de conservar isolado os efeitos do EE e não sumá-los com os do exercício aeróbico, sendo que este EE está padronizado no laboratório e seus efeitos na neurogênese tem sido reproduzidos em diversos trabalhos (JAIMES *et al.*, 2020; MONTEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017; 2018)

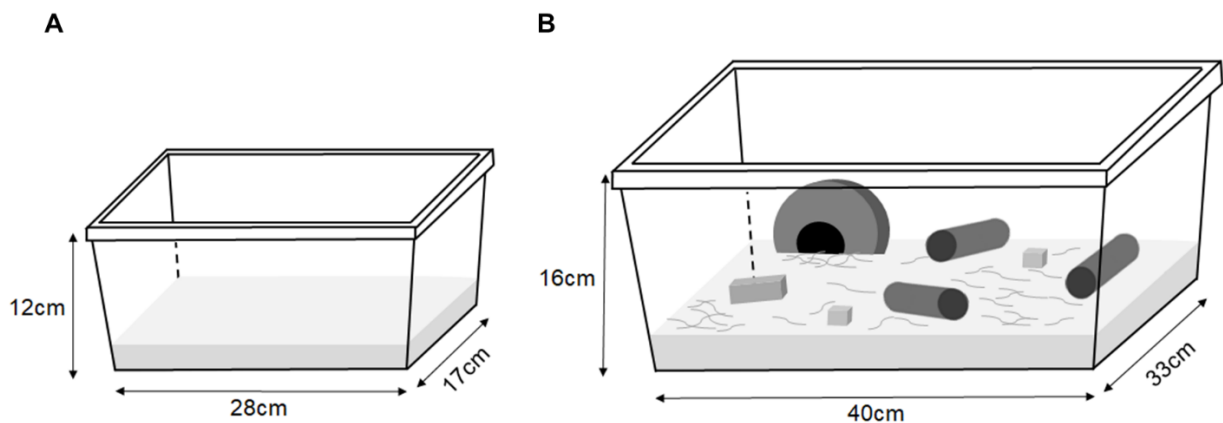


FIGURA 2.1. Condições de alojamento. (A) Imagem representativa do alojamento padrão (*Standard Environment*, SE). **(B)** Imagem representativa do ambiente enriquecido (*Enriched Environment*, EE).

Nos dois ambientes o assoalho era coberto por maravalha. A limpeza das caixas era feita duas vezes por semana. Os mesmos objetos foram utilizados ao longo do EE, mas limpos 3 vezes por semana para evitar o acúmulo indesejado de dejetos.

2.4.3. Tarefa de Reconhecimento Social

A memória social foi avaliada pela tarefa de reconhecimento social em um protocolo modificado da versão original de Thor e Holloway (1982). O protocolo consiste em três sessões: habituação, treino e teste. Durante os 20 minutos de habituação, os adultos foram transferidos individualmente para uma caixa retangular (28cm x 17cm x 12cm) com as mesmas características do alojamento padrão contendo maravalha para cobrir o assoalho e um cilindro de acrílico transparente (de 10 cm de diâmetro) com 60 buracos uniformemente espaçados (GUSMÃO et al., 2012). Em seguida, durante o treino, os camundongos juvenis foram introduzidos no cilindro por 5 minutos. A intromissão do focinho do animal experimental adulto nos buracos foi contabilizada como tempo de exploração social. O cilindro sempre foi posicionado no mesmo lugar e limpo com álcool 70% entre os animais. A memória de reconhecimento social foi testada 24 horas, 10 ou 14 dias após o treino e na fase de teste, que é idêntica ao treino. É esperado que o animal experimental diminua a exploração do juvenil conhecido (reconhecimento social) (Figura 2.2.).

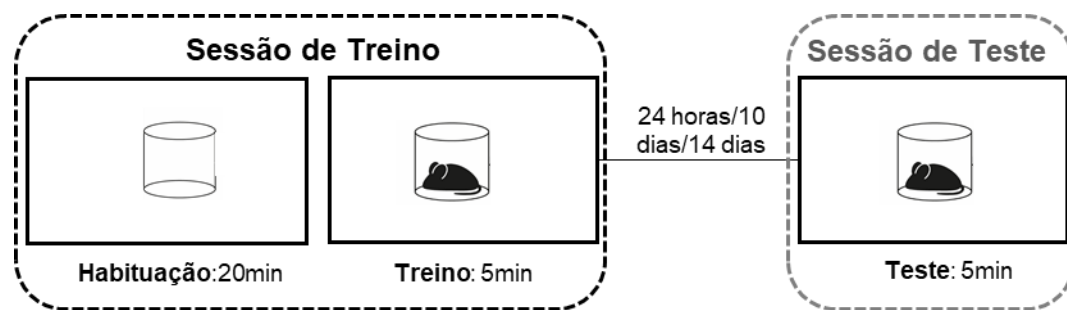


FIGURA 2.2. Esquema representativo da tarefa de reconhecimento social.

O índice de reconhecimento social (IRS) foi calculado utilizando a seguinte fórmula: tempo explorando juvenil no teste/tempo explorando juvenil no treino. O IRS foi comparado com o valor da chance de exploração do animal juvenil se esse é tido como uma novidade, ou seja 0,5 (50%). Consideramos que um grupo experimental possuía a MRS quando a média do seu IRS era significativamente menor do que 0,5 (GUARNIERI et al., 2020; PEREIRA-CAIXETA et al., 2018).

2.4.4. Tarefa de Discriminação Social na caixa de três compartimentos

Este teste foi baseado no previamente descrito por Lin e colaboradores (2018). O aparato consiste em uma caixa retangular de três câmaras fabricada em policarbonato transparente (62cm x 42cm x 27cm), que foi recoberta completamente de cartolina preta. As paredes divisórias tinham portas que permitiam acesso a cada câmara. Este teste é realizado em três fases: habituação, treino/sociabilidade e teste. Na fase de habituação, o animal experimental explora livremente a caixa - que contém dois cilindros com 60 buracos - durante 20 minutos, imediatamente depois é conduzido gentilmente ao compartimento do meio, onde fica confinado enquanto é colocado o estímulo juvenil em um dos cilindros escolhido aleatoriamente. A fase de treino se inicia quando as comportas são abertas e o animal consegue de novo explorar os três compartimentos da caixa durante 5 minutos, e aqui se espera que ele tenha uma preferência pelo pote com o estímulo social. Finalmente, durante a fase de teste, os animais eram reabilitados à caixa e reexpostos ao animal juvenil do treino, enquanto o outro cilindro continha um juvenil novo. Durante a fase de teste de discriminação se espera que os animais explorem mais o juvenil novo (Figura 2.3.).

Foram feitos dois tipos de quantificação, sendo a primeira delas com vídeo, contando todas as fases com cronômetro, medindo especificamente o tempo que os animais passaram em cada compartimento. A segunda quantificação foi feita diretamente pelo observador, contando a investigação do mesmo jeito utilizado na tarefa de reconhecimento social.

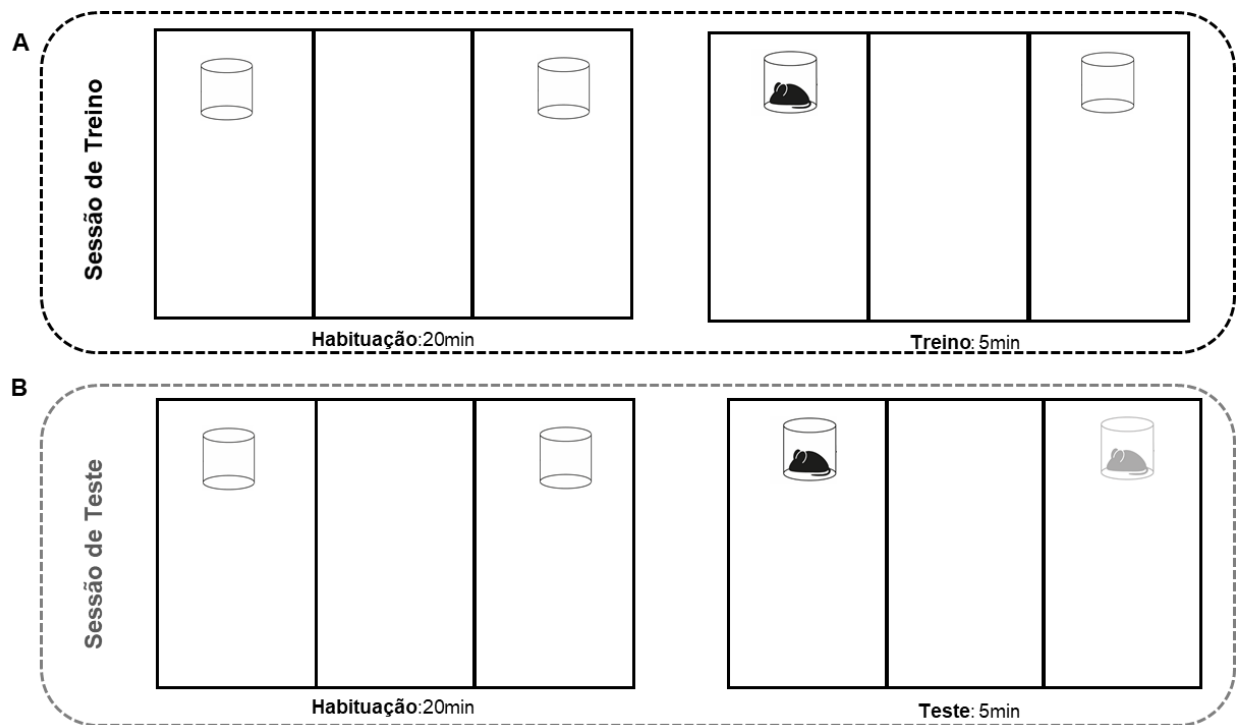


FIGURA 2.3. Figura esquemática da tarefa de três compartimentos. (A) Representação da sessão de treino, com os 20 minutos de habituação e os 5 minutos de treino com o animal juvenil. **(B)** Representação da sessão de teste com os tempos de habituação e de exposição ao animal familiar e ao animal novo.

O índice de discriminação social foi calculado como a diferença da exploração entre o animal novo e o animal familiar dividida pela exploração total (OKUYAMA, 2018). Considera-se que o animal lembra do familiar quando o resultado são valores positivos e diferentes de 0 (chance de exploração).

2.4.5. Tarefas de discriminação social na caixa grande

Esta tarefa é usada em ratos e camundongos como um procedimento de avaliação da memória de discriminação social não condicionada (ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011). O procedimento tem duas sessões, a primeira considerada uma amostragem (treino) na qual o animal é exposto ao estímulo social (macho juvenil) durante 4 minutos depois de ser habituado a uma caixa maior (50cm x 30cm x 16cm) por 30 minutos. Na sessão de teste ou diferenciação (discriminação) social o animal é apresentado ao animal familiar e um animal novo. O esperado é que na sessão de teste o animal experimental explore mais o juvenil desconhecido (Figura 2.4.).

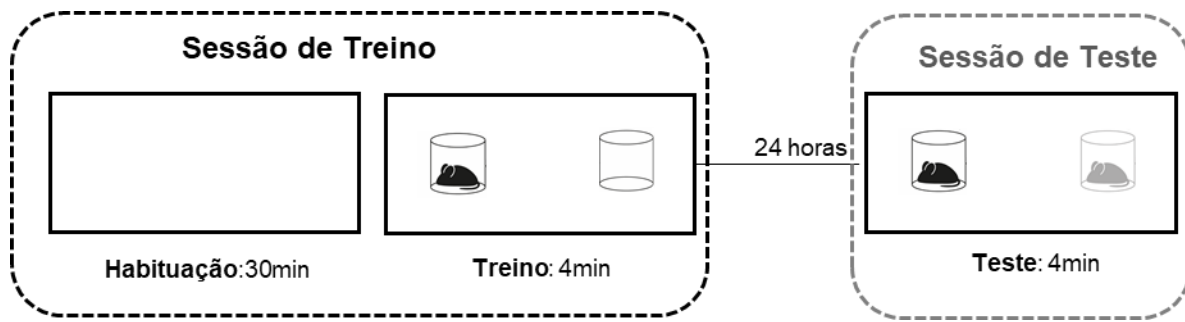


FIGURA 2.4. Figura esquemática da tarefa de discriminação social na caixa grande.

2.4.6. Tratamentos farmacológicos

2.4.6.1. *BrdU*

O 5-bromo-2'-deoxiuridina ou BrdU é um análogo da timidina que incorpora-se ao ácido desoxirribonucleico (DNA) das células durante a fase-S da mitose (fase de autoduplicação do DNA). Os animais receberam 4 injeções intraperitoneais de BrdU (Sigma) no primeiro dia do experimento (diluído em solução de NaCl a 0,9%), na dose de 75 mg/kg (KUHNet *et al.*, 2016).

2.4.6.2. *Memantina (MEM)*

A Memantina é um antagonista dos receptores glutamatérgicos tipo NMDA (ALBENSI, 2004; KELTNER; WILLIAMS, 2003; MOBIUS, 2003; RAMMES; DANYSZ; PARSONS, 2008), e atualmente é um dos tratamentos farmacológicos utilizados para a doença de Alzheimer. A memantina também tem sido relatada como potencializadora da neurogênese no giro denteado do hipocampo (AKERS *et al.*, 2014; ISHIKAWA *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2006). A MEM (Sigma: *Memantinehydrochloride*) foi administrada na dose de 25 mg/kg, via intraperitoneal, uma única vez sete dias antes do treino (AKERS *et al.*, 2014).

2.4.6.3 *Andrographolide (AND)*

Este é o composto ativo da *Andrographispaniculata* Nees. (Family: Acanthaceae), uma erva milenar utilizada na medicina tradicional chinesa (MAITI *et al.*, 2006). O AND tem efeitos neuroprotetores (CHAN *et al.*, 2010; JARUKAMJORN; NEMOTO, 2008; LIU *et al.*, 2018) e recentemente foi relatado que este composto aumenta a neurogênese no hipocampo (VARELA-NALLAR, 2015). Neste estudo, utilizamos uma única injeção intraperitoneal de 2mg/kg⁻¹ de AND, sete dias antes do treino.

2.4.7. Marcação da neurogênese, obtenção dos tecidos e imunofluorescência

Existe uma grande variedade de marcadores de novos neurônios. Os marcadores podem ser classificados entre aqueles baseados na expressão de proteínas internas dos neurônios novos e em substâncias que se incorporam durante o processo de divisão celular, sendo que estes podem ter isótopos radiativos incorporados como a timidina radiomarcada (Thymidine H³)¹⁶.

Entre estes últimos se destaca 5-bromo-2'-deoxiuridina ou BrdU, um análogo a timidina, que basicamente chegou para substituí-la porque era uma forma mais simples de marcação dos processos de duplicação do DNA (GRATZNER, 1982). É o marcador mais usado para o estudo da neurogênese adulta (TAUPIN, 2007) e por isso é considerado um “padrão-ouro” dentro desta área de estudo (WOJTOWICZ ; KEE, 2006). Seu funcionamento consiste em uma injeção de BrdU intraperitoneal para incorporar-se nas células que estejam dividindo-se, assim seguido de um tempo de sobrevivência variável (que podem ser horas, dias ou inclusive anos¹⁷) e, finalmente, por um período que permite rastrear o destino das células divididas e sua progênie (KEE et al., 2002). Uma vez incorporado pela célula, o BrdU é detectado por imunensaio, com anticorpos específicos para sua marcação (GRATZNER, 1982; KEE *et al.*, 2002; WOJTOWICZ ; KEE, 2006). Dependendo do protocolo de aplicação, o BrdU pode ser usado como um marcador de proliferação (TAUPIN, 2007) ou de sobrevivência (CAHILL *et al.*, 2016; DHALIWAL *et al.*, 2016; MOURET *et al.*, 2008; PRICKAERTS *et al.*, 2004; VAN PRAAG; KEMPERMANN ; GAGE, 1999). Cabe ressaltar que o BrdU não é um marcador de neurogênese, pois ele por si mesmo não identifica nenhum tipo celular, por isso deve ser usado em combinação com outros marcadores para estabelecer com exatidão o tipo de célula nova que é formada (KEE *et al.*, 2002; TAUPIN, 2007).

De acordo com as perguntas de nossos experimentos, nesse trabalho foram realizadas dois imunoenaios. Em primeiro lugar, uma imunofluorescência para dupla marcação, usando o anti-BrdU, para detecção de células contendo o marcador de proliferação celular BrdU, e anti-NeuN, para detecção de neurônios nas fatias. A colocalização de ambos marcadores nos

¹⁶ Uma especial menção a timidina radiomarcada que ajudou na descoberta da neurogênese adulta, sendo utilizada pelos pioneiros como um indicador de divisão celular devido a esta molécula ser utilizada exclusivamente pelos núcleos de células que estão se preparando para a multiplicação (ALTMAN, 1963; ALTMAN; DAS, 1965, 1966; SMART, 1961; SMART; LEBLOND, 1961).

¹⁷ No caso dos anos se destaca o primeiro trabalho que documentou a neurogênese adulta em humanos, onde os participantes foram injetados e os seus cérebros coletados até 2 anos depois da injeção do BrdU (ERIKSSON et al., 1998).

indicou a presença de neurônios novos (MONTEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018). Para isso foram selecionadas 10 fatias do bulbo olfatório e 4 fatias do hipocampo dorsal e 4 do ventral dos cérebros de animais que anestesiados com xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg) e submetidos à perfusão.

Os camundongos que tiveram o cérebro coletado foram perfundidos com 10 ml de tampão fosfato e salina 10% (PBS 10%: Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, pH 7,4) e 10ml de paraformaldeído 4% m/v (PFA 4%). O processamento dos tecidos consistiu em uma fixação por 24 horas no PFA 4%, seguida de uma desidratação dos tecidos numa solução de sacarose a 30%. Os cérebros permaneceram na solução de sacarose até o momento de serem fatiados no criostato. Fatias de 40µm, contendo o bulbo olfatório e o hipocampo foram obtidas e armazenadas em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona PVP 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v).

As fatias foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em PBS (0,1M pH 7,4) e logo 3 vezes por 5 minutos em PBS-T (PBS 0,1M + Triton-X 0,3% v/v). Posteriormente, o tecido foi lavado 3 vezes por 5 minutos em NaCl 0,9% m/v e incubado seguidamente em HCl 3M por 10 minutos e HCl 2M por 30 minutos. Em seguida, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos em Tampão Borato (Ácido Bórico - H₃BO₃ - 0,1M) e 3 vezes por 5 minutos em PBS-T. Logo após, as fatias tiveram seus sítios imunorreativos inespecíficos bloqueados pelo soro normal de cabra (NGS – normal goatserum) diluído a 5% em PBS-T, por 2 horas. Após o bloqueio, as fatias foram incubadas por 72 horas no anticorpo primário anti-BrdU produzido em rato (IgG de rato anti-BrdU – monoclonal Abcam®) na proporção de 1:800 v/v e no anticorpo primário anti-NeuN, produzido em camundongo (1:500 IgG de camundongo anti-NeuN – monoclonal Milipore®), diluído em PBS-T + NGS 5%, em agitação constante a 4°C. Ao fim do período de incubação do anticorpo primário, as fatias foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com PBS 10% para evitar o depósito de anticorpos primários em sítios inespecíficos. Logo após, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG de rato associado ao composto AlexaFluor 488® (Molecular Probes®) (1:400 v/v), que foi utilizado para a detecção do anticorpo primário anti-BrdU, e o anti-IgG de camundongo associado ao composto AlexaFluor 647® (Molecular Probes®) (1:400 v/v), utilizado para detecção do anticorpo primário anti-NeuN. A incubação foi feita por 1 hora e 30 minutos, no escuro. Após esse tempo, as fatias foram lavadas 4 vezes por 10

minutos em PBS, e foi adicionado o DAPI (1:2000) deixando uma incubação por 10 minutos. Depois as fatias foram lavadas duas vezes em PBS por 10 minutos e montadas em lâminas carregadas (Superfrost® Plus). As lâminas foram cobertas com meio de montagem (Hydromount™) e, posteriormente, foi colocada a lamínula.

2.4.8. Microscopia

As fatias foram fotografadas em um microscópio de fluorescência (AxioImager M2 -Zeissystem). Com o *software* Carl ZeissAxiovision 4.8) foram obtidas as fotografias de bulbo olfatório, HD e HV da imunofluorescência em objetiva de 5x e em objetiva de 20x. O bulbo olfatório foi fotografado unicamente em sua camada granular e o hipocampo no giro dentado, incluindo as camadas granular e subgranular. Cada uma dessas regiões da imunofluorescência para BrdU/NeuN/DAPI foi fotografada utilizando-se a obtenção de série Z, que consiste em se fazer uma série de fotografias a partir do foco superior da fatia até o foco inferior a intervalos regulares, utilizamos uma serie de 8-10 fotografias de 1µm. Utilizamos também dois filtros diferentes, um de excitação 450-530nm/emissão 500-610nm para o AlexaFluor 488, associado ao anticorpo anti-BrdU, e o outro de excitação 590-680nm/emissão 630-800nm para o AlexaFluor 647, associado ao anticorpo anti-NeuN. O tempo de exposição para cada filtro foi determinado com base no histograma de saturação de pixels, utilizando o máximo possível de pixels abaixo do limite de saturação, sendo que todos os valores da fotografia estiveram no mesmo intervalo e foram reunidos numa tabela durante a fotografia.

2.4.9. Quantificação da imunofluorescência

Todas as quantificações foram realizadas com o *software* FIJI. Este programa é uma versão atualizada do *imageJ* criado por Wayne Rasband (SCHINDELIN *et al.*, 2015; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Por ser um programa gratuito, é versátil e com muitas aplicações. O FIJI (*Fiji is Just Image J*) tem se consolidado como o *software* mais usado para análises de imagens biológicas (SCHINDELIN *et al.*, 2015).

Particularmente nas análises da imunofluorescência, as imagens da marcação das células BrdU/NeuN/DAPI positivas foram submetidas à ferramenta *Z Project*, que realiza uma projeção de todas as imagens da série Z em uma única imagem como previamente descrito

(PEREIRA-CAIXETA et al., 2017). Para isso selecionamos a projeção Média (*Mean*) para todos os filtros, obtendo uma imagem única a partir de todas as imagens para cada marcação.

A partir dessas imagens foram usadas ferramentas do FIJI: *Threshold*, COLOC2 e *Analyse particles*. O *Threshold* é um das ferramentas mas usadas para o processamento de imagens biológicas dentro do *Image J* (JENSEN, 2013; SCHINDELIN *et al.*, 2015; SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012; SEZGIN; BULENT, 2004; YANG YU *et al.*, 2011). Basicamente é possível definir o *threshold* como uma operação que permite separar objetos de um fundo, produzindo como resultado uma imagem binária onde esses objetos encontram-se marcados (SEZGIN; BULENT, 2004). Existem diferentes tipos de *threshold*, sendo os paramétricos¹⁸ os mais utilizados (JENSEN, 2013). Nós usamos o *Yen*, uma das opções disponíveis de *threshold* paramétricos automáticos, mas que apresenta como maior vantagem sua classificação multinível e sua menor complexidade de processamento computacional (YEN; CHANG; CHANG, 1995). Esse *threshold* foi aplicado para todas as imagens de BrdU e naquelas produzidas pelo COLOC2.

O *plugin* COLOC2 realiza uma colocalização automática onde se correlacionam os pixels na mesma localização de dois filtros distintos dando como resultado uma imagem binária da colocalização (para ver mais detalhes do *plugin* acesse https://imagej.net/Coloc_2). Com o estabelecimento das imagens binárias pelos *thresholds*, realizamos uma contagem automática das células positivamente marcadas para BrdU e BrdU/NeuN. Todas as contagens foram normalizadas pela área da região de interesse. Assim, foram obtidos os parâmetros sobrevivência celular (número de células BrdU positivas/mm²) e neurogênese (número de células BrdU positivas + NeuN positivas/mm²). Obteve-se o parâmetro da taxa de neurogênese (número de células BrdU positivas + NeuN positivas/número de células BrdU positivas), sendo que este cálculo permite inferir o percentual das células novas produzidas, BrdU positivas, que sobreviveram e efetivamente se tornaram neurônios ao expressar NeuN.

2.4.10. Análises Estatísticas

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. O índice de reconhecimento social foi calculado utilizando a seguinte fórmula: tempo explorando juvenil no

¹⁸Os *threshold* paramétricos são aqueles baseados em um algoritmo para a separação da imagem, sendo os mais reconhecidos aqueles que fazem a separação de objetos por entropia baseados no histograma da imagem (BATTIATO, 2001; YEN; CHANG ; CHANG, 1995)

teste/(tempo explorando juvenil no treino + teste). O índice de discriminação social foi calculado como a diferença da exploração entre o animal novo e o animal familiar dividida pela exploração total. Os índices foram analisados pelo teste t de amostra única para uma amostra com valor hipotético igual a 0,5 (índice de reconhecimento) ou 0 (índice de discriminação). Se o índice para memória social for menor que 0,5, significa que o animal lembrou-se do juvenil no dia do teste, de igual maneira os valores positivos do índice de discriminação diferentes de 0 foram considerados como memória. As comparações entre os índices foram feitas com teste t para dois grupos e com a análise de variância de uma via (*Oneway ANOVA*), quando havia mais de três grupos, seguida pelo *pos hoc* Bonferroni. As diferenças entre os grupos nos experimentos de comportamento que expressam tempo de exploração foram avaliadas pela *Two way ANOVA*, seguida pelo teste de Bonferroni.

As análises referentes à marcação com imunofluorescência para BrdU/NeuN/DAPI foram feitas pela ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. Do mesmo modo, foram realizadas as análises da

2.5 Resultados

2.5.1. Camundongos C57/BL6 não apresentaram esquecimento fisiológico da memória de reconhecimento social

Em trabalho prévio do laboratório foi verificado que camundongos Swiss não possuem a MS de 10 dias (JAIMES et al., 2020; PEREIRA-CAIXETA et al., 2017). Porém, não foi observado o esquecimento fisiológico em camundongos C57/BL6 e CD1 (dados não publicados) (Figura 2.5.). Os dados preliminares de Mansk e colaboradores (dados não publicados) mostram que todas as três linhagens de camundongos (Swiss, CD1 e C57BL/6) conseguem formar a MRS de longa duração (Figura 2.5B), como previamente reportado (CAMATS-PERNA; ENGELMANN, 2015), mas se observa que o C57BL/6 e o CD1 tem uma MRS mais persistente (Figura 2.5.).

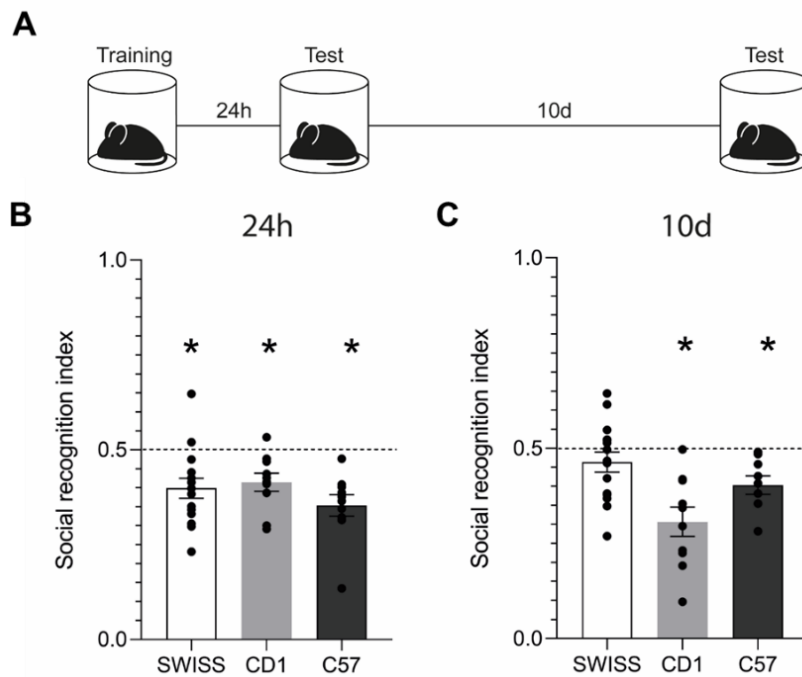


FIGURA 2.5. Memória social em diferentes linhagens de camundongos. Figura adaptada do trabalho de MANSK (2020). **(A)** Desenho experimental: os animais foram treinados na tarefa de MRS e avaliados 24 horas e 10 dias depois do treino. **(B)** Índice de reconhecimento 24 horas depois em 3 linhagens de camundongo. **(C)** Índice de reconhecimento 10 dias em 3 linhagens de camundongo. *diferente de 0,5; $p < 0,05$.

Então nos perguntamos se haveria esquecimento fisiológico da MS em camundongos C57/BL6. Para responder essa pergunta testamos a MS 10 e 14 dias pós-treino. A figura 2.6. mostra que camundongos C57/BL6 não apresentam esquecimento fisiológico da MS, quando a sessão de treino dura 5 min e a memória é testada 10 ($t_{(8)} = 3.7$; $p = 0.0063$) ou 14 dias ($t_{(9)} = 4.4$; $p = 0.0018$). O teste T não pareado não mostrou diferença entre os dois índices ($t_{(17)} = 0.5$; $p = 0.5904$).

A seguir testamos a hipótese de que protocolos mais desafiadores poderiam permitir que visualizássemos um esquecimento fisiológico, pelo menos em nível comportamental. Para isso usamos dois tempos de aquisição que a literatura reporta como suficientes para a formação de MS de 24h: 3 minutos (TANIMIZU et al., 2017) e 2 minutos (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000). A figura 2.7. mostra que 2 minutos de treino são suficientes para formar MS de 24h ($t_{(7)} = 3.9$; $p = 0.0057$) que persiste por 10 dias ($t_{(7)} = 2.5$; $p = 0.0433$). De maneira semelhante, 3 minutos de aquisição é suficiente para que os animais lembrem do coespecífico 24 horas ($t_{(5)} = 4.9$; $p = 0.0044$) e 10 dias ($t_{(7)} = 2.4$; $p = 0.02$). Particularmente, 3 minutos de aquisição parecem produzir uma memória diferente, já que os animais que foram testados 24 horas após o treino possuem um

valor de índice de reconhecimento compatível com um melhor desempenho na tarefa, comparado com os camundongos que foram testados 10 dias após a aquisição ($t_{(11)} = 3.0$; $p = 0.0119$). Ou seja, o protocolo de reconhecimento social com sessão de aquisição de 3min foi aquele que melhor indicou um possível enfraquecimento fisiológico da MS em camundongos C57/BL6 (Figura 2.7.).

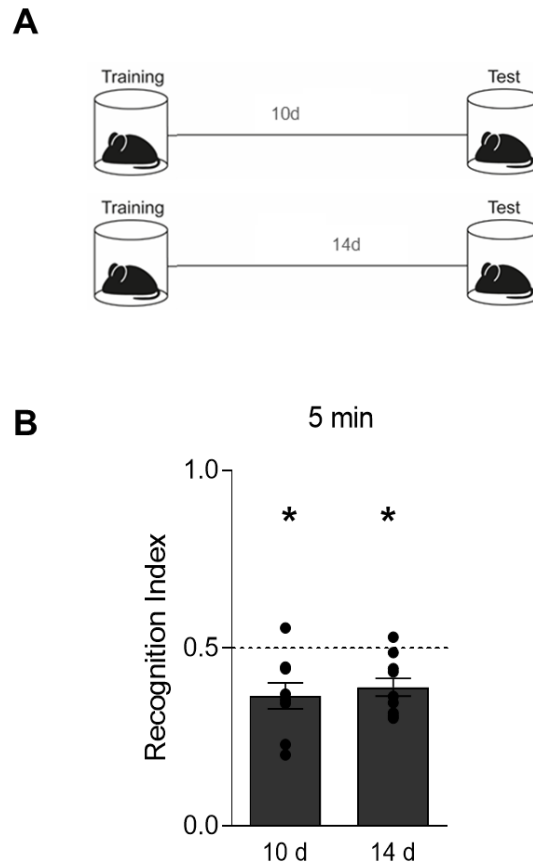


FIGURA 2.6. Persistência da MRS após um treino de 5 minutos. (A) Os animais foram treinados por 2 minutos na tarefa de MRS e avaliados 24 horas e 10 dias depois do treino. (B) Índice de reconhecimento 10 e 14 dias em animais treinados por 5 minutos. $n=9-10$. Análise de teste t de uma amostra em referência a 0.5, teste t não pareado (diferença entre os grupos). * diferente de 0,5; + Grupos diferentes entre si; $p < 0,05$.

A seguir testamos a hipótese de que protocolos mais desafiadores poderiam permitir que visualizássemos um esquecimento fisiológico, pelo menos em nível comportamental. Para isso usamos dois tempos de aquisição que a literatura reporta como suficientes para a formação de MS de 24h: 3 minutos (TANIMIZU et al., 2017) e 2 minutos (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000). A figura 2.7. mostra que 2 minutos de treino são suficientes para formar MS de 24h ($t_{(7)} = 3.9$; $p = 0.0057$) que persiste por 10 dias ($t_{(7)} = 2.5$; $p = 0.0433$). De maneira semelhante, 3 minutos

de aquisição é suficiente para que os animais lembrem do coespecífico 24 horas ($t_{(5)} = 4.9$; $p = 0.0044$) e 10 dias ($t_{(7)} = 2.4$; $p = 0.02$). Particularmente, 3 minutos de aquisição parecem produzir uma memória diferente, já que os animais que foram testados 24 horas após o treino possuem um valor de índice de reconhecimento compatível com um melhor desempenho na tarefa, comparado com os camundongos que foram testados 10 dias após a aquisição ($t_{(11)} = 3.0$; $p = 0.0119$). Ou seja, o protocolo de reconhecimento social com sessão de aquisição de 3min foi aquele que melhor indicou um possível enfraquecimento fisiológico da MS em camundongos C57/BL6 (Figura 2.7.).

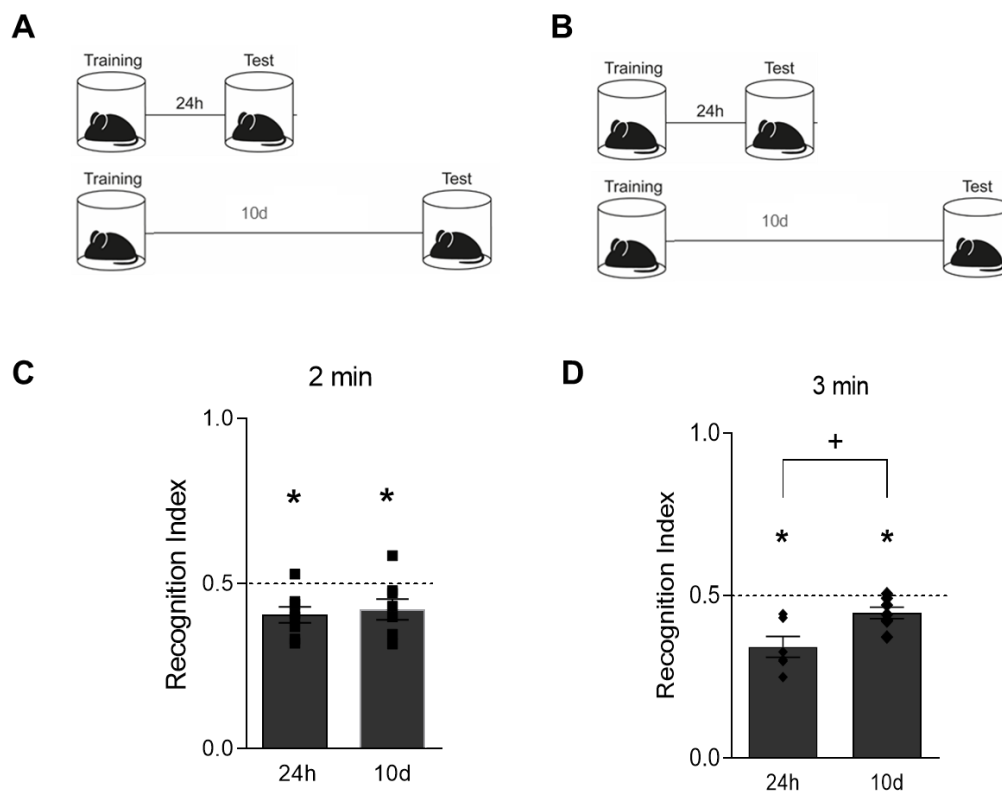


FIGURA 2.7. Persistência da MRS após treinos com diferentes durações. (A) Os animais foram treinados por 3 minutos na tarefa de MRS e avaliados 24 horas e 10 dias depois do treino. (B) Os animais foram treinados na tarefa de MRS e avaliados 10 e 14 dias depois do treino (C) Índice de reconhecimento 24horas e 10dias em animais treinados por 2 minutos. (D) Índice de reconhecimento 24horas e 10 dias em animais treinados por 3 minutos. Análise com teste t de uma amostra em referência a 0,5, teste t não pareado (diferença entre os grupos). $n=8-9$, * diferente de 0,5; + Grupos diferentes entre si; $p<0,05$.

2.5.2. Protocolos onde a diferenciação social predomina não produzem comportamentos compatíveis com MS de longa-duração

A seguir, nos perguntamos como seria o desempenho de camundongos C57/BL6 em tarefas de MS cuja diferenciação social é mais evidente.

No modelo estabelecido pelo grupo do Engelmann (BIELSKY *et al.*, 2005; PERNA; ENGELMANN, 2015; ENGELMANN, 2009; ENGELMANN; HÄDICKE;NOACK, 2011; HÄDICKE; ENGELMANN, 2013; LUKAS *et al.*, 2013; RICHTER; WOLF;ENGELMANN, 2005b; WANISCH; WOTJAK;ENGELMANN, 2008), no qual os animais são expostos a encontros sociais dentro de um campo aberto (Figura 2.8. A), observamos que os animais preferiram interagir com o juvenil, indicando um comportamento de sociabilidade como esperado ($t_{(9)}=5.7$; $p= 0.0003$)(Figura 2.8. B). Entretanto, não observamos MS 24h ($t_{(9)}=2.1$; $p= 0.0621$). De fato, observamos o oposto, uma preferência pelo juvenil familiar.

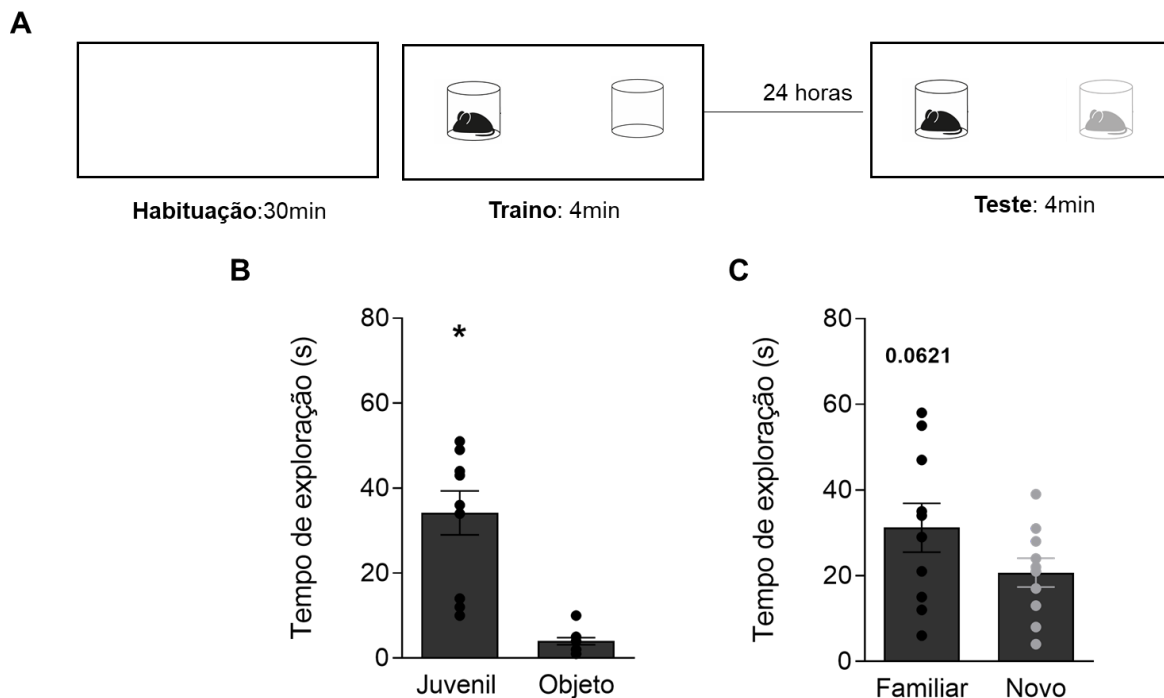


FIGURA 2.8. Discriminação social do C57BL/6 na caixa grande.(A)Os animais foram submetidos à tarefa de discriminação na caixa grande, sendo que a memória foi avaliada 24 horas após treino. **(B)** Sociabilidade dos camundongos C57BL/6. **(C)** Discriminação social dos camundongos C57BL/6. **(D)** Índice de discriminação nesse modelo mostra preferência pelo animal familiar. Análise com teste t não pareado, $n=8-9$, * indica $p<0,05$.

Nosso próximo passo foi usar um outro protocolo de diferenciação social, onde a apresentação aos juvenis ocorre numa caixa com três compartimentos (Figura 2.9. A). A figura 2.9. B mostra que os animais adultos não apresentaram o comportamento de sociabilidade previsto ($t_{(10)}=0.8$; $p=$

0. 4241). Adicionalmente, não observamos comportamento compatível com MS (24 horas) ($t_{(12)}=0.5$; $p= 0.6406$, Índice de discriminação $t_{(9)}=0.7$; $p= 0.4996$).

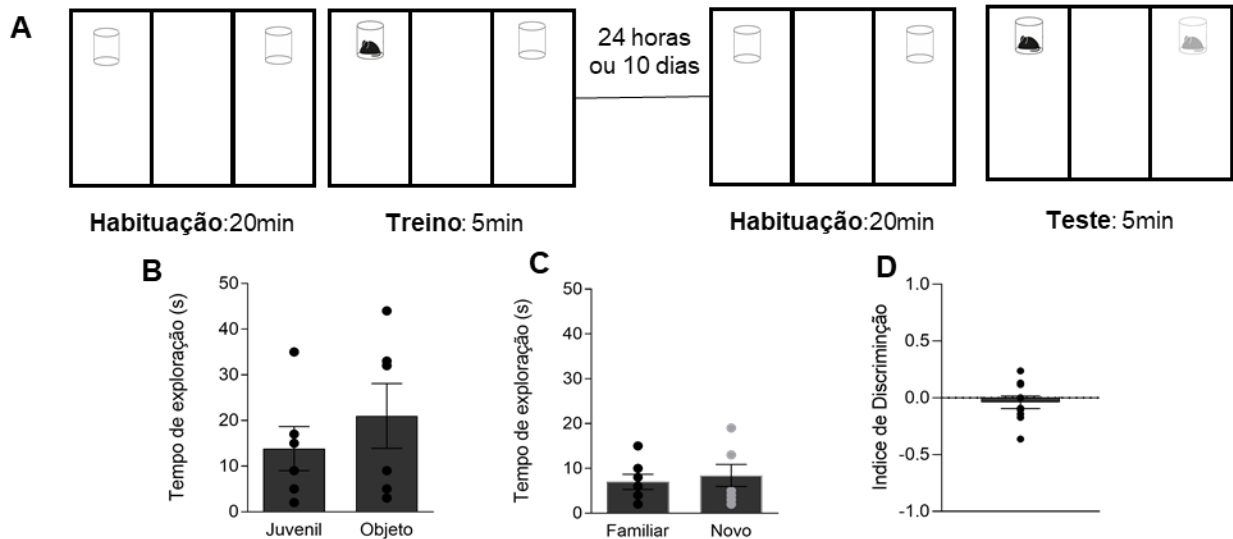


FIGURA 2.9. Discriminação social do C57BL/6 no teste de três compartimentos. (A) Os animais foram submetidos à tarefa de discriminação na caixa grande, sendo que a memória foi avaliada 24 horas após treino. (B) Sociabilidade dos camundongos C57BL/6. (C) Discriminação social dos camundongos C57BL/6. (D) Índice de discriminação social. Análise com teste t não pareado, $n=7$, * indica $p<0,05$.

2.5.3. Aumento da neurogênese prévio à aquisição da MS não promove seu esquecimento

Até o momento, nossos resultados sugerem que camundongos C57/BL6 não são os mais indicados para o estudo da MS em protocolos que envolvem a diferenciação. Porém, em protocolos onde o reconhecimento é mais evidente, esses animais são ideais como modelos de persistência da MS. Em outras palavras, o fato de não termos observado o esquecimento fisiológico nestes animais, pelo menos até 14 dias, torna-os ideais para testar hipóteses acerca do esquecimento da MS. Uma das propostas mais recentes sugere que a neurogênese desempenharia um papel fundamental no esquecimento (AKERS *et al.*, 2014; FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013; GOODWIN, 2018a; ISHIKAWA *et al.*, 2016; KEMPERMANN *et al.*, 2018; OPPENHEIM, 2019b). Então nos perguntamos se o aumento da neurogênese prévio ao treino levaria ao esquecimento da MS num modelo onde ele não ocorre naturalmente. A figura 2.10 mostra que todos os animais, incluindo os controles, apresentam MS de 10 dias [ANOVA de duas. vias: Interação, ($F_{(3, 66)}=0.2$; $p=0.8627$), Tratamento ($F_{(3, 66)}= 2.7$; $p=0.0528$) e Sessão Treino-Teste ($F_{(3, 66)}=58.0$; $p<0.0001$)]. O *Pos hoc* de Bonferroni mostrou que houve diferenças entre o treino e o teste do grupo Salina ($p= 0.0595$), MEM ($p= 0.0014$), AND ($p=0.0008$) e EE

($p= 0.0424$). A MRS observada no tempo de exploração não é explicada por alterações na exploração social produzidas pelos tratamentos, pois as manipulações farmacológicas não evidenciaram diferenças entre os tempos de exploração no treino de cada grupo tratado e do controle (Figura 2.10.B).

Para confirmar os resultados observados no tempo de exploração nós calculamos o índice de reconhecimento, evidenciando que todos os grupos possuíam a persistência da memória [SAL(t_7)=4.1; $p= 0.0043$), MEM(t_9)=7.1; $p<0.0001$), AND (t_9)=6.8; $p<0.0001$) e EE (t_9)=6.8; $p<0.0001$]. Para comparar as diferenças da memória, nós realizamos uma análise de ANOVA de uma via e encontramos diferença entre os grupos [$F_{(3,34)}=5.3$; $p=0.0043$]. A análise *pos hoc* mostrou que o grupo salina foi diferente de do grupo AND($p=0.0039$), MEM ($p=0.0209$) e EE ($p=0.0636$)

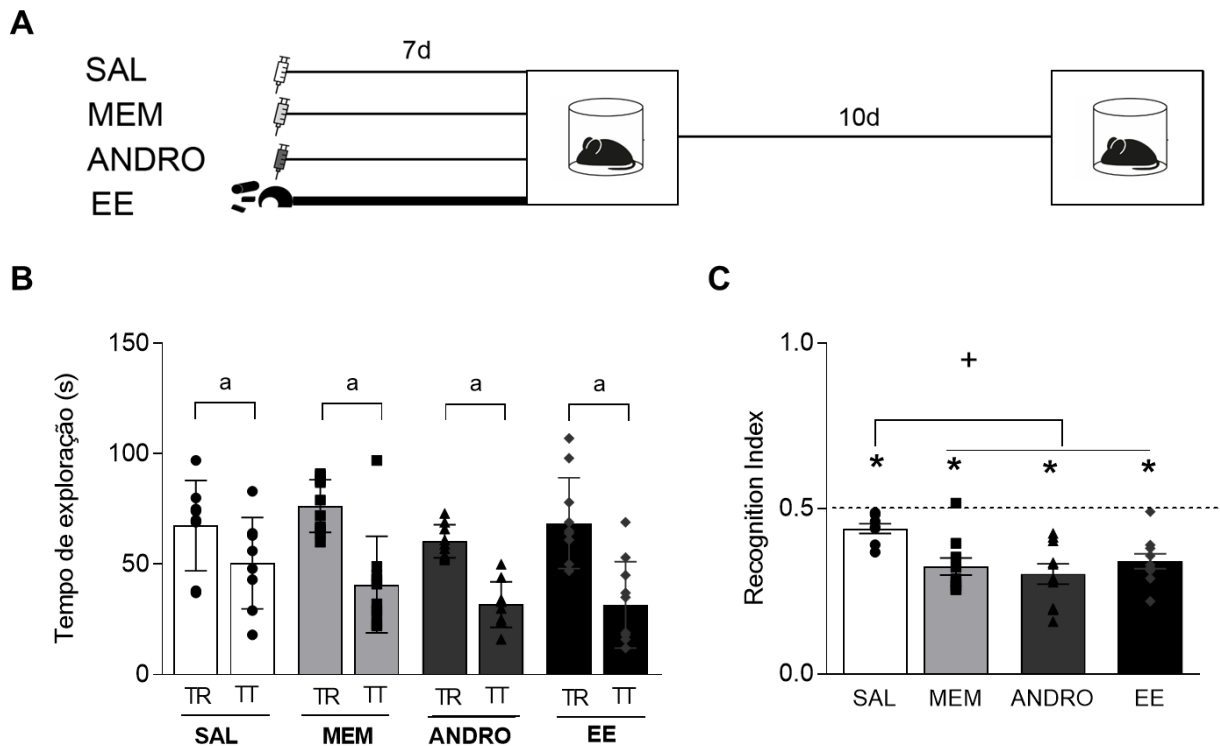


FIGURA 2.10. Efeitos do aumento da neurogênese sobre a memória de reconhecimento social do C57BL/6. (A) Os animais foram tratados ou alocados no EE e, após sete dias, foram submetidos ao treino na tarefa de MRS. O teste ocorreu 10 dias após o treino. (B) Tempos de exploração social no treino (TR) e no teste (TT) entre os diferentes grupos. Análise com Anova de duas vias para o tempo de exploração e ANOVA de uma via para comparação entre os índices dos tratamentos. (C) Índice de reconhecimento social. Análise com teste t de uma amostra em referência a 0.5 e foi realizado ANOVA de uma via para a comparação dos índices dos tratamentos.

n=8-10, a diferença entre treino (TR) e teste (TT),* índice menor que 0.5; + diferença entre os grupos tratados e o controle <0,05.

Em resumo, o modelo de persistência do C57BL/6 permite o estudo da modulação da neurogênese na persistência, sendo que os efeitos observados permitem afirmar que o aumento da neurogênese não causa esquecimento e, pelo contrário, parece promover memórias que são diferentes da memória formada pelo grupo controle.

2.5.4. A modulação do Ambiente Enriquecido (EE) na memória social: Sobrevivência de novos neurônios.

Nosso primeiro passo foi reproduzir os resultados prévios do laboratório com a linhagem Swiss (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018). Confirmamos que, diferente do observado em C57BL/6, os camundongos Swiss não tem a memória social de 10 dias (SE, $t_{(8)}=6.8$; $p=0.3951$). Entretanto, o EE (SE, $t_{(8)}=5.1$; $p=0.0009$) é capaz de produzir uma memória que naturalmente não existiria, aumentando então a persistência da MRS ($t_{(16)}= 2.8$; $p=0.0124$).

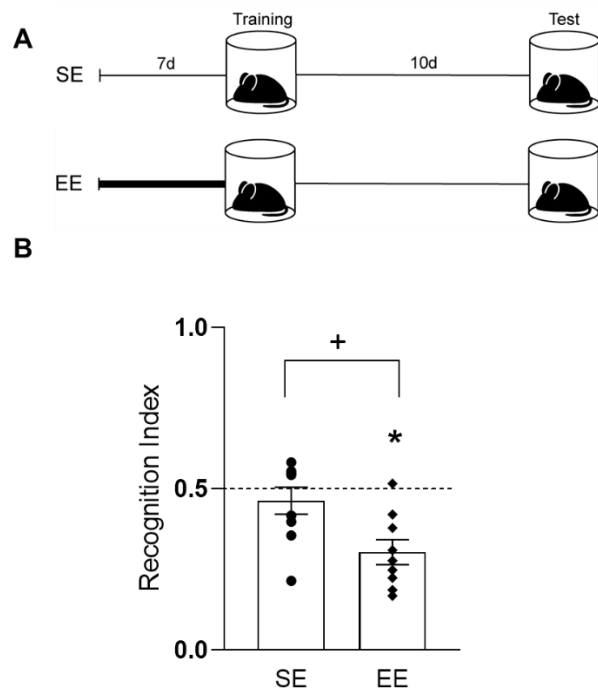


FIGURA 2.11. O ambiente enriquecido induz 10 dias de persistência da memória social em camundongos swiss. (A) Os animais foram alocados no EE ou no SE 7 dias antes do treino na MRS. A memória foi avaliada 10 dias após o treino. **(B)** Os animais do EE, mas não do SE, se lembraram do juvenil. * Índice menor que 0.5; + diferença entre EE e SE, $p<0,05$.

Por nossos estudos prévios sabíamos que essa memória persistente produzida pelo EE no Swiss é dependente da neurogênese (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018). Além disso, tem sido

demonstrado que o EE aumenta a sobrevivência dos neurônios novos no cérebro adulto (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999, 2000; VAN PRAAG, 2008; ZHAO *et al.*, 2014) e que seus efeitos podem ser aditivos com outros estímulos quando exposto de forma consecutiva (FABEL *et al.*, 2009), especialmente se envolver o aprendizado (DIFEO ; SHORS, 2017; LEUNER *et al.*, 2004; OLARIU *et al.*, 2005; SISTI; GLASS ; SHORS, 2007).

Então nos perguntamos se a combinação do EE com a exposição a um encontro social aumentaria a sobrevivência de neurônios novos (Figura 2.12.A).

A figura 2.12. B mostra que a presença do juvenil de fato aumenta a exploração de maneira semelhante entre os grupos em condição padrão (SE) e enriquecida (EE). A ANOVA de duas vias mostrou que não existe interação entre os fatores [Estímulo social x Alojamento: $F_{(1,20)}=0.50$; $p=0.4844$] e que também não existe um efeito do alojamento ($F_{(1,20)}=0.40$; $p=0.5337$). Entretanto, observamos um efeito principal do estímulo social ($F_{(1,20)}=114.2$; $p < 0.0001$). O *pos hoc* de Bonferroni mostrou que houve diferença entre os animais que treinaram com o juvenil em comparação com os que não tiveram estímulo social (todas os $p < 0.0001$), de forma independente do tipo do alojamento (Figura 2.12), pois não se encontraram diferenças entre os grupos NST e SMT em SE e EE ($p > 0.9999$).

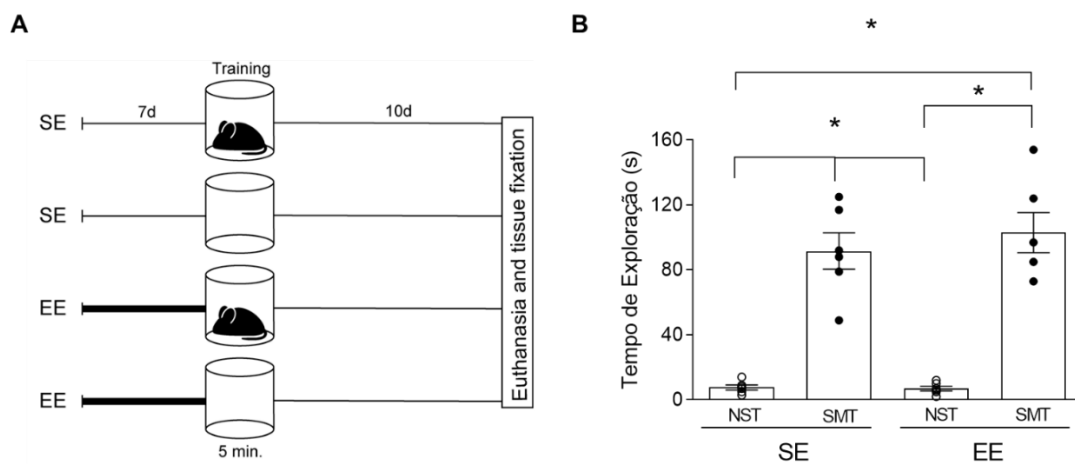


FIGURA 2.12. O estímulo social durante o treino aumenta a exploração. (A) Os animais foram alocados no EE ou no SE. Sete dias depois, eles passaram pelo MST ou NST e foram testados 10 dias depois. (B) Tempo de exploração durante o treino de 5 minutos. * indica diferença estatística, $p < 0,05$ (* ver indicação da linha).

A análise da imunofluorescência BrdU/NeuN/DAPI no Hipocampo Dorsal (HD) revelou que o enriquecimento aumenta a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo dorsal [ANOVA de

duas vias: Interação, ($F_{(1,17)}=0.6$; $p=0.4630$), Estímulo social ($F_{(1,17)}=2.1$; $p=0.1604$) e Alojamento ($F_{(1,17)}=24.3$; $p=0.0001$). O *pos hoc* de Bonferroni mostrou que existem diferenças entre os grupos, sendo que os animais EE NST são diferentes do SE NST ($p=0.0065$) e SE SMT ($p=0.0022$). Ainda, o EE SMT evidenciou diferenças estatisticamente significativas com SE NST ($p=0.0464$) (Figura 2.13. A).

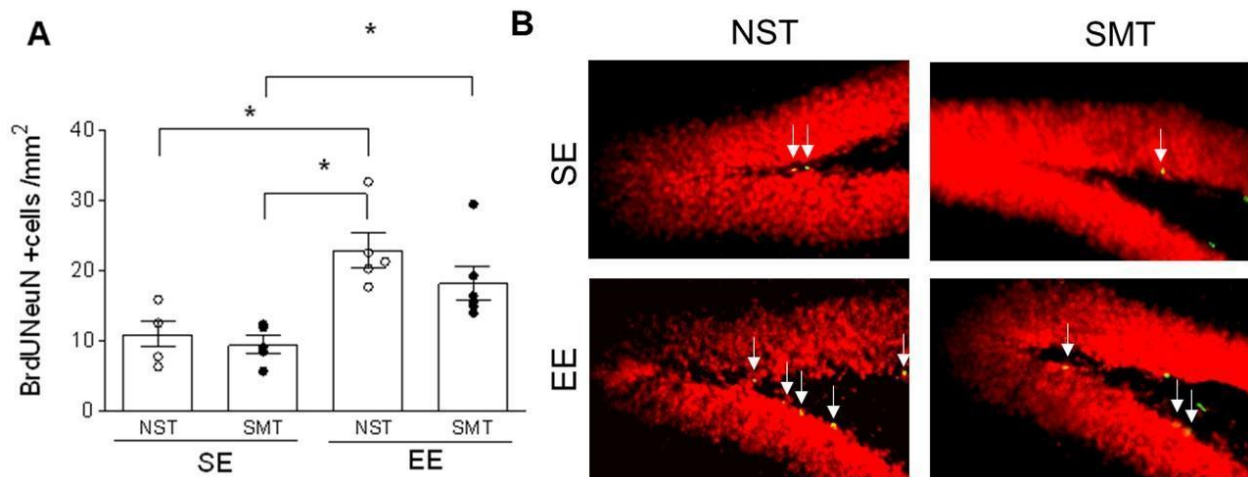


FIGURA 2.13. Efeitos do encontro social e do enriquecimento ambiental sobre a sobrevivência de novos neurônios no HD. (A) Sobrevivência de neurônios novos no hipocampo dorsal marcados pela colocação de BrdU e NeuN, mostrando as diferenças entre os animais EE e os SE. Os animais do grupo SE apresentam níveis de sobrevivência menores. (B) Imagens representativas. Análise com ANOVA de duas vias. $n=5-6$, * indica diferença estatística, $p<0,05$.

No hipocampo ventral (HV), o resultado foi semelhante, mostrando um aumento da sobrevivência nos neurônios novos [ANOVA de duas vias: Interação, ($F_{(1,17)}=0.3$; $p=0.6156$), Estímulo social ($F_{(1,17)}=2.0$; $p=0.1730$) e Alojamento ($F_{(1,17)}=18.01$; $p=0.0005$)]. Como pode observar-se na figura 2.14.A os animais EE NST foram diferentes dos SE NST ($p=0.0259$) e SE SMT ($p=0.0066$) (Figura 2.14. A).

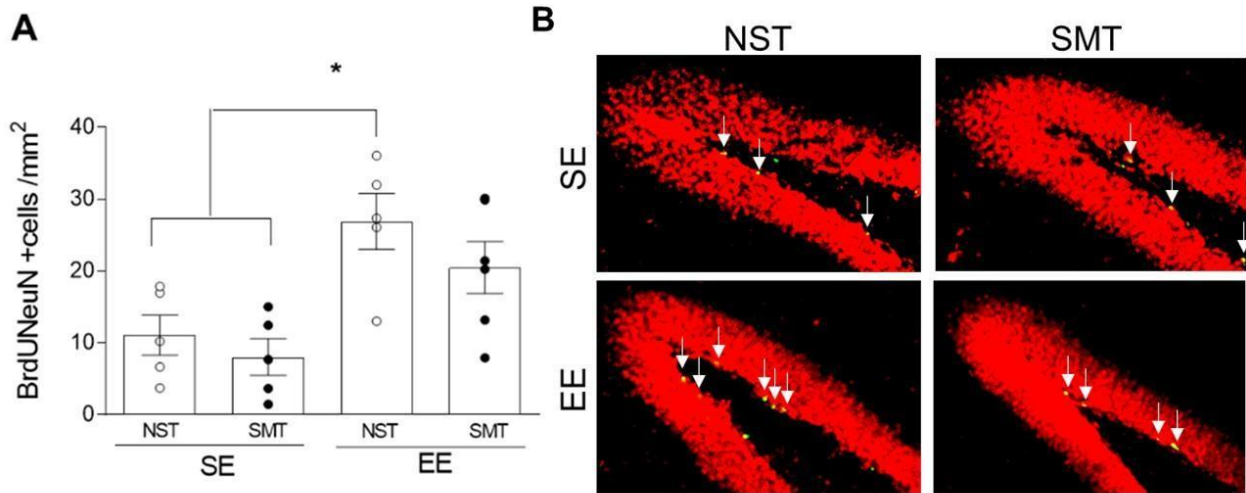


FIGURA 2.14. Efeitos do encontro social e do enriquecimento ambiental sobre a sobrevivência de novos neurônios no HV. **(A)** Sobrevivência de neurônios novos no HV mostrando efeitos unicamente do EE. **(B)** Imagens representativas. Análise com ANOVA de duas vias. $n=5-6$, * indica diferença estatística, $p<0,05$.

Em resumo, estes resultados sugerem que o treino na tarefa de reconhecimento social não influencia a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo.

A seguir analisamos o bulbo olfatório. A análise da camada granular do bulbo olfatório não mostrou diferença na sobrevivência de neurônios novos [ANOVA de duas vias: Interação, ($F_{(1, 17)}= 8.7$; $p=0.9927$), Estímulo social ($F_{(1, 17)}= 1.8$; $p=0.1909$) e Alojamento ($F_{(1, 17)}= 0.2$; $p=0.1909$)] (Figura 2.15).

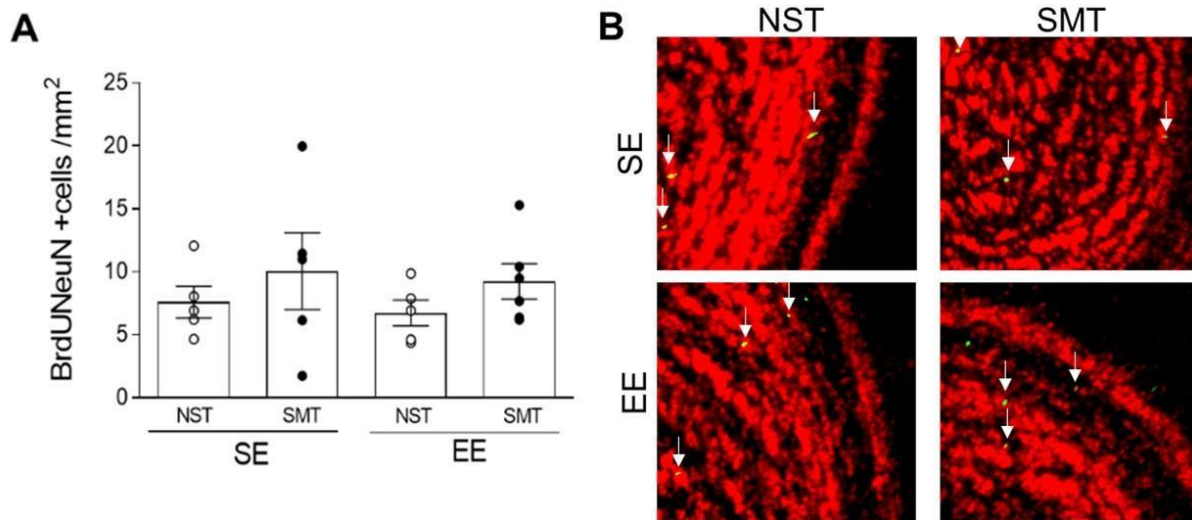


FIGURA 2.15. Efeitos do encontro social na sobrevivência de células novas no bulbo olfatório adulto. (A) Sobrevivência de neurônios novos no bulbo olfatório marcado com a dupla BrdU e NeuN. **(B)** Imagens representativas. Análise com ANOVA de duas vias. $n=4-6$, $p<0,05$.

Em síntese, nossos resultados revelaram que a aquisição de uma memória social não afeta a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo nem no bulbo olfatório. Mesmo assim, nós demonstramos que o ambiente enriquecido aumenta a sobrevivência de novas células no hipocampo, mas não no bulbo olfatório, o que demonstra um efeito diferenciado do EE em cada estrutura.

2.6. Discussão

Nossos resultados mostram que, ao se estudar a neurobiologia da memória social, é crucial que se escolha a linhagem adequada, bem como um protocolo comportamental de acordo com a pergunta a ser respondida. Por exemplo, se o objetivo for o estudo do componente de diferenciação da MS, é preciso usar protocolos que produzam um traço de memória observável em nível comportamental. Os protocolos testados aqui não foram eficientes em gerar comportamentos compatíveis com o esperado para estes paradigmas: sociabilidade e neofilia.

No teste realizado na caixa única, a sociabilidade foi observada, mas não a neofilia. Ou seja, os animais preferiram o juvenil ao objeto, mas não preferiram o juvenil novo em detrimento do juvenil familiar. Nos experimentos de Engelmann usam-se caixas com tamanho menor, como 14cm x 20cm x 15cm (ENGELMANN, 2009; RICHTER; WOLF; ENGELMANN, 2005a;

WANISCH; WOTJAK; ENGELMANN, 2008) ou 30cm x 23cm x36cm (LUKAS *et al.*, 2013). De igual maneira, os tempos de habituação reportados por Engelman podem durar duas horas. Aqui usamos uma caixa de 50cm x 30cm x 16cm e uma habituação de 30 minutos. Essas diferenças podem ter sido as responsáveis pela ausência de discriminação nos nossos resultados. Nessa perspectiva, a literatura revisada de discriminação social exhibe uma falta de informações que nós descobrimos serem crucias para a reprodução da tarefa no laboratório. Por exemplo, vários autores não especificam de forma adequada as dimensões dos aparatos usados (BIELSKY *et al.*, 2005; CHIANG *et al.*, 2018; JACOBS *et al.*, 2014; TATSUKAWA *et al.*, 2018), sendo que esse aspecto se apresentou de suma importância para a reprodução do modelo de discriminação na caixa grande (ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011).

Já no paradigma de discriminação social usando a caixa com três compartimentos, ambas a sociabilidade e a neofilia foram ausentes. Dos protocolos de discriminação este talvez seja o mais difícil de reproduzir. Por exemplo, Matthews e colaboradores (2016) usando esse protocolo não observaram sociabilidade nos animais controles que tinham um juvenil como estímulo, 10minutos de habituação e 10minutos de teste (MATTHEWS *et al.*, 2016). Estes autores não testaram a memória social. Aqui também usamos juvenis como estímulo, mas com 20minutos de habituação e 5 minutos de teste, e também não observamos sociabilidade. Outros autores já reportaram que o tempo de habituação e o controle de variáveis em tarefas de discriminação são crucias para reprodução dos experimentos (ENGELMANN; HÄDICKE; NOACK, 2011).

No que diz respeito à diferenciação, a maioria dos estudos não realiza o teste de memória 24h depois. Ou ainda, os que observam a MS de 24h usam como estímulo social animais adultos (JACOBS; TSIEN, 2012; SMITH *et al.*, 2016). De fato, a relevância do estímulo social deve ser levada em conta, pois os estímulos neutros podem ter assinaturas olfatórias mais tênues e, por isso, podem não gerar uma preferência social tão marcada como a que gerariam companheiros de ninhada, fêmeas, ou camundongos de outras linhagens (WINSLOW, 2003).

Nossos achados mostram diferenças na persistência das memórias de longa duração entre as linhagens de camundongos, o que resultou nos dois modelos apresentados na figura 2.16. A diferença entre essas linhagens pode ser atribuída à neurogênese basal delas ou a características da exploração social dos animais. Nessa perspectiva, existem evidências de que a taxa de neurogênese entre as linhagens influencia na aquisição da memória espacial (KEMPERMANN;

GAGE, 2002) e, dessa maneira, nossos resultados poderiam ser explicados por essas diferenças (KEMPERMANN; GAGE, 2002; NICOLA; FABEL; KEMPERMANN, 2015). Achados recentes sugerem que os níveis de DCX entre animais C57 e Swiss são diferentes (JAIMES *et al.*, 2020). Outros estudos compararam a memória social em várias linhagem de camundongos, porém unicamente avaliaram a LTM (24h) sem encontrar diferença entre o C57BL/6 e alguns híbridos (HÄDICKE; ENGELMANN, 2013). Efetivamente, na memória de 24 horas, nós também não observamos diferenças entre as linhagens, pois é em memórias mais remotas que as discrepâncias aparecem. De fato, não é incomum diferença entre linhagens. Por exemplo, camundongos C57BL/6 parecem ser mais resilientes e resistentes ao estresse em comparação com outras linhagens (POULTER, *et al.*, 2010; SAVIGNAC, *et al.* 2011).

Futuros estudos deverão explorar com mais profundidade as diferenças entre os dois modelos, pois no Swiss é experimentalmente mais simples reconhecer a participação dos neurônios novos por meio da formação de memórias persistentes que não existem naturalmente. Em outras palavras, a transiência natural da LTM do Swiss ajuda na operacionalização das perguntas referentes à neurogênese e persistência. Ao contrário, o modelo de C57BL/6 não apresenta essas facilidades, e as diversas manipulações no tempo de avaliação e na aquisição não esclareceram um ponto de transiência da MRS no C57BL/6. Entretanto, mostramos pela primeira vez que o aumento da neurogênese prévio ao aprendizado social não induz o esquecimento, mas pelo contrário, induz a um comportamento compatível com um melhor desempenho na tarefa. Estudos futuros são necessários para explorar os mecanismos envolvidos nos efeitos dos diferentes tratamentos sobre a memória (CAPÍTULO 3).

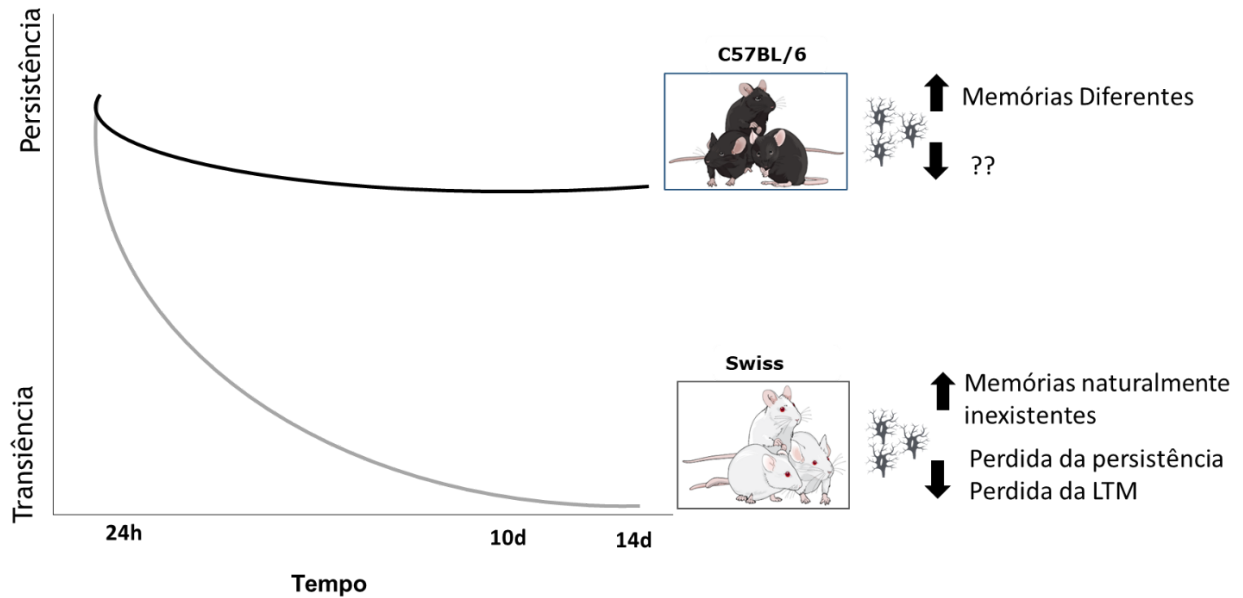


FIGURA 2.16. Representação esquemática dos modelos de estudo da memória social. A linha preta indica a memória persistente do camundongo C57BL/6 por até 14 dias. Nossos resultados evidenciaram que o aumento da neurogênese consegue produzir memórias diferentes, assim como a mudança de tempos da aquisição. A linha cinza representa o modelo de Swiss, que tem sido bastante caracterizado, pois apresenta uma memória de longa duração que é transiente, permitindo que as manipulações experimentais do aumento da neurogênese produzam memórias naturalmente inexistentes. Nosso trabalho mostrou que a tarefa em si mesma não influencia na sobrevivência de novos neurônios.

No presente estudo também testamos a hipótese de que, além do número de novos neurônios e de seu grau de amadurecimento, a sobrevivência de neurônios novos é um mecanismo envolvido nos efeitos do ambiente enriquecido sobre a persistência da MS. Outros estímulos como estresse, depressão, exercício físico e estimulação elétrica também podem modular a sobrevivência dos neurônios novos (CURLIK; SHORS, 2011; DIFEO; SHORS, 2017; OPENDAK; GOULD, 2015; SHORS, 2014; STONE *et al.*, 2011). Particularmente, o enriquecimento ambiental é um fator reconhecido por aumentar a sobrevivência em zonas neurogênicas, especificamente no hipocampo (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999, 2000; VAN PRAAG, 2008; ZHAO *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que o EE utilizado pelo nosso grupo é capaz de aumentar a sobrevivência de neurônios novos no hipocampo, corroborando estudos prévios.

Curiosamente, os efeitos da sobrevivência não se estenderam ao bulbo olfatório. Existem dois possíveis motivos pelos quais a sobrevivência não pareceu alterada nessa estrutura: a renovação do bulbo olfatório e os efeitos do enriquecimento no bulbo. Está estabelecido que as células do

bulbo olfatório são continuamente renovadas pela neurogênese adulta da zona subventricular do ventrículo lateral (LLEDO; VALLEY, 2016)(LLEDO; VALLEY, 2006; YOUNG *et al.*, 2007). Esse constante *turnover* no bulbo olfatório pode fazer com que o número de células novas varie ao longo do tempo. Nesse sentido, os efeitos na sobrevivência do ambiente enriquecido no bulbo são observáveis no período apoptótico desse novos neurônios que acontece entre os dias de 15 a 30 após a divisão celular(CARLETON *et al.*, 2003; PETREANU; ALVAREZ-BUYLLA, 2002) (PETREANU ; ALVAREZ-BUYLLA,2002; WINNER *et al.*, 2002; GIACHINO *et al.*, 2005; YAMAGUCHI ANDMORI, 2005). No nosso experimento, nós sacrificamos os animais 17 dias após as injeções com BrdU, o que pode dificultar a percepção de diferenças entre os grupos, pois é apenas o início desse período apoptótico. Outros estudos devem avaliar os efeitos em períodos mais prolongados para testarem se as nossas observações são dependentes do tempo ou de outros fatores, como a migração. Em referência a este último ponto, é conhecido que muitas das células migram para diferentes camadas do bulbo olfatório (LIM; ALVAREZ-BUYLLA, 2016), mas como as nossas contagens estiveram restritas à camada granular, não é possível saber se as diferenças eram visíveis em outras camadas.

Em segundo lugar, os efeitos do enriquecimento no bulbo não são unívocos. Previamente foi mostrado que o ambiente enriquecido pode causar aumento da neurogênese no hipocampo e não no bulbo olfatório (BROWN *et al.*, 2003). Nesse sentido, já foi demonstrado que os efeitos do EE no bulbo olfatório dependem da manutenção da novidade olfatória (VEYRAC *et al.*, 2009). O nosso ambiente enriquecido não prevê um enriquecimento olfatório, o que levanta a possibilidade de que a estimulação proposta não seja suficiente para promover diferenças no bulbo olfatório.

Devido ao fato de que o amadurecimento depende da sobrevivência dos neurônios, este processo pode ser um elemento chave na persistência das memórias (SHORS, 2014). Diversos estudos tem mostrado que o aprendizado parece aumentar a sobrevivência dos neurônios novos (CAHILL *et al.*, 2016; LEUNER *et al.*, 2004; MOURET *et al.*, 2008; OLARIU *et al.*, 2005; WADDELL; ANDERSON; SHORS, 2011). Nossos resultados mostraram que o aprendizado social não possui esse efeito, revelando que o treinamento da tarefa não afeta nenhuma das estruturas neurogênicas do processamento da memória social: hipocampo e bulbo olfatório.

Sabe-se que a integração dos novos neurônios depende da estimulação olfativa, ou seja, a experiência e sua consequente atividade dentro do circuito glomerular são os maiores determinantes (ALVAREZ-BUYLLA; GARCI, 2002; ROCHEFORT *et al.*, 2002). As características do estímulo podem influenciar na codificação e sendo que nosso estímulo é neutro, pode não ter sido suficiente para influenciar na sobrevivência. Dessa forma, estimulações mais complexas, como as de discriminação olfativa, têm conseguido influenciar na sobrevivência de novos neurônios (MEAS-YEDID *et al.*, 2006).

CAPÍTULO 3. EFEITOS DA NEUROGÊNESE NA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE MEDO

“O medo sempre me guiou para o que eu quero. E porque eu quero, temo. Muitas vezes foi o medo que me tomou pela mão e me levou. O medo me leva ao perigo. E tudo o que eu amo é arriscado.”

Clarice Lispector

3.1. A memória do medo e suas particularidades

Darwin propôs que as emoções são universais (DARWIN, 1987). Nesse sentido, não é de se estranhar que o medo esteja presente em todas as culturas (EKMAN, P.; DAVIDSON, 1994; EKMAN, PAUL, 1992; FREEDMAN *et al.*, 2013) e seja a emoção mais influente na história da humanidade (BOURKE, 2016). Porém, o medo não é uma aquisição evolutiva recente. Todos os organismos, independentemente de sua complexidade, têm a capacidade de detectar e responder a um estímulo significativo que seja ameaçador para sua sobrevivência (LEDOUX, 2012). Basicamente, pode definir-se o medo como um mecanismo de defesa em resposta a estímulos sensoriais iminentes que são perigosos, os quais promovem no organismo respostas comportamentais e fisiológicas de defesa com enorme valor para a sobrevivência (LEDOUX; PINE, 2016). Essas respostas podem ser congelamento (*Freezing*), lutar ou fugir para a segurança, sendo que particularmente em humanos, o medo está acompanhado por sentimentos afetivos de pavor e antecipação (SAH; SUN; GOOCH, 2020).

Existem medos inatos e medos condicionados, sendo que estes últimos são resultados da experiência. O medo condicionado, um tipo de aprendizado no qual um estímulo ou ação associa-se com o medo (DUDAI, 2002a), é uma memória emocional. Diferente de outras memórias, as memórias de medo têm paradigmas robustos para sua investigação. Por isso, dentre todos os paradigmas, a memória de medo condicionado é um dos mais utilizados (AKERS *et al.*, 2014; GUSKJOLEN *et al.*, 2018b; LEDOUX, 2003; LIU *et al.*, 2012, 2014; MAREN, 2001; MAREN; QUIRK, 2004; PAN *et al.*, 2020; QUINN *et al.*, 2008; ROY; KITAMURA; *et al.*, 2017b; SAH, 2017; SAHAY *et al.*, 2011; SUZUKI *et al.*, 2011).

De forma experimental, a memória de medo pode realizar-se pelo paradigma do condicionamento clássico desenvolvido por Pavlov. O condicionamento pavloviano tem sido adaptado a diversas espécies e sistemas de comportamento buscando entender os mecanismos subjacentes à memória

e ao medo (MAREN, 2001). Basicamente, um estímulo inicialmente neutro (contexto novo, som, cheiro, luz) pode adquirir uma relevância emocional (estímulo condicionado – CS) quando pareado temporalmente a um estímulo que elicia uma resposta comportamental (comida, sexo, agressão, choque; estímulo incondicionado - US). A partir dessa associação o CS pode produzir respostas condicionadas, ou seja, respostas autonômicas que originalmente eram produzidas pelo US (LEDOUX, 2012; MAREN, 2001; SAH; SUN; GOOCH, 2020). Operacionalmente é típico associar um choque nas patas (US), cuja resposta comportamental é a de congelamento (*freezing*), (LEE; MILTON; EVERITT, 2006) a um CS que pode variar desde os estímulos sensoriais mais básicos, como som e cheiro (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004; BALOGH *et al.*, 2002; FALLS; FOX; MACAULAY, 2010; FANSELOW; GALE, 2003; FANSELOW; LEDOUX, 1999; LANDEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2006; LEDOUX, 2003; STEIGER *et al.*, 2015) até tarefas recentes desenvolvidas em realidade virtual (contextos complexos) para humanos (BAAS *et al.*, 2004).

Uma das principais vantagens de usar os modelos de condicionamento ao medo é a de induzir a formação da memória após apenas uma sessão de aquisição (*one-trial learning*) (WEHNER; RADCLIFFE, 2004). Além disso, por ser bastante utilizado, existe uma descrição extensa dos circuitos neurais envolvidos na formação da memória de medo. Por exemplo, no condicionamento ao medo contextual, sabe-se que existe uma participação importante da amígdala, particularmente da basolateral e da central, e do córtex pré-frontal e hipocampo (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; BOUTON *et al.*, 2006; HARTLEY; PHELPS, 2010; LEE; MILTON; EVERITT, 2006; MAREN; QUIRK, 2004; MILLER; SAHAY, 2019; RESSLER; MAREN, 2019; SAH; SUN; GOOCH, 2020; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003; TERRANOVA; OGAWA; KITAMURA, 2019b; VANELZAKKER *et al.*, 2014). A amígdala e o córtex pré-frontal também são estruturas relevantes nos condicionamentos de pistas (*cued conditioning*) (CHAAYA, N. *et al.*, 2018; DO-MONTE *et al.*, 2015; JANAK; TYE, 2015; JOSSELYN, 2010; LEDOUX, JOSEPH, 2003; LIKHTIK; PAZ, 2019; MAREN, 2001; SAH, 2017; SAH; SUN; GOOCH, 2020; SHACKMAN; FOX, 2016). A principal diferença entre este último e o condicionamento ao medo contextual é que o contexto geralmente contém uma maior quantidade de pistas, muitas das quais podem ser difusas (BERGSTROM, 2016; PERUSINI; FANSELOW, 2015)

Ambos condicionamentos são muito utilizados dentro da pesquisa básica (WEHNER; RADCLIFFE, 2004), com a particularidade que o *cued conditioning* mais frequentemente usado é de natureza auditiva, ou seja, o CS é um tom específico (ABEL; LATTAL, 2001; CONTARINO et al., 2002; KOLKER et al., 2001). Entretanto, as pistas podem ser de diferentes naturezas. O aprendizado associativo olfativo, por exemplo, acontece inclusive em neonatos (PEDERSEN; WILLIAMS; BLASS, 1982; SEVELINGES *et al.*, 2007; SHIONOYA *et al.*, 2013; SULLIVAN *et al.*, 1991) e a participação da amígdala, córtex piriforme, bulbo olfatório e do córtex pré-frontal é fundamental no condicionamento aos odores (HEGOBURU *et al.*, 2014; MORICEAU *et al.*, 2006; SHIONOYA *et al.*, 2013).

É indiscutível o valor do condicionamento ao medo para o entendimento da memória como processo (JOSSELYN; TONEGAWA, 2020; KITAMURA *et al.*, 2017; LIU, XU; RAMIREZ; TONEGAWA, 2014; ROY; KITAMURA; *et al.*, 2017b; TONEGAWA; PIGNATELLI; *et al.*, 2015). Além disso, a pesquisa deste tipo de memória emocional tem sido vinculada com o entendimento de transtornos de ansiedade e de estresse pós-traumático (BAAS et al., 2004; CHAAYA; BATTLE; JOHNSON, 2018; DOLCOS et al., 2017; DYMOND et al., 2015; LIKHTIK; PAZ, 2019; MARKS; FRANKLIN; ZOELLNER, 2018; SAH, 2017; VANELZAKKER et al., 2014). Entretanto, a memória de medo é adaptativa e o fato de suas alterações estarem vinculadas com os transtornos de ansiedade não faz dos modelos de condicionamento tarefas para avaliação da ansiedade¹⁹ (PERUSINI; FANSELOW, 2015).

Porém, como todas as memórias, a memória de medo ajuda a dirigir nosso comportamento (LEDOUX; PINE, 2016). Nesse sentido, os comportamentos antecipatórios do estímulo aversivo podem ser similares a ansiedade, criando uma tensão entre a natureza adaptativa do condicionamento ao medo e a natureza disfuncional dos transtornos de ansiedade, por isso, o desenho de protocolos para o estudo de transtornos de ansiedade deve realizar-se dentro da teoria diátese-estresse (BECKERS et al., 2013), enquanto o estudo da memória deve realizar-se em protocolos de condicionamento que possuam um esquecimento fisiológico.

¹⁹ De acordo com Perusini e Fanselow (2015) a ansiedade está relacionada com o comportamento antecipatório dos animais, o que pode produzir, por exemplo, modificações na procura de comida ou cautela ao sair da guarida. Nesse sentido as alterações nos processos de antecipação do predador produziriam a base dos transtornos de ansiedade. A memória de medo estaria vinculada as reações pós-encontro do predador, onde não existe a iminência dele. Os dois processos fazem parte de um continuum de respostas defensivas ao perigo de acordo com a teoria da iminência do predador proposta pelos autores.

3.2. Neurogênese e memória de medo

Podemos observar dois resultados ao associar a manipulação dos níveis de neurogênese em paradigmas de memória de medo: retrógrados, ou seja, na modificação de memórias passadas. E anterógrados, que são os efeitos na formação das novas memórias (FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013a).

Os efeitos retrógrados da neurogênese dependem da manipulação de novos neurônios após a aquisição da memória de medo. Especificamente, o aumento da neurogênese apagou memórias já formadas nos paradigmas de condicionamento ao medo contextual e esquiva inibitória (AKERS et al., 2014; GAO et al., 2018; ISHIKAWA et al., 2016). Acredita-se que a neurogênese nestas condições promova a remodelação dos circuitos hipocâmpais, reduzindo a probabilidade de que a dica para evocação (contexto, por exemplo) reative um padrão previamente armazenado (FRANKLAND; KÖHLER; JOSSELYN, 2013a). Apesar de ainda pouco explorada, a indução do esquecimento pela neurogênese tem sido postulada como um mecanismo para a amnésia infantil (AKERS et al., 2014; CALLAGHAN; LI; RICHARDSON, 2014; JOSSELYN; FRANKLAND, 2012; MARTÍNEZ-CANABAL; LÓPEZ-OROPEZA; DURAN, 2019; RAMSARAN; SCHLICHTING; FRANKLAND, 2019)

É possível ainda falar de efeitos anterógrados. Nesse sentido, o aumento da neurogênese tem efeito promnésicos na memória de medo (AIMONE; DENG; GAGE, 2011; ANACKER; DENNY; HEN, 2015; BERDUGO-VEGA *et al.*, 2020; BISCHOFBERGER; SCHINDER, 2008; CAMERON; GLOVER, 2015; DALLA *et al.*, 2007; DREW; FUSI; HEN, 2013; EPP; SPRITZER; GALEA, 2007; GOODMAN *et al.*, 2010; HUCKLEBERRY *et al.*, 2018; MARÍN-BURGIN ; SCHINDER, 2012; MARRONE *et al.*, 2006). Além disso, abordagens de perda de função têm mostrado que a ablação da neurogênese por diferentes métodos prejudica a formação da memória de medo (DENG; AIMONE; GAGE, 2010; DENNY *et al.*, 2014; KO *et al.*, 2009; SAXE *et al.*, 2006; VUKOVIC *et al.*, 2013^a; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2018). Não obstante, os efeitos anterógrados não são lineares, e recentemente tem se demonstrado que o tipo de ablação ou indução da neurogênese, assim como o paradigma comportamental, podem ser relevantes na hora de avaliar os efeitos anterógrados (ISHIKAWA et al., 2016; LAZAROV; HOLLANDS, 2016b). Isso porque a forma como a manipulação da neurogênese é feita pode gerar proporções diferentes de células, além de afetar a sobrevivência e o grau de

amadurecimento dos novos neurônios (JAIMES et al., 2020). De fato, o estado de amadurecimento e a idade do neurônio novo vão determinar a sua excitabilidade e a sua relevância dentro do circuito (SNYDER, 2019).

Uma outra proposta para a função de novos neurônios na memória de medo é a de que eles favoreçam a consolidação sistêmica, ao facilitarem a gênese de *Sharp Wave Ripples*, que acredita-se que comuniquem o hipocampo com o córtex pré-frontal (TERRANOVA; OGAWA; KITAMURA, 2019b). Complementando essa ideia, memórias de medo remotas, ou seja mais antigas, são resistentes aos efeitos retrógrados do esquecimento produzido por novos neurônios (GAO et al., 2018). Basicamente, a neurogênese facilitaria a codificação da memória, ajudando no *pattern separation* e diminuindo a interferência, e, do mesmo modo, provocaria um “amadurecimento” do engrama no processo de consolidação (ANACKER; DENNY; HEN, 2015; TERRANOVA; OGAWA; KITAMURA, 2019a).

A maioria dos achados em memória de medo estão restritos à memória de medo condicionado ao contexto. Apesar disso, alguns estudos já mostram que esses efeitos retrógrados podem ser diferentes dependendo do paradigma comportamental, sendo que memórias contextuais, por serem hipocampo dependentes, são mais sensíveis ao esquecimento produzido pela indução da neurogênese do que aquelas mais dependentes da amígdala, como o *cued conditioning* (ISHIKAWA et al., 2016). A ablação neurogênica parece não afetar o condicionamento auditivo, apesar de produzir déficit da memória contextual (ALAM et al., 2018). Levando em conta todas estas evidências, nós nos perguntamos: quais seriam os efeitos anterógrados de 3 tratamentos distintos de aumento da neurogênese em 3 modelos diferentes de condicionamento ao medo?

3.3. Objetivos

3.3.1 Geral

Avaliar se os efeitos promnésicos do aumento da neurogênese ocorrem em diferentes memórias de condicionamento ao medo.

3.3.2 Específicos

- Avaliar os mecanismos de ação de 3 tratamentos conhecidos por aumentar a neurogênese.
- Estabelecer protocolos de memória de medo condicionada ao som, contexto e cheiro que durem 24h e que sejam transientes 10 dias após o treino;

- Avaliar os efeitos do aumento da neurogênese sobre memórias de medo condicionada ao som, contexto e cheiro que naturalmente são esquecidas 10 dias após o treino;
- Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre o comportamento durante o processamento de estímulos sonoros, contextuais e olfativos;
- Avaliar os efeitos agudos e crônicos produzidos pela memantina e o andrografolide na energia em CA1 e no giro dentado

3.4. Materiais e Métodos

3.4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com oito semanas de idade comprados no Biotério Central da UFMG. Foram mantidas as condições descritas no item animais do capítulo 2. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) sob o protocolo nº 46/2017 e nº245/2018.

Adicionalmente, foram usados animais transgênicos Nestina-GFP de background C57BL/6. Estes animais são uma construção genética para a expressão de Nestina associada a proteína fluorescente verde (MIGNONE *et al.*, 2004). A Nestina é uma proteína de filamento intermediário, encontrada nas células-tronco neuroepiteliais e que está envolvida na geração de neurônios e glias (LEND AHL *et al.*, 1990). A Nestina é considerada um marcador para células tronco (BIRBRAIR *et al.*, 2011; MIGNONE *et al.*, 2004). Estes animais foram gentilmente fornecidos pelo Professor Alexander Birbrair e mantidos no biotério para animais transgênicos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do ICB.

3.4.2. Condições de Alojamento (Ver capítulo 2, item 2.4.2 - Condições de Alojamento)

3.4.3. Condicionamento ao Medo Contextual

Os animais foram divididos em dois grupos: não condicionado (US-) e condicionado (1US). Todos os animais foram expostos à caixa de condicionamento (AMARAL-JÚNIOR *et al.*, 2019) que possui um assoalho acoplado ao estimulador elétrico. A caixa de condicionamento fica localizada no interior de uma caixa de isolamento acústico (530 x 650 x 500mm), juntamente com uma câmera adaptada para registrar o comportamento dos animais na caixa. O contexto consistia em 3 paredes listradas e uma preta. A caixa foi higienizada com álcool 70%. O

protocolo de condicionamento ao medo consiste em duas fases: treino e teste. Durante o treino os animais não condicionados (US) permaneceram por 120 minutos na caixa. Os animais condicionados permaneceram na caixa por 120s de habituação e, logo após, receberam 2s de choque nas patas (0.7mA) e, 30 segundos depois, foram tirados do aparato e retornaram para a gaiola. No teste, os animais foram colocados no mesmo contexto durante 5 minutos e foi quantificada a porcentagem de *freezing*, como previamente descrito por PEREIRA *et al.* (2019). Na figura 3.1. pode observar-se o desenho usado para o desenvolvimento desse protocolo. Para o contexto B da generalização foi usado contexto distinto (caixa de diferente formato, com luz vermelha, chão de textura diferente, paredes lisas e higienização com ácido acético 1%).

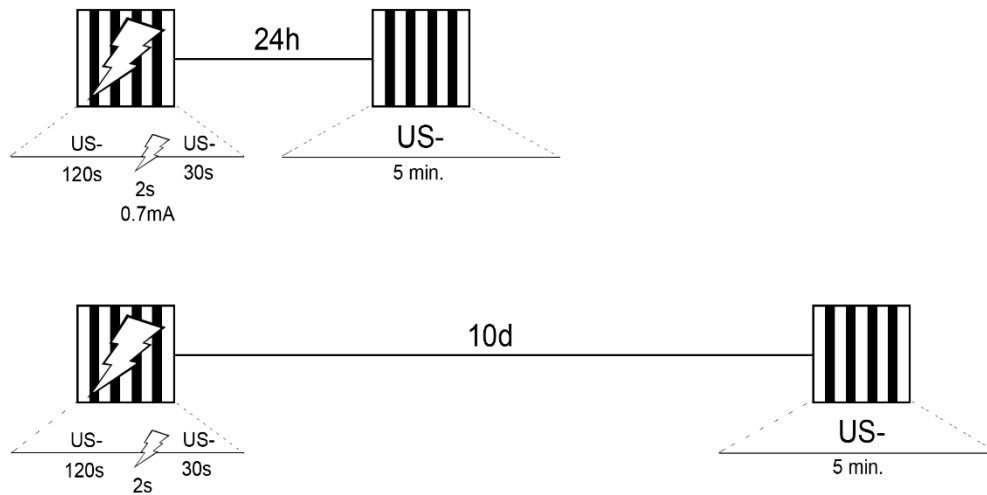


FIGURA 3.1. Esquema do protocolo de condicionamento ao contexto.

3.4.4. Condicionamento ao Som

Os procedimentos foram realizados na mesma caixa do condicionamento ao contexto e o protocolo também consistiu em uma sessão de treino e uma sessão de teste realizadas em dois dias diferentes (Figura 3.2.). No primeiro dia, as paredes da caixa foram transparentes e o álcool 70% foi utilizado como higienizador (contexto A). O assoalho foi mantido como o original da caixa de condicionamento, composto por barras cilíndricas dispostas paralelamente, por onde a corrente elétrica é conduzida. Neste dia, o protocolo seguiu as seguintes etapas: 120s de habituação inicial, seguidos por 30s de exposição ao som de 1KHz (CS) e, nos últimos 2s de apresentação do som, este foi pareado a um choque de 0.17mA (US) (Figura 3.2). Em seguida, o animal permaneceu na caixa por 30s (período pós-pareamento) e posteriormente retornou para

sua gaiola. A sessão de teste foi realizada 24h ou 10 dias após o treino para cada grupo, em um contexto distinto (chão de textura diferente, paredes listradas, higienização com ácido acético 1%). Nenhum animal foi reexposto a caixa ou ao som além do dia do teste para o qual foi designado (Figura 3.2.).

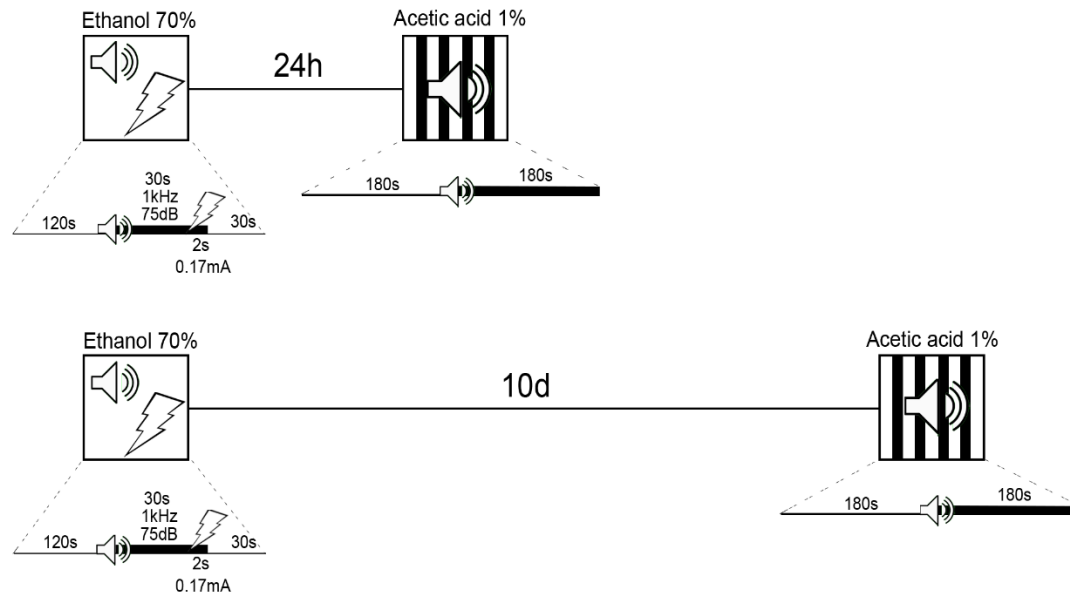


FIGURA 3.2. Esquema do protocolo de condicionamento ao som.

3.4.4. Condicionamento Olfativo

Inicialmente, os animais foram ambientados em uma sala específica por, no mínimo, 20 minutos. A tarefa foi realizada na caixa de Skinner (dimensões de 390 x 470 x 320mm) equipada com um assoalho acoplado a um estimulador elétrico, um olfatômetro personalizado na região lateral superior e um sistema de filmagem no topo (Insight[®], Brasil). O protocolo de treino foi realizado com as seguintes etapas: 120s de habituação inicial, seguidos por 20s de exposição ao odor de *peppermint* na concentração de 2:10 (CS) e, nos últimos 2s, o odor foi pareado a um choque de 0,7mA (US). Este procedimento foi repetido por 6 vezes com intervalos de 3 minutos. Em seguida, o animal permaneceu na caixa por mais 30s e logo após retornou para a sua gaiola. O comportamento de *freezing* foi analisado por 25s antes do CS (CS-, pré Odor) e durante o CS (CS+ Odor, 20s) (Figura 3.3.). Os treinos foram realizados em um contexto de paredes claras, com uma luz LED acesa numa das paredes (270 LUX) e com o fundo da caixa limpo com álcool. O teste foi realizado 24h e 10 dias depois num contexto diferente com paredes listradas, menor luminosidade (180 LUX) e padrão de chão diferente.

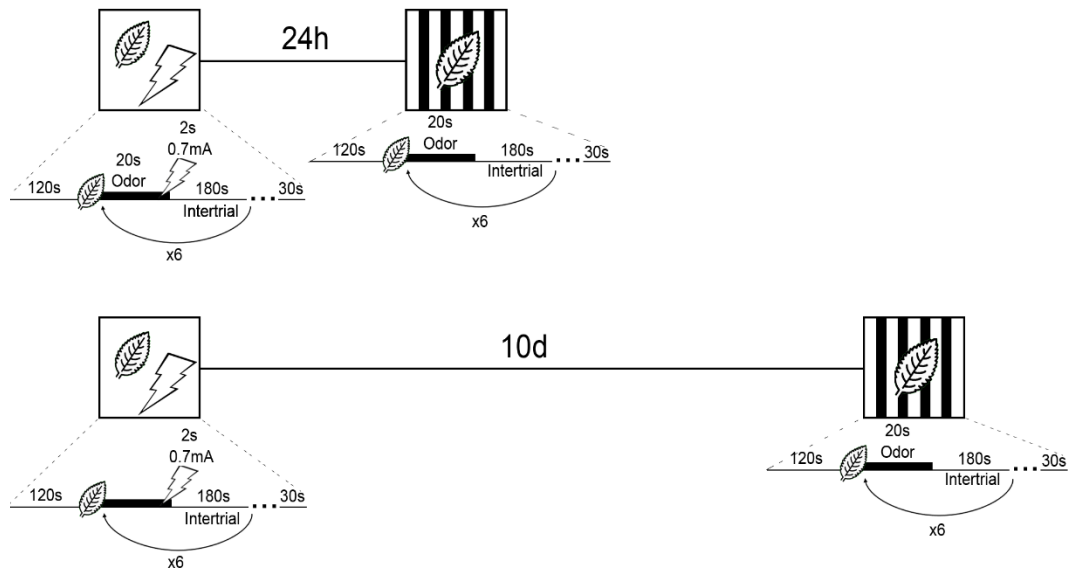


FIGURA 3.3. Esquema do protocolo de condicionamento ao olfato.

3.4.5 Análises dos treinos e da reação ao choque

Em todos os modelos utilizados durante o treino existe um pareamento entre o choque e uma pista unimodal (condicionamento por pistas) ou polimodal (contexto). Assim, durante a sessão de treino, também foi avaliada a reação dos animais ao choque.

Vários fatores podem afetar como o animal percebe o choque, dentre eles estão condições emocionais e diferenças na sensibilidade periférica ou percepção central. Desta forma, a formação da associação choque-pista ou choque-contexto pode ser afetada. A intensidade do choque é uma variável que está relacionada com a quantidade de *freezing* e com a persistência da memória (BALDI; LORENZINI; BUCHERELLI, 2004), sendo que choques mais fortes ou percebidos como mais intensos vão gerar traços de memórias duradouros. Neste estudo, pretendeu-se verificar se a reação ao choque foi alterada pelo tratamento farmacológico, visto que este foi realizado antes do pareamento. A reação observada após a passagem da corrente por um período de 2s foi classificada de acordo com o score apresentado na Tabela 1 (NIELSEN; CRNIC, 2002). No caso do condicionamento olfativo, como foram usados 6 ciclos com choque, foi feita uma média do *score* da reação ao choque. Adicionalmente como o cheiro era apresentado em cada ciclo se quantificou a reação ao choque e a quantidade de *freezing* para gerar a curva de aprendizado.

Score	Comportamento	Descrição
0	Ausência de resposta	Atividade normal sem qualquer reação perceptível.
1	Recuo	Mudança abrupta na postura corporal com pelo menos três patas no assoalho, permanecendo no mesmo local.
2	Sobressalto	Pequeno movimento horizontal para frente ou para trás (menos da metade do comprimento da câmara) ou pequeno movimento vertical (menor que a altura do corpo) com pelo menos duas patas restantes no chão.
3	Corrida	Movimento horizontal para a frente (maior que a metade da câmara) com pelo menos duas patas na grade ou movimento coordenado exagerado de patas.
4	Salto horizontal	Movimento horizontal (maior que a metade da câmara) com todas as quatro patas fora da grade em um movimento de mola e altura do corpo ou superior.
5	Salto vertical	Movimento vertical (maior que a altura do corpo) com todas as quatro patas fora do assoalho. O salto vertical foi distinguido do 'sobressalto' (2) pela velocidade e elevação da resposta e do 'salto horizontal' pela elevação vertical.

TABELA 1. Score de reação ao choque

3.4.5. Administração de Drogas

3.4.5.1. Administração de BrdU

Os animais receberam 6 injeções intraperitoneais de BrdU (Sigma®) 24 horas após o início da administração dos tratamentos. O BrdU (4O 5-bromo-2'-deoxiuridina) diluído em solução de NaCl 0,9%), na dose de 75 mg/kg (Ver capítulo 2) é um análogo da timidina e incorpora-se ao DNA das células durante a fase-S da mitose (fase de autoduplicação do DNA).

3.4.6. Métodos para o aumento da neurogênese

O aumento da neurogênese foi feito conforme descrito no capítulo 2. Foram usados 3 métodos para a indução do aumento da neurogênese: Andrografolide (AND), Memantina (MEM) e ambiente enriquecido (EE). A única diferença deste protocolo é que foi injetada outra MEM (cloridrato de memantina 10mg; Eurofarma®, Brasil) em uma dose única de 25 mg/kg i.p.

3.4.7. Registro eletrofisiológico de potencial de campo (*Local Field Potential, LFP*)

Potenciais de campo local (LFP) são sinais elétricos transientes gerados no tecido nervoso e representam o somatório da atividade elétrica excitatória e inibitória celular. Esta atividade reflete um fluxo dinâmico da informação de múltiplas redes neurais localizadas em torno dos eletrodos de registro (HERRERAS, 2016; SHAROTT, 2020).

Na presente pesquisa realizamos registros de LFP através de uma matriz de eletrodos customizada no NNC (Figura 3.4.A), que consiste em uma placa de circuito impresso com 16 canais de registro (VEGA, 2020). A confecção das matrizes foi realizada com fios de tungstênio ($50\ \mu\text{m}$ de diâmetro) que formavam um arranjo de 10+6 eletrodos dispostos paralelamente e com distância de $100\ \mu\text{m}$ de ponta a ponta. Essa arquitetura possibilitou o registro de todas as camadas do hipocampo, sendo que 10 eletrodos abrangiam desde o giro dentado (DG) até CA1 e outros 6 eletrodos de CA3 a CA2. Contudo, o foco inicial será dado para os registros no DG e em CA1. Estas regiões foram escolhidas por constituírem as vias de entrada e saída do circuito trissináptico hipocampal, uma vez que as projeções do córtex entorrinal chegam ao DG pela via perfurante, conectando-se com os neurônios granulares que projetam suas fibras musgosas para os neurônios piramidais de CA3. Finalmente, esses neurônios em CA3 projetam seus axônios (fibras colaterais de Schaffer) para o CA1, fechando assim o circuito (ANDERSEN et al., 2007; EDITORS, 2017). Foi de especial interesse o DG, pois a neurogênese ocorre nesta região. Para garantir valores de impedância adequados, as pontas de cada eletrodo foram eletrodepositadas com ouro em um circuito de eletrodeposição construído por nossa equipe.

Os animais foram anestesiados por uma mistura de oxigênio e isoflurano 3% (1ml/ml) através de um sistema de anestesia gasosa, desenvolvido pelo NNC e acoplado ao estereotáxico. Na ausência de respostas reflexas, a região da cabeça foi tricotomizada e higienizada com iodopovidona (PVPI 10%) e, a seguir, o perióstio foi removido para que então se alcançasse a visualização exata das suturas cranianas, bregma e lambda, que por sua vez serviram de referência para a implantação dos eletrodos e parafusos de fixação. O bregma foi utilizado como a referência e as coordenadas utilizadas foram, AP: -2.0; LL: +1.0 e AP: -2.0; LL: +2.0 (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Após realização de uma pequena abertura no crânio, a matriz foi cuidadosamente posicionada de forma vertical (Figura 3.4.B).

Foram realizadas 10 cirurgias, mas um animal foi descartado por problemas técnicos durante o registro. Todas as cirurgias foram confirmadas pela análise histológica do posicionamento dos eletrodos. Para a histologia os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) i.p., e perfundidos com uma solução tampão fosfato salina (PBS) 0,01M, seguido por paraformaldeído (PFA) a 4%. Os cérebros foram removidos e colocados em PFA 4% por um período de 24h, seguido de armazenamento em solução de sacarose 30% para posterior secção em criostato com espessura de 50 μm

As fatias foram montadas e distribuídas em lâminas gelatinizadas. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas na solução de vermelho neutro (10 minutos), água destilada (45s), etanol 70% (45s), etanol 80% (45s), etanol 90% (45s) e, por fim, em xilol 100% (45s; ver Figura 3.4.F).

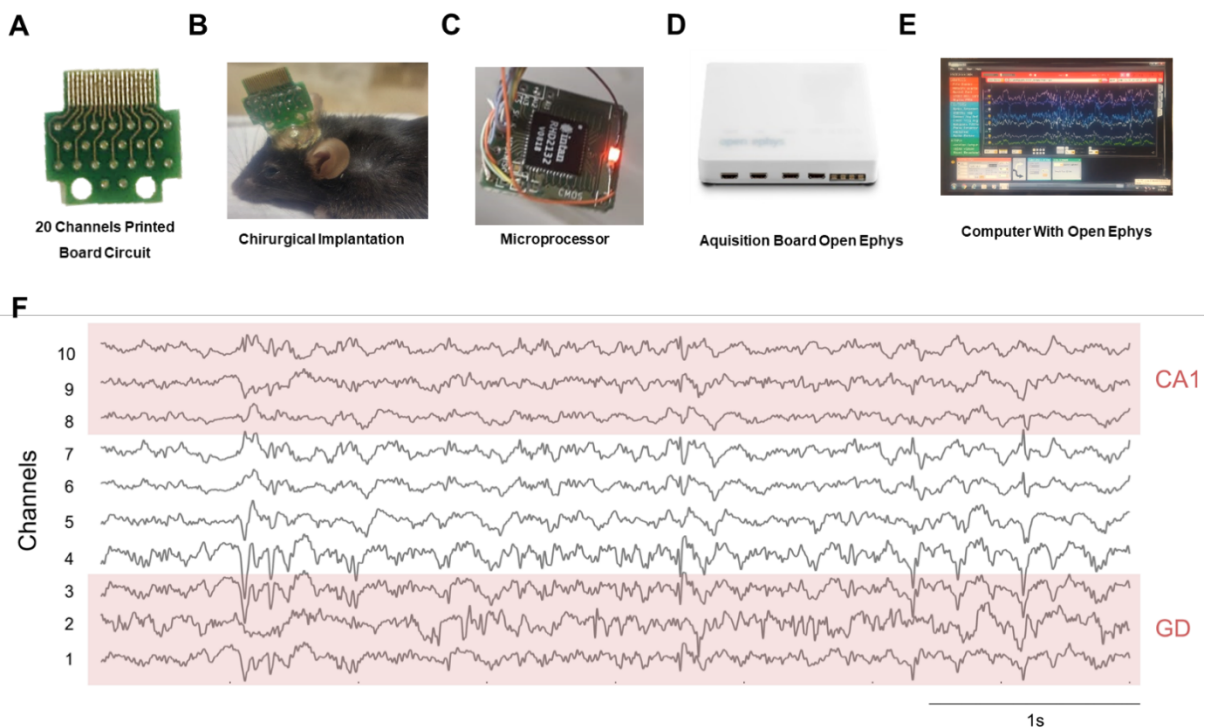


FIGURA 3.4. Registro de LFP. (A) Imagem ilustrativa de uma placa de circuito impresso. (B) Imagem representativa de um animal após a cirurgia, onde é possível observar a matriz implantada. (C) Imagem do microprocessador Intan RHD2132 em um *headstage* desenvolvido pelo NNC. (D) Placa de aquisição *Open Ephys*. (E) Imagem do software de registro. (F) Imagem representativa de um registro com os 10 eletrodos dispostos do DG até CA1.

3.4.7.2. Sistema de registro e análise eletrofisiológica:

Os registros foram realizados com uma frequência de amostragem de 30kHz, pré-amplificados e digitalmente filtrados (filtro passa-alto de 0.5 Hz e filtro passa-baixo de 7000 Hz). Foram realizadas 3 diferentes sessões: 1) Registro basal da atividade espontânea durante a exploração do contexto por 30 min; 2) Registro após os respectivos tratamentos durante 50 minutos. 3) Registros da atividade por 60 minutos após sete dias do tratamento (ver Figura 3.5.). O Registro foi feito numa arena com maravalha (40cm x 33cm x 16cm) e toda a atividade foi filmada por uma câmera disposta acima da arena (Figura 3.4.B-C).

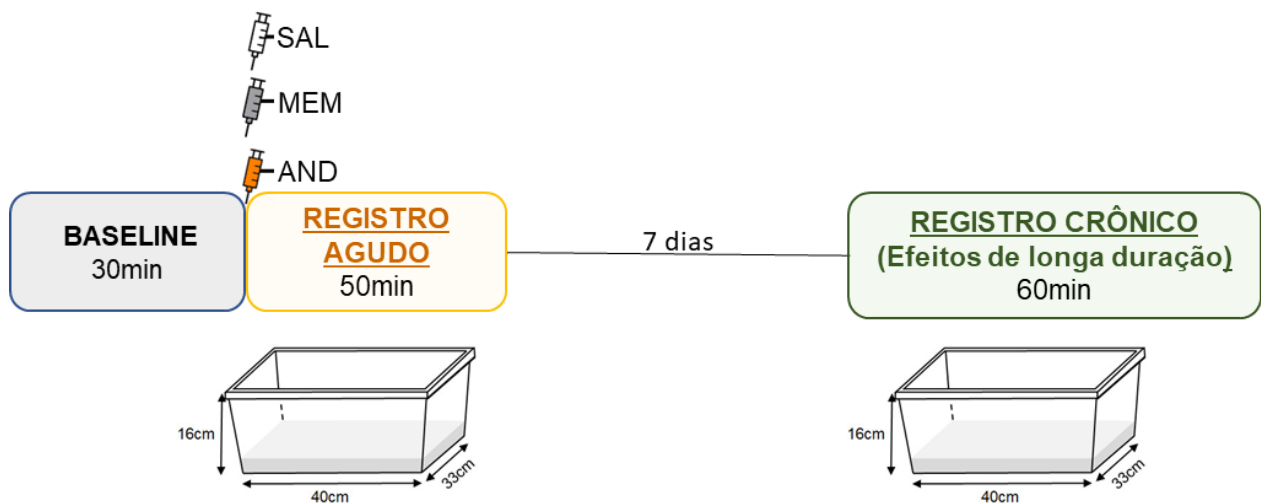


FIGURA 3.5. Esquema representativo do protocolo de registro. Ilustra-se os 30 minutos iniciais, nos quais o animal é habituado à arena e é realizado o registro da atividade basal. Após esse período, os animais eram retirados e tratados com as respectivas drogas. Uma vez que a droga era administrada, o animal foi reposicionado para a segunda etapa do registro. Sete dias depois realizou-se novamente o registro da atividade basal durante a exploração no mesmo contexto.

A gravação da exploração do animal (30 frames/s) foi associada a um *software* de análise comportamental, Bonsai (<https://open-ephys.org/bonsai>), utilizado para sincronizar o vídeo ao registro eletrofisiológico. Através da saída serial do computador, o *software* se comunicava com um arduíno (UNO) e, através de uma rotina customizada, a cada 10 frames do vídeo gerava-se um pulso TTL que era enviado e registrado pela placa de aquisição de sinais, garantindo assim o pareamento entre o comportamento exploratório do animal ao sinal eletrofisiológico.

Os dados eletrofisiológicos foram analisados *offline* com códigos em linguagem MATLAB personalizados e adaptados a partir de funções prontas (MATLAB R2017a. EEG lab toolbox - <https://sccn.ucsd.edu/eeglab/index.php>). A potência tempo-frequência das bandas de

interesse (*slow* Gamma: 30-58 Hz, *fast* Gamma: 62-100 Hz e Theta 4-10) foram calculadas pela função espectrograma (transformada rápida de Fourier - STFT; janela Hamming de 45.000 pontos, com 50% de sobreposição) ao longo do período experimental e normalizadas pelo período basal.

3.4.8. Marcação da neurogênese, obtenção dos tecidos e imunofluorescência

3.4.8.1. Nestina GFP

Os cérebros dos camundongos transgênicos para Nestina GFP foram perfundidos com 10 ml de tampão fosfato e salina 10% (PBS 10%: Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, pH 7,4) e 10ml de PFA 2% m/v. O processamento dos tecidos consistiu em uma fixação por 4 horas no PFA 2% seguida de uma desidratação dos tecidos numa solução de sacarose a 30% por 48 horas. Os tecidos foram fatiados com uma espessura de 40 μ m e montados em uma lâmina, as quais foram cobertas com meio de montagem (HydromountTM).

3.4.8.2. Imunofluorescência BrdU/DCX/DAPI

Como previamente descrito no capítulo 2, o BrdU pode ser usado como um marcador de proliferação. Já entre os marcadores de proteínas intrínsecas expressas se destaca a DCX, uma proteína de microtúbulos expressa em neurônios pós mitóticos, frequentemente associada com a diferenciação e migração neuronal (PLÜMPE *et al.*, 2006; VUKOVIC *et al.*, 2013). A expressão de DCX é considerada exclusivamente neuronal (RAO; SHETTY, 2004; STEINER *et al.*, 2004). Em adição, alguns estudos mostram que as células DCX positivas expressam TuJ1 (antígeno de células proliferativas neurais) e NeuN (*Neuronal Nuclei*) (RAO; SHETTY, 2004), sendo que este último é um marcador de neurônios maduros em vertebrados (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992). Esta imunofluorescência foi realizada com o objetivo de caracterizar a neurogênese que foi produzida por nossos tratamentos, sendo que a colocalização do BrdU/DCX se refere aos neurônios que se dividiram durante os 6 dias das injeções.

Para tal, foram selecionadas 10 fatias do bulbo olfatório, 4 fatias do hipocampo dorsal e 4 do hipocampo ventral de cada cérebro de animais anestesiados com xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg). Os camundongos que tiveram o cérebro coletado foram perfundidos com 10 ml de tampão fosfato e salina 10% (PBS 10%: Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM, pH 7,4) e 10ml de PFA 4% m/v. O processamento dos tecidos consistiu em uma fixação

por 24 horas no PFA 4%, seguida de uma desidratação dos tecidos numa solução de sacarose a 30%. Os cérebros permaneceram na solução de sacarose até o momento de serem fatiados no criostato. Fatias de 40µm, contendo o bulbo olfatório e o hipocampo foram obtidas e armazenadas em solução crioprotetora (sacarose 30% m/v, polivinilpirrolidona 1% m/v, PBS 10% e etileno glicol 30% v/v).

As fatias foram lavadas 6 vezes por 6 minutos em PBS (0,1M pH 7,4) seguidas por 3 lavagens de 6 minutos em PBS-T (PBS 0,1M + Triton-X 0,3% v/v). Posteriormente, o tecido foi lavado 3 vezes por 6 minutos em NaCl 0,9% m/v e incubados seguidamente em HCl 3M por 10 minutos e HCl 2M por 30 minutos. Em seguida, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em tampão citrato (0.1 M) a 70°C e 3 vezes por 5 minutos em PBS-T. Após essas lavagens as fatias tiveram seus sítios imunorreativos inespecíficos bloqueados pelo soro normal de cabra (NGS – *normal goat serum*) diluído a 5% em PBS-T, por 1 hora. Em seguida, as fatias foram incubadas por 72 horas no anticorpo primário anti-BrdU, produzido em rato (IgG de rato anti-BrdU – monoclonal Abcam®), na proporção de 1:400 v/v e no anticorpo primário anti-DCX, produzido em camundongo (1:200 IgG de coelho anti-DCX policlonal Santa Cruz®), diluído em PBS-T + NGS 5% e em agitação constante a 4°C. Ao fim do período de incubação do anticorpo primário, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos com PBS 10%. Logo após, foram adicionados os anticorpos secundários anti-IgG de rato associado ao composto AlexaFluor 647 (1:400 v/v, Abcam®), para a detecção do anticorpo primário anti-BrdU, e o anti-IgG de coelho associado ao composto AlexaFluor 488 (1:400 v/v, Molecular Probes®), para detecção do anticorpo primário anti-NeuN. A incubação foi feita por 2 horas no escuro. Após esse tempo, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em PBS. Em seguida, foram submersas em água destilada e incubadas com em CuSO₄ 1mM em acetato de amônio (pH 5.0) por 1h, seguido por outra imersão em água destilada. Posteriormente, as fatias foram lavadas 3 vezes por 6 minutos em PBS e incubadas com DAPI (1:2500) por 6 minutos. Por fim as fatias foram lavadas uma vez em PBS por 6 minutos, montadas em lâminas carregadas (Superfrost Plus®) e foram cobertas com meio de montagem (Hydromount™).

3.4.9. Microscopia

As fatias foram fotografadas com a objetiva de 40x do microscópio de fluorescência (Axio Imager M2-Zeiss system). Foi fotografado o hipocampo unicamente em sua camada granular e subgranular. Cada uma das regiões da imunofluorescência para BrdU/DCX/DAPI foi fotografada

utilizando a série Z, que consiste em se fazer uma série de fotografias a partir do foco superior da fatia até o foco inferior a intervalos regulares, sendo que foi utilizado uma série 7-14 fotografias de 1µm. Utilizamos também dois filtros diferentes, um de excitação 450-530 nm/emissão 500-610 nm para o AlexaFluor 488, associado ao anticorpo anti-DCX, e o outro de excitação 590-680 nm/emissão 630-800 nm para o AlexaFluor 647, associado ao anticorpo anti-BrdU. O tempo de exposição para cada filtro foi determinado com base no histograma de saturação de pixels, utilizando o máximo possível de pixels abaixo do limite de saturação, sendo que todos os valores da fotografia estiveram no mesmo intervalo e foram plotados numa tabela durante a realização das fotos.

Para a fotografia dos tecidos dos animais transgênicos Nestina-GFP o procedimento foi similar, usando uma série Z entre 6-15 de 1µm para HD e HV. Todas as fotografias foram feitas na excitação 450-530 nm/emissão 500-610 nm para a excitação do GFP.

3.4.10. Quantificação

Todas as quantificações foram realizadas com o software FIJI (ver capítulo 2). Particularmente nas análises da imunofluorescência, as imagens da marcação das células BrdU/DCX/DAPI positivas foram submetidas à ferramenta Z Project, que realiza uma projeção de todas as imagens da série Z em uma única imagem, como previamente descrito (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017). Escolhemos as 7 melhores fotografias contínuas da série Z e selecionamos a projeção média (*Mean*) para o filtro BrdU e DAPI e a projeção mediana (*Median*) para o DCX. Cada uma das imagens foi tratada com a ferramenta de subtração de background e posteriormente foram montadas uma única imagem a partir da fusão de todas as imagens (*Merge channels*).

Para a determinação e seleção da área de interesse (camada granular e subgranular do giro dentado) foi usado o filtro de DAPI. O número de células BrdU e DCX foi contado manualmente nas imagens projetadas manipulando a aparição dos canais. Foram consideradas células positivas aquelas que apresentavam marcação bem definida como previamente descrito (PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017). A contagem foi feita no aumento de 200% da imagem original com o *plugin cell counter*. Usando a ferramenta *channel tools*, que permite a manipulação da imagem criada com a fusão dos canais, primeiro foram contabilizadas as células BrdU/DAPI e logo as células DCX positivas. Foi considerado como dupla marcação as células que tinham sido previamente marcadas em cada canal com o *cell counter*.

Todas as contagens foram normalizadas pela área da região de interesse. Assim, foram obtidos os parâmetros de proliferação celular (número de células BrdU positivas/mm²) e neurogênese (número de células BrdU positivas + DCX positivas/mm²). Foi obtido ainda a taxa de neurogênese (número de células BrdU positivas + DCX positivas / número de células BrdU positivas), sendo que este cálculo permite inferir o percentual das células novas produzidas, BrdU/DAPI positivas, que proliferaram e sobreviveram (durante os 6 dias de injeção de BrdU) e efetivamente diferenciaram-se em neurônios ao expressar DCX (para mais informações sobre a expressão da proteína DCX, ver capítulo 2).

Para análise das imagens dos animais transgênicos Nestina-GFP foi realizada a subtração de background e logo foram usadas as ferramentas *threshold* e *analyze particles* (ver capítulo 2). O *threshold* usado foi adequado para a marcação e por isso foi escolhida a opção de *moments* entre as opções automáticas (para mais informação https://imagej.net/Auto_Threshold.html#Moments). Com o estabelecimento das imagens binárias pelos *thresholds* realizamos uma contagem automática das células positivamente marcadas para Nestina. Todas as contagens foram normalizadas pela área da região de interesse.

3.4.11. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. As comparações da análise de variância de uma via (*One way ANOVA*) foram usadas para a caracterização da neurogênese produzida pelos tratamentos, para a análise da reação ao choque e para os resultados do condicionamento ao medo contextual. Depois do *one way ANOVA* foi usado *pos hoc* Bonferroni.

As diferenças entre os grupos nos experimentos de comportamento para tarefas de medo condicionado baseado em pistas (Condicionamento ao medo ao cheiro e ao som) foram avaliadas pela *Two way ANOVA* para medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni. Esta mesma análise foi utilizada para a avaliação dos dados da eletrofisiologia, usando também o mesmo *pos hoc*. Todas as análises foram feitas utilizando o *software* Prism 8.0.

3.5. Resultados

3.5.1. Memantina (MEM), andrographolide (AND) e ambiente enriquecido (EE) não alteram nicho neurogênico no hipocampo

Para caracterizar o nicho neurogênico²⁰ hipocampal após cada um dos tratamentos (EE, AND, MEM) quantificamos o número de células que expressam Nestina (KOZAREVA; CRYAN; NOLAN, 2019) em camundongos Nestina-GFP (Figura 3.6 A). A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa no número de células Nestina positivas do HD [$F_{(3,9)}=0.3$; $p=0.761$] (Figura 3.6 B e D), e do HV [$F_{(3,9)}=0.3$; $p=0.7848$] (Figura 3.6 C e E), sugerindo que as células tronco e progenitoras não foram alteradas pelos nossos tratamentos.

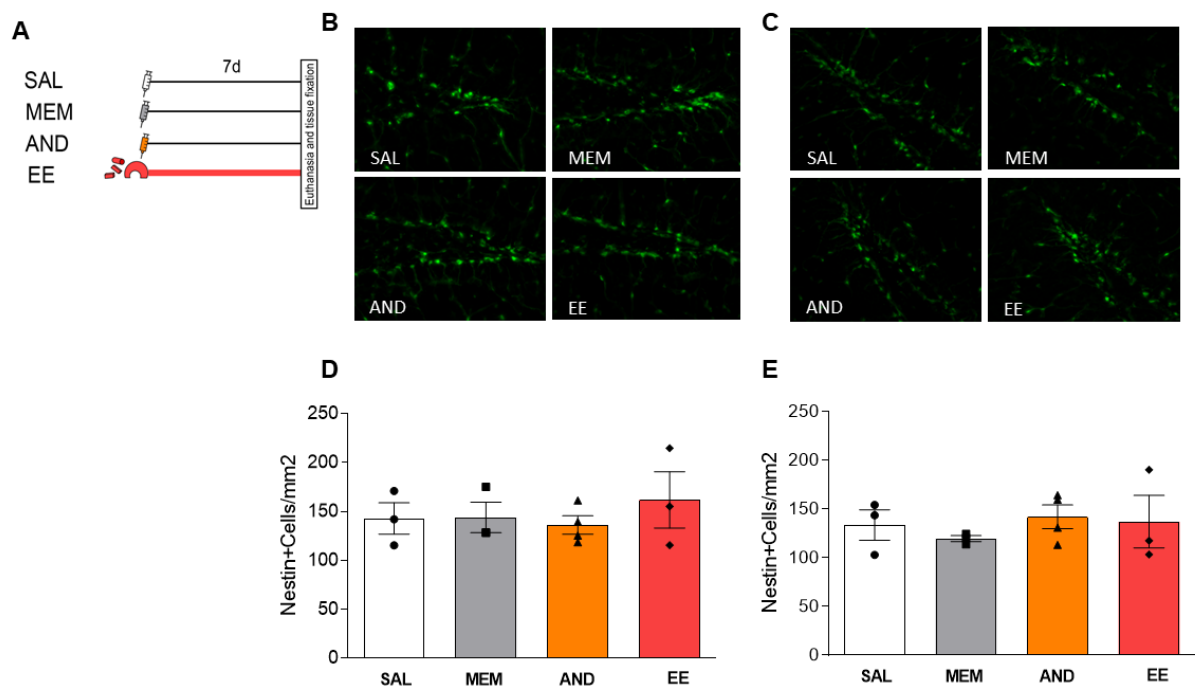


FIGURA 3.6. Efeitos dos tratamentos nas células Nestina positivas no hipocampo. (A) Desenho experimental. **(B)** Imagens representativas do HD de animais transgênicos Nestina-GFP. **(C)** Imagens representativas do HV de animais transgênicos Nestina-GFP. **(D)** Efeitos dos tratamentos nas células Nestina positivas no HD. **(E)** Efeitos dos tratamentos nas células Nestina positivas no HV. Análise ANOVA de uma via. $n=3-4$, $p<0,05$.

A seguir, avaliamos o efeito dos tratamentos (MEM, AND e EE) na proliferação e na neurogênese. Foram feitas injeções diárias de BrdU por 7 dias, para marcar as células que se dividiram ao longo dos tratamentos (Figura 3.7.).

²⁰ Um nicho neurogênico é uma região caracterizada pela presença de células tronco neurais (*Neural StemCells*) (KAZANIS, 2012). Na neurogênese adulta são observadas habitualmente duas regiões neurogênicas, a zona subventricular (SVZ) e o giro dentado (GD).

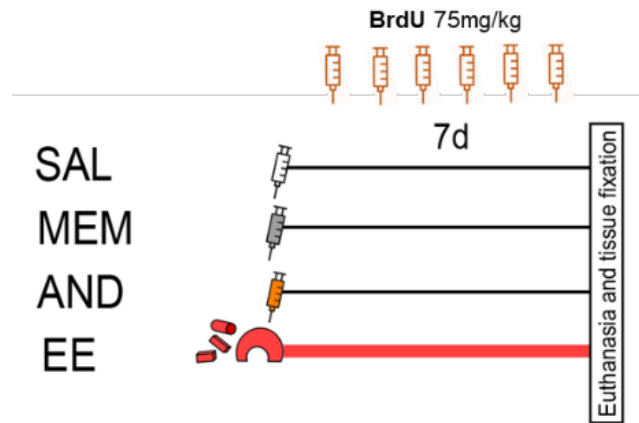


FIGURA 3.7. Desenho experimental do protocolo de obtenção de tecidos que foram utilizados na imunofluorescência BrdU/DCX.

Após a obtenção dos tecidos, foi realizada a imunofluorescência BrdU/DCX (Figura 3.8 A). Em relação aos resultados do HD, a análise de ANOVA de uma via não encontrou diferença para as células BrdU positivas [$F_{(3,15)}=0.04$; $p=0.9882$], sugerindo que nenhum dos tratamentos alterou a taxa de proliferação celular. (Figura 3.8 B). Entretanto, houve diferença no número de células DCX positivas [$F_{(3,15)}=5.9$; $p=0.0077$]. Os animais que receberam AND ($p=0.0249$) e EE ($p=0.0116$) diferiram do grupo salina (figura 3.8. C).

A seguir, nos perguntamos se os tratamentos alteraram a quantidade de neurônios imaturos (DCX positivos) dentro da população de células novas (BrdU positivas) marcadas durante os tratamentos. Não observamos diferença entre os grupos quanto ao número de células duplamente marcadas com BrdU/DCX [$F_{(3,15)}=0.04$; $p=0.7474$] (figura 3.8.D).

Por fim, quantificamos o número de neurônios novos e imaturos (BrdU+/DCX+) dentro da população de células novas (BrdU+) e expressamos como percentagem de neurogênese. Todos os tratamentos MEM ($p=0.0014$), AND ($p=0.0171$) e EE ($p=0.0015$) aumentaram o percentual de neurogênese no HD [$F_{(3,15)}=10.4$; $p=0.0006$] (Figura 3.8 E).

No hipocampo ventral não foi encontrada diferença significativa para as células BrdU positivas [$F_{(3,16)} = 0.98$; $p=0.4247$], DCX positivas [$F_{(3,16)} = 2.4$; $p=0.1124$] e BrdU/DCX [$F_{(3,16)} = 0.6$; $p=0.6150$]. A única diferença encontrada foi no percentual de neurogênese [$F_{(3,16)} = 4.2$; $p=0.0219$], apenas para o grupo AND ($p=0.0220$) em comparação ao grupo SAL (Figura 3.9).

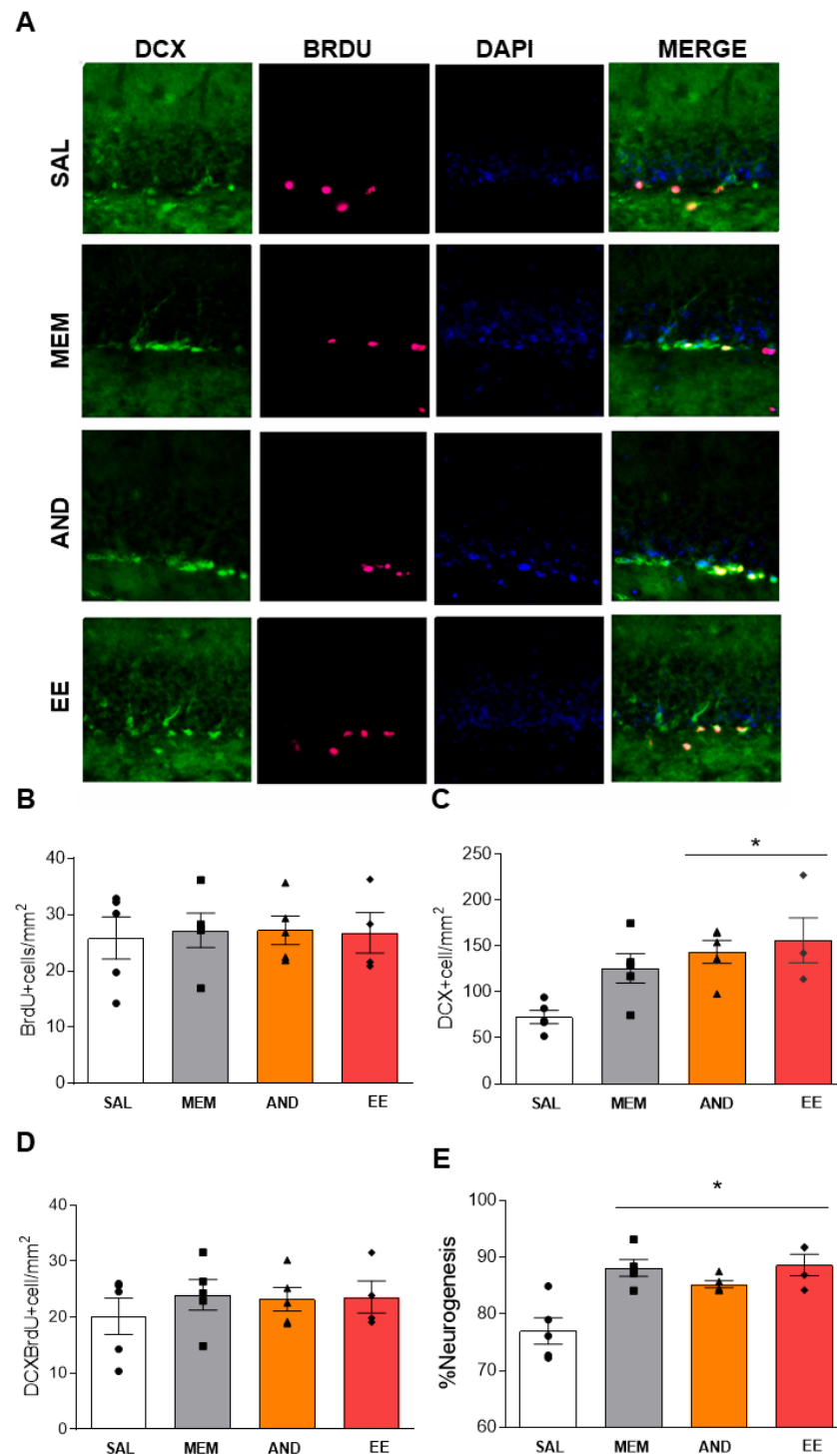


FIGURA 3.8. Efeito dos tratamentos sobre a neurogênese no HD. (A) Imagens representativas do HD de animais BrdU/DCX/DAPI: em verde células DCX (ver primeira coluna), em magenta células BrdU (segunda coluna), em azul a marcação nuclear com DAPI (terceira coluna) e na quarta coluna o merge. (B) Quantificação de células BrdU positivas. (C) Quantificação de células DCX positivas. (D) Quantificação de células com dupla marcação BrdU/DCX. (E) Percentual de neurogênese em cada uma das condições. Percentual de neurogênese (BrdU+/DCX+ dividido BrdU+). Análise com ANOVA de uma via. n=4-5. * diferença estatística em relação ao grupo SAL, p<0.05.

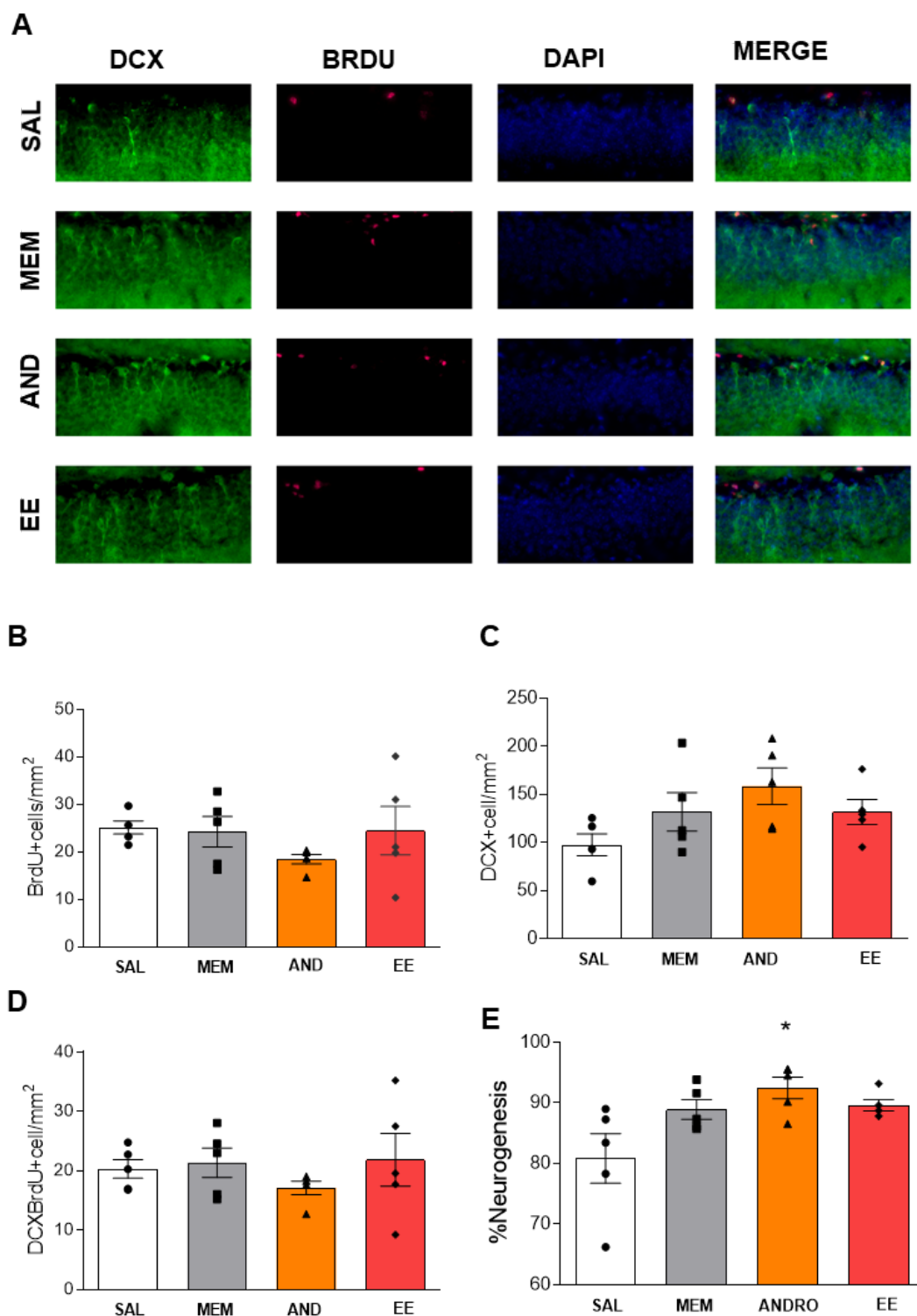


FIGURA 3.9. Efeito dos tratamentos sobre a neurogênese do HV. (A) Imagens representativas do HD de animais BrdU/DCX/DAPI: em verde células DCX (ver primeira coluna), em magenta células BrdU (segunda coluna), em azul a marcação nuclear com DAPI (terceira coluna) e finalmente na quarta coluna o merge. (B) Quantificação de células BrdU positivas. (C) Quantificação de células DCX positivas. (D) Quantificação de células com dupla marcação BrdU/DCX. (E) Percentual de neurogênese em cada uma das condições. Percentual de neurogênese

(BrdU+/DCX+ dividido BrdU+). Análise com ANOVA de uma via. n=4-5. * diferença estatística em relação ao grupo SAL, p<0.05.

Em síntese, esses resultados demonstraram que nenhum dos tratamentos utilizados alterou o nicho neurogênico da porção dorsal e ventral do giro dentado hipocampal. Todavia, os nossos tratamentos induziram o aumento da taxa de neurogênese, ou seja, a quantidade de células que proliferaram e se tornaram neurônios.

3.5.2. Efeito agudo e de longa duração da MEM e AND nas oscilações hipocampais

Para melhor compreender os mecanismos de ação da MEM e do AND registramos o LFP após os tratamentos farmacológicos. A análise foi feita logo após a injeção - efeito agudo - e após 7 dias – efeito crônico. Na figura 3.10. mostramos uma representativa com a linha de base (*baseline*), registro agudo e registro crônico.



FIGURA 3.10. LFP representativo. Nesse esquema se observa um registro LFP de um animal representativo de cada um dos tratamentos.

Na figura 3.11. podemos observar o espectrograma que nos permitiu verificar a coexistência das bandas Theta, Gamma alta e Gamma baixa no registro do LFP dos dois substratos dos animais: CA1 e DG. No espectrograma já é possível detectar algumas diferenças, não só entre os grupos, como entre o período agudo e crônico.

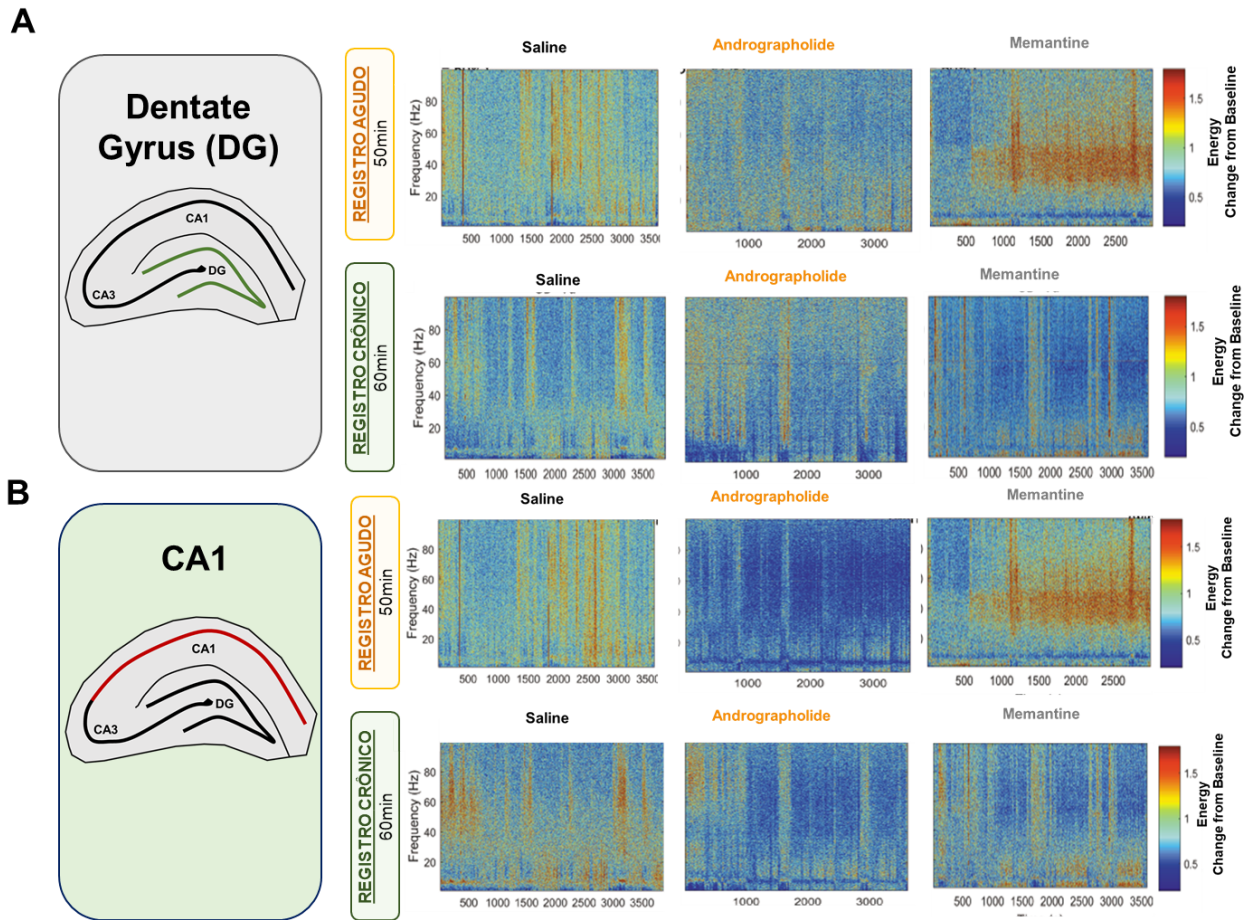


FIGURA 3.11. Espectrogramas ilustrativos dos períodos experimentais no DG e CA1. (A) Espectrograma do giro dentado no registro agudo e de longa duração. **(B)** Espectrograma do giro dentado no registro agudo e de longa duração no CA1. Valores normalizados pelo registro basal de 30 minutos.

Analisamos os registros em janelas de 5 minutos. Quanto ao efeito agudo no giro dentado (DG), a análise da energia na banda *slow* Gama mostrou interação entre tratamento e tempo [$F_{(18, 54)}=7.0$; $p<0.0001$], efeito principal do tempo [$F_{(1.876, 11.25)}=5.5$; $p=0.0224$] e também do tratamento [$F_{(2, 6)}=18.8$; $p=0.0026$]. O *Pos Hoc* de Bonferroni detectou aumento de *slow* Gama no grupo MEM, comparado ao AND, a partir de 25min pós-injeção (25min: $p=0.0034$; 30 min: $p=0.0114$; 35 min: $p=0.0074$; 40 min: $p=0.0040$; 50 min: $p=0.0026$). Além disso, o grupo MEM foi diferente do grupo SAL, a partir dos 40 minutos ($p=0.0311$; 45 min $p=0.0311$; 50 min $p=0.0420$). Por fim, grupo AND diferiu do SAL nas janelas de 35 min ($p=0.0369$) e 50 min ($p=0.0294$) (Figura 3.12. A).

Na banda *fast* Gamma do DG também encontramos interação entre tratamento e tempo [$F_{(18, 54)}=4.1$; $p<0.0001$], efeito principal do tempo [$F_{(2,308, 13.85)}=3.8$; $p<0.0440$] e do tratamento [$F_{(2, 6)}=8.3$; $p=0.0183$]. No geral, o grupo AND foi diferente dos demais ($p<0.05$) (Figura 3.12. C)

A análise das oscilações Theta (Figura 3.13.E) apresentou uma interação entre tratamento e tempo [$F_{(18, 54)}=5.5$; $p<0.0001$] e efeito principal do tratamento [$F_{(2,6)}=9.2$; $p=0.0148$]. Não observamos efeito principal no fator tempo [$F_{(1,337, 8.024)}=2.4$; $p=0.1558$]. O teste de Bonferroni revelou que o grupo MEM apresentou uma diminuição na energia desta oscilação nas janelas de 35 min ($p=0.0261$) e 45 min ($p=0.0028$).

Levando em conta esses resultados analisamos também as diferenças ao longo do tempo em cada tratamento, para esse caso nós focamos nas bandas de frequência de Gamma e fizemos também a análise de ANOVA de duas vias para ver as diferenças nos tempos de ação. As análises *pos hoc* de Bonferroni de *slow* Gamma, focadas na comparação múltiplas das janelas de tempo, não encontraram diferenças nos grupos SAL e ANDRO. Porém, no grupo MEM as análises mostraram que a janela de 5 minutos é diferente daquela de 15min ($p=0.0392$) e de todos os tempos a partir de 20min até 50min (todas as $p<0.0001$). Ainda, a janela de 10 minutos foi significativamente menor que a de 20min ($p=0.0012$), 25min ($p=0.0020$) e de todas as demais janelas até 50min (todas os $p<0.0001$). Para a janela de 15 minutos nós encontramos diferenças em relação à janela de 35min ($p=0.0406$), 40min ($p=0.0022$), 45min ($p=0.0029$) e 50min ($p=0.0024$).

No caso de *fast* Gamma, a janela de 5 minutos é diferente da de 20min ($p=0.0023$), 25 min ($p=0.0330$), 30min ($p=0.0022$), 35min ($p=0.0048$), 40min ($p=0.0006$), 45min ($p=0.0001$) e 50min ($p<0.0001$). Já a janela de 10 minutos é significativamente menor que a de 20min ($p=0.0250$), 30min ($p=0.0247$), 35min ($p=0.0496$), 40min ($p=0.0076$), 45min ($p=0.0016$) e 50min ($p=0.0005$). Finalmente, a janela de 15 minutos foi diferente da janela de 50 min ($p=0.0245$).

A seguir, repetimos o registro do LFP 7 dias após os tratamentos farmacológicos, já que nesse momento sabemos que os efeitos da MEM e da AND de aumento da neurogênese estão presentes. No DG, não encontramos interação entre os fatores nas oscilações *slow* Gamma ($F_{(22, 66)}=1.0$; $p=0.4339$), ou efeito principal do tratamento ($F_{(2, 6)}=0.5$; $p=0.6380$). Entretanto, houve um

efeito principal do tempo ($F_{(3.567, 21.40)}=5.5$; $p=0.0042$), porém a análise *pos hoc* não detectou diferenças (Figura 3.12. B).

Os resultados foram semelhantes quanto à frequência *fast* Gamma, [Interação Tratamento x tempo ($F_{(22, 66)}=0.8$; $p=0.7145$), Tempo ($F_{(3.265, 19.59)}=5.1$; $p=0.0079$), tratamento ($F_{(2, 6)}=0.6$; $p=0.5943$) (Figura 3.13.D) e à oscilação Theta [Interação Tratamento x tempo ($F_{(22, 66)}=1.1$; $p=0.3219$), Tempo ($F_{(2.314, 13.89)}=3.3$; $p=0.0594$), tratamento ($F_{(2, 6)}=0.4$; $p=0.6959$] (Figura 3.12. F).

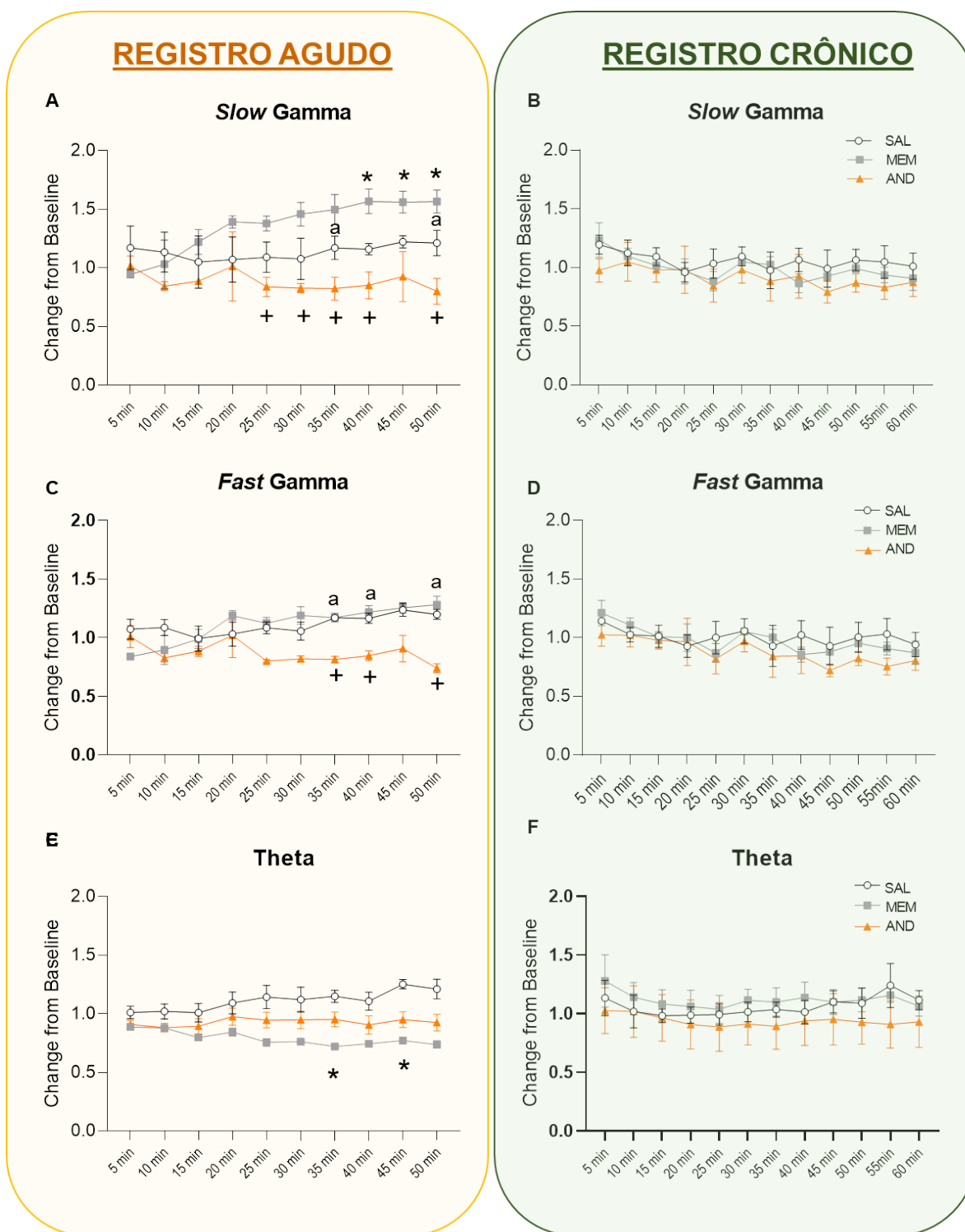


FIGURA 3.12. Energia de *slow Gamma*, *fast Gamma* e *Theta* no registro LFP agudo e crônico do DG de animais tratados com SAL, MEM e AND. (A) Registro LFP agudo de *slow Gamma*. (B) Registro LFP crônico de *slow Gamma*. (C) Registro LFP agudo *fast Gamma*. (D) Registro LFP crônico de *fast gamma*. (E) Registro LFP agudo *Theta*. (F) Registro LFP crônico de *Theta*. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. + AND menor que o grupo MEM, (a) SAL maior que AND, *MEM diferente do grupo SAL. Todos os símbolos com $p < 0.05$.

A seguir, analisamos o padrão de oscilação na região CA1 do hipocampo e observamos efeitos similares aos observados no DG. A análise do efeito agudo dos tratamentos revelou que para *slow* Gamma houve interação entre os fatores ($F_{(18, 54)}=6.1$; $p<0.0001$), e efeitos principais do tempo ($F_{(2,001, 12,00)}=3.6$; $p=0.00576$) e do tratamento ($F_{(2, 6)}=20.4$; $p=0.0021$). O grupo MEM teve um aumento de *slow* Gamma quando comparado com AND nas janelas de 15 min ($p=0.0474$), 25 min ($p=0.0053$), 30 min ($p=0.0298$), 35 min ($p=0.0091$), 40 min ($p=0.0065$) e 50 min ($p=0.0282$). O grupo MEM diferiu do SAL nas janelas de 20 min ($p=0.0196$), 30 min ($p=0.0250$), 40 min ($p=0.0284$) e 45 min ($p=0.0222$) (Figura 3.13. A).

O CA1 mostrou também diferenças em *fast* Gamma. Detectamos interação entre tratamento e tempo ($F_{(18, 54)}=5.5$; $p<0.0001$) e efeito principal do tratamento ($F_{(2, 6)}=6.1$; $p=0.0358$). Não observamos efeito do tempo ($F_{(1,939, 11,63)}=3.3$; $p=0.0730$). O *pos hoc* de Bonferroni mostrou uma diminuição da energia de *fast* Gamma no grupo AND em comparação com o MEM nas janelas de 25min ($p=0.0171$), 35 min ($p=0.0135$), 40 min ($p=0.0365$) e 50 min ($p=0.0176$) (Figura 3.13. C).

Quanto às oscilações Theta em CA1, observamos uma interação entre os fatores ($F_{(18, 54)}=2.5$; $p=0.0044$), porém sem efeito principal do tempo ($F_{(1,537, 9,224)}=1.7$; $p=0.2369$), nem do tratamento ($F_{(2, 6)}= 4.0$; $p=0.0801$). A análise de Bonferroni mostrou uma diminuição de Theta de MEM em comparação com SAL no registro agudo durante as janelas de tempo de 45 min ($p=0.258$) e 50 min ($p=0.0088$).

De forma similar à análise aguda do DG, nós realizamos um *pos hoc* de Bonferroni para o ANOVA de três vias, focadas nas análises nas janelas do tempo e encontramos diferenças apenas no grupo MEM, nas bandas de frequência Gamma. Em *slow* Gamma de CA1, a janela de 5 minutos é significativamente diferente da de 20 min ($p=0.0003$), 25 min ($p=0.0003$) e de todas as demais janelas até 50min (todas as $p<0.0001$). Em relação à janela de 10 min, vimos que é menor que a de 20 min ($p=0.0101$), 25min ($p=0.0106$), 30 min ($p=0.0005$), 35 min ($p<0.0001$), 40 min ($p<0.0001$), 45 min ($p<0.0001$), 50 min ($p<0.0001$). A janela de 15 minutos, por outro lado, foi significativamente menor que as janelas de 40 min ($p=0.0123$), 45 min ($p=0.0137$) e 50 min ($p=0.0139$).

Quando analisamos o *fast* Gamma encontramos resultados similares, sendo que a janela de 5 minutos foi diferente daquelas de 20 min ($p=0.0002$), 25min ($p=0.0043$), 30 min ($p<0.0001$), 35

min ($p=0.0003$), 40 min ($p<0.0001$), 45 min ($p<0.0001$), 50 min ($p<0.0001$). Ainda foram detectadas diferenças entre a janela de 10 min, de 20 min ($p=0.0053$), 30 min ($p=0.0021$), 35 min ($p=0.0095$), 40 min ($p=0.0006$), 45 min ($p<0.0001$) e 50 min ($p<0.0001$). Também as análises evidenciaram diferenças entre a janela de 45 min ($p=0.0190$) e 50 min ($p=0.0023$).

Assim como no DG, analisamos o registro do LFP 7 dias após os tratamentos farmacológicos no CA1. Não encontramos diferenças significativas para *slow* Gamma [Interação, ($F_{(22, 66)}=1.2$; $p=0.2712$), tempo ($F_{(2.166, 12.99)}=4.7$; $p=0.0264$), tratamento ($F_{(2, 6)}=0.6$; $p=0.5892$)] (Figura 3.14.B), *fast* Gamma [Interação ($F_{(22, 66)}= 1.1$; $p=0.3816$), tempo ($F_{(2.025, 12.15)}=4.4$; $p=0.0362$), tratamento ($F_{(2, 6)}=0.8$; $p=0.4961$)] (Figura 3.14.D) e Theta [Interação ($F_{(22, 66)}= 0.5$; $p=0.9615$), tempo ($F_{(1.967, 11.80)}=2.$; $p=0.1750$), tratamento ($F_{(2, 6)}=1.4$; $p=0.3061$)] (Figura 3.13. F).

Nossos resultados sugerem que em ambos, DG e CA1, os efeitos agudos da MEM e da AND na energia das oscilações Gamma são opostos, e que o padrão de oscilações Theta é ligeiramente sensível à MEM. Entretanto, a longo prazo, ambos os fármacos não alteraram o padrão de oscilação basal destas regiões do hipocampo.

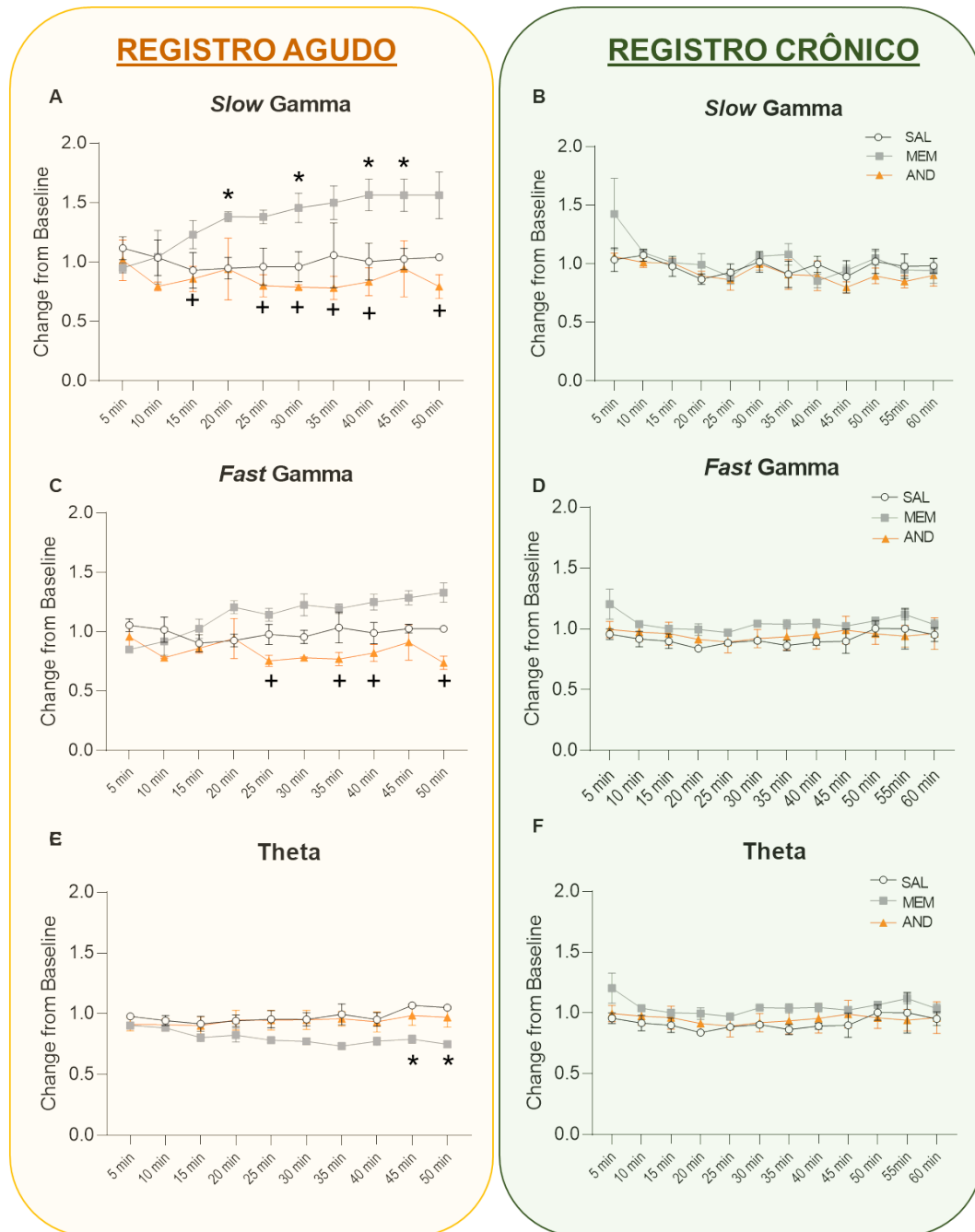


FIGURA 3.13. Energia de *slow Gamma*, *fast Gamma* e Theta no registro LFP agudo e crônico do CA1 de animais tratados com SAL, MEM e AND. A) Registro LFP agudo de *slow Gamma*. (B) Registro LFP crônico de *slow Gamma*. (C) Registro LFP agudo *fast Gamma*. (D) Registro LFP crônico de *fast gamma*. (E) Registro LFP agudo Theta. (F) Registro LFP crônico de Theta. ANOVA de duas vias para medidas repetidas. + AND < MEM, (a) SAL > AND, *MEM ≠ SAL. Todos os símbolos com $p < 0.05$.

Um resumo dos resultados referentes aos mecanismos avaliados para cada um dos tratamentos -EE, MEM e AND – está apresentado na tabela 2.

	DCX	%Neurogênese	<i>Slow</i> Gamma DG ¹	<i>Fast</i> Gamma DG ¹	Tetha DG ¹	<i>Slow</i> Gamma CA1 ¹	<i>Fast</i> Gamma CA1 ¹	Tetha CA1 ¹
MEM	=	+	+	+	-	+	=	-
AND	+	+	-	-	=	=	=	=
EE	+	+						

TABELA 2. Resumo dos mecanismos estudados dos tratamentos MEM, END e EE. Principais resultados das diferenças dos grupos experimentais em relação ao grupo salina. ¹Estes resultados correspondem ao registro LFP agudo e indicam uma diferença pelo menos em uma das janelas de 5 minutos, durante os 50 minutos registrados, sempre em relação ao grupo salina.

3.5.3. Modelos de memória de medo para o estudo da modulação da neurogênese

Previamente em nosso laboratório foi desenvolvido um modelo para o estudo da persistência, no qual estímulos mais fortes (5US) geram memórias que persistem 30 dias, enquanto treinos mais fracos (1US) tem uma menor persistência (7 dias) (PEREIRA *et al.*, 2019). Utilizando esse trabalho como base, os animais foram submetidos a um treino fraco (Figura 3.14. A) com o intuito de gerar uma memória de longa duração que não persistiria por muito tempo. Os resultados mostraram que os animais pareados formam uma LTM de 24 horas ($t_{(7)} = 6.1$; $p=0.0285$) (Figura 3.14. B). Entretanto, não foi encontrada diferença significativa entre o grupo não pareado e o grupo pareado quando avaliados 10 dias após o treino ($t_{(7)} = 2.3$; $p=0.3699$) (Figura 3.14.C).

A seguir, realizamos um protocolo na tarefa de condicionamento ao som (Figura 3.15. A) onde a intensidade do choque (US: estímulo incondicionado) foi fraca (0.17mA) (Figura 3.16.A). A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou interação entre os fatores ($F_{(1, 10)}=43.6$; $p<0.0001$) e efeito principal do tom ($F_{(1, 10)}=43.6$; $p<0.0001$). Não houve efeito principal do US ($F_{(1, 10)}=2.7$; $p=0.1331$). A análise *pos hoc* mostrou que os animais não condicionados (No-US) possuem níveis de *freezing* semelhantes na presença (tom) ou ausência do som (Pré-tom). E que de fato os animais condicionados (CS-US) aprendem a associar o tom ao choque (Figura 3.15. B)

Um outro grupo de animais foi submetido ao mesmo protocolo, porém tiveram sua memória testada 10 dias após. Não observamos interação ($F_{(1,10)}=0.5$; $p=0.5065$), ou efeito principal do tom ($F_{(1,10)}=0.8$; $p=0.4092$) e do US ($F_{(1,10)}=0.6$; $p=0.4488$), indicando que esta memória não persiste por 10 dias (Figura 3.15. C).

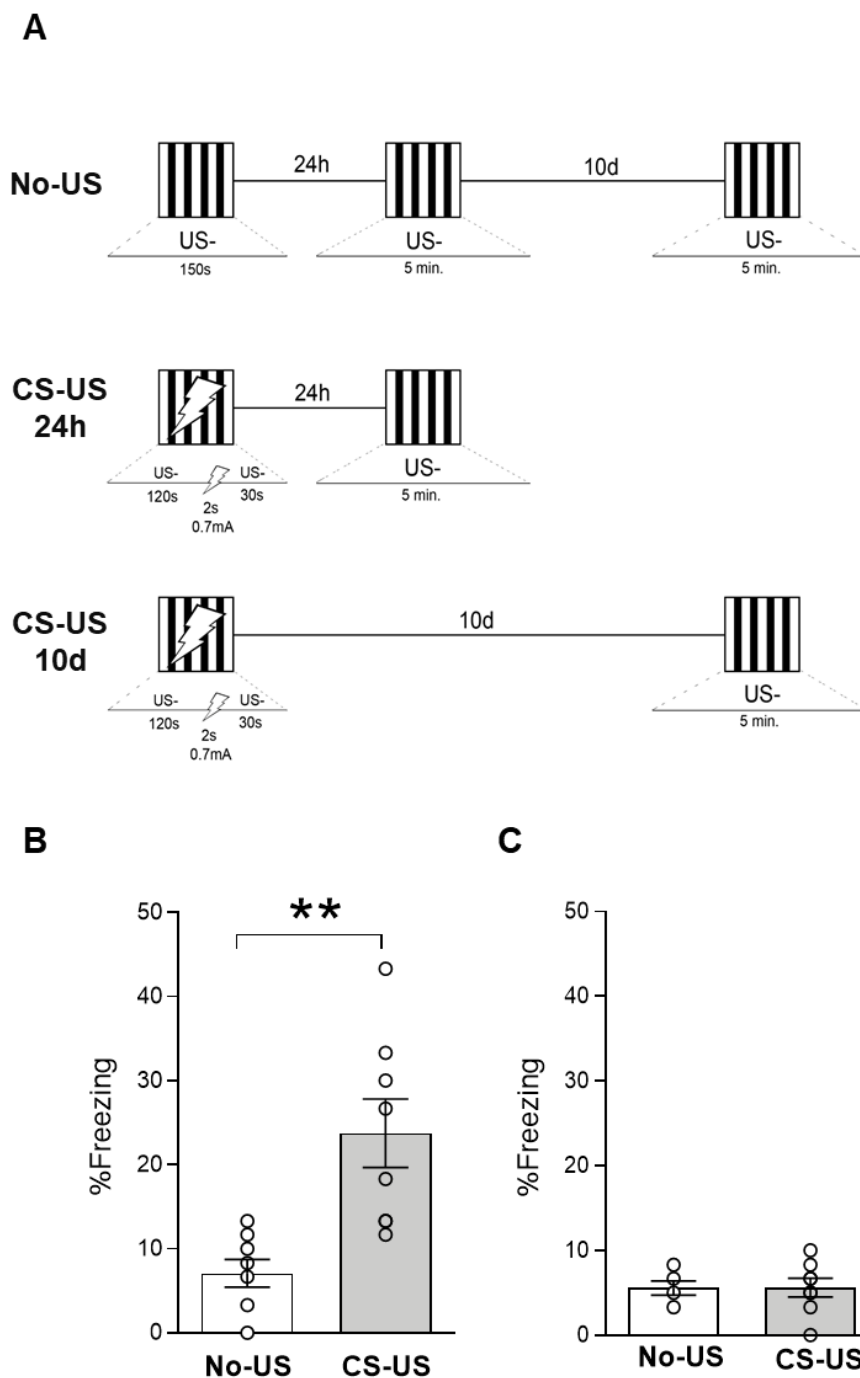


Figura 3.14. Padronização de um modelo de memória de medo contextual de longa duração com transiência de 10 dias. (A) Desenho experimental do protocolo de condicionamento ao medo contextual com os 3 grupos, o controle não pareado (No-US) que unicamente é exposto ao contexto, e os grupos pareados (CS-US). (B) Comportamento de *freezing* durante os testes de memória 24 horas. (C) Comportamento de *freezing* durante os testes de memória de medo contextual 10 dias após o treino. Análise Teste T, n=6-8,** Diferença estatística, $p < 0.001$.

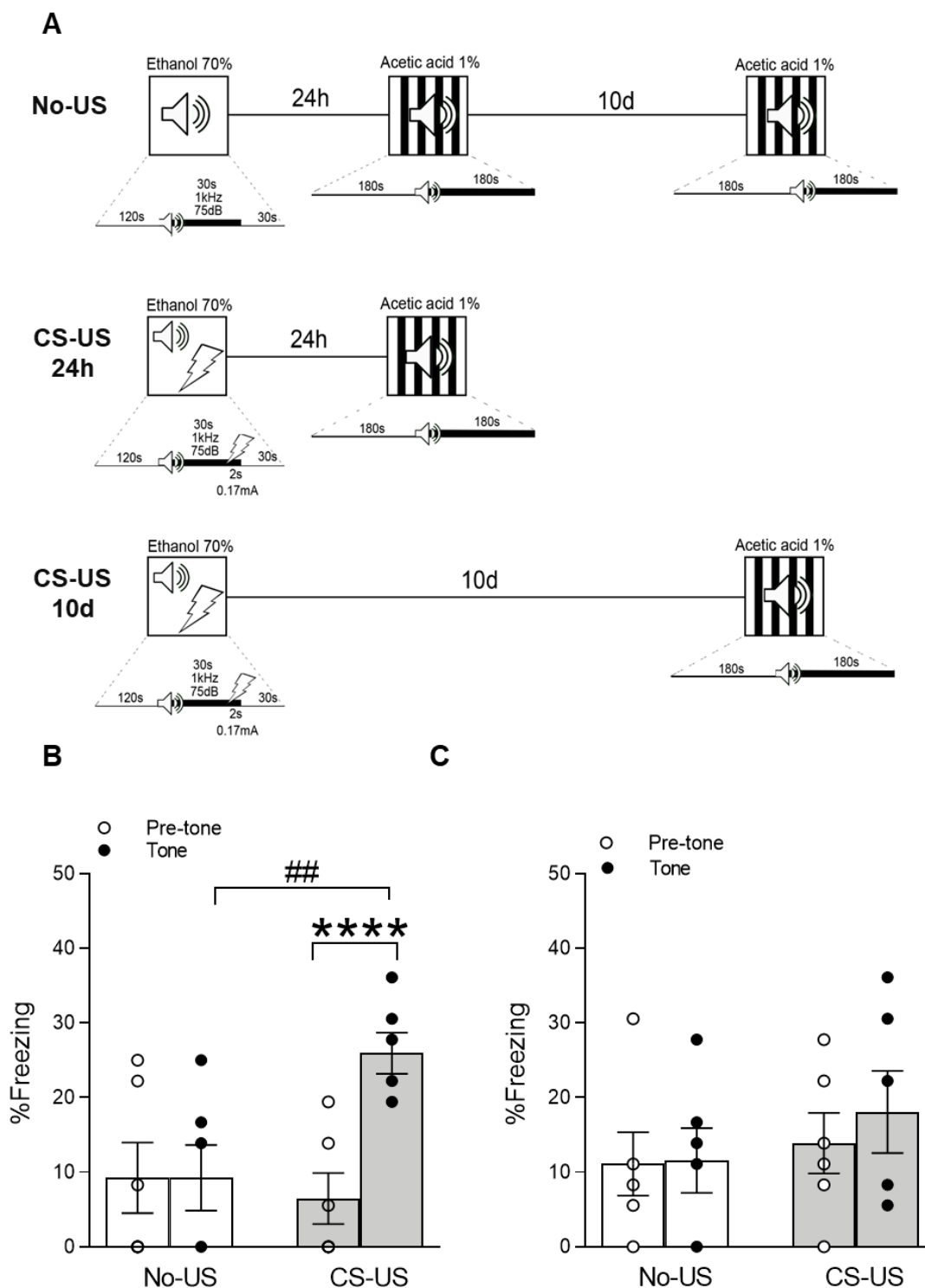


Figura 3.15. Padronização de um modelo de memória de medo condicionado ao som de longa duração com transiência de 10 dias. (A) Desenho experimental do protocolo de condicionamento de medo ao som. Foram feitos 3 grupos, um grupo não pareado (No-US), que apenas escutou o som e foi o controle para os grupos pareados (CS-US), os quais receberam o choque e foram avaliados em dois tempos diferentes. (B) Comportamento do *freezing* durante os testes de memória de condicionamento ao som 24 horas. (C) Comportamento de *freezing* durante os testes

de memória de condicionamento ao som 10 dias. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, $n=6$, **** Diferença estatística, $p<0.0001$, ## diferença estatística $p<0.005$.

O terceiro tipo de memória de medo que testamos foi a de condicionamento olfativo. Desenvolvemos um protocolo (3.16. A) que permitiu que os animais formassem uma memória olfativa com duração e 24h, mas não de 10 dias. A análise dos resultados apresentados na figura 3.17B detectaram interação entre os fatores US e Odor ($F_{(1,9)}=34.02$; $p=0.00020$). E também efeito principal do US ($F_{(1,9)}=40.8$; $p=0.0001$) e odor ($F_{(1,9)}=43.5$; $p<0.0001$). O *pos hoc* mostrou que os animais pareados (CS-US), ou seja, aqueles que associaram o cheiro com o choque, apresentaram o comportamento de medo, 24h após, na presença do odor ($p<0.0001$)(Figura 3.16 B).

Um outro grupo de animais foi submetido ao mesmo protocolo, porém tiveram sua memória testada 10 dias após. A Figura 3.16. C mostra que a memória de medo olfativa, com o protocolo utilizado, não persiste por 10 dias [Interação: ($F_{(2,15)}=3.4$; $p=0.0592$), Odor: ($F_{(1,15)}=0.2$; $p=0.6459$), US: ($F_{(2,15)}=0.8$; $p=0.4809$)].

Em suma, desenvolvemos três protocolos de memória de medo de longa duração (24h) que têm um esquecimento fisiológico 10 dias após o treino.

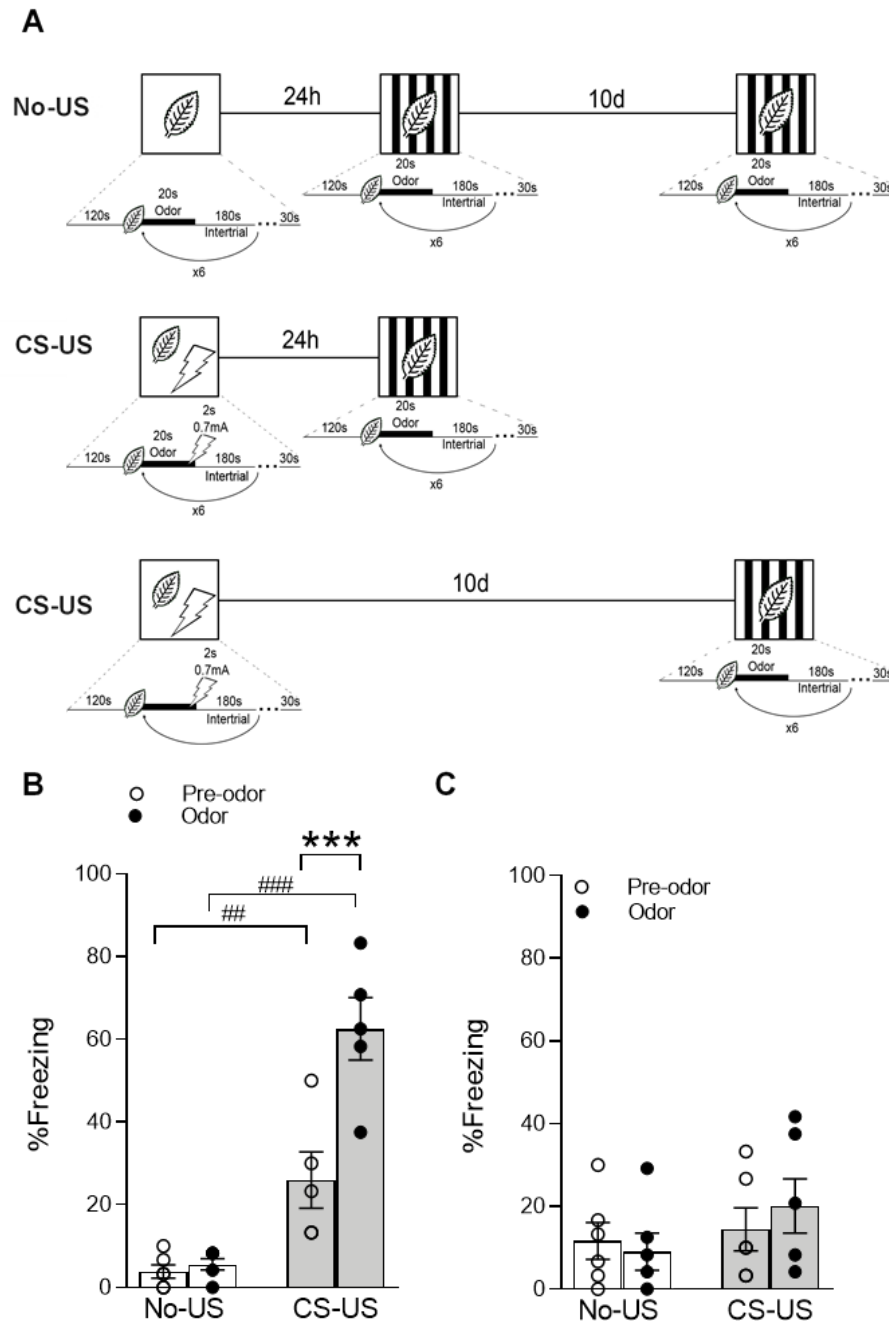


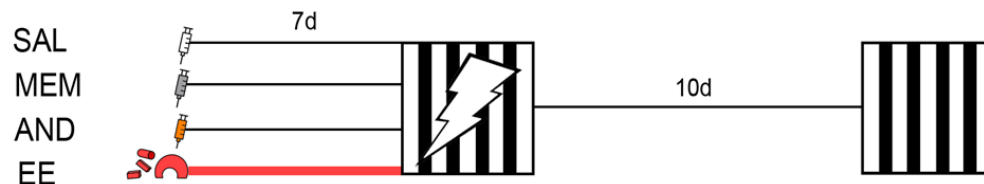
Figura 3.16. Padronização de um modelo de memória de medo condicionado ao cheiro de longa duração com transiência de 10 dias. (A) Desenho experimental do protocolo de condicionamento de medo ao cheiro, foram feitos 3 grupos, um grupo não pareado (No-US) que unicamente foi exposto ao odor e foi o controle para os grupos pareados (CS-US) que receberam o choque e foram avaliados em dois tempos diferentes. (B) Comportamento de *freezing* durante os testes de memória de medo condicionada ao cheiro 24 horas. (C) Comportamento de *freezing* durante os testes de memória de medo condicionada 10 dias após o treino. ANOVA de duas vias para medidas repetidas, n=6, **** Diferença estatística, $p < 0.0001$, ## diferença estatística $p < 0.005$.

3.5.4. Efeitos do aumento da neurogênese na persistência da memória de medo

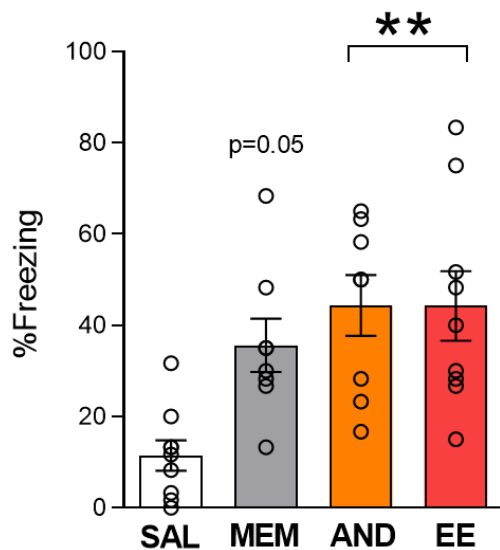
Usando o EE, MEM e AND como ferramentas para aumentar a neurogênese, testamos seus efeitos nas memórias de medo que naturalmente não persistem por 10 dias.

Testamos a memória de medo contextual após os 3 tratamentos (Figura 3.17. A) e detectamos diferença entre os grupos ($F_{(3, 30)} = 6.9$; $p = 0.0012$). Tanto o grupo MEM ($p = 0.0518$), quanto AND ($p = 0.0037$) e EE ($p = 0.0028$) apresentaram a persistência de memória por 10 dias em comparação com o grupo SAL (Figura 3.17. B). Além disso, não observamos alteração no comportamento dos animais durante o treino ($F_{(3, 28)} = 0.3$; $p = 0.8198$) (Figura 3.17. C).

A



B



C

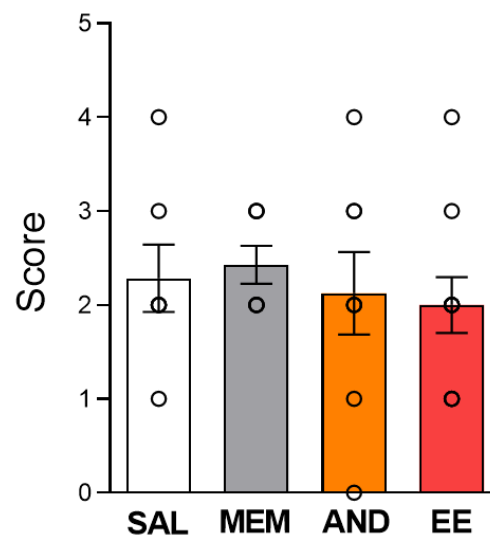


Figura 3.17. Aumento da neurogênese hipocampal promove a persistência da memória de medo contextual. (A) Desenho experimental da administração dos tratamentos no protocolo de memória de medo contextual. (B) Efeito do aumento da neurogênese na persistência da memória de medo contextual (C) Efeito do aumento da neurogênese na reação ao choque na aquisição da memória de medo contextual. Análise ANOVA de uma via, $n = 7-10$, ** Diferença estatística, $p < 0.05$.

Na tarefa de memória de medo condicionada ao som (Figura 3.18. A) observamos interação entre os fatores tratamento e tom ($F_{(3, 28)} = 0.9$; $p = 0.4590$) e efeito principal do tom ($F_{(3, 28)} = 0.9$;

$p=0.4590$). Porém não houve efeito principal do tratamento ($F_{(3, 28)}= 0.7$; $p=0.5469$). A análise post-hoc mostrou que apenas os animais submetidos ao EE apresentaram a memória condicionada ao som ($p=0.0166$) (Figura 3.18. B). Para verificar um possível efeito periférico dos tratamentos avaliamos a reação ao choque durante o treino e não encontramos diferenças entre os grupos ($F_{(3, 26)}=1.6$; $p=0.2007$) quanto à resposta ao choque (Figura 3.18. C).

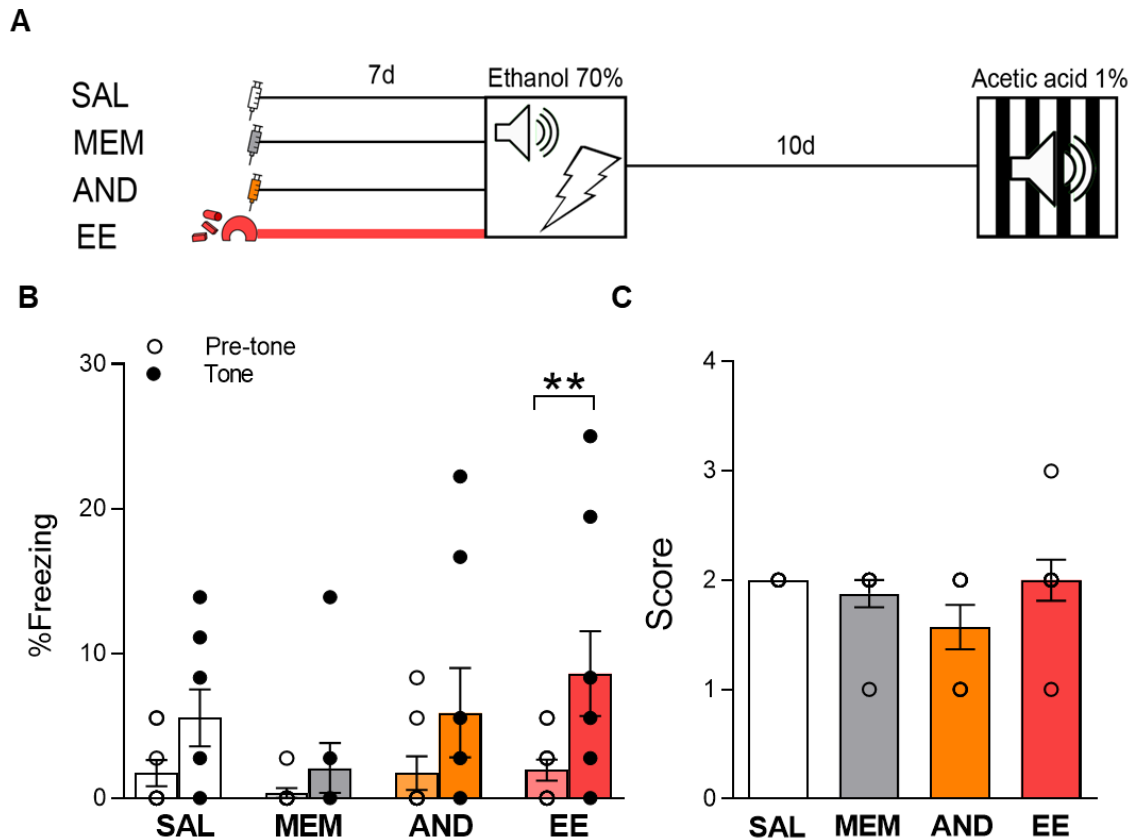


Figura 3.18. O Enriquecimento promove a persistência da memória de medo contextual. (A) Desenho experimental da administração dos tratamentos no protocolo de memória de medo condicionada ao som. (B) Efeito do aumento da neurogênese na persistência da memória de medo condicionada ao som. (C) Efeito do aumento da neurogênese na reação ao choque na aquisição da memória de medo condicionada ao som. Análise ANOVA de uma via, $n=7-8$, ** Diferença estatística, $p<0.05$.

No paradigma de condicionamento ao odor (Figura 3.19. A), não encontramos interação entre os fatores ($F_{(3, 29)}=2.1$; $p=0.12$) ou efeito do tratamento ($F_{(3, 29)}=0.2$; $p=0.8$). Observamos um efeito principal do fator odor ($F_{(1, 29)}= 5.8$; $p=0.02$), cuja análise post-hoc falhou em detectar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 3.19. B). Do mesmo modo que foi observado nas outras tarefas, os tratamentos não tiveram nenhum efeito na reação ao choque dos animais durante o treino ($F_{(3, 31)}=1.451$; $p=0.2469$) (Figura 3.19. C).

Como o modelo de memória de condicionamento olfativa tem 6 trials, analisamos a curva de aprendizado ao longo da sessão de treino para avaliar se os tratamentos afetaram o aprendizado. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostra que existem diferenças [Interação: ($F_{(15, 145)}=2.320$; $p=0.0054$), Tratamento ($F_{(3, 29)}=6.357$; $p=0.0019$), Trial ($F_{(3, 811, 110.5)}=123.4$; $p< 0.0001$)]. O *pos hoc* de Bonferroni evidencia que o freezing do grupo EE foi nos trial 3 e 4 (Figura 3.20D).

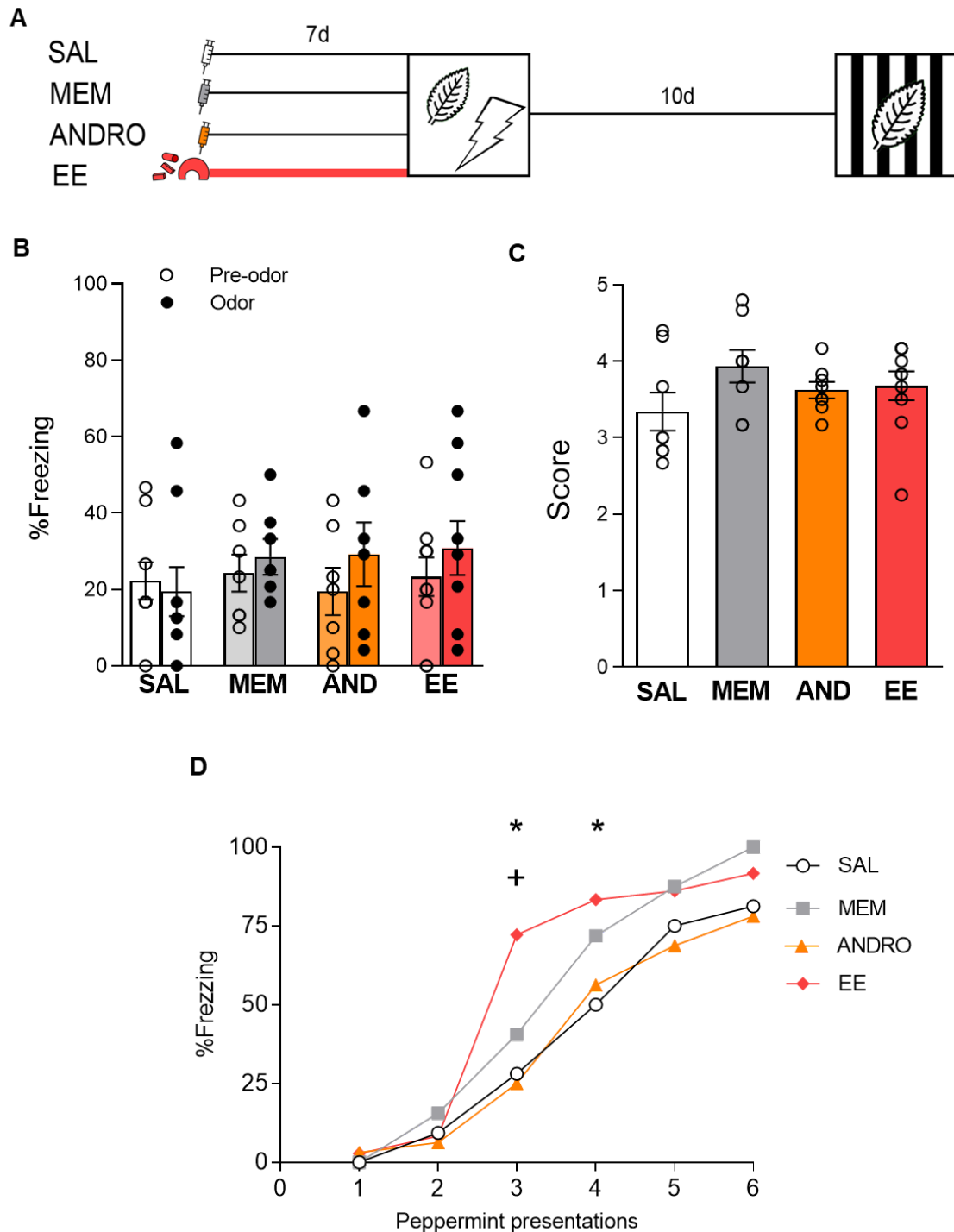


Figura 3.19. O Enriquecimento melhora a aquisição da memória de medo condicionada ao cheiro mas não promove a persistência. (A) Desenho experimental da administração dos tratamentos no protocolo de memória de medo condicionada ao cheiro. (B) Efeito do aumento da neurogênese na persistência da memória de medo condicionada ao cheiro. (C) Efeito do aumento da neurogênese na reação ao choque na aquisição da memória de medo condicionada ao cheiro (D) Observa-se a porcentagem de freezing durante o tempo de apresentação do cheiro em cada um dos 6 trials. Ao longo da sessão de treino o freezing aumenta mostrando a formação do aprendizado

associativo. Os animais do grupo EE melhoraram seu aprendizado dessa tarefa. Análise de ANOVA de duas vias para medidas repetidas. n= 7-10, *EE>SAL, +EE>AND, p<0.0,5

4.0. Discussão

Nosso estudo não detectou diferenças expressivas entre EE, MEM e AND quanto aos mecanismos de ação avaliados - nicho neurogênico, proliferação celular e neurogênese. A grande diferença observada entre MEM e AND foi nos seus efeitos agudos sobre o padrão das oscilações Gamma e Theta do hipocampo dorsal. Entretanto, quando comparamos os efeitos do EE, MEM e AND sobre as memórias de medo, se destaca a efetividade do EE em promover a persistência de memórias que naturalmente são esquecidas. De maneira surpreendente, a memória de condicionamento olfativo foi insensível aos efeitos promnésicos do aumento da neurogênese.

A única memória de medo avaliada que teve sua persistência aumentada pelos 3 tratamentos foi o medo contextual. A memória de medo condicionada ao contexto compartilha com o condicionamento de pistas o recrutamento da amígdala e do córtex pré-frontal, mas é o hipocampo que se destaca como fundamental na formação desta memória (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001; BOUTON et al., 2006; HARTLEY; PHELPS, 2010; LEE; MILTON; EVERITT, 2006; MAREN; QUIRK, 2004; MILLER; SAHAY, 2019; RESSLER; MAREN, 2019; SAH; SUN; GOOCH, 2020; SANDERS; WILTGEN; FANSELOW, 2003; TERRANOVA; OGAWA; KITAMURA, 2019a; VANELZAKKER et al., 2014). Sua forte dependência do hipocampo e o fato dele ser a principal área neurogênica no cérebro de mamíferos, pode ser a razão pela qual a participação dos novos neurônios na memória de medo contextual tem sido amplamente explorada (AIMONE; DENG & GAGE, 2011; ANACKER; DENNY & HEN, 2015; ARRUDA-CARVALHO *et al.*, 2014; BISCHOFBERGER & SCHINDER, 2008; CAMERON & GLOVER, [S.d.]; DALLA *et al.*, 2007; DREW; FUSI & HEN, 2013; EPP; SPRITZER & GALEA, 2007; GOODMAN *et al.*, 2010; HUCKLEBERRY *et al.*, 2018; MARÍN-BURGIN & SCHINDER, 2012; MARRONE *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2014; PEREIRA-CAIXETA *et al.*, 2017, 2018; VUKOVIC *et al.*, 2013a). Semelhante argumentação pode ser feita no que diz respeito ao efeito promnésico que EE, MEM e AND tiveram na memória social (CAP. 2). Em outras palavras, as duas memórias mais sensíveis aos níveis de neurogênese foram justamente àquelas mais dependentes do hipocampo.

Vários autores têm sugerido que o DG parece ter um papel importante na codificação de novos contextos (AIMONE; DENG; GAGE, 2011; JOHNSTON et al., 2016; SANDERS; WILTGEN;

FANSELOW, 2003), o que poderia explicar a persistência da memória contextual gerada pelos nossos tratamentos de aumento da neurogênese. Ao respeito, outros estudos já mostraram que esses neurônios novos poderiam ser mais facilmente recrutados na codificação de novos ambientes (DANIELSON et al., 2016b). Outras evidências sugerem que os novos neurônios facilitariam a indução do LTP no DG e isso contribuiria na formação da memória de medo contextual (SAXE et al., 2006).

A ideia que os neurônios novos deixariam o sistema mais excitável tem sido discutida (DOETSCH; HEN, 2005). Esta ideia está fundamentada no perfil eletrofisiológico dos neurônios imaturos que são excitáveis por GABA e tem um é baixo limiar para a indução de LTP (AMBROGINI *et al.*, 2004; GE *et al.*, 2006, 2007; MARKWARDT; WADICHE ; OVERSTREET-WADICHE, 2009; MONGIAT *et al.*, 2009; OVERSTREET-WADICHE *et al.*, 2005; SAILOR; SCHINDER; LLEDO, 2017; SCHMIDT-HIEBER; JONAS ; BISCHOFBERGER, 2004; SNYDER *et al.*, 2009; WANG; SCOTT; WOJTOWICZ, 2000). Porém, isso não se traduz em uma hiperexcitabilidade da rede, pois tem se mostrado que essa hiperexcitabilidade é produzida pela diminuição da neurogênese por radiação, sendo que o aumento da neurogênese gera uma maior inibição do DG (IKRAR et al., 2013).

O estado da energia do hipocampo nas manipulações neurogênicas de animais *freely moving* é uma aproximação relevante para entender a contribuição desses novos neurônios dentro do circuito hipocampal, por isso nós fizemos um registro LFP em duas condições de aumento de neurogênese. Nossas análises mostraram um aumento de *slow* e *fast* Gamma poucos minutos após a administração de MEM, esses efeitos já tinham sido reportados previamente em outro registro *in vivo* de roedores (MA; MUFTI; STAN LEUNG, 2015). Em geral, a MEM é um antagonista dos receptores tipo NMDA (ALBENSI et al., 2004; KELTNER; WILLIAMS, 2003; MOBIUS, 2003; RAMMES; DANYSZ; PARSONS, 2008) altamente utilizada na clínica para o tratamento de Alzheimer e outras demências (AREOSA; MCSHANE; SHERRIFF, 2004; ATRI et al., 2012; JAIN, 2000; KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015; LO; GROSSBERG, 2011; MOLINUEVO; GARCIA-GIL; VILLAR, 2004; PRASHER, 2004; ROBLES-BAYÓN, 2006; ROGAWSKI; WENK, 2003).

Neste trabalho nós conseguimos reproduzir inclusive o pico do aumento de *slow* Gamma em CA1 e DG perto dos 40 minutos após a injeção i.p. da MEM reportado por Ma e colaboradores (2015).

A atividade Gamma no hipocampo é gerada por interneurônios gabaérgicos parvalbumina positivos que se conectam com as células piramidais (LEUNG, 1998; SOHAL *et al.*, 2009; WHITTINGTON *et al.*, 2000). Nesse sentido, o bloqueio do receptor glutamatérgico promove um aumento da atividade desses interneurônios e uma maior comunicação do circuito local do hipocampo, sendo que efeitos similares são reportados com outros antagonistas de NMDA como cetamina (CARLEN *et al.*, 2012; GRUNZE *et al.*, 1996).

Outros trabalhos tem mostrado o aumento de Gamma com antagonistas NMDA como cetamina em roedores (LAZAREWICZ *et al.*, 2010). Estudos com cetamina em humanos também evidenciam esse aumento da amplitude de Gamma no córtex, sendo discutido se esses efeitos podem explicar as recentes aplicações antidepressivas dessa substância (SHAW *et al.*, 2015). Além disso, recentemente, um estudo em humanos mostrou o aumento de Gamma em pessoas saudáveis e pacientes com esquizofrenia que receberam uma única dose de MEM de 20mg (LIGHT *et al.*, 2017).

Levando em conta essas evidências, nossos resultados reforçam que o aumento de Gamma produzido pela MEM é um dos mecanismos de ação relevantes dessa substância, especialmente em seus efeitos na performance cognitiva. Ao respeito, diversos estudos têm mostrado o envolvimento de Gamma em tarefas cognitivas, sendo que esse aumento tem sido associado à recuperação cognitiva de déficits cognitivos produzidos por placas amilóides (IACCARINO *et al.*, 2016).

Curiosamente, nossos resultados não evidenciam o mesmo aumento de Gamma com AND e, ao contrário, esses animais exibem uma diminuição nessa frequência no DG. O presente trabalho é o primeiro registro eletrofisiológico da andrografolide, e mostramos uma diminuição de Gamma alta e baixa no registro agudo no DG. Embora a andrografolide seja o principal composto da *andrographolis paniculata*, uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa (JARUKAMJORN; NEMOTO, 2008), os seus mecanismos de ação não estão muito esclarecidos. Trabalhos prévios têm mostrado que a AND aumenta a neurogênese e estimula a sinalização Wnt (VARELA-NALLAR *et al.*, 2015). Outros trabalhos tem focado no potencial para a redução da neuroinflamação, regulando a ativação das células T (IRURETAGOYENA, 2004) e reduzindo o estresse oxidativo (YANG *et al.*, 2017). A maioria dos trabalhos tem realizado tratamentos constantes ou de longa duração do andrografolide (IRURETAGOYENA, 2004;

IRURETAGOYENA et al., 2005; LI et al., 2018b; LIU et al., 2019), motivo pelo qual os efeitos agudos são ainda pouco conhecidos. Previamente já foi reportado um efeito hipnótico que poderia coincidir com o observado no nosso experimento (JARUKAMJORN; NEMOTO, 2008; THAKUR; CHATTERJEE; KUMAR, 2015)

Por outro lado, os resultados não mostraram diferenças entre os grupos no registro 7 dias após a administração das drogas, o que poderia sugerir que a proporção aumentada de novos neurônios não faz diferença dentro do circuito hipocampal e, particularmente, dentro do giro dentado. Alguns trabalhos vêm mostrando que os mecanismos do aumento da neurogênese devem ser explicados dentro das conexões do hipocampo. Nesse sentido, IKRAR e colaboradores (2013) concluíram que:

“Quando o número de novos neurônios é aumentado, a excitação sobre os interneurônios hilares cresce, aumentando assim o *feedback* inibitório sobre os neurônios granulares maduros. Consequentemente, a excitação *feedforward* e a inibição *feedforward* di-sináptica para CA3, mediada por neurônios granulares maduros do DG, é diminuída. Entretanto, a excitação e a inibição di-sináptica *feedforward* mediada pelos neurônios novos para CA3 é aumentada” (IKRAR *et al.*, 2013, p. 12).

Nessa perspectiva, outros trabalhos mostraram que durante o período crítico de maturação os neurônios novos conseguem ajudar no processamento de *inputs* e contribuir de forma significativa com o processamento do hipocampo através do *feedforward* inibitório (TEMPRANA et al., 2015).

Adicionalmente, o fato dos novos neurônios serem ativos sob demanda, particularmente, em tarefas cognitivas demandantes (GONÇALVES; SCHAFFER; GAGE, 2016), pode ter contribuído para que nós não observássemos nenhum efeito a longo prazo, mesmo que as análises histológicas tenham mostrado uma maior proporção de neurônios nesse tempo. Ao respeito, metodologias mais refinadas mostraram que novos neurônios em estados amadurecidos (6 semanas) parecem não ter diferença dos neurônios maduros, porém, quando o animal é submetido a uma demanda de codificação, esses neurônios são mais excitáveis e preferencialmente recrutados (DANIELSON et al., 2016a). Futuras análises de nosso próprio registro, poderiam esclarecer esta questão ao separar os momentos de exploração dentro da caixa para verificar se nesta pequena demanda cognitiva é possível observar diferença entre os animais tratados com MEM, AND e os salina.

No mais, nossos achados sugerem que o aumento da neurogênese não influenciaria tarefas amígdala dependentes como os condicionamentos de pistas. Ao respeito Farioli-Vecchioli e colaboradores (2008), por meio de animais transgênicos, mostraram que o aumento da neurogênese não afeta a memória de medo condicionada ao som, o que vai ao encontro do que foi observado neste trabalho.

Além disso, nós observamos um efeito promnésico promovido pelo enriquecimento nos condicionamentos de pistas. No medo condicionado ao som, ele promove a persistência da memória, e no medo condicionado ao cheiro ele melhora a curva de aprendizagem. Acreditamos que os mecanismos subjacentes a esses efeitos promnésicos não estão vinculados à neurogênese, devido ao fato dos outros tratamentos não terem mostrado esse efeito. O ambiente enriquecido tem sido vinculado a mudanças plásticas que vão além da neurogênese e que incluem remodelamento celular, expressão de fatores neurotróficos, diminuição da neuroinflamação, aumento de arborização dendrítica e aumento de plasticidade sináptica (BINDU et al., 2007; JAIMES et al., 2020; KAZLAUCKAS et al., 2011; KEMPERMANN, 2019b; LEGGIO et al., 2005; SALE; BERARDI; MAFFEI, 2014; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 2000b). Outros trabalhos mostram que o EE pode modular a amígdala de diferentes formas modificando sua resposta ante estímulos emocionais (EHNINGER et al., 2011; FISCHER, 2015; NOVAES et al., 2017; OKUDA et al., 2009).

A melhoria do ambiente enriquecido altera a curva do aprendizado do cheiro condicionado, sem chegar a afetar sua persistência, coincidindo com outros estudos que mostraram uma melhora de tarefas olfativas associadas com o enriquecimento (MANDAIRON et al., 2006; MANDAIRON; STACK; LINSTER, 2006; SULTAN et al., 2010). Por outro lado, nenhum dos outros tratamentos parece ter impactado na persistência do condicionamento olfativo, o que faz supor duas possíveis hipóteses: 1) o aumento da neurogênese não afeta esta memória ou 2) os tratamentos não aumentaram a neurogênese no bulbo como o fizeram no hipocampo. A respeito da primeira hipótese, sugerimos que a tarefa de medo condicionado ao cheiro não seja adequada para avaliar a influência da neurogênese pelo fato de não ser uma tarefa de discriminação. Vários trabalhos têm mostrado que o aumento da neurogênese é importante em tarefas de discriminação olfatória, particularmente em aquelas com maior dificuldade (BRAGADO ALONSO et al., 2019; GREGORIAN et al., 2009; KIRSCHEN; SAILOR; GE, 2017; KOUREMENOU; PIPER;

ZALUCKI, 2020; LI et al., 2018a; MANDAIRON et al., 2006). De igual maneira, um estudo mostrou que em tarefas olfativas a neurogênese não parece estar relacionada com a persistência da memória (IMAYOSHI et al., 2008). Não obstante, nossas análises futuros devem comprovar se o aumento da neurogênese pelos tratamentos acontece no bulbo olfatório, pois já foi mostrado que a indução da neurogênese hipocampal nem sempre está acompanhada de um aumento similar no bulbo olfatório (BROWN et al., 2003).

Em resumo, nós mostramos que o aumento da neurogênese hipocampal tem efeitos anterógrados promnésicos exclusivamente na memória de medo contextual. Nossos achados sugerem que a diferença nas formas em que a neurogênese é induzida se traduz em mecanismos distintos de ação, e que essa é uma variável a ser levada em conta na análise dos efeitos da neurogênese na persistência da memória. Nossos resultados evidenciam também uma melhora no desempenho nos condicionamentos por pistas produzida unicamente pelo EE. Sugerimos que esses efeitos são independentes da neurogênese e podem estar ligados à modulação de estruturas como a amígdala. Finalmente, apesar deste estudo ter explorado alguns dos mecanismos por trás de 3 tratamentos de indução da neurogênese, ainda permanece obscuro como AND está agindo e de que forma o EE estaria modulando a amígdala para a melhora do aprendizado no condicionamento ao cheiro e na promoção da persistência do medo condicionado ao som.

4. CONCLUSÃO

A indução da neurogênese não tem uma relação linear com a performance mnemônica, em outras palavras, mais neurônios novos não se traduzem necessariamente em um aumento da persistência da memória, sendo que variáveis, como tipo de memória e formas de indução da neurogênese, podem determinar a influência das manipulações neurogênicas anterógradas. De igual forma, fatores como a linhagem podem ser determinantes na hora da escolha da tarefa ou da avaliação da persistência em tarefas sensíveis a manipulação da neurogênese.

Esta tese mostrou que existem diferenças entre as formas de aumento da neurogênese, sendo que a MEM e AND são ferramentas farmacológicas adequadas para induzir a produção de novos neurônios, tendo como principal vantagem uma alta resolução temporal e alvos menos esparsos. Particularmente no caso da MEM, nós sugerimos que seu uso seja ideal em estudos que procurem

relações de causa-efeito entre neurogênese e memória, porque não só induz o aumento de novos neurônios, como também tem um mecanismo bem conhecido. Entretanto, sob uma perspectiva translacional, mudanças sutis no ambiente e no dia a dia das pessoas, que impactem na sua cognição, são mais promissoras. É nesse cenário que o presente estudo contribui, ao demonstrar a robustez dos efeitos do EE sobre a persistência de memórias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current opinion in neurobiology*, v. 11, n. 2, p. 180–187, abr. 2001.
- ABRAHAM, Wickliffe C.; JONES, Owen D.; GLANZMAN, David L. *Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? npj Science of Learning*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41539-019-0048-y>>. , 2019
- AIMONE, James B. *et al.* Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological reviews*, v. 94, n. 4, p. 991–1026, out. 2014.
- AIMONE, James B.; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, v. 70, n. 4, p. 589–596, 26 maio 2011.
- AIMONE, James B.; WILES, Janet; GAGE, Fred H. Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. *Neuron*, v. 61, n. 2, p. 187–202, 29 jan. 2009.
- AKERS, Katherine G. *et al.* Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, v. 344, n. 6184, p. 598–602, 9 maio 2014.
- ALAM, Md Jahangir *et al.* Adult Neurogenesis Conserves Hippocampal Memory Capacity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 38, n. 31, p. 6854–6863, 1 ago. 2018.
- ALBENSI, Benedict C. *et al.* Why do many NMDA antagonists fail, while others are safe and effective at blocking excitotoxicity associated with dementia and acute injury? *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, v. 19, n. 5, p. 269–274, set. 2004.
- ALBERINI, Cristina M.; KANDEL, Eric R. The regulation of transcription in memory consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 1, p. a021741, 4 dez. 2014.
- ALBO, Zimbul; GRÄFF, Johannes. *Engram Excitement. Neuron*. [S.l: s.n.]. , 16 jan. 2019
- ALMEIDA-SANTOS, Ana F. *et al.* Social isolation impairs the persistence of social recognition memory by disturbing the glutamatergic tonus and the olfactory bulb-dorsal hippocampus coupling. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 473, 24 jan. 2019.
- ALONSO, Mariana *et al.* Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 41, p. 10508–10513, 11 out. 2006.

- ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *The Anatomical record*, v. 145, p. 573–591, abr. 1963.
- ALTMAN, J.; DAS, G. D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, v. 124, n. 3, p. 319–335, jun. 1965.
- ALTMAN, Joseph; DAS, Gopal D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *The Journal of comparative neurology*, v. 126, n. 3, p. 337–389, 1966.
- AMBROGINI, Patrizia *et al.* Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain research*, v. 1017, n. 1-2, p. 21–31, 13 ago. 2004.
- ANACKER, Christoph; DENNY, Christine Ann; HEN, René. *Regulation of hippocampal memory traces by neurogenesis. Neurogenesis (Austin, Tex.)*. [S.l.: s.n.], 17 set. 2015
- ANAGNOSTARAS, S. G.; GALE, G. D.; FANSELOW, M. S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus*, v. 11, n. 1, p. 8–17, 2001.
- AREOSA, Sastre A.; SHERRIFF, F. Memantine for dementia. *Cochrane database of systematic reviews*, n. 3, p. CD003154, 2003.
- ARRUDA-CARVALHO, Maithe *et al.* Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 34, n. 47, p. 15793–15803, 19 nov. 2014.
- ASOK, Arun *et al.* Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in neurosciences*, v. 42, n. 1, p. 14–22, jan. 2019.
- ATRI, Alireza *et al.* Validity, significance, strengths, limitations, and evidentiary value of real-world clinical data for combination therapy in Alzheimer's disease: comparison of efficacy and effectiveness studies. *Neurodegenerative Diseases*, v. 10, n. 1-4, p. 170–174, 2012.
- BAAS, Johanna M. *et al.* Fear conditioning in virtual reality contexts: a new tool for the study of anxiety. *Biological psychiatry*, v. 55, n. 11, p. 1056–1060, 1 jun. 2004.
- BADDELEY, Alan D.; KOPELMAN, Michael D.; WILSON, Barbara A. *The Handbook of Memory Disorders*. [S.l.]: Wiley, 2002.
- BAILEY, Craig H.; KANDEL, Eric R.; HARRIS, Kristen M. Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 7, p. a021758, 1 jul. 2015.
- BALDI, Elisabetta; LORENZINI, Carlo Ambrogio; BUCHERELLI, Corrado. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. *Neurobiology of learning and memory*, v. 81, n. 3, p. 162–166, maio 2004.
- BALOGH, Seth A. *et al.* Contextual and cued fear conditioning in C57BL/6J and DBA/2J mice: context discrimination and the effects of retention interval. *Behavioral neuroscience*, v. 116, n. 6, p. 947–957, dez. 2002.

- BARNEA, Anat; PRAVOSUDOV, Vladimir. Birds as a model to study adult neurogenesis: bridging evolutionary, comparative and neuroethological approaches. *The European journal of neuroscience*, v. 34, n. 6, p. 884–907, set. 2011.
- BATTIATO, Sebastiano. Entropy and gibbs distribution in image processing: An historical perspective. *University of Catania*, v. 6, n. 1, p. 1–21, 2001.
- BECKERS, Tom *et al.* What's wrong with fear conditioning? *Biological psychology*, v. 92, n. 1, p. 90–96, jan. 2013.
- BÉDÉCARRATS, Alexis; CHEN, Shanping; PEARCE, Kaycey. RNA from Trained Aplysia Can Induce an Epigenetic Engram for Long-Term. *eNeuro*, 5 (3), 2018. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/323077661.pdf>>.
- BEKINSCHTEIN, Pedro *et al.* Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? *Seminars in cell & developmental biology*, v. 22, n. 5, p. 536–542, jul. 2011.
- BEKINSCHTEIN, Pedro *et al.* Persistence of long-term memory storage: new insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. *Neurotoxicity research*, v. 18, n. 3-4, p. 377–385, nov. 2010.
- BEKINSCHTEIN, Pedro *et al.* Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.11.025>>. , 2007
- BEN-YAKOV, Aya; DUDAI, Yadin; MAYFORD, Mark R. Memory Retrieval in Mice and Men. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 7, n. 12, 5 out. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021790>>.
- BERGSTROM, Hadley C. The neurocircuitry of remote cued fear memory. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 71, p. 409–417, dez. 2016.
- BESNARD, Antoine; CABOCHE, Jocelyne; LAROCHE, Serge. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Progress in neurobiology*, v. 99, n. 1, p. 61–80, out. 2012.
- BEVILAQUA, Lia R. *et al.* Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotoxicity research*, v. 14, n. 4, p. 353–358, dez. 2008.
- BIELSKY, Isadora F. *et al.* The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. *Neuron*, v. 47, n. 4, p. 503–513, 18 ago. 2005.
- BINDU, B. *et al.* Short-term exposure to an enriched environment enhances dendritic branching but not brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus of rats with ventral subicular lesions. *Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.09.057>>. , 2007
- BIRBRAIR, Alexander *et al.* Nestin-GFP transgene reveals neural precursor cells in adult skeletal muscle. *PloS one*, v. 6, n. 2, p. e16816, 3 fev. 2011.
- BLANCHARD, Robert J. *Animal welfare beyond the cage...and beyond the evidence? Journal of applied animal welfare science: JAAWS*. [S.l.]: Informa UK Limited. , 2010
- BLISS, Tvp; COLLINGRIDGE, G. L. Persistent memories of long-term potentiation and the

- N-methyl-d-aspartate receptor. *Brain and neuroscience advances*, v. 3, p. 2398212819848213, jan. 2019.
- BLISS, T. V. P.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010274>>. , 1973
- BOLDRINI, Maura *et al.* Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell stem cell*, v. 22, n. 4, p. 589–599.e5, 5 abr. 2018.
- BONFANTI, Luca. Adult Neurogenesis 50 Years Later: Limits and Opportunities in Mammals. *Frontiers in neuroscience*, v. 10, p. 44, 19 fev. 2016.
- BORGES, Jorge Luis. *Siete noches*. [S.l.]: Alianza Editorial, 1999.
- BOURKE, Joanna. Fear and anxiety: writing about emotion in modern history. *History workshop journal: HWJ*, n. 55, p. 111–133, Primavera 2003.
- BOUTON, Mark E. *et al.* Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biological psychiatry*, v. 60, n. 4, p. 352–360, 15 ago. 2006.
- BRAGADO ALONSO, Sara *et al.* An increase in neural stem cells and olfactory bulb adult neurogenesis improves discrimination of highly similar odorants. *The EMBO journal*, v. 38, n. 6, 15 mar. 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15252/embj.201798791>>.
- BRANDT, Moritz D. *et al.* Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and cellular neurosciences*, v. 24, n. 3, p. 603–613, nov. 2003.
- BROWN, Jason *et al.* Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, v. 17, n. 10, p. 2042–2046, maio 2003.
- CAHILL, Shaina P. *et al.* Early survival and delayed death of developmentally-born dentate gyrus neurons. *Hippocampus*, v. 27, n. 11, p. 1155–1167, nov. 2017.
- CALLAGHAN, Bridget L.; LI, Stella; RICHARDSON, Rick. The elusive engram: what can infantile amnesia tell us about memory? *Trends in neurosciences*, v. 37, n. 1, p. 47–53, jan. 2014.
- CAMATS PERNA, Judith; ENGELMANN, Mario. Recognizing Others: Rodent's Social Memories. *Current topics in behavioral neurosciences*, v. 30, p. 25–45, 2017.
- CAMERON, Heather A.; GLOVER, Lucas R. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. *Annual review of psychology*, v. 66, p. 53–81, 3 jan. 2015.
- CARLETON, Alan *et al.* Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature neuroscience*, v. 6, n. 5, p. 507–518, maio 2003.
- CARRIÓN, Óscar Arias; BUÑUELOS, Tatiana Olivares; COLÍN, René Drucker. *Neurogénesis en el cerebro adulto*. *Revista de Neurología*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.33588/rn.4409.2006426>>. , 2007
- CASTRO, Fabiano S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Soul, body and the ancient greek civilization: the first observations of brain functioning and mental activities. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, v. 24, n. 4, p. 798–809, 2011.

- CHAAYA, N. *et al.* Localization of Contextual and Context Removed Auditory Fear Memory within the Basolateral Amygdala Complex. *Neuroscience*, v. 398, p. 231–251, 1 fev. 2019.
- CHAAYA, Nicholas; BATTLE, Andrew R.; JOHNSON, Luke R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 92, p. 43–54, set. 2018.
- CHENG, Sen; WERNING, Markus. What is episodic memory if it is a natural kind? *Synthese*, v. 193, n. 5, p. 1345–1385, maio 2016.
- CHEN, Patrick; HONG, Weizhe. Neural Circuit Mechanisms of Social Behavior. *Neuron*, v. 98, n. 1, p. 16–30, 4 abr. 2018.
- CHIANG, Ming-Ching *et al.* A role for CA3 in social recognition memory. *Behavioural brain research*, v. 354, p. 22–30, 15 nov. 2018.
- CLAYTON, Nicola S.; RUSSELL, James. Looking for episodic memory in animals and young children: prospects for a new minimalism. *Neuropsychologia*, v. 47, n. 11, p. 2330–2340, set. 2009.
- CLELLAND, C. D. *et al.* A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science*, v. 325, n. 5937, p. 210–213, 10 jul. 2009. Acesso em: 19 fev. 2021.
- CONTARINO, Angelo *et al.* Automated assessment of conditioning parameters for context and cued fear in mice. *Learning & memory*, v. 9, n. 2, p. 89–96, mar. 2002.
- CRAIK, Fergus I. M. Remembering: An Activity of Mind and Brain. *Annual review of psychology*, v. 71, p. 1–24, 4 jan. 2020.
- CURLIK, Daniel M., 2nd; SHORS, Tracey J. Learning increases the survival of newborn neurons provided that learning is difficult to achieve and successful. *Journal of cognitive neuroscience*, v. 23, n. 9, p. 2159–2170, set. 2011.
- DALLA, Christina *et al.* Neurogenesis and learning: acquisition and asymptotic performance predict how many new cells survive in the hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, v. 88, n. 1, p. 143–148, jul. 2007.
- DANIELSON, Nathan B. *et al.* Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron*, v. 90, n. 1, p. 101–112, 6 abr. 2016.
- DAVIS, Ronald L.; ZHONG, Yi. The Biology of Forgetting-A Perspective. *Neuron*, v. 95, n. 3, p. 490–503, 2 ago. 2017.
- DENARDO, Laura; LUO, Liqun. Genetic strategies to access activated neurons. *Current opinion in neurobiology*, v. 45, p. 121–129, ago. 2017.
- DENG, Wei; AIMONE, James B.; GAGE, Fred H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature reviews. Neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 339–350, maio 2010.
- DENG, Xiaofei *et al.* Parvalbumin interneuron in the ventral hippocampus functions as a discriminator in social memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 33, p. 16583–16592, 13 ago. 2019.

- DENNY, Christine A. *et al.* Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron*, v. 83, n. 1, p. 189–201, 2 jul. 2014.
- DHALIWAL, Jagroop *et al.* Doublecortin (DCX) is not Essential for Survival and Differentiation of Newborn Neurons in the Adult Mouse Dentate Gyrus. *Frontiers in neuroscience*, v. 9, p. 494, 2015.
- DIFEO, Gina; SHORS, Tracey J. Mental and physical skill training increases neurogenesis via cell survival in the adolescent hippocampus. *Brain research*, v. 1654, n. Pt B, p. 95–101, 1 jan. 2017.
- DOETSCH, Fiona; HEN, Rene. Young and excitable: the function of new neurons in the adult mammalian brain. *Current opinion in neurobiology*, v. 15, n. 1, p. 121–128, fev. 2005.
- DOLCOS, Florin *et al.* Emerging Directions in Emotional Episodic Memory. *Frontiers in psychology*, v. 8, p. 1867, 4 dez. 2017.
- DO-MONTE, Fabricio H. *et al.* Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 35, n. 8, p. 3607–3615, 25 fev. 2015.
- DRANOVSKY, Alex *et al.* Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron*, v. 70, n. 5, p. 908–923, 9 jun. 2011.
- DREW, Liam J.; FUSI, Stefano; HEN, René. Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus? *Learning & memory*, v. 20, n. 12, p. 710–729, 19 nov. 2013.
- DUDAI, Y. Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron*, v. 17, n. 3, p. 367–370, set. 1996.
- DUDAI, Yadin. *Memory from A to Z: Keywords, Concepts, and Beyond*. [S.l.]: Oxford University Press, 2004a.
- DUDAI, Yadin. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Current opinion in neurobiology*, v. 12, n. 2, p. 211–216, abr. 2002.
- DUDAI, Y.. Memory: It's all about representations. In: ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). *Science of memory: Concepts*. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1ª ed, p.13-16.
- DUDAI, Yadin. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of psychology*, v. 55, p. 51–86, 2004b.
- DUDAI, Yadin. The restless engram: consolidations never end. *Annual review of neuroscience*, v. 35, p. 227–247, 20 mar. 2012.
- DUDAI, Yadin; EDELSON, Micah G. Personal memory: Is it personal, is it memory? *Memory Studies*, v. 9, n. 3, p. 275–283, 1 jul. 2016.
- DUDAI, Yadin; EISENBERG, Mark. *Rites of Passage of the Engram*. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.003>>. , 2004
- DUDAI, Yadin; KARNI, Avi; BORN, Jan. *The Consolidation and Transformation of Memory*. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>>. , 2015
- DUDAI, Yadin; MORRIS, Richard G. M. *Memorable Trends*. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.039>>. , 2013

DYMOND, Simon *et al.* Fear Generalization in Humans: Systematic Review and Implications for Anxiety Disorder Research. *Behavior therapy*, v. 46, n. 5, p. 561–582, set. 2015.

EHNINGER, Dan *et al.* Enriched environment and physical activity reduce microglia and influence the fate of NG2 cells in the amygdala of adult mice. *Cell and tissue research*, v. 345, n. 1, p. 69–86, jul. 2011.

EKMAN, Paul. *An argument for basic emotions. Cognition and Emotion*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/02699939208411068>>. , 1992

EKMAN, Paul *et al.* *The Nature of Emotion: Fundamental Questions*. [S.l.]: Oxford University Press, 1994.

ENCINAS, Juan M. *et al.* Division-Coupled Astrocytic Differentiation and Age-Related Depletion of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell Stem Cell*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>>. , 2011

ENGELMANN, Mario. Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, v. 91, n. 1, p. 58–65, jan. 2009.

ENGELMANN, Mario; HÄDICKE, Jana; NOACK, Julia. Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nature protocols*, v. 6, n. 8, p. 1152–1162, 14 jul. 2011.

EPP, Jonathan R.; FRANKLAND, Paul W. *Re-engineering the Hippocampus. Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.008>>. , 2016

EPP, J. R.; SPRITZER, M. D.; GALEA, L. A. M. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*, v. 149, n. 2, p. 273–285, 26 out. 2007.

ERIKSSON, P. S. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, nov. 1998.

FABEL, Klaus *et al.* Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in neuroscience*, v. 3, p. 50, 10 nov. 2009.

FALLS, William A.; FOX, James H.; MACAULAY, Christina M. Voluntary exercise improves both learning and consolidation of cued conditioned fear in C57 mice. *Behavioural brain research*, v. 207, n. 2, p. 321–331, 5 mar. 2010.

FANSELOW, Michael S.; GALE, Greg D. The amygdala, fear, and memory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 985, p. 125–134, abr. 2003.

FANSELOW, M. S.; LEDOUX, J. E. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron*, v. 23, n. 2, p. 229–232, jun. 1999.

FEDERMAN, Noel *et al.* Epigenetic mechanisms and memory strength: a comparative study. *Journal of physiology, Paris*, v. 108, n. 4-6, p. 278–285, set. 2014.

FERGUSON, Jennifer N.; YOUNG, Larry J.; INSEL, Thomas R. The neuroendocrine basis of social recognition. *Frontiers in neuroendocrinology*, v. 23, n. 2, p. 200–224, abr. 2002.

FIORITI, Luana *et al.* The Persistence of Hippocampal-Based Memory Requires Protein Synthesis Mediated by the Prion-like Protein CPEB3. *Neuron*, v. 86, n. 6, p. 1433–1448, 17 jun. 2015.

FISCHER, Andre. Environmental enrichment as a method to improve cognitive function. What can we learn from animal models? *NeuroImage*, v. 131, p. 42–47, 1 maio 2016.

FLOR-GARCÍA, Miguel *et al.* Unraveling human adult hippocampal neurogenesis. *Nature protocols*, v. 15, n. 2, p. 668–693, fev. 2020.

FLYNN, Mark. *The Importance of Forgetting “Perishing” in Whitehead’s Cosmology and Epistemology. Interchange*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10780-005-2345-z>>. , 2005

FRANÇA, Thiago F. A. The evolutionary significance of hippocampal neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, v. 48, n. 9, p. 2945–2947, nov. 2018.

FRANKLAND, Paul W.; JOSSELYN, Sheena A.; KÖHLER, Stefan. The neurobiological foundation of memory retrieval. *Nature neuroscience*, v. 22, n. 10, p. 1576–1585, out. 2019.

FRANKLAND, Paul W.; KÖHLER, Stefan; JOSSELYN, Sheena A. *Hippocampal neurogenesis and forgetting. Trends in Neurosciences*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2013.05.002>>. , 2013

FREEDMAN, Morris *et al.* Theory of mind and recognition of facial emotion in dementia: challenge to current concepts. *Alzheimer disease and associated disorders*, v. 27, n. 1, p. 56–61, jan. 2013.

GALLISTEL, C. R. The Coding Question. *Trends in cognitive sciences*, v. 21, n. 7, p. 498–508, jul. 2017.

GAO, Aijing *et al.* Elevation of Hippocampal Neurogenesis Induces a Temporally Graded Pattern of Forgetting of Contextual Fear Memories. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 38, n. 13, p. 3190–3198, 28 mar. 2018.

GASCON, Eduardo; VUTSKITS, Laszlo; KISS, Jozsef Zoltan. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain research reviews*, v. 56, n. 1, p. 101–118, nov. 2007.

GERSHMAN, Samuel J.; DAW, Nathaniel D. Reinforcement Learning and Episodic Memory in Humans and Animals: An Integrative Framework. *Annual review of psychology*, v. 68, p. 101–128, 3 jan. 2017.

GE, Shaoyu *et al.* A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, v. 54, n. 4, p. 559–566, 24 maio 2007.

GE, Shaoyu *et al.* GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, v. 439, n. 7076, p. 589–593, 2 fev. 2006.

GISQUET-VERRIER, Pascale; RICCIO, David C. *Memory Integration as a Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis: Similarities, Differences and Perspectives. Frontiers in Systems Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fnsys.2018.00071>>. , 2019

GONÇALVES, J. Tiago *et al.* *Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. Cell*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>>. , 2016

GONZALEZ, Walter G. *et al.* Persistence of neuronal representations through time and damage in the hippocampus. *Science*, v. 365, n. 6455, p. 821–825, 23 ago. 2019.

GOODWIN, Shikha Jain. Neurogenesis: remembering all or forgetting some. *Journal of neurophysiology*, v. 119, n. 6, p. 2003–2006, 1 jun. 2018.

GRATZNER, H. G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, v. 218, n. 4571, p. 474–475, 29 out. 1982.

GREGORIAN, Caroline *et al.* Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 29, n. 6, p. 1874–1886, 11 fev. 2009.

GUSKJOLEN, Axel *et al.* Recovery of “Lost” Infant Memories in Mice. *Current biology: CB*, v. 28, n. 14, p. 2283–2290.e3, 23 jul. 2018.

GUSMÃO, Isabela D. *et al.* Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behavioural brain research*, v. 228, n. 2, p. 440–446, 17 mar. 2012.

HÄDICKE, Jana; ENGELMANN, Mario. Social investigation and long-term recognition memory performance in 129S1/SvImJ and C57BL/6JOLA_{Hsd} mice and their hybrids. *PLoS one*, v. 8, n. 1, p. e54427, 16 jan. 2013.

HALBACH, O. von Bohlen Und; VON BOHLEN UND HALBACH, O. *Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus*. *Cell and Tissue Research*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00441-007-0432-4>>. , 2007

HARDT, Oliver; NADER, Karim; NADEL, Lynn. Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends in cognitive sciences*, v. 17, n. 3, p. 111–120, mar. 2013.

HARTLEY, Catherine A.; PHELPS, Elizabeth A. Changing fear: the neurocircuitry of emotion regulation. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 136–146, jan. 2010.

HEBB, Donald Olding. *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. [S.l.]: Taylor & Francis Group, 2002.

HEGOBURU, Chloé *et al.* Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. *Learning & memory*, v. 21, n. 12, p. 651–655, dez. 2014.

HILL, Alexis S.; SAHAY, Amar; HEN, René. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 40, n. 10, p. 2368–2378, set. 2015.

HOLTMAAT, Anthony; CARONI, Pico. Functional and structural underpinnings of neuronal assembly formation in learning. *Nature neuroscience*, v. 19, n. 12, p. 1553–1562, dez. 2016.

HUCKLEBERRY, Kylie A. *et al.* Dorsal and ventral hippocampal adult-born neurons contribute to context fear memory. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 43, n. 12, p. 2487–2496, nov. 2018.

IACCARINO, Hannah F. *et al.* Gamma frequency entrainment attenuates amyloid load and modifies microglia. *Nature*, v. 540, n. 7632, p. 230–235, 7 dez. 2016.

IKRAR, Taruna *et al.* Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Frontiers in neural*

circuits, v. 7, p. 204, 26 dez. 2013.

IMAYOSHI, Itaru *et al.* Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience*, v. 11, n. 10, p. 1153–1161, out. 2008.

INDA, M. C.; MURAVIEVA, E. V.; ALBERINI, C. M. *Memory Retrieval and the Passage of Time: From Reconsolidation and Strengthening to Extinction*. *Journal of Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.4736-10.2011>>. , 2011

IRURETAGOYENA, Mirentxu I. *et al.* *Andrographolide Interferes with T Cell Activation and Reduces Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1124/jpet.104.072512>>. , 2005

ISHIKAWA, Rie *et al.* Hippocampal neurogenesis enhancers promote forgetting of remote fear memory after hippocampal reactivation by retrieval. *eLife*, v. 5, 26 set. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.17464>>.

IZQUIERDO, Ivan. *The Art of Forgetting*. *The Art of Forgetting*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-06716-2_2>. , 2015

IZQUIERDO, Iván *et al.* The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 80, n. 1, p. 115–127, mar. 2008.

JACOBS, S. A.; TSIEN, J. Z. Overexpression of the NR2A subunit in the forebrain impairs long-term social recognition and non-social olfactory memory. *Genes, brain, and behavior*, v. 13, n. 4, p. 376–384, abr. 2014.

JACOBS, Stephanie A.; TSIEN, Joe Z. genetic overexpression of NR2B subunit enhances social recognition memory for different strains and species. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. e36387, 27 abr. 2012.

JAIMES, Laura F. *et al.* Maturation of newborn neurons predicts social memory persistence in mice. *Neuropharmacology*, v. 171, p. 108102, jul. 2020.

JAIN, K. K. Evaluation of memantine for neuroprotection in dementia. *Expert opinion on investigational drugs*, v. 9, n. 6, p. 1397–1406, jun. 2000.

JANAK, Patricia H.; TYE, Kay M. *From circuits to behaviour in the amygdala*. *Nature*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature14188>>. , 2015

JARUKAMJORN, Kanokwan; NEMOTO, Nobuo. *Pharmacological Aspects of Andrographis paniculata on Health and Its Major Diterpenoid Constituent Andrographolide*. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1248/jhs.54.370>>. , 2008

JENSEN, Ellen C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. *Anatomical record* , v. 296, n. 3, p. 378–381, mar. 2013.

JOHNSTON, Stephen T. *et al.* Paradox of pattern separation and adult neurogenesis: A dual role for new neurons balancing memory resolution and robustness. *Neurobiology of learning and memory*, v. 129, p. 60–68, mar. 2016.

JOSSELYN, Sheena A. Continuing the search for the engram: examining the mechanism of fear memories. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN*, v. 35, n. 4, p. 221–228, jul. 2010.

- JOSSELYN, Sheena A.; FRANKLAND, Paul W. Infantile amnesia: a neurogenic hypothesis. *Learning & memory*, v. 19, n. 9, p. 423–433, 16 ago. 2012.
- JOSSELYN, Sheena A.; FRANKLAND, Paul W. *Memory Allocation: Mechanisms and Function. Annual Review of Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061956>>. , 2018
- JOSSELYN, Sheena A.; KÖHLER, Stefan; FRANKLAND, Paul W. Finding the engram. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 16, n. 9, p. 521–534, set. 2015.
- JOSSELYN, Sheena A.; KÖHLER, Stefan; FRANKLAND, Paul W. *Heroes of the Engram. The Journal of Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0056-17.2017>>. , 2017
- JOSSELYN, Sheena A.; TONEGAWA, Susumu. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, v. 367, n. 6473, 3 jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.aaw4325>>.
- JÚNIOR, P. A. A. *et al.* A Custom Microcontrolled and Wireless-Operated Chamber for Auditory Fear Conditioning. *bioRxiv*, 2019. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/738336v1.abstract>>.
- KANDEL, Eric R.; DUDAI, Yadin; MAYFORD, Mark R. The molecular and systems biology of memory. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 163–186, 27 mar. 2014.
- KARAKIS, Ioannis. Neuroscience and Greek mythology. *Journal of the history of the neurosciences*, v. 28, n. 1, p. 1–22, jan. 2019.
- KATCHE, Cynthia; CAMMAROTA, Martín; MEDINA, Jorge H. Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. *Neurobiology of learning and memory*, v. 106, p. 40–47, nov. 2013.
- KAZANIS, Ilias. Can adult neural stem cells create new brains? Plasticity in the adult mammalian neurogenic niches: realities and expectations in the era of regenerative biology. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 18, n. 1, p. 15–27, fev. 2012.
- KAZLAUCKAS, Vanessa *et al.* Enriched environment effects on behavior, memory and BDNF in low and high exploratory mice. *Physiology & behavior*, v. 102, n. 5, p. 475–480, 28 mar. 2011.
- KEE, N. *et al.* The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of neuroscience methods*, v. 115, n. 1, p. 97–105, 30 mar. 2002.
- KELTNER, Norman L.; WILLIAMS, Beth. Memantine: a new approach to Alzheimer's disease. *Perspectives in psychiatric care*, v. 40, n. 3, p. 123–124, jul. 2004.
- KEMPERMANN, Gerd. Adult Neurogenesis: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 8, n. 2, p. a018986, 18 dez. 2015.
- KEMPERMANN, Gerd. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 20, n. 4, p. 235–245, abr. 2019.
- KEMPERMANN, Gerd *et al.* Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell stem cell*, v. 23, n. 1, p. 25–30, 5 jul. 2018.
- KEMPERMANN, Gerd *et al.* Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in*

neurosciences, v. 27, n. 8, p. 447–452, ago. 2004.

KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *The European journal of neuroscience*, v. 16, n. 1, p. 129–136, jul. 2002.

KESSELS, Helmut W.; MALINOW, Roberto. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, v. 61, n. 3, p. 340–350, 12 fev. 2009.

KHEIRBEK, Mazen A.; TANNENHOLZ, Lindsay; HEN, René. NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 32, n. 25, p. 8696–8702, 20 jun. 2012.

KIRSCHEN, Gregory W.; SAILOR, Kurt A.; GE, Shaoyu. *Structural Plasticity Induced by Adult Neurogenesis. The Rewiring Brain*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803784-3.00002-0>>. , 2017

KITAMURA, Takashi *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, v. 356, n. 6333, p. 73–78, 7 abr. 2017.

KOGAN, Jeffrey H.; FRANKLANDAND, Paul W.; SILVA, Alcino J. *Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. Hippocampus*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1063\(2000\)10:1<47::aid-hipo5>3.0.co;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-1063(2000)10:1<47::aid-hipo5>3.0.co;2-6)>. , 2000

KO, Hyoung-Gon *et al.* Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Molecular brain*, v. 2, p. 1, 13 jan. 2009.

KOOIJ, Michael A. Van der; VAN DER KOOIJ, Michael A.; SANDI, Carmen. *Social memories in rodents: Methods, mechanisms and modulation by stress. Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.10.006>>. , 2012

KOUREMENOU, Ioanna; PIPER, Michael; ZALUCKI, Oressia. Adult Neurogenesis in the Olfactory System: Improving Performance for Difficult Discrimination Tasks? *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, v. 42, n. 10, p. e2000065, out. 2020.

KUMAR, Anil; SINGH, Arti; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological reports: PR*, v. 67, n. 2, p. 195–203, abr. 2015.

KUMAR, Ashutosh *et al.* ADULT NEUROGENESIS IN HUMANS: A Review of Basic Concepts, History, Current Research, and Clinical Implications. *Innovations in clinical neuroscience*, v. 16, n. 5-6, p. 30–37, 1 maio 2019.

KYRKE-SMITH, Madeleine; WILLIAMS, Joanna M. Bridging Synaptic and Epigenetic Maintenance Mechanisms of the Engram. *Frontiers in molecular neuroscience*, v. 11, p. 369, 5 out. 2018.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. *et al.* Immediate shock deficit in fear conditioning: Effects of shock manipulations. *Behavioral Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.120.4.873>>. , 2006

LA ROSA, Chiara; PAROLISI, Roberta; BONFANTI, Luca. Brain Structural Plasticity: From Adult Neurogenesis to Immature Neurons. *Frontiers in neuroscience*, v. 14, p. 75, 4 fev. 2020.

LAZAREWICZ, Maciej T. *et al.* Ketamine Modulates Theta and Gamma Oscillations. *Journal of*

- Cognitive Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1162/jocn.2009.21305>>. , 2010
- LAZAROV, Orly; HOLLANDS, Carolyn. Hippocampal neurogenesis: Learning to remember. *Progress in neurobiology*, v. 138-140, p. 1–18, mar. 2016.
- LEDOUX, Joseph. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cellular and molecular neurobiology*, v. 23, n. 4-5, p. 727–738, out. 2003.
- LEDOUX, Joseph E. Evolution of human emotion: a view through fear. *Progress in brain research*, v. 195, p. 431–442, 2012.
- LEE, Jonathan L. C.; MILTON, Amy L.; EVERITT, Barry J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 39, p. 10051–10056, 27 set. 2006.
- LEGGIO, Maria Giuseppa *et al.* Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behavioural brain research*, v. 163, n. 1, p. 78–90, 30 ago. 2005.
- LEUNER, Bendetta *et al.* Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 24, n. 34, p. 7477–7481, 25 ago. 2004.
- LIGHT, Gregory A. *et al.* Single-Dose Memantine Improves Cortical Oscillatory Response Dynamics in Patients with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 42, n. 13, p. 2633–2639, dez. 2017.
- LIKHTIK, Ekaterina; PAZ, Rony. Chapter 21 - Maladaptive learning and the amygdala—prefrontal circuit. In: CHEN, ALON (Org.). . *Stress Resilience*. [S.l.]: Academic Press, 2020. p. 323–348.
- LIM, Daniel A.; ALVAREZ-BUYLLA, Arturo. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 8, n. 5, 2 maio 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a018820>>.
- LIN, Yu-Ting *et al.* Conditional Deletion of Hippocampal CA2/CA3a Oxytocin Receptors Impairs the Persistence of Long-Term Social Recognition Memory in Mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 38, n. 5, p. 1218–1231, 31 jan. 2018.
- LIU, Jianwei *et al.* Andrographolide prevents human nucleus pulposus cells against degeneration by inhibiting the NF- κ B pathway. *Journal of cellular physiology*, v. 234, n. 6, p. 9631–9639, jun. 2019.
- LIU, Xu *et al.* Identification and Manipulation of Memory Engram Cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, v. 79, p. 59–65, 2014.
- LIU, Xu *et al.* Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, v. 484, n. 7394, p. 381–385, 22 mar. 2012.
- LIU, Xu; RAMIREZ, Steve; TONEGAWA, Susumu. Inception of a false memory by optogenetic manipulation of a hippocampal memory engram. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 369, n. 1633, p. 20130142, 5 jan. 2014.
- LIU, Y.; FUJISE, N.; KOSAKA, T. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus. I. General description. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, v. 108, n. 3, p. 389–403, mar. 1996.

- LIU, Yunlong *et al.* Social Isolation Induces Rac1-Dependent Forgetting of Social Memory. *Cell reports*, v. 25, n. 2, p. 288–295.e3, 9 out. 2018.
- LI, Wankun L. *et al.* Adult-born neurons facilitate olfactory bulb pattern separation during task engagement. *eLife*, v. 7, 13 mar. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.33006>>.
- LI, Xiang *et al.* Andrographolide ameliorates intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury by inhibiting neuroinflammation induction. *Neuropharmacology*, v. 141, p. 305–315, out. 2018.
- LLEDO, Pierre-Marie; VALLEY, Matt. *Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a018945>>. , 2016
- LO, Daphne; GROSSBERG, George T. Use of memantine for the treatment of dementia. *Expert review of neurotherapeutics*, v. 11, n. 10, p. 1359–1370, out. 2011.
- LUKAS, Michael *et al.* Oxytocin mediates rodent social memory within the lateral septum and the medial amygdala depending on the relevance of the social stimulus: male juvenile versus female adult conspecifics. *Psychoneuroendocrinology*, v. 38, n. 6, p. 916–926, jun. 2013.
- LÜSCHER DIAS, Thomaz *et al.* c-Fos expression predicts long-term social memory retrieval in mice. *Behavioural brain research*, v. 313, p. 260–271, 15 out. 2016.
- LYNCH, Gary; KRAMÁR, Enikő A.; GALL, Christine M. Protein synthesis and consolidation of memory-related synaptic changes. *Brain research*, v. 1621, p. 62–72, 24 set. 2015.
- MA, Jingyi; MUFTI, Asfandyar; STAN LEUNG, L. Effects of memantine on hippocampal long-term potentiation, gamma activity, and sensorimotor gating in freely moving rats. *Neurobiology of aging*, v. 36, n. 9, p. 2544–2554, set. 2015.
- MANDAIRON, Nathalie *et al.* Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behavioral neuroscience*, v. 120, n. 1, p. 173–179, fev. 2006.
- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annual review of neuroscience*, v. 24, p. 897–931, 2001.
- MAREN, Stephen; QUIRK, Gregory J. *Neuronal signalling of fear memory. Nature Reviews Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrn1535>>. , 2004
- MARÍN-BURGIN, Antonia; SCHINDER, Alejandro F. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. *Behavioural brain research*, v. 227, n. 2, p. 391–399, 14 fev. 2012.
- MARKHAM, Julie A.; JURASKA, Janice M. Social recognition memory: influence of age, sex, and ovarian hormonal status. *Physiology & behavior*, v. 92, n. 5, p. 881–888, 5 dez. 2007.
- MARKS, Elizabeth H.; FRANKLIN, Anna R.; ZOELLNER, Lori A. *Can't get it out of my mind: A systematic review of predictors of intrusive memories of distressing events. Psychological Bulletin*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1037/bul0000132>>. , 2018
- MARKWARDT, Sean J.; WADICHE, Jacques I.; OVERSTREET-WADICHE, Linda S. Input-specific GABAergic signaling to newborn neurons in adult dentate gyrus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 29, n. 48, p. 15063–15072, 2 dez. 2009.

- MARTÍNEZ-CANABAL, Alonso; LÓPEZ-OROPEZA, Grecia; DURAN, Pilar. *Is There a Role of Epigenetically Inherited Neurogenesis on Infantile Amnesia? Commentary: Intergenerational Transmission of the Positive Effects of Physical Exercise on Brain and Cognition. Frontiers in Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2019.01079>>. , 2019
- MATTHEWS, Gillian A. *et al.* Dorsal Raphe Dopamine Neurons Represent the Experience of Social Isolation. *Cell*, v. 164, n. 4, p. 617–631, 11 fev. 2016.
- MCGAUGH, James L. Consolidating memories. *Annual review of psychology*, v. 66, p. 1–24, 3 jan. 2015.
- MCKENZIE, Sam; EICHENBAUM, Howard. Consolidation and reconsolidation: two lives of memories? *Neuron*, v. 71, n. 2, p. 224–233, 28 jul. 2011.
- MIGNONE, John L. *et al.* Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *The Journal of comparative neurology*, v. 469, n. 3, p. 311–324, 9 fev. 2004.
- MILLER, Samara M.; SAHAY, Amar. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nature neuroscience*, v. 22, n. 10, p. 1565–1575, out. 2019.
- MÖBIUS, Hans J. Memantine: update on the current evidence. *International journal of geriatric psychiatry*, v. 18, n. Suppl 1, p. S47–54, set. 2003.
- MOLINUEVO, José L.; GARCIA-GIL, Vicente; VILLAR, Amparo. Memantine: an antiglutamatergic option for dementia. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, v. 19, n. 1, p. 10–18, jan. 2004.
- MONGIAT, L. A.; SCHINDER, A. F. *A Price to Pay for Adult Neurogenesis. Science*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.1254236>>. , 2014
- MONGIAT, Lucas A. *et al.* Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. *PLoS one*, v. 4, n. 4, p. e5320, 28 abr. 2009.
- MONTEIRO, Brisa M. M. *et al.* Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus*, v. 24, n. 2, p. 239–248, fev. 2014.
- MORICEAU, Stephanie *et al.* Dual circuitry for odor-shock conditioning during infancy: corticosterone switches between fear and attraction via amygdala. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 25, p. 6737–6748, 21 jun. 2006.
- MORRIS, R. G. M.. Memory: Distinctions and dilemmas. In: ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). *Science of memory: Concepts*. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1ª ed, p. 29-34.
- MOSKOVITCH, M.. Memory: Why the engram is elusive? In: ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). **Science of memory: Concepts**. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1ª ed, p. 17-22.
- MOURET, Aurélie *et al.* Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 28, n. 45, p. 11511–11516, 5 nov. 2008.
- MULLEN, R. J.; BUCK, C. R.; SMITH, A. M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.

Development, v. 116, n. 1, p. 201–211, set. 1992.

MURRAY, Elisabeth A.; WISE, Steven P.; GRAHAM, Kim S. *The Evolution of Memory Systems: Ancestors, Anatomy, and Adaptations*. [S.l.]: Oxford University Press, 2017.

NADEL, L.. Consolidation: The demise of the fixed trace. *In: ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). Science of memory: Concepts*. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1ª ed, p. 177-182.

NADEL, L. *et al.* Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, v. 36, n. 7, p. 1640–1645, ago. 2012.

NADEL, Lynn; BOHBOT, Veronique. *Consolidation of memory. Hippocampus*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <3.0.co;2-o">[http://dx.doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<56::aid-hipo1020>3.0.co;2-o](http://dx.doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<56::aid-hipo1020>3.0.co;2-o)>. , 2001

NAKASHIBA, Toshiaki *et al.* Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, v. 149, n. 1, p. 188–201, 30 mar. 2012.

NAKAZAWA, Kazu *et al.* NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 5, n. 5, p. 361–372, maio 2004.

NICOLA, Zeina; FABEL, Klaus; KEMPERMANN, Gerd. Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Frontiers in neuroanatomy*, v. 9, p. 53, 7 maio 2015.

NICOLL, Roger A. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, v. 93, n. 2, p. 281–290, 18 jan. 2017.

NOVAES, Leonardo S. *et al.* Environmental enrichment protects against stress-induced anxiety: Role of glucocorticoid receptor, ERK, and CREB signaling in the basolateral amygdala. *Neuropharmacology*, v. 113, n. Pt A, p. 457–466, fev. 2017.

OKUDA, Hiroaki *et al.* Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. *Journal of neuroscience research*, v. 87, n. 16, p. 3546–3553, dez. 2009.

OKUYAMA, Teruhiro. Social memory engram in the hippocampus. *Neuroscience research*, v. 129, p. 17–23, abr. 2018.

OKUYAMA, Teruhiro *et al.* Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, v. 353, n. 6307, p. 1536–1541, 30 set. 2016.

OLARIU, Ana *et al.* A natural form of learning can increase and decrease the survival of new neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus*, v. 15, n. 6, p. 750–762, 2005.

OPENDAK, Maya; BRIONES, Brandy A.; GOULD, Elizabeth. Social behavior, hormones and adult neurogenesis. *Frontiers in neuroendocrinology*, v. 41, p. 71–86, abr. 2016.

OPENDAK, Maya; GOULD, Elizabeth. Adult neurogenesis: a substrate for experience-dependent change. *Trends in cognitive sciences*, v. 19, n. 3, p. 151–161, mar. 2015.

OPPENHEIM, Ronald W. Adult Hippocampal Neurogenesis in Mammals (and Humans): The Death of a Central Dogma in Neuroscience and its Replacement by a New Dogma. *Developmental neurobiology*, v. 79, n. 3, p. 268–280, mar. 2019.

- OVERSTREET WADICHE, Linda *et al.* GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *Journal of neurophysiology*, v. 94, n. 6, p. 4528–4532, dez. 2005.
- PALLOTTO, Marta; DEPREZ, Francine. Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABAA-receptors. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 8, p. 166, 20 jun. 2014.
- PAN, Simon *et al.* Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation. *Nature neuroscience*, v. 23, n. 4, p. 487–499, abr. 2020.
- PAROLISI, Roberta; COZZI, Bruno; BONFANTI, Luca. Humans and Dolphins: Decline and Fall of Adult Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*, v. 12, p. 497, 20 jul. 2018.
- PEDERSEN, Patricia E.; WILLIAMS, Christina L.; BLASS, Elliott M. *Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1037/0097-7403.8.4.329>>. , 1982
- PEREIRA-CAIXETA, Ana Raquel *et al.* Inhibiting constitutive neurogenesis compromises long-term social recognition memory. *Neurobiology of learning and memory*, v. 155, p. 92–103, nov. 2018.
- PEREIRA-CAIXETA, Ana Raquel *et al.* Neurogenesis Inhibition Prevents Enriched Environment to Prolong and Strengthen Social Recognition Memory, But Not to Increase BDNF Expression. *Molecular neurobiology*, v. 54, n. 5, p. 3309–3316, jul. 2017.
- PERNA, Judith Camats; ENGELMANN, Mario. Recognizing others: rodent's social memories. *Social Behavior from Rodents to Humans*, p. 25–45, 2015.
- PERUSINI, Jennifer N.; FANSELOW, Michael S. Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety. *Learning & memory*, v. 22, n. 9, p. 417–425, set. 2015.
- PETREANU, Leopoldo; ALVAREZ-BUYLLA, Arturo. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 22, n. 14, p. 6106–6113, 15 jul. 2002.
- PHELPS, Elizabeth A.; HOFMANN, Stefan G. Memory editing from science fiction to clinical practice. *Nature*, v. 572, n. 7767, p. 43–50, ago. 2019.
- PLÜMPE, Tobias *et al.* Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC neuroscience*, v. 7, p. 77, 15 nov. 2006.
- POO, Mu-Ming *et al.* What is memory? The present state of the engram. *BMC biology*, v. 14, p. 40, 19 maio 2016.
- PRASHER, V. P. Review of donepezil, rivastigmine, galantamine and memantine for the treatment of dementia in Alzheimer's disease in adults with Down syndrome: implications for the intellectual disability population. *International journal of geriatric psychiatry*, v. 19, n. 6, p. 509–515, jun. 2004.
- PRICKAERTS, Jos *et al.* Learning and adult neurogenesis: survival with or without proliferation? *Neurobiology of learning and memory*, v. 81, n. 1, p. 1–11, jan. 2004.
- QUINN, Jennifer J. *et al.* Dorsal hippocampus involvement in delay fear conditioning depends upon the strength of the tone-footshock association. *Hippocampus*, v. 18, n. 7, p. 640–654, 2008.

RAKIC, P. DNA synthesis and cell division in the adult primate brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 457, p. 193–211, 1985.

RAMIREZ-AMAYA, Victor *et al.* Integration of new neurons into functional neural networks. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 47, p. 12237–12241, 22 nov. 2006.

RAMMES, G.; DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Pharmacodynamics of memantine: an update. *Current neuropharmacology*, v. 6, n. 1, p. 55–78, mar. 2008.

RAMSARAN, Adam I.; SCHLICHTING, Margaret L.; FRANKLAND, Paul W. The ontogeny of memory persistence and specificity. *Developmental cognitive neuroscience*, v. 36, p. 100591, abr. 2019.

RAO, Muddanna S.; SHETTY, Ashok K. Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *The European journal of neuroscience*, v. 19, n. 2, p. 234–246, jan. 2004.

REDONDO, Roger L. *et al.* Bidirectional switch of the valence associated with a hippocampal contextual memory engram. *Nature*, v. 513, n. 7518, p. 426–430, 18 set. 2014.

RESSLER, Reed L.; MAREN, Stephen. Synaptic encoding of fear memories in the amygdala. *Current opinion in neurobiology*, v. 54, p. 54–59, fev. 2019.

REYNOLDS, B. A.; WEISS, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, v. 255, n. 5052, p. 1707–1710, 27 mar. 1992.

RICHARDS, Blake A.; FRANKLAND, Paul W. The Persistence and Transience of Memory. *Neuron*, v. 94, n. 6, p. 1071–1084, 21 jun. 2017.

RICHTER, Karin; WOLF, Gerald; ENGELMANN, Mario. Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learning & memory*, v. 12, n. 4, p. 407–413, jul. 2005.

ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). **Science of memory: Concepts**. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1^a ed.

ROGAWSKI, Michael A.; WENK, Gary L. *The Neuropharmacological Basis for the Use of Memantine in the Treatment of Alzheimer's Disease*. *CNS Drug Reviews*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1527-3458.2003.tb00254.x>>. , 2006

ROSS, W.; HALL, P. A. Ki67: from antibody to molecule to understanding? *Clinical molecular pathology*, v. 48, n. 3, p. M113–7, jun. 1995.

ROY, Dheeraj S.; KITAMURA, Takashi; *et al.* Distinct Neural Circuits for the Formation and Retrieval of Episodic Memories. *Cell*, v. 170, n. 5, p. 1000–1012.e19, 24 ago. 2017.

ROY, Dheeraj S.; MURALIDHAR, Shruti; *et al.* Silent memory engrams as the basis for retrograde amnesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 46, p. E9972–E9979, 14 nov. 2017.

RUNYAN, Jason D.; MOORE, Anthony N.; DASH, Pramod K. *Coordinating what we've learned about memory consolidation: Revisiting a unified theory*. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.02.010>>. , 2019

SAHAY, Amar *et al.* Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, v. 472, n. 7344, p. 466–470, 28 abr. 2011.

SAILOR, Kurt A.; SCHINDER, Alejandro F.; LLEDO, Pierre-Marie. *Adult neurogenesis beyond the niche: its potential for driving brain plasticity*. *Current Opinion in Neurobiology*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2016.12.001>>. , 2017

SALE, Alessandro; BERARDI, Nicoletta; MAFFEI, Lamberto. *Environment and Brain Plasticity: Towards an Endogenous Pharmacotherapy*. *Physiological Reviews*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00036.2012>>. , 2014

SAMANTA, Anumita; ALONSO, Alejandra; GENZEL, Lisa. Memory reactivations and consolidation: considering neuromodulators across wake and sleep. *Current Opinion in Physiology*, v. 15, p. 120–127, 1 jun. 2020.

SANDERS, Matthew J.; WILTGEN, Brian J.; FANSELOW, Michael S. The place of the hippocampus in fear conditioning. *European journal of pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 217–223, 28 fev. 2003.

SANKUR, Buğlent. *Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation*. *Journal of Electronic Imaging*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1117/1.1631315>>. , 2004

SANTOS, S. D. *et al.* Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.02.037>>. , 2009

SARA, S. J.. Consolidation: From hypothesis to paradigm to concept. *In: ROEDIGER, H. L., III; DUDAI, Y.; FITZPATRICK, S. M. (ORGS.). Science of memory: Concepts*. New York, NY, US: Oxford University Press Science of memory, 2007. 1ª ed, p. 183-189.

SAXE, Michael D. *et al.* Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 46, p. 17501–17506, 14 nov. 2006.

SCHINDELIN, Johannes *et al.* The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular reproduction and development*, v. 82, n. 7-8, p. 518–529, jul. 2015.

SCHLÜTER, C. *et al.* The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of cell biology*, v. 123, n. 3, p. 513–522, nov. 1993.

SCHMIDT, Brandy; MARRONE, Diano F.; MARKUS, Etan J. Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behavioural brain research*, v. 226, n. 1, p. 56–65, 1 jan. 2012.

SCHMIDT-HIEBER, Christoph; JONAS, Peter; BISCHOFBERGER, Josef. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, v. 429, n. 6988, p. 184–187, 13 maio 2004.

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, v. 182, n. 3, p. 311–322, mar. 2000.

SEVELINGES, Yannick *et al.* Enduring effects of infant memories: infant odor-shock conditioning attenuates amygdala activity and adult fear conditioning. *Biological psychiatry*, v. 62, n. 10, p. 1070–1079, 15 nov. 2007.

SHACKMAN, Alexander J.; FOX, Andrew S. Contributions of the Central Extended Amygdala to Fear and Anxiety. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 36, n. 31, p. 8050–8063, 3 ago. 2016.

SHAW, Alexander D. *et al.* Ketamine amplifies induced gamma frequency oscillations in the human cerebral cortex. *European Neuropsychopharmacology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.04.012>>. , 2015

SHIONOYA, Kiseko *et al.* It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00128>>. , 2013

SHORS, Tracey J. *The Adult Brain Makes New Neurons, and Effortful Learning Keeps Them Alive.* *Current Directions in Psychological Science*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/0963721414540167>>. , 2014

SHULZ, D. E. Memories of memories: the endless alteration of the engram. *Neuron*, v. 28, n. 1, p. 25–29, out. 2000.

SIMPSON, Joy; KELLY, John P. The effects of isolated and enriched housing conditions on baseline and drug-induced behavioural responses in the male rat. *Behavioural brain research*, v. 234, n. 2, p. 175–183, 1 out. 2012.

SMART, I. *The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection.* *The Journal of Comparative Neurology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/cne.901160306>>. , 1961

SMART, I.; LEBLOND, C. P. Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injection of thymidine-H3. *The Journal of comparative neurology*, v. 116, n. 3, p. 349–367, jun. 1961.

SMITH, A. S. *et al.* Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular psychiatry*, v. 21, n. 8, p. 1137–1144, ago. 2016.

SNYDER, Jason S. *et al.* Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 29, n. 46, p. 14484–14495, 18 nov. 2009.

SNYDER, Jason S. Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis. *Trends in neurosciences*, v. 42, n. 3, p. 164–178, mar. 2019.

SORRELLS, Shawn F. *et al.* Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, v. 555, n. 7696, p. 377–381, 15 mar. 2018.

STEIGER, Frauke *et al.* Behavioral and central correlates of contextual fear learning and contextual modulation of cued fear in posttraumatic stress disorder. *International journal of psychophysiology: official journal of the International Organization of Psychophysiology*, v. 98, n. 3 Pt 2, p. 584–593, dez. 2015.

- STEINER, Barbara *et al.* Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia*, v. 46, n. 1, p. 41–52, 1 abr. 2004.
- STONE, Scellig S. D. *et al.* Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 31, n. 38, p. 13469–13484, 21 set. 2011.
- SULLIVAN, R. M. *et al.* Olfactory classical conditioning in neonates. *Pediatrics*, v. 87, n. 4, p. 511–518, abr. 1991.
- SULTAN, S. *et al.* Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 24, n. 7, p. 2355–2363, jul. 2010.
- SUN, Yajie; GOOCH, Helen; SAH, Pankaj. Fear conditioning and the basolateral amygdala. *F1000Research*, v. 9, 28 jan. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.21201.1>>.
- SUZUKI, Akinobu *et al.* Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 31, n. 24, p. 8786–8802, 15 jun. 2011.
- TAKEHARA-NISHIUCHI, Kaori. Neurobiology of systems memory consolidation. *The European journal of neuroscience*, 6 fev. 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/ejn.14694>>.
- TANIMIZU, Toshiyuki *et al.* Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 37, n. 15, p. 4103–4116, 12 abr. 2017.
- TATSUKAWA, Tetsuya *et al.* Impairments in social novelty recognition and spatial memory in mice with conditional deletion of *Scn1a* in parvalbumin-expressing cells. *Neurobiology of disease*, v. 112, p. 24–34, abr. 2018.
- TAUPIN, Philippe. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, v. 53, n. 1, p. 198–214, jan. 2007.
- TEMPRANA, Silvio G. *et al.* Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron*, v. 85, n. 1, p. 116–130, 7 jan. 2015.
- TERRANOVA, Joseph I.; OGAWA, Sachie K.; KITAMURA, Takashi. Adult hippocampal neurogenesis for systems consolidation of memory. *Behavioural brain research*, v. 372, p. 112035, 17 out. 2019.
- THAKUR, Ajit Kumar; CHATTERJEE, Shyam Sunder; KUMAR, Vikas. Adaptogenic potential of andrographolide: An active principle of the king of bitters (*Andrographis paniculata*). *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, v. 5, n. 1, p. 42–50, jan. 2015.
- THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, v. 96, n. 6, p. 1000–1006, dez. 1982.
- TONEGAWA, Susumu; LIU, Xu; *et al.* Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>>. , 2015
- TONEGAWA, Susumu; PIGNATELLI, Michele; *et al.* Memory engram storage and retrieval. *Current*

opinion in neurobiology, v. 35, p. 101–109, dez. 2015.

TONEGAWA, Susumu; MORRISSEY, Mark D.; KITAMURA, Takashi. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 19, n. 8, p. 485–498, ago. 2018.

TONI, Nicolas *et al.* *Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. Nature Neuroscience*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nn1908>>. , 2007

TONI, Nicolas; SCHINDER, Alejandro F. Maturation and Functional Integration of New Granule Cells into the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 8, n. 1, p. a018903, 4 dez. 2015.

TRONEL, Sophie *et al.* Adult-born dentate neurons are recruited in both spatial memory encoding and retrieval. *Hippocampus*, v. 25, n. 11, p. 1472–1479, nov. 2015.

TULVING, Endel; CRAIK, Fergus I. M. *The Oxford Handbook of Memory*. [S.l.]: Oxford University Press, USA, 2005.

VALENTINUZZI, Verónica S. *et al.* Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice. *Animal learning & behavior*, v. 29, n. 2, p. 133–142, 1 maio 2001.

VANELZAKKER, Michael B. *et al.* From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiology of learning and memory*, v. 113, p. 3–18, set. 2014.

VAN PRAAG, Henriette. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular medicine*, v. 10, n. 2, p. 128–140, 20 fev. 2008.

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

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, v. 2, n. 3, p. 266–270, mar. 1999.

VARELA-NALLAR, Lorena *et al.* *Andrographolide Stimulates Neurogenesis in the Adult Hippocampus. Neural Plasticity*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/935403>>. , 2015

VETERE, Gisella *et al.* Memory formation in the absence of experience. *Nature neuroscience*, v. 22, n. 6, p. 933–940, jun. 2019.

VEYRAC, Alexandra *et al.* *Novelty Determines the Effects of Olfactory Enrichment on Memory and Neurogenesis Through Noradrenergic Mechanisms. Neuropsychopharmacology*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2008.191>>. , 2009

VIGUERA EDITORES S L. *Acción de la memantina sobre la alteración cognitiva del paciente con demencia: reflexiones tras dos años de experiencia en España : Neurología.com*. Disponível em: <<https://www.neurologia.com/articulo/2005336>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

VUKOVIC, Jana *et al.* Immature doublecortin-positive hippocampal neurons are important for learning but not for remembering. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 33, n. 15, p. 6603–6613, 10 abr. 2013.

WADDELL, Jaylyn; ANDERSON, Megan L.; SHORS, Tracey J. Changing the rate and hippocampal dependence of trace eyeblink conditioning: slow learning enhances survival of new neurons. *Neurobiology*

of learning and memory, v. 95, n. 2, p. 159–165, fev. 2011.

WANG, Sabrina; SCOTT, Brian W.; MARTIN WOJTOWICZ, J. *Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat. Journal of Neurobiology*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <3.0.co;2-j">[http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(20000205\)42:2<248::aid-neu8>3.0.co;2-j](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(20000205)42:2<248::aid-neu8>3.0.co;2-j)>. , 2000

WANISCH, Klaus; WOTJAK, Carsten T.; ENGELMANN, Mario. Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behavioural brain research*, v. 186, n. 2, p. 191–196, 25 jan. 2008.

WEHNER, Jeanne M.; RADCLIFFE, Richard A. Cued and contextual fear conditioning in mice. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]*, v. Chapter 8, p. Unit 8.5C, set. 2004.

WINSLOW, James T. *Mouse Social Recognition and Preference. Current Protocols in Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/0471142301.ns0816s22>>. , 2003

WIXTED, John T. *et al.* Coding of episodic memory in the human hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 5, p. 1093–1098, 30 jan. 2018.

WOJTOWICZ, J. Martin; MARTIN WOJTOWICZ, J.; KEE, Nohjin. *BrdU assay for neurogenesis in rodents. Nature Protocols*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.224>>. , 2006

YANG, Chih-Hao *et al.* Multi-Targeting Andrographolide, a Novel NF- κ B Inhibitor, as a Potential Therapeutic Agent for Stroke. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 8, 27 jul. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/ijms18081638>>.

YANG YU, Bo *et al.* Image processing and classification algorithm for yeast cell morphology in a microfluidic chip. *Journal of biomedical optics*, v. 16, n. 6, p. 066008, jun. 2011.

YEN, J. C.; CHANG, F. J.; CHANG, S. A new criterion for automatic multilevel thresholding. *IEEE transactions on image processing: a publication of the IEEE Signal Processing Society*, v. 4, n. 3, p. 370–378, 1995.

YOKOSE, Jun *et al.* Overlapping memory trace indispensable for linking, but not recalling, individual memories. *Science*, v. 355, n. 6323, p. 398–403, 27 jan. 2017.

ZHAO, Chunmei *et al.* Spine morphogenesis in newborn granule cells is differentially regulated in the outer and middle molecular layers. *The Journal of comparative neurology*, v. 523, n. 10, p. 1588, 1 jul. 2015.

ZILKHA, Noga *et al.* From classic ethology to modern neuroethology: overcoming the three biases in social behavior research. *Current opinion in neurobiology*, v. 38, p. 96–108, jun. 2016.

ZIMPRICH, Annemarie *et al.* Assessing Sociability, Social Memory, and Pup Retrieval in Mice. *Current protocols in mouse biology*, v. 7, n. 7, p. 287–305, 20 dez. 2017.