

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CAIO MARTINS DE CASTRO

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL SOBRE A FISIOLOGIA DO
BULBO OLFATÓRIO EM CAMUNDONGOS ICR-CD1**

BELO HORIZONTE

2020

CAIO MARTINS DE CASTRO

**EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL SOBRE A FISIOLOGIA DO
BULBO OLFATÓRIO EM CAMUNDONGOS ICR-CD1**

Dissertação de mestrado entregue ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Grace Schenatto Pereira Moraes

Coorientadora: Dr^ª. Ana Flávia Santos Almeida

BELO HORIZONTE

2020

043

Castro, Caio Martins de.

Efeitos do isolamento social sobre a fisiologia do bulbo olfatório em camundongos ICR-CD1 [manuscrito] / Caio Martins de Castro. - 2020.
86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dr^a. Grace Schenatto Pereira Moraes. Co-orientadora: Dr^a. Ana Flávia Santos Almeida.

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

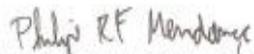
1. Fisiologia. 2. Isolamento Social. 3. Memória. 4. Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Almeida, Ana Flávia Santos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

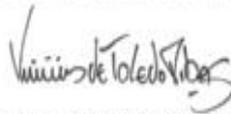
"EFEITOS DO ISOLAMENTO SOCIAL SOBRE A FISIOLOGIA DO BULBO OLFATÓRIO EM CAMUNDONGOS ICR-CD1"

CAIO MARTINS DE CASTRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 27 de março de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROF. DR. PHILIPPE RIBEIRO FURTADO DE MENDONÇA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. VINICIUS DE TOLEDO RIBAS
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROFA. DRA. ANA FLÁVIA SANTOS ALMEIDA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORIENTADORA



PROFA. DRA. GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

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

Belo Horizonte, 27 de março de 2020

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos e Creuza, agradeço pelo suporte durante todos estes anos de estudos. Pelas palavras de incentivo e afeto de vocês.

A minha orientadora, Grace Schenatto Pereira Moraes, agradeço por todos os conselhos e ensinamentos. Eu sempre aprendi muito com você.

Aos meus irmãos, Camila e Carlos, por estarem sempre ao meu lado me incentivando durante todo esse trajeto acadêmico. Muito obrigado por tudo!

A minha amiga e coorientadora, Ana Flávia, que sempre esteve ao meu lado. Agradeço muito por todos os momentos bons que passamos e que ainda vamos passar juntos. Aprendo muito com você todos os dias. Você é um exemplo para mim.

A Laura e Lara por estarem sempre ao meu lado. Muito obrigado pelo apoio em todos os experimentos deste projeto. A amizade de vocês foi um presente pra mim.

A Ana Maria e ao professor Christopher Kushmerick pela colaboração nos experimentos de eletrofisiologia. Os experimentos realizados no Laboratório de Eletrofisiologia celular foram essenciais para a conclusão deste projeto. Novamente, muito obrigado!

Ao Leonardo Guarnieri pela colaboração no experimento de ressonância magnética estrutural. Este experimento foi fundamental para o trabalho.

Aos meus amigos do Núcleo de Neurociências, em especial a Ana Luiza e Lorena Terene, agradeço por todos os momentos de diversão dentro e fora do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica, Harrison Santero e Matheus Costa, pela ajuda nos experimentos.

As minhas amigas Jéssica Samara e Isabella Gurgel pelo companheirismo e cumplicidade de vocês. Sempre que precisei vocês estavam presentes para me ajudar. Muito obrigado!

Aos professores do Núcleo de Neurociências, Márcio Moraes, André Massensini, Juliana Tavares, Bruno Resende e Cleiton Lopes. Agradeço por contribuírem com importantes sugestões e críticas para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A todos os meus amigos aqui mencionados e os que não foram citados, mas que estiveram presentes em diferentes fases deste trabalho, agradeço pelos momentos de diversão, conversas e risadas.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEMIG agradeço o suporte financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

As interações sociais são essenciais para a manutenção da cognição. Nesta perspectiva, o isolamento social (IS) pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios cognitivos. De fato, o IS pode modificar vários parâmetros fisiológicos no cérebro causando transtornos afetivos e prejuízos de memória. No primeiro capítulo deste trabalho, investigamos se o IS de 7 dias altera a estrutura e a fisiologia do bulbo olfatório (BO) em camundongos ICR-CD1. Através de imagens de ressonância magnética estrutural demonstramos que o IS reduz o volume do BO. Adicionalmente, registros eletrofisiológicos *in vitro* mostraram que o IS diminui a excitabilidade das células mitrais/tufadas do BO, ao mesmo tempo em que aumenta as correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas nestas células. Ainda, por diferentes paradigmas comportamentais demonstramos que o IS não prejudica a percepção e discriminação de odores sociais, assim como não induz comportamentos tipo-ansioso e tipo-depressivo. Entretanto, o IS teve efeito amnésico em memórias olfatórias de longa-duração. No segundo capítulo demonstramos a participação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) na consolidação da memória de reconhecimento social. Inicialmente, verificamos um aumento dos níveis de expressão da isoforma madura desta proteína (m-BDNF) no BO de animais agrupados 12 horas após o treino da tarefa de reconhecimento social. O bloqueio do m-BDNF neste ponto da consolidação impediu que animais agrupados apresentassem a memória de reconhecimento social de longa-duração. Por outro lado, a administração do hr BDNF intra-BO em animais isolados, neste mesmo ponto da consolidação, não teve efeito promnóstico em reverter o déficit de memória social causado pelo isolamento. Assim sendo, mostramos que o IS altera a atividade eletrofisiológica do BO e este efeito parece prejudicar memórias olfatórias de longa-duração. Além disso, o m-BDNF expresso na fase tardia da consolidação da memória de reconhecimento social mostrou ser essencial para o estabelecimento de um traço de memória de longa-duração.

Palavras chaves: Isolamento social; Memória social; BDNF.

Abstract

Social interactions are crucial for the maintenance of the cognition. In this perspective, social isolation (SI) may be a risk factor for the development of cognitive disorders. In fact, SI can change a variety of physiologic parameters in the brain inducing emotional disorders and memory impairment. In the first chapter of the present work, we evaluated whether SI of 7 days causes changes in the structure and physiology in ICR-CD1 mice olfactory bulb (OB). Through structural magnetic resonance images, we demonstrated that SI reduces the OB volume. *In vitro* electrophysiological studies showed that SI decrease the excitability of the mitral/tufted cells in the OB, simultaneously it increases the spontaneous excitatory postsynaptic currents within these cells. Additionally, we demonstrated through different behavior paradigms that SI does not impair the social odor perception and discrimination, as well as it does not induce anxiety-like or depressive-like behaviors. However, SI showed an amnesic effect in long-term olfactory memories. In the second chapter, we demonstrated the role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the consolidation of social recognition memory. Initially, we found an increase in the expression levels of the mature isoform of this protein (m-BDNF) in the OB of animals grouped 12 hours post social recognition training. The m-BDNF blockage at this consolidation point avoided grouped animals to present long-term social recognition memory. At the same consolidation point, the intra-OB hr BDNF administration in isolated animals showed no promnestic effect in reversing the social memory deficit caused by isolation. Therefore, we show that SI alters the electrophysiological activity of the OB and this effect seems to impair the long-term olfactory memories. In addition, the m-BDNF expressed in the late consolidation of social recognition memory proved to be essential for the establishment of a long-term memory trace.

Key words: Social isolation; Social memory; BDNF.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Isolamento social e seus efeitos biológicos	15
1.2. Sistema olfatório	16
1.3. Formação da memória	20
1.4. Memória social	22
1.5. Bases moleculares da memória de longa-duração: protagonismo do BDNF ..	25

CAPÍTULO 1

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	30
2.1. Justificativa	30
2.2. Objetivo	30
2.3. Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. Animais e condições de alojamento.....	31
3.2. Ressonância magnética estrutural	31
3.3. Patch clamp.....	32
3.3.1. Preparação das fatias	32
3.3.2. Registros eletrofisiológicos	32
3.3.3. Análise morfológica	34
3.3.4. Seleção das células mitrais/tufadas para análise.....	35
3.3.5. Análise dos dados	36
3.4. Teste de comportamento exploratório	36
3.5. Teste de suspensão pela cauda.....	37
3.6. Labirinto em cruz elevado	37
3.7. Teste de olfação para odores sociais.....	38

3.7.1. Tarefa para avaliar a detecção de odores sociais.....	38
3.7.2. Tarefa de habituação/desabituação social.....	40
3.8. Condicionamento olfatório	41
3.9. Tarefa de reconhecimento social	42
3.10 Análise estatística	42
4. RESULTADOS	44

CAPÍTULO 2

5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	57
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
6.1. Western Blotting	59
6.2. Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias.....	60
6.3. Tratamento farmacológico	61
6.4. Análise estatística	61
7. RESULTADOS	63
8. DISCUSSÃO.....	70
9. CONCLUSÃO.....	74
10. REFERÊNCIAS	75

Lista de figuras

Figura 1 - Sistema olfatório principal de camundongos.....	17
Figura 2 - Representação das sinapses na região glomerular.....	18
Figura 3 - Circuito neural do bulbo olfatório	19
Figura 4 - Projeções das células mitrais e tufadas para o córtex olfatório.....	20
Figura 5 - Representação ilustrativa dos paradigmas residente intruso e discriminação social.....	23
Figura 6 - Representação esquemática das áreas cerebrais envolvidas no processamento da memória social.....	25
Figura 7 - Representação esquemática da síntese e maturação do BDNF.	26
Figura 8 - Cascatas de sinalização intracelular ativadas pela interação do m-BDNF com o receptor TrkB.....	27
Figura 9 - Fotomicrografias do bulbo olfatório.....	34
Figura 10 – Identificação das células mitrais.	35
Figura 11 - Imagem representativa da caixa de locomoção.	36
Figura 12 - Imagem ilustrativa do teste suspensão pela cauda.....	37
Figura 13 - Imagem ilustrativa do labirinto em cruz elevado.	38
Figura 14 - Caixa utilizada no teste de odor espacial.....	39
Figura 15 – Tarefa de odor espacial: disposição relativa dos quadrantes em relação ao alvo.	40
Figura 16 - Imagem ilustrativa do teste da habituação/desabituação.	41
Figura 17 - Imagem ilustrativa do condicionamento olfatório.....	42

Figura 18 - O isolamento social reduziu o volume do bulbo olfatório, sem alterar o volume total do cérebro.	44
Figura 19 - O isolamento social alterou a excitabilidade das células mitrais, sem afetar o potencial de repouso e a resistência de entrada.	45
Figura 20 - O isolamento social aumentou a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias nas células mitrais/tufadas.....	47
Figura 21 - O isolamento social não alterou a frequência das correntes pós-sinápticas inibitórias nas células mitrais/tufadas.....	48
Figura 22 - O isolamento social não alterou o comportamento exploratório.	49
Figura 23 - O isolamento social não induziu comportamento tipo-depressivo.....	49
Figura 24 - O isolamento social não induziu comportamento tipo-ansioso.....	50
Figura 25 - O isolamento social não prejudicou a detecção de odores sociais.....	51
Figura 26 - O isolamento social não prejudicou a capacidade discriminatória de odores sociais..	53
Figura 27 - O isolamento social prejudicou a memória de condicionamento olfatório de longa-duração.	54
Figura 28 - O isolamento social prejudicou a memória de reconhecimento social de longa-duração, mas não a memória de curta-duração.	55
Figura 29 - Fotografia de corte histológico do bulbo olfatório.	61
Figura 30 - A expressão do m-BDNF no bulbo olfatório aumentou 12 e 18 horas após o treino da tarefa de reconhecimento social.	63
Figura 31 - O bloqueio do m-BDNF no bulbo olfatório 12 horas após o treino prejudicou a consolidação da memória de reconhecimento social.	65
Figura 32 - A administração do <i>hr</i> BDNF no bulbo olfatório de animais isolados não teve efeito promnóstico na memória de reconhecimento social.....	66

Figura 33 - Não houve diferença no tempo de investigação social entre os treinos realizados nas fases clara e escura do ritmo circadiano..... 67

Figura 34 - Os níveis de expressão do BDNF 12 horas pós-treino, com ou sem aprendizado, não apresentaram diferença no bulbo olfatório de animais agrupados e isolados..... 68

Lista de abreviações e siglas

aCSF	Solução artificial do líquido cérebro-espinhal
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BO	Bulbo olfatório
CA	Corno Ammon
CTPMag	Centro de Tecnologia e Pesquisa em Magneto-Ressonância
D-AP5	Ácido D-(-)- 2-amino-5 fosfonoaléico
dHIP	Hipocampo dorsal
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilase
GC	Célula granular
GTP-ases	Hidrolases de trifosfato de guanosina
hrBDNF	BDNF recombinante humano
IRM	Imagem por ressonância magnética
IS	Isolamento social
LTP	Potenciação a longo prazo
L-LTP	Potenciação a longo prazo tardia
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
m-BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro maduro
MCD	Memória de curta-duração
MLD	Memória de longa-duração
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4 tetra-hidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida
NMDA	N-metil-D-aspartato
NSO	Neurônio sensorial olfatório
PBS	Solução tampão de fosfato
PGC	Célula justaglomerular
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PLC-γ	fosfolipase C- γ
pró-BDNF	Precursor do fator neurotrófico derivado do cérebro
PVN	Núcleo paraventricular hipotalâmico
PVPI	Iodopovidona

Rho	Ras homolog
sEPSC	Correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas
sIPSC	Correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas
SON	Núcleo supraóptico
SVZ	Zona subventricular
TH	Tirosina hidroxilase
TrkB	Receptor tirosina-quinase B

1. INTRODUÇÃO

1.1. Isolamento social e seus efeitos biológicos

A formação de laços sociais é essencial para a manutenção da saúde de indivíduos que vivem em sociedade (EISENBERGER, 2012). Em relação a espécie humana, um grande número de evidências tem mostrado que o isolamento social (IS) afeta negativamente a saúde (HAWKLEY; CACIOPPO, 2010), e em especial, as funções cognitivas (WILSON et al., 2007). Estudos mostram que indivíduos socialmente isolados podem apresentar vários efeitos deletérios, como transtornos afetivos e prejuízo de aprendizado e memória (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016; TEO; LERRIGO; ROGERS, 2013). Ainda em humanos, a privação social pode induzir distúrbios de personalidade, transtorno de ansiedade, depressão e aumento no risco da doença de Alzheimer (CACIOPPO et al., 2006; DENIRO, 1995; MATTHEWS et al., 2016; WILSON et al., 2007).

Efeitos semelhantes são observados em roedores de laboratório. O IS de camundongos pode resultar em fenótipos tipo-depressivo e ansioso, aumento da agressividade e baixo desempenho em tarefas de aprendizado e memória (GUARNIERI et al., 2020; MA et al., 2011; PIETROPAOLO; FELDON; YEE, 2008).

Estes efeitos deletérios causados pelo IS estão associados a alterações plásticas e bioquímicas no cérebro. Sabe-se que a ausência de contato social perturba a liberação de vários neurotransmissores, como a dopamina, serotonina e o glutamato (revisado por MUMTAZ et al., 2018). Além disso, o IS pode reduzir a proliferação celular em circuitos neurogênicos durante a fase adulta, causando prejuízo no processamento de memórias e emoções (CURTIS, 2011; GUARNIERI et al., 2020; SCHOENFELD; GOULD, 2012).

Tendo em vista este panorama, nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos do IS de 7 dias na memória de reconhecimento social de camundongos adultos. Foi demonstrado que este período de isolamento é capaz de prejudicar a formação da memória de reconhecimento social de longa-duração, sem alterar a memória de curta-duração (GUSMÃO et al., 2012a; MONTEIRO et al., 2014). Tal prejuízo de memória foi associado à redução de dopamina no bulbo olfatório (BO) (GUARNIERI, dados não publicados), assim como à diminuição da proliferação celular e neurogênese nesta mesma estrutura (GUARNIERI et al., 2020). Além disso, a privação social alterou os níveis de glutamato em substratos importantes para a memória social. Sete dias de isolamento

potencializou a sinalização glutamatérgica no BO, ao mesmo tempo que reduziu esta sinalização no hipocampo dorsal (dHIP). Este desequilíbrio na neurotransmissão glutamatérgica foi concomitante à diminuição do acoplamento fase-amplitude entre BO e dHIP, comprometendo a comunicação entres estes substratos durante a evocação da memória de longa-duração (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019).

Assim, motivados por achados prévios do nosso grupo indicando que o BO é um alvo sensível aos efeitos deletérios do IS, investigamos no presente estudo, os mecanismos pelos quais o IS de 7 dias altera a fisiologia do BO e suas funções subjacentes, especialmente o armazenamento da memória de reconhecimento social de longa-duração.

1.2. Sistema olfatório

No sistema olfatório de roedores, os odores são detectados por quimiorreceptores distribuídos no epitélio olfatório principal. Tais receptores se encontram na membrana dos neurônios sensoriais olfatórios (NSO), que por sua vez, apresentam expressão singular do receptor olfatório (CHESS et al., 1994; ISHII et al., 2001; SERIZAWA; MIYAMICHI; SAKANO, 2004). Além disso, todos os NSOs que expressam o mesmo receptor se projetam para um único glomérulo no BO (Figura 1-A) (IMAI; SAKANO; VOSSHALL, 2010; MOMBAERTS et al., 1996). Sabe-se também que um tipo específico de receptor olfatório pode responder a vários estímulos e um determinado estímulo pode ativar inúmeros tipos de receptores (MALNIC et al., 2000). Deste modo, os odores detectados pelos NSOs são discriminados por combinações específicas de glomérulos ativados no BO (Figura 1-B) (IMAI; SAKANO; VOSSHALL, 2010).

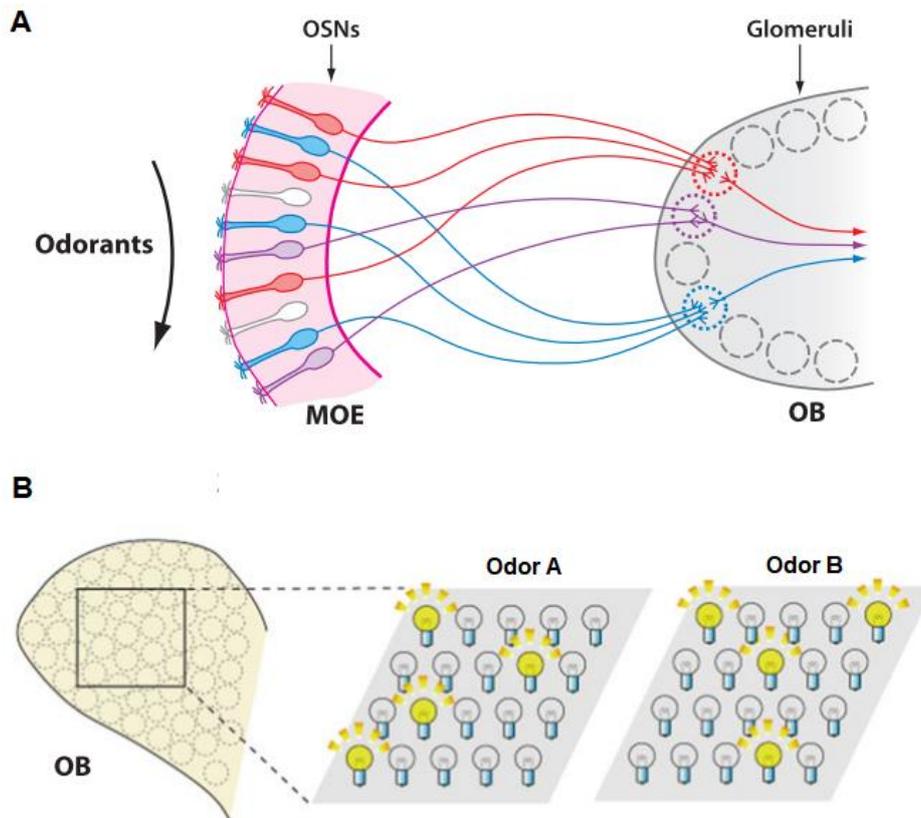


Figura 1 - Sistema olfatório principal de camundongos. (A) Os neurônios sensoriais olfatórios que expressam o mesmo tipo de receptor (vermelho, azul ou roxo) direcionam seus axônios para o mesmo glomérulo no bulbo olfatório. (B) Os odores detectados pelos neurônios sensoriais olfatórios são representados pela combinação de glomérulos ativados no bulbo olfatório. MOE: epitélio olfatório principal; OSNs: neurônios sensoriais olfatórios; OB: bulbo olfatório (Adaptada de MORI; SAKANO, 2011).

Na presença de estímulos olfatórios, os NSOs fazem sinapses excitatórias com interneurônios justaglomerulares e o dendrito apical de células mitrais e tufadas nos glomérulos do BO (Figuras 2 e 3). Quando estimulados, os interneurônios justaglomerulares liberam dois neurotransmissores com ação inibitória na região glomerular, a dopamina e o ácido gama-aminobutírico (GABA). O neurotransmissor GABA é capaz de inibir os terminais pré-sinápticos dos NSOs através dos receptores GABA_B (MCGANN, 2013; SHAO et al., 2019; WACHOWIAK et al., 2005), além de inibir as células mitrais e tufadas através dos receptores GABA_A (ISAACSON; STROWBRIDGE, 1998; SCHOPPA et al., 1998). Por outro lado, a dopamina exerce seu efeito inibitório ativando os receptores D2 presentes apenas nos terminais pré-sinápticos dos NSOs, conforme mostrado na figura 2 (ENNIS et al., 2020; HSIA et al., 2020; KOSTER et al., 1999).

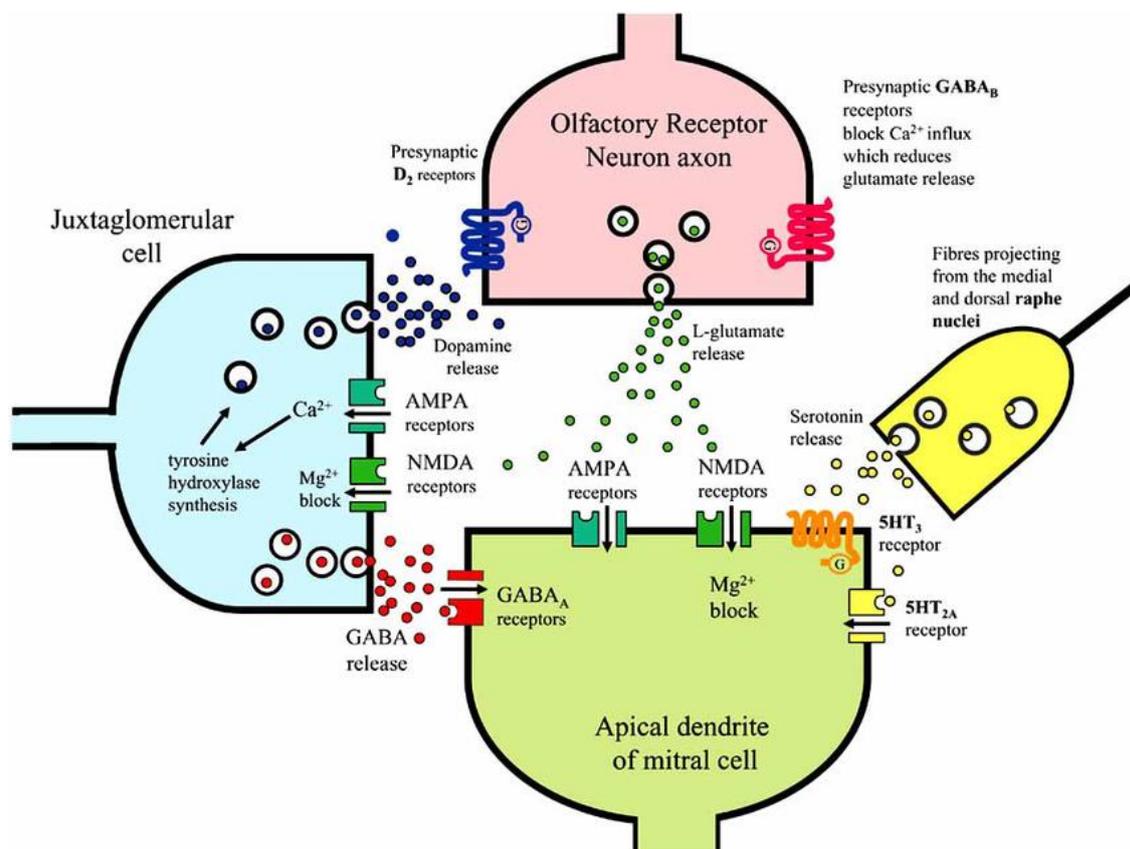


Figura 2 - Representação das sinapses na região glomerular (CONNOR; JACOB, 2008).

Os interneurônios justaglomerulares são agrupados em duas populações de células principais. As células justaglomerulares GABAérgicas, que são caracterizadas por apresentarem uma morfologia uniglomerular além de expressarem a enzima glutamato descarboxilase (GAD) (KIYOKAGE et al., 2010; SHAO et al., 2009). E outra população representada por células dopaminérgicas que expressam a enzima tirosina hidroxilase (TH) podendo ou não coexpressar a enzima GAD (KIYOKAGE et al., 2010; KOSAKA; KOSAKA, 2008). Além disso, as células dopaminérgicas são caracterizadas por apresentarem múltiplas projeções enviadas a vários glomérulos no interior do BO (KIYOKAGE et al., 2010). Assim, a organização funcional das células justaglomerulares contribuem para o processamento do sinal olfatório desde o início da entrada sensorial.

Já as células mitrais e tufadas quando estimuladas pela entrada sensorial fazem sinapses dendrodendríticas excitatórias com as células granulares. Em resposta, as células granulares fazem sinapses GABAérgicas dendrodendríticas recíprocas com as células mitrais e tufadas promovendo *feedback* negativo sobre estas células (CARLETON et al.,

apresentam disparos iniciais de alta frequência para áreas do pedúnculo olfatório, tubérculo olfatório e córtex piriforme (FUKUNAGA et al., 2012; IGARASHI et al., 2012). Enquanto as células mitrais apresentam disparos tardios de frequência lenta para quase todas as áreas do córtex olfatório, incluindo o córtex entorrinal lateral, que se conecta diretamente com o HIP (Figura 4 - B) (FUKUNAGA et al., 2012; IGARASHI et al., 2012; WITTER, 1993).

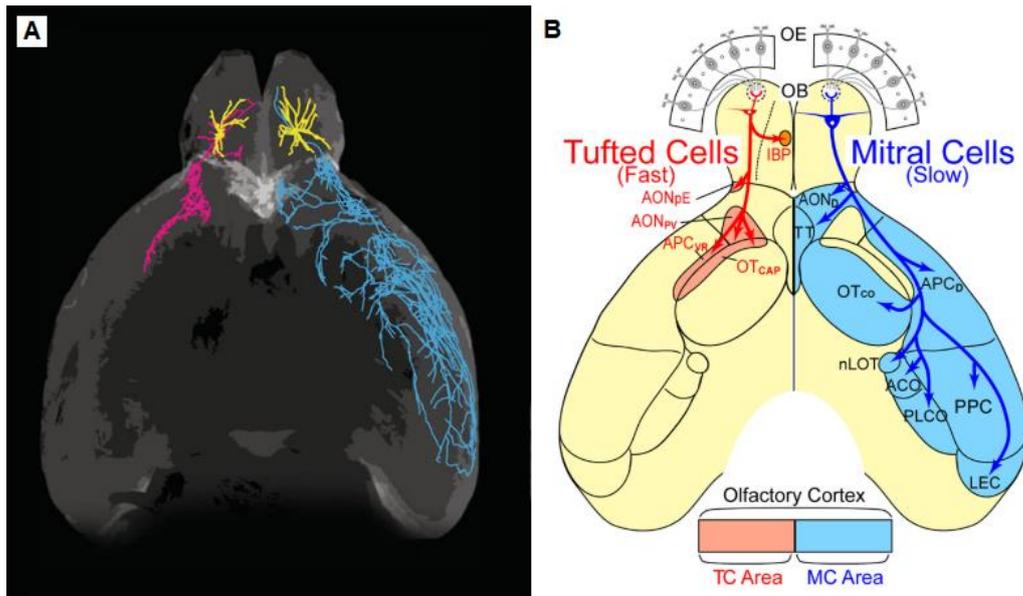


Figura 4 – Projeções das células tufadas e mitrais para o córtex olfatório. (A) Do lado esquerdo está representada uma célula tufada, mostrando os dendritos laterais (amarelo) e seus axônios (rosa). Do lado direito está representada uma célula mitral com os dendritos laterais (amarelo) e seus axônios (azul). (B) Imagem ilustrativa das projeções axônais para o córtex olfatório de uma célula tufada (vermelho) e uma célula mitral (azul) (Adaptada de IGARASHI et al., 2012).

Além das projeções enviadas ao HIP, o córtex olfatório envia projeções ao hipotálamo e tálamo, conectando o sistema olfatório ao sistema límbico. Estas conexões são a base anatômica que conecta a olfação à formação de memórias e comportamentos afetivos que são fundamentais para o convívio social e sobrevivência dos indivíduos na natureza (BRENNAN; KEVERNE, 1997; CARLETON et al., 2002).

1.3. Formação da memória

A formação da memória envolve mudanças em conexões neurais de áreas específicas do cérebro. Tais mudanças são induzidas pelo aprendizado e resultam na ativação de um complexo celular denominado engrama neural (SCHACTER; EICH;

TULVING, 1978). O engrama mantém as informações aprendidas como representações internas que podem ser acessadas pela reativação deste complexo celular (SCHACTER; EICH; TULVING, 1978; SCHACTER, 2001).

Neste contexto, a formação da memória envolve dois estágios principais: a aquisição e a consolidação. Na aquisição ocorre o aprendizado, que se refere à geração ou a modificação de representações internas (DUDAI, 1989, 1993). Tais representações são consequências de experiências sensoriais, motoras, emocionais ou cognitivas que ocorrem no cotidiano (Bower; Hilgard, 1981). Assim, o que ocorre no processo de aprendizado é a associação e integração de novidades recém-adquiridas com informações já armazenadas, resultando na formação de uma nova representação interna.

A formação da memória é um processo altamente dinâmico. Logo após o aprendizado, as memórias lábeis podem se tornar mais duradouras pelo processo de consolidação (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000). Neste processo ocorrem vários eventos químicos e moleculares que resultam em mudanças estruturais em conexões sinápticas ao longo do tempo. Assim, em termos fisiológicos, a consolidação apresenta dois níveis temporais: o nível celular/sináptico e o nível de consolidação sistêmica (DUDAI; KARNI; BORN, 2015).

A consolidação celular caracteriza-se pela síntese de proteínas logo após o aprendizado (SAKAKIBARA; ITO, 2015). Neste processo ocorre a ativação de várias cascatas de sinalização intracelular responsáveis por regular expressão gênica de proteínas envolvidas no aprimoramento da eficácia sináptica (ALBERINI; KANDEL, 2015; DUDAI; KARNI; BORN, 2015). Esta é uma fase caracterizada por ser sensível a perturbações externas e se encerra poucas horas após seu início (DUDAI; KARNI; BORN, 2015).

Por outro lado, a consolidação sistêmica refere-se a mudanças estruturais em conexões sinápticas para estabelecer um traço de memória persistente (DUDAI, 2012; SQUIRE; ALVAREZ, 1995). Tal processo é caracterizado principalmente pela redução da participação do HIP na evocação e o aumento da função do neocórtex em promover a retenção da memória. Esta é uma fase que pode perdurar por período prolongado após o aprendizado, pois depende de mudanças de conectividade entre regiões corticais (SAKAKIBARA; ITO, 2015).

Após serem consolidadas, as memórias podem ser recordadas por um processo denominado de evocação (STARESINA; WIMBER, 2019). Este é um processo que pode ser desencadeado tanto por pistas internas quanto externas ao indivíduo. Exemplos de

pistas que desencadeiam a evocação de memórias são os estímulos endógenos e sensoriais diários. No entanto, a evocação também torna as memórias sensíveis a perturbações, podendo levar ao fortalecimento ou enfraquecimento do traço de memória (HUPBACH et al., 2007; NADER, 2015; WALKER; BRAKEFIELD; HOBSON, 2003). Sendo assim, a evocação é caracterizada tanto por reativar quanto modificar as memórias armazenadas (MOSCOVITCH et al., 2005; NADEL et al., 2000).

Quando formada, uma memória pode ser classificada quanto a duração e ao conteúdo. Em relação à duração, as memórias que perduram por apenas um curto intervalo de tempo, como minutos ou horas após a aquisição são denominadas memória de curta-duração (MCD). Neste caso, a formação da memória depende da facilitação sináptica em áreas envolvidas na codificação sensorial (EMPTAGE; CAREW, 1993). Por outro lado, existe a memória de longa-duração (MLD) que pode perdurar por dias, semanas, meses ou anos após a aquisição (ASOK et al., 2019). Este tipo de memória é fisiologicamente caracterizada por depender da síntese de proteínas e fortalecimento sináptico em áreas específicas do cérebro (DUDAI; KARNI; BORN, 2015) .

Quanto ao conteúdo, as memórias de longa-duração podem ser classificadas como não-declarativas ou declarativas. A memória não-declarativa refere-se principalmente à capacidade de reter habilidades motoras e hábitos (DHARANI, 2015) e sua evocação não ocorre de forma consciente (PACKARD; WHITE; HA, 1978; PAUL; SQUIRE, 2002). Em contrapartida, a memória declarativa caracteriza-se por registrar conceitos, fatos ou eventos (DHARANI, 2015) e pode ser acessada de forma consciente, como é o caso da memória social (SQUIRE, 1984).

1.4. Memória social

A memória social pode ser definida como um processo cognitivo que possibilita o reconhecimento de co-específicos através de informações sensoriais específicas (GAO et al., 2009; LÉVY; KELLER; POINDRON, 2004; NOACK et al., 2010). Em roedores, o reconhecimento social é baseado principalmente em informações olfatórias particulares de cada indivíduo (BOWERS; ALEXANDER, 1967; WILLS et al., 1983). Tal reconhecimento possibilita vários comportamentos de sociabilidade necessários a sobrevivência, como o cooperativismo e a reprodução sexual (ARAKAWA et al., 2008).

O reconhecimento de co-específicos envolve a percepção e a discriminação dos odores de assinatura (WYATT, 2010, 2017). No caso dos roedores, os odores de assinatura são secretados por glândulas corporais e liberados na urina (WYATT, 2010).

Por serem facilmente detectados e processados pelo sistema olfatório de outros indivíduos (WYATT, 2010), os odores de assinatura são essenciais para a formação da identidade dos roedores. Desta forma, as características olfatórias específicas de cada animal são utilizadas como informações primárias para a formação da memória social.

Em laboratório, a memória social é comumente avaliada por dois paradigmas principais: ‘residente-intruso’ e ‘discriminação social’. No paradigma residente intruso a memória social é avaliada medindo-se o tempo de investigação social gasto pelo residente (animal experimental) com o animal intruso (juvenil da mesma linhagem), no primeiro e no segundo encontro da tarefa de reconhecimento social (Figura 5-A). Em situações normais, é esperado que o tempo de investigação social do animal intruso pelo animal residente diminua no segundo encontro quando comparado ao primeiro, o que caracteriza memória social intacta (Figura 5-B).

Já no paradigma de discriminação social mede-se o tempo de investigação social entre um indivíduo familiar e um desconhecido (Figura 5-C). Se o animal experimental tem a memória social, o tempo gasto na investigação do indivíduo familiar é significativamente menor que a investigação social do indivíduo desconhecido durante o teste (Figura 5-D). A premissa destes dois paradigmas é que, em condições naturais, animais tendem a interagir mais tempo com uma novidade social do que com um estímulo social familiar (THOR; HOLLOWAY, 1982).

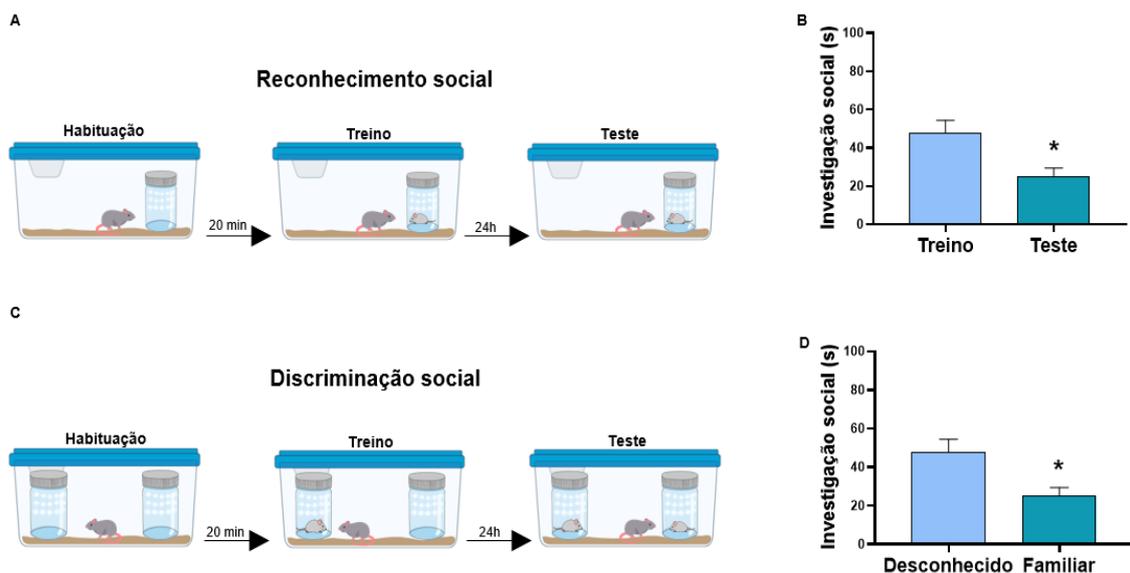


Figura 5 - Representação ilustrativa dos paradigmas residente intruso e discriminação social. (A) No primeiro encontro da tarefa de reconhecimento social, um intruso (representado pelo roedor dentro do

cilindro) é apresentado ao camundongo residente ao longo de 5 minutos (treino). Em um segundo encontro (teste), também de 5 minutos, (B) a redução da investigação social com o mesmo intruso é interpretada como memória social intacta. (C) Na tarefa de discriminação social, um camundongo juvenil é apresentado a um camundongo experimental por 5 minutos na sessão de treino. No teste, o mesmo juvenil (familiar) é reexposto ao animal experimental, na presença de um novo camundongo (desconhecido). (D) Se a investigação social do familiar for significativamente menor que a investigação do desconhecido, é considerado memória social intacta.

Um estudo que utilizou manipulação viral para bloquear a transmissão sináptica dos neurônios piramidais da região CA2 do hipocampo dorsal (dCA2) de camundongos, mostrou que a inativação destes neurônios impede a discriminação social (HITTI; SIEGELBAUM, 2014). Neste caso, os camundongos testados apresentaram tempo similar de investigação social com o familiar e o desconhecido durante a sessão de teste indicando prejuízo da memória social. Em outro estudo, camundongos que sofreram silenciamento por optogenética dos neurônios da região dCA2 foram incapazes de codificar, consolidar e evocar a memória social (MEIRA et al., 2018). Por analisar cada uma das fases da memória, este último estudo demonstrou que a região dCA2 exerce um papel importante tanto para a formação quanto reativação do engrama da memória social.

Além disso, Okuyama e colaboradores (2016), utilizando a tarefa de discriminação social, demonstraram que a ativação dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo ventral (vCA1) aumenta durante a investigação social do indivíduo familiar em comparação com o desconhecido. Esta maior ativação se correlaciona com menor tempo de investigação social do indivíduo familiar durante a sessão de teste, sugerindo que os neurônios piramidais da região vCA1 estão envolvidos na memória social. Sendo assim, estes estudos propõem que os neurônios piramidais das regiões dCA2 e vCA1 são necessários para a formação da memória social (Figura 6).

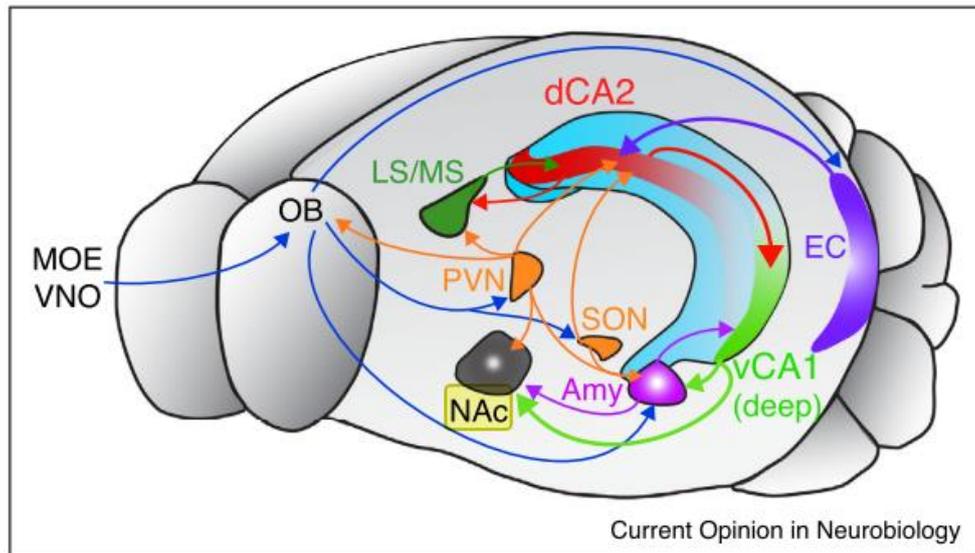


Figura 6 – Representação esquemática das áreas cerebrais envolvidas no processamento da memória social. MOE: epitélio olfatório principal; VNO: órgão vômeronasal; OB: bulbo olfatório; EC: córtex entorrinal; NAc: núcleo accumbens; Amy: amígdala; LS/ MS: septo lateral e medial; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; SON: núcleo supraóptico (PISKOROWSKI; CHEVALEYRE, 2018).

Além das regiões dCA2 e vCA1, o processamento da memória social envolve outras áreas importantes do cérebro como mostrado na figura 6. Em mamíferos, sabe-se que o BO tem um papel fundamental na formação da memória social (KABA; NAKANISHI, 1995). Estudos de ativação celular por c-Fos e inibição da síntese proteica no BO de camundongos apontam que este substrato é recrutado durante a consolidação da memória de reconhecimento social (LÜSCHER DIAS et al., 2016; PENA et al., 2014).

Projeções neurais que conectam o BO ao giro denteado do HIP, via córtex entorrinal lateral, envolve o sistema olfatório na formação da memória social (SÁNCHEZ-ANDRADE; JAMES; KENDRICK, 2005; SANCHEZ-ANDRADE; KENDRICK, 2009). Além disso, células granulares do BO são moduladas por projeções *top-down* enviadas pelo HIP através do córtex entorrinal (ROSA-PRIETO; INSAUSTI, 2009). Assim, acredita-se que a interação dinâmica entre estes substratos neurais, após a aquisição da memória social, pode induzir alterações plásticas duradouras no BO garantindo um traço de memória de longa-duração.

1.5. Bases moleculares da memória de longa-duração: protagonismo do BDNF

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma neurotrofina com diferentes isoformas biologicamente ativas (HOFER et al., 1990; PANG; LU, 2004). Sua síntese

ocorre no retículo endoplasmático na forma pré-pró-BDNF, que é translocada para o aparelho de Golgi onde é clivada para formar o pró-BDNF (MORRIS; SEIDAH; MURPHY, 2001). O pró-BDNF, por sua vez, pode ou não sofrer uma nova clivagem intracelular formando a proteína madura, o m-BDNF (GREENBERG et al., 2009; MIZUI et al., 2015). Em seguida, as isoformas pró-BDNF e m-BDNF são secretadas no espaço extracelular de forma constitutiva ou regulada por atividade desencadeada por estímulos endógenos ou exógenos (Figura 7) (MORRIS; SEIDAH; MURPHY, 2001; YANG et al., 2003; DIENI et al., 2012).

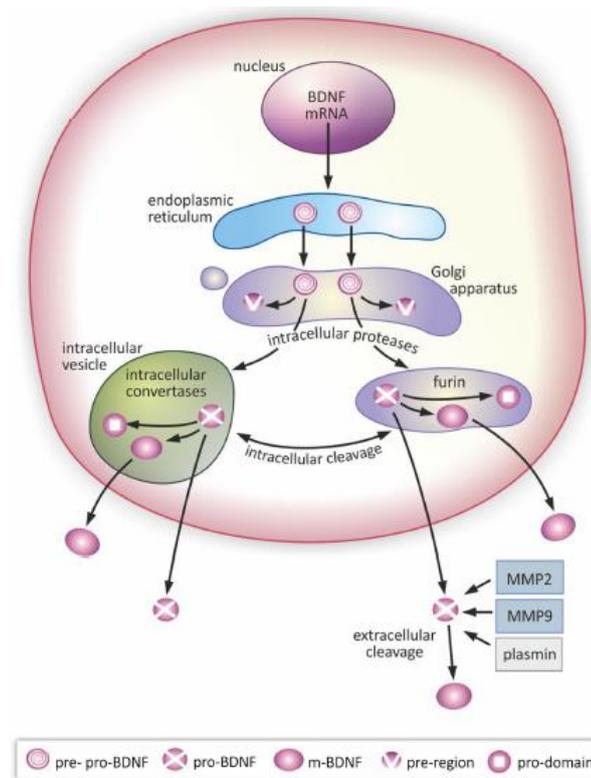


Figura 7 – Representação esquemática da síntese e maturação do BDNF (KOWIAŃSKI et al., 2018).

O m-BDNF exerce seus efeitos ao se ligar com alta afinidade ao receptor tirosina-quinase B (TrkB), que pertence à família dos receptores relacionada à tropomiosina (MIZUI et al., 2015). A ligação do m-BDNF ao receptor TrkB resulta na formação do complexo m-BDNF/TrkB, dimerização e autofosforilação dos resíduos de tirosina intracelular (BARBACID, 1994; PATAPOUTIAN; REICHARDT, 2001). Esta fosforilação pode induzir a ativação das vias de transdução mediadas por fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fosfolipase C- γ (PLC-

γ) e hidrolases de trifosfato de guanosina (GTP-ases). Consequentemente, a ativação destas diferentes vias de sinalização induz efeitos celulares variados no sistema nervoso central, conforme mostrado na figura 8.

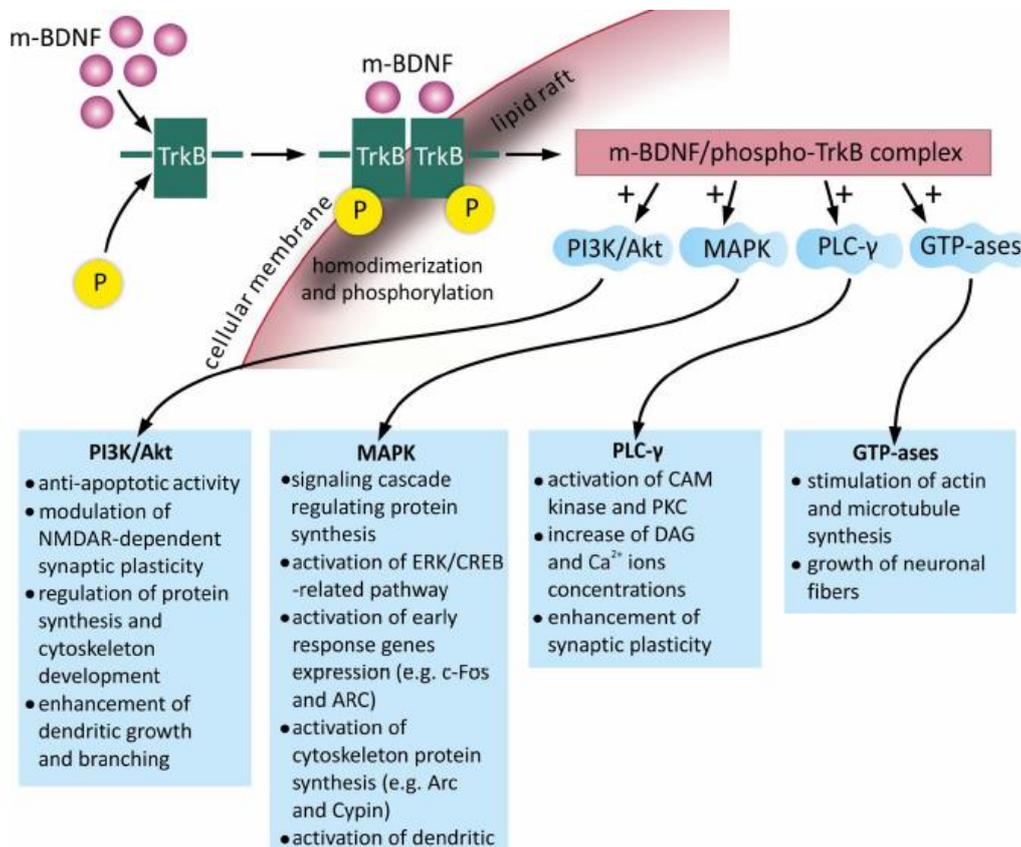


Figura 8 – Cascatas de sinalização intracelular ativadas pela interação do m-BDNF com o receptor TrkB (KOWIAŃSKI et al., 2018).

No cérebro, sabe-se que o m-BDNF é um potente modulador da plasticidade sináptica. Um dos seus efeitos plásticos é induzir a potenciação a longo prazo (LTP), contribuindo para o aprimoramento de processos cognitivos (GREENBERG et al., 2009; EDELMANN, 2015; MINICHIELLO, 2009). Em muitos casos, o comprometimento da plasticidade sináptica mediada pelo m-BDNF no HIP resulta em prejuízos cognitivos, como déficits de aprendizado e memória (LINNARSSON; BJORKLUND; ERNFORS, 1997; MINICHIELLO, 2009).

Em um estudo clássico, Linnarsson e colaboradores (1997) mostraram que camundongos mutantes, sem o gene do BDNF, apresentam prejuízo no aprendizado da tarefa do labirinto aquático de Morris quando comparados a camundongos do tipo

selvagem. Ou seja, a redução sistêmica da expressão do m-BDNF prejudica o aprendizado espacial. Além disso, um outro trabalho utilizando ratos Spregue-Dawley mostrou que a administração crônica intracerebroventricular de anticorpos anti-BDNF antes da aquisição, também prejudica o aprendizado de tarefa espacial (MU; LI, 1999). Neste caso, a inativação da proteína m-BDNF no cérebro foi suficiente para reduzir o desempenho no aprendizado da tarefa espacial. Logo, esses achados dão suporte a teoria de que a sinalização difusa do m-BDNF é essencial para aquisição de memória espacial.

Além da participação no aprendizado espacial, o m-BDNF é importante para a memória associativa (ALONSO et al., 2002; BEKINSCHTEIN; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). Alonso e colaboradores (2002) mostraram que o bloqueio hipocampal do m-BDNF imediatamente após o aprendizado da tarefa de esquiiva inibitória prejudica a formação da memória de medo associativa. Em outro estudo, a administração intra-hipocampal do BDNF exógeno em ratos, reverteu o déficit de memória causado pelo tratamento com anisomicina (inibidor de síntese proteica) 12 horas após o aprendizado da esquiiva inibitória (BEKINSCHTEIN et al., 2008). Assim, estes achados evidenciam que o m-BDNF tem um papel fisiológico importante tanto na fase inicial quanto tardia da consolidação da memória associativa.

Deste modo, considerando (1) as evidências de que os mecanismos plásticos envolvidos no armazenamento de memórias de longa-duração envolvem vias moleculares dependentes do BDNF e que (2) o BO, bem como as memórias dependentes de seu funcionamento, é um alvo preferencial para os efeitos deletérios do IS, o presente estudo também testou a hipótese de que o IS em camundongos ICR-CD1 prejudica a memória social e a sinalização dependente de BDNF no BO.

Capítulo 1

Efeito do isolamento social na estrutura e função do bulbo olfatório de camundongos ICR-CD1.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1. Justificativa

Sabe-se que as interações sociais podem modificar a plasticidade neural impactando diretamente no comportamento. Estas interações induzem mudanças em diversas áreas do cérebro, incluindo áreas associadas à codificação e ao processamento de memórias (HSIAO; CHANG; GEAN, 2018; QUIROGA, 2018). Camundongos que vivem em ambientes ricos em estímulos sociais apresentam a memória de reconhecimento social de longa-duração intacta (GUSMÃO et al., 2012b), enquanto a ausência de contato social prejudica a formação desta memória (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012b).

Além do prejuízo mnemônico, a privação social pode causar disfunção sensorial e transtornos afetivos. Tais efeitos deletérios ocorrem concomitantemente a modificações estruturais e fisiológicas no BO (GUARNIERI et al., 2020; MONTEIRO et al., 2014). Sendo assim, na primeira parte deste trabalho investigamos se o IS induz modificações no BO de camundongos da linhagem ICR-CD1. Também avaliamos se o IS altera comportamentos afetivos, a atividade locomotora e a função olfatória destes animais.

2.2. Objetivo

Avaliar se o isolamento social altera a estrutura e função do bulbo olfatório, sem comprometer comportamentos afetivos e sociais.

2.3. Objetivos específicos

- Medir o volume do bulbo olfatório após o isolamento social;
- Analisar as propriedades intrínsecas das células mitrais/tufadas após o isolamento social;
- Analisar as correntes espontâneas excitatórias e inibitórias das células mitrais/tufadas após o isolamento social;
- Avaliar se o isolamento social induz comportamento tipo-depressivo, tipo-ansioso e alteração no comportamento exploratório;
- Verificar se o isolamento social promove prejuízo na detecção e discriminação de odores sociais;
- Verificar se o isolamento social prejudica uma memória olfatória não-social e social de longa-duração.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e condições de alojamento

Foram utilizados camundongos machos ICR-CD1 com oito a doze semanas de idade, em conformidade com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, CEUA/UFMG: 219/2018. Os animais foram mantidos em gaiolas padrão (28X17X12cm), no máximo cinco animais por gaiola, dentro de uma estante com temperatura e umidade controladas, receberam comida e água e foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12/12 horas.

Os animais socialmente isolados foram alojados individualmente em uma gaiola padrão com o uso de microisolador por um período de 7 dias. Estes animais foram submetidos as mesmas condições circadianas e alimentares que os animais controles e foram manipulados apenas quando necessário.

3.2. Ressonância magnética estrutural

A imagem por ressonância magnética (IRM) é uma técnica que permite a identificação e diferenciação de tecidos corporais com alta precisão. A formação de uma IRM depende da interação de um forte campo magnético externo, produzido pelo equipamento, com prótons de hidrogênio do tecido avaliado. O sinal resultante desta interação é conseqüentemente processado e convertido em uma imagem estrutural (MAZZOLA, 2009).

Para a captura das imagens, animais agrupados e isolados foram individualmente acomodados no equipamento e anestesiados com uma mistura contendo isoflurano (3% para indução, 1,5% para manutenção) e oxigênio (1,5%) entregues por uma máscara acoplada ao focinho. Em seguida, imagens de todo o cérebro foram capturadas utilizando um magneto de 4.7T NMR (Oxford Systems) controlado por console de imagens UNITY Inova-200 (Varian). O protocolo consistiu na aquisição de imagens coronais ponderadas em T2 (TR = 3000 ms, TE = 50 ms) com um total de 50 fatias contíguas de 1 mm de espessura (512 × 256 voxels). Por fim, as imagens foram posteriormente analisadas através dos softwares Bamboo Tablet Driver V5.2.5 WIN (WACOM Technology Corporation, USA) e MeVisLab (MeVis Medical Solutions AG, Fraunhofer) (GUARNIERI et al., 2020).

3.3. Patch clamp

3.3.1. Preparação das fatias

Fatias coronais do BO foram preparadas para registros eletrofisiológicos como descrito por Dos Santos e colaboradores em 2019 (DOS SANTOS E ALHADAS et al., 2019). Animais machos com 8 semanas foram anestesiados com ketamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) e submetidos a infusão intra-cardíaca com solução artificial cerebrospinal (aCSF) com baixa quantidade de cálcio e gelada. Em seguida, os cérebros foram rapidamente removidos e colocados em solução aCSF de corte borbulhada com “carbogênio” contendo 5% CO₂ e 95% O₂. O aCSF de corte continha (em mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 0,1 CaCl₂, 3 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 25 Glicose, 0,4 Ácido ascórbico, 2 Piruvato de sódio e 3 Myo-inositol. Cortes seriados (200 µm de espessura) foram feitos usando um micrótomo vibratório (VTS-1000S; Leica) em aCSF oxigenado a 4°C. As fatias do BO esquerdo e direito foram separadas e imediatamente transferidas para uma câmara, onde permaneceram imersas na solução carbogenada de aCSF de registro contendo (em mM): 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 25 Glicose, 0,4 Ácido ascórbico, 2 Piruvato de sódio e 3 Myo-inositol a 37°C por 45 minutos (pH 7,3 – 7,4). Posteriormente, as fatias foram mantidas à temperatura ambiente até o momento do registro.

3.3.2. Registros eletrofisiológicos

Cada fatia do BO esquerdo ou direito foi movida para uma câmara de registro perfundida com aCSF com fluxo de 2,5 ml/min utilizando uma bomba peristáltica (*Pharmacia Biotech Pump P-1*). Os registros foram obtidos através da identificação visual das células na camada mitral do BO, usando objetivas de 4x e 40x da Olympus e iluminação de contraste diferencial (DIC) infravermelho no microscópio modular MRK100 (Siskiyou, Oregon, USA). As imagens foram captadas através da câmera acoplada IR-1000 (DAGE-MTI, Indiana, USA) e visualizadas no PC usando o software ENLTV-FM3 (Encore Electronics, USA). As células mitrais/tufadas foram identificadas por apresentarem corpos celulares grandes e dendritos secundários (laterais) que se projetam para a camada plexiforme externa (NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014).

Para realização dos registros foram utilizados capilares de vidro (Patch Clamp Glass, PG52151-4, World Precision Instruments) transformados em micropipetas usando

um estirador vertical de pipetas de dois estágios (PP830 Narishige, Tokyo, Japan). As propriedades intrínsecas da membrana foram registradas no modo *Whole cell - current clamp* com corrente ajustada em 0 pA e uma solução de pipeta intracelular contendo (em mM) 125 gluconato de K, 20 KCl, 10 Na² - fosfocreatina, 0,5 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg² - ATP, 0,3 Na² – GTP (305-310 mOsm, pH 7,2).

As correntes sinápticas das células mitrais/tufadas foram registradas na modalidade *Whole cell – voltage clamp*. Durante o registro das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (sEPSC), o potencial de membrana das células foi mantido em -60 mV e as correntes glutamatérgicas foram isoladas com a perfusão das fatias por aCSF contendo Picrotoxina (100µM; TOCRIS, 124-87-8), um antagonista não competitivo do receptor GABA_A. Por outro lado, as correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas (sIPSC) foram registradas mantendo o potencial de membrana em -80 mV. Para isolar as correntes GABAérgicas, as fatias foram perfundidas com 2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4 tetra-hidrobenzo [f] quinoxalina-7-sulfonamida (NBQX, 20 µM; TOCRIS, 479347-86-9) e ácido D-(-)- 2-amino-5 fosfonoaléxico (D-AP5, 50 µM; TOCRIS, 79055-68-8), antagonistas dos receptores AMPA e NMDA, respectivamente. Para obter a caracterização morfológica dos neurônios registrados, foi adicionada Biocitina (0,25%) (Sigma-Aldrich, B4261) na solução de pipeta intracelular que continha os mesmos reagentes descritos acima.

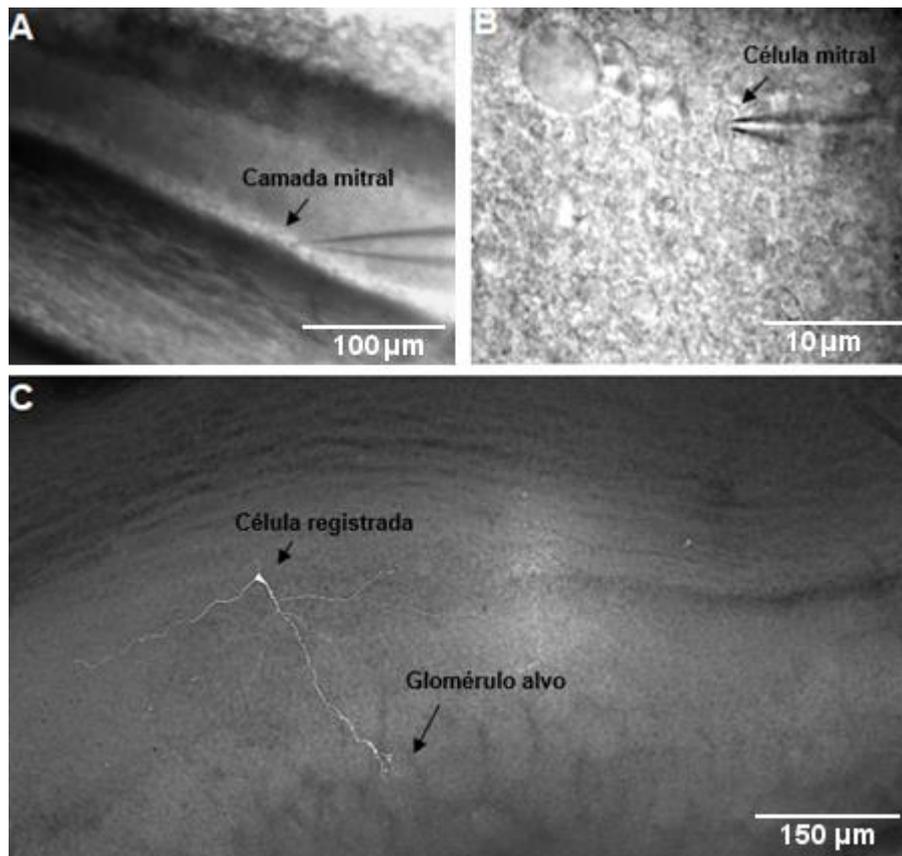


Figura 9 – Fotomicrografias do bulbo olfatório. (A) Aumento de 4x mostrando a pipeta de registro na camada mitral do bulbo olfatório. (B) Aumento de 40x mostrando o corpo de uma célula mitral clampado. (C) Microscopia de fluorescência com aumento de 5x mostrando uma célula mitral preenchida intracelularmente por biocitina. O corpo da célula está localizado na camada mitral e o dendrito apical se estende até o glomérulo alvo.

3.3.3. Análise morfológica

Células mitrais/tufadas do BO esquerdo e direito de camundongos com 8 semanas foram preenchidos com biocitina após o registro no modo *voltage-clamp* para identificação da morfologia celular (Figura 9) (AREVIAN; KAPOOR; URBAN, 2008; BOURNE; SCHOPPA; STATES, 2018; GORIN et al., 2016; SCHOPPA; WESTBROOK, 2001). No final de cada registro, a fatia com células mitrais/tufadas preenchidas com biocitina foi fixada *overnight* em paraformaldeído 4% a 4°C. Após 3 lavagens de 10 minutos com solução tampão de fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4), as fatias foram bloqueadas em PBS contendo albumina de soro bovino a 2% e Triton X-100 a 0,1% por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram incubadas com AlexaFluor-488 conjugado com estreptavidina (1:500; Thermo Fisher Scientific, S11223) por 4 horas em temperatura ambiente. As fatias foram fixadas em lâminas com

Hydromount (National diagnostics, HS-106) e mantidas no escuro a 4°C. 24 horas depois, as células mitrais/tufadas positivas para biocitina foram identificadas por microscopia confocal (LSM 880, ZEISS). Foi utilizado o modo z-stack para a obtenção de imagens tridimensionais, a fim de se confirmar o tipo celular registrado (Figura 10) (GORIN et al., 2016).

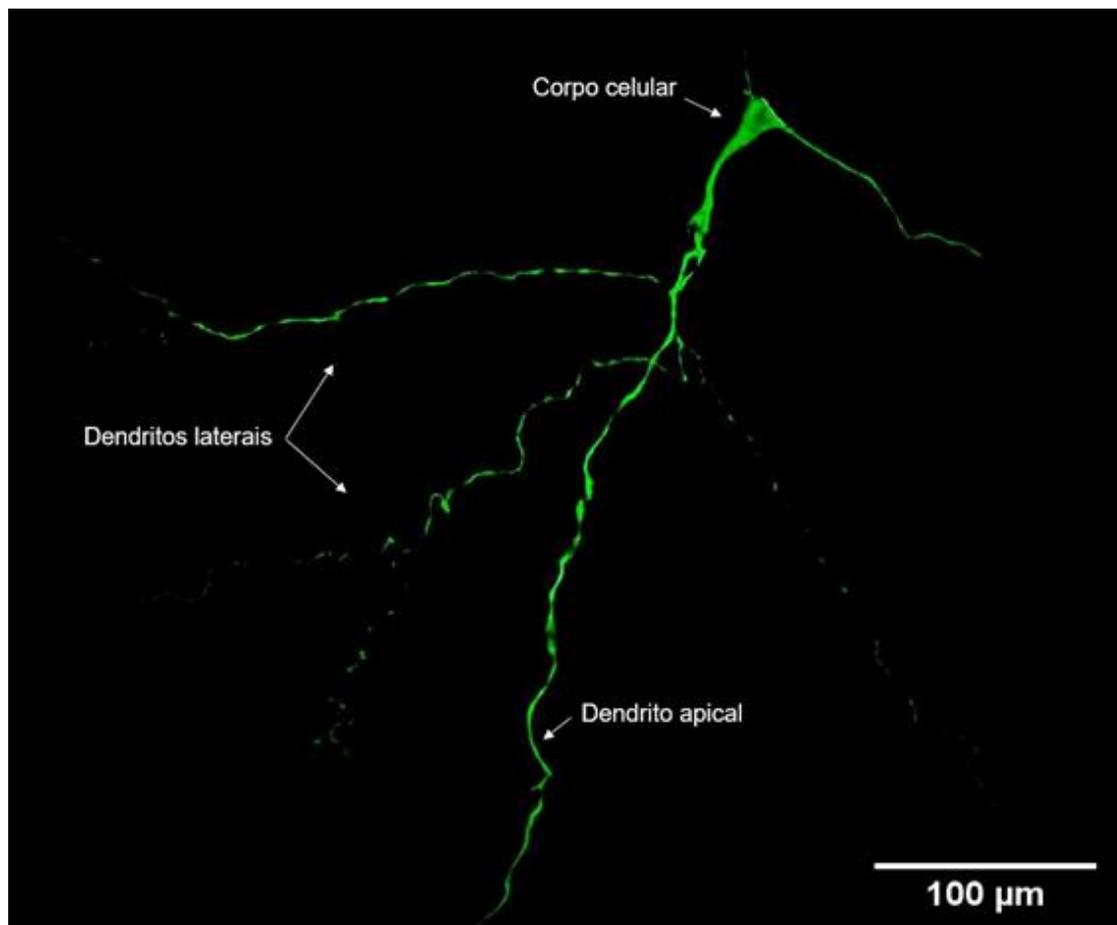


Figura 10 – Microscopia confocal de uma célula mitral preenchida intracelularmente com biocitina e posteriormente incubada com AlexaFluor-488 conjugado com estreptavidina. A célula mitral foi identificada através da morfologia do corpo celular, dendritos laterais e o dendrito apical.

3.3.4. Seleção das células mitrais/tufadas para análise

Além da análise morfológica, foi utilizado um banco de dados contendo as propriedades eletrofisiológicas das células mitrais/tufadas para selecionar apenas estas células na análise final. O banco de dados pode ser acessado através do endereço eletrônico: <https://www.neuroelectro.org/neuron/129/>. As células mitrais/tufadas foram selecionadas de acordo com os seguintes parâmetros:

1. Células com disparos espontâneos;
2. Resistência de entrada com valores entre 19 - 299 M Ω ;
3. Potencial de repouso com valores entre -49 e -65 mV.

3.3.5. Análise dos dados

Os registros em *whole-cell - voltage e current clamp* foram obtidos usando um amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments, Califórnia, USA). Os sinais foram filtrados a 5kHz usando o filtro interno do Axopatch, e digitalizados a 40 kHz usando um conversor análogo-digital (Digidata 1322A, Molecular Devices) gerenciado pelo software WinWCP e WinEDR (Strathclyde Electrophysiology Software), fornecido por John Dempster, (University of Strathclyde). Uma das saídas do amplificador foi dirigida ao Osciloscópio Tektronix TDS340 (Tektronix Inc, Oregon, USA) para visualização do sinal original. Os dados foram analisados utilizando o programa Clampfit (Version 10).

3.4. Teste de comportamento exploratório

A atividade exploratória dos animais foi avaliada por um sistema automatizado (*Actitrack v2.7.1*), que permite mensurar os comportamentos exploratórios em um ambiente totalmente novo. O aparato consiste em uma arena de acrílico (25x25cm) acoplada a um sistema externo de infravermelho (Figura 11). Este sistema permite monitorar a distância total percorrida na arena (em centímetros) e o número total de *rearings* (exploração vertical). O animal foi colocado inicialmente no centro da arena e permaneceu por 5 minutos em livre exploração (PODHORNA; BROWN, 2002).

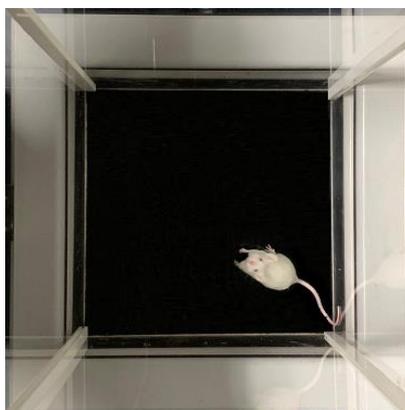


Figura 11 – Imagem representativa da caixa de locomoção.

3.5. Teste de suspensão pela cauda

Os animais foram suspensos individualmente pela cauda na borda de um aparato de acrílico (50cm de altura) com o auxílio de uma fita adesiva (Figura 12). O tempo de imobilidade de cada animal foi contabilizado por 5 minutos usando um cronômetro digital. A imobilidade foi considerada pela ausência total de movimentos. Após o teste, a fita adesiva foi removida da cauda e os animais foram recolocados em suas gaiolas (POWELL; FERNANDES; SCHALKWYK, 2012).

Este teste se baseia na observação de que camundongos com comportamento tipo-depressivo, em situação estressante, inicialmente apresentam comportamentos de fuga, seguidos pela postura de imobilidade por desamparo aprendido (CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005).

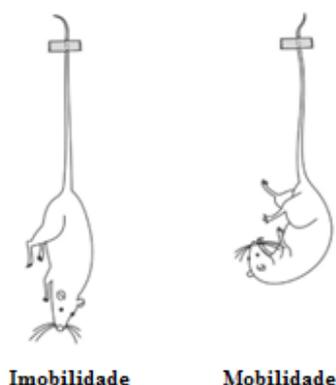


Figura 12 – Imagem ilustrativa do teste de suspensão pela cauda mostrando os comportamentos de imobilidade e mobilidade.

3.6. Labirinto em cruz elevado

O aparato utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansioso dos animais, consiste em um labirinto de acrílico no formato de cruz elevado a 30cm do solo. O labirinto é formado por quatro braços, sendo dois abertos (30cm de comprimento e 5cm de largura) e dois fechados (30cm de comprimento, 5cm de largura e 50cm de altura) que emergem de uma plataforma central (5cm comprimento e 5cm largura) (Figura 13).

Este teste se baseia na premissa de que animais com comportamento tipo-ansioso tendem a permanecer menos tempo nos braços abertos, por ser um ambiente mais aversivo (LISTER, 1990). O teste foi iniciado colocando o camundongo na plataforma central do labirinto, de frente para um dos braços abertos, e deixando-o explorar livremente o labirinto por 5 minutos. O comportamento do camundongo foi gravado por

uma câmera de vídeo colocada acima do aparato e o tempo de permanência em cada braço foi quantificado usando o programa *X-Plot-Rat*[®]. Considerou-se que os animais entraram em um braço específico quando as quatro patas estavam contidas neste braço. O teste foi realizado apenas uma vez por cada animal durante a fase clara do ciclo circadiano.



Figura 13 – Imagem representativa do aparato utilizado no teste do labirinto em cruz elevado.

3.7. Teste de olfação para odores sociais

3.7.1. Tarefa para avaliar a detecção de odores sociais

A capacidade de detectar odores sociais foi avaliada através da tarefa de odor espacial desenvolvida em nosso laboratório (PENA et al., 2017). Esta tarefa comportamental permite avaliar se camundongos são capazes de perceber pistas olfatórias presentes no ambiente.

Inicialmente os animais foram ambientados por uma hora à sala de comportamento. Em seguida, um camundongo foi colocado em uma caixa de acrílico (50x50x50cm) contendo 3 cm de altura de maravalha limpa e sem pistas espaciais (Figura 14). Este momento da tarefa foi denominado como habituação e o animal explorou livremente a caixa por 10 minutos.

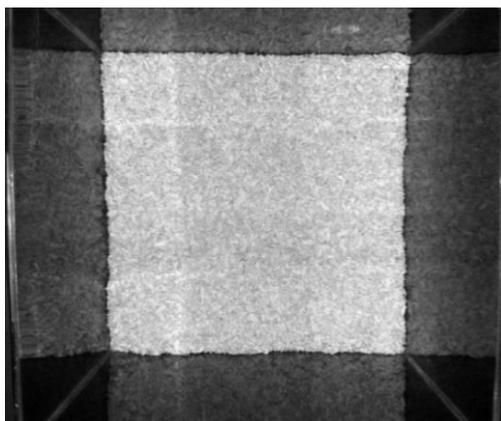


Figura 14 – Caixa onde foi realizada a tarefa de odor espacial.

Após a habituação, o animal foi retirado da caixa e 1cm³ de maravalha suja proveniente da caixa original do animal (contendo odores de fezes e urina), foi escondido sob a camada de maravalha limpa no centro do quadrante alvo. Em sequência o animal foi recolocado no centro da caixa para mais 5 minutos de livre exploração.

A caixa e o alvo foram alternados entre os animais obedecendo ao sentido anti-horário para evitar viés de posicionamento. Os outros quadrantes receberam a seguinte denominação em relação ao Alvo: Adjacente Direito, Adjacente Esquerdo e Oposto (Figura 15-A).

Nesta tarefa espera-se que no período de habituação, por não conter nenhum estímulo olfatório atrativo, o animal explore cada quadrante em média 25% do tempo total de exploração. Durante o período de teste (5 minutos), se o animal for capaz de detectar odores sociais, espera-se que ele apresente maior comportamento exploratório no quadrante alvo quando comparado aos demais quadrantes. Foram considerados movimentos exploratórios os comportamentos de cavar, cheirar e o número de exploração vertical (*rearings*).

A habituação e o teste foram filmados por uma câmera para posterior análise. Os vídeos foram analisados utilizando o programa *X-Plot-Rat*[®], que permitiu a quantificação do comportamento exploratório apresentado pelo animal em cada um dos quadrantes.

Os traçados comportamentais referentes a habituação e teste dos animais foram feitos utilizando o programa *IOGraph*[®] (Figura 15-B e C).

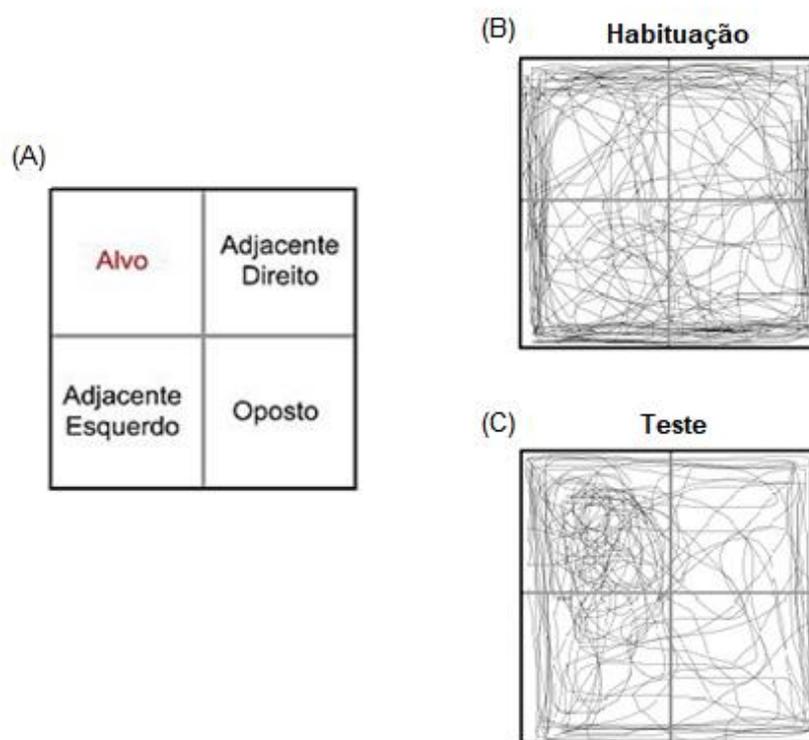


Figura 15 – (A) Esquema da disposição relativa dos quadrantes em relação ao alvo. Traçado comportamental de um animal escolhido aleatoriamente durante a (B) habituação e (C) teste.

3.7.2. Tarefa de habituação/desabituação social

A tarefa de habituação/desabituação foi realizada como previamente descrita por Bielsky e colaboradores (2004). Este teste permite avaliar se um animal é capaz de detectar e distinguir odores sociais diferentes. A tarefa foi constituída pelas etapas de aclimatação, habituação e teste. Para aclimatação, 30 minutos antes do teste, um pedaço de papel filtro de 2,5 cm de diâmetro, com 30µl de água destilada adsorvida sobre ele foi colocado na tampa da gaiola de cada animal.

Para iniciar o teste, o papel filtro contendo água presente durante o período de aclimatação foi removido e substituído por um novo papel filtro contendo 30µl de urina de camundongos machos da linhagem C57BL/6 (1:2) adsorvidos. A duração da investigação, definida como "focinho estar a 1 cm do papel filtro" foi registada utilizando um cronômetro digital durante o ensaio de 50 segundos. Uma vez que o ensaio terminou, a parte superior da gaiola com o papel filtro foi removida e uma tampa limpa foi colocada na gaiola. Após o intervalo de três minutos, um novo papel filtro foi afixado com nova diluição de 30µl do mesmo odor.

Este procedimento foi repetido pelo total de seis ensaios no período de habituação. Antes do sétimo ensaio (teste), o papel filtro foi removido durante o intervalo e substituído por um novo, sobre o qual foram adsorvidos 30µl de urina de camundongos fêmeas (1:2) da linhagem C57BL/6. Novamente a duração da investigação dentro de um intervalo de 50 segundos foi registrada.

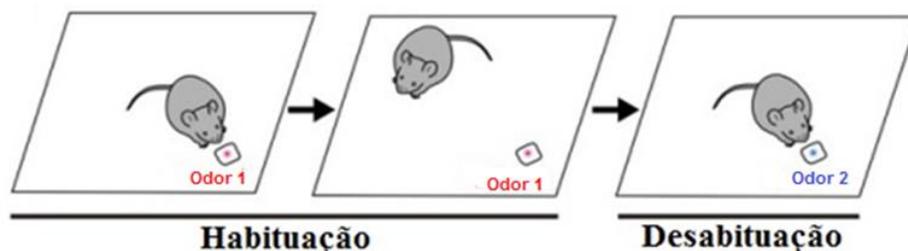


Figura 16 – Imagem ilustrativa do teste da habituação/desabituação. Durante a fase de habituação o estímulo social foi a urina de camundongos machos da linhagem C57BL/6 (Odor 1). Na desabituação o estímulo social foi trocado para a urina de camundongos fêmeas (Odor 2) (Adaptada de KAGEYAMA; IMAYOSHI, 2014).

3.8. Condicionamento olfatório

A memória olfatória não associada a um odor social foi avaliada pelo condicionamento olfatório como descrito por Bertolus e colaboradores em 2014 (BERTOLUS et al., 2014). Inicialmente os animais foram ambientados a sala de comportamento por 20 minutos. A tarefa foi realizada na caixa de Skinner (390 x 470 x 320mm) equipada com um assoalho acoplado a um estimulador elétrico, um olfatômetro personalizado na região lateral superior e uma câmera no topo da caixa (Insight⁰, Brasil) (Figura 17).

O treino foi realizado com as seguintes etapas: 120 segundos de habituação inicial seguidos por 30s de exposição ao odor de *peppermint* (estímulo condicionado) e nos últimos 2s, o odor foi pareado a um choque de 0,7mA (estímulo incondicionado). Este procedimento se repetiu por nove vezes entre intervalos de 2 minutos. Em seguida, o animal permaneceu na caixa por mais 30s e logo após retornou para a sua gaiola.

Para testar se o animal condicionou o odor ao choque, 24h pós-treino, o animal foi colocado em uma caixa com contexto diferente. Após 120s de habituação o mesmo odor usado no treino foi apresentado 5 vezes com duração de 30s entre intervalos de 2 minutos. O comportamento de *freezing* (ausência de movimentos, exceto os respiratórios) foi mensurado durante os 30s da apresentação do odor e nos 25s pré-apresentação.

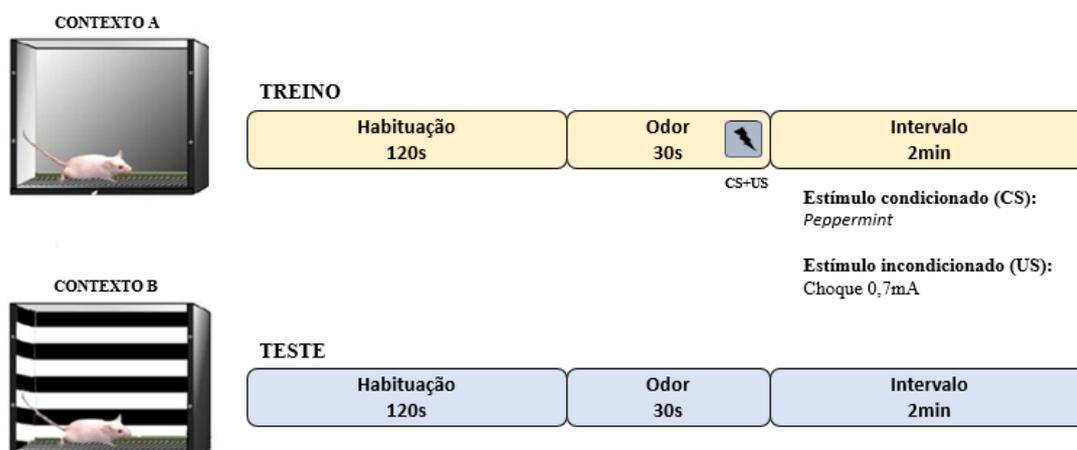


Figura 17 – Imagem ilustrativa do teste de condicionamento olfatório.

3.9. Tarefa de reconhecimento social

O paradigma residente intruso foi escolhido para avaliar a memória social. Durante a realização da tarefa, um camundongo juvenil (intruso) foi colocado na gaiola de um animal adulto (residente) e o tempo de investigação social foi cronometrado. Em condições naturais, espera-se que o tempo de investigação do animal intruso pelo residente diminua no segundo encontro quando comparado ao primeiro.

Na etapa inicial o animal residente foi habituado a gaiola com maravalha limpa e ao cilindro vazio (transparente com 10 cm de diâmetro, contendo cerca de 60 orifícios igualmente distribuídos) por 20 minutos. Imediatamente após a habituação, iniciou a sessão de treino, onde o animal intruso foi colocado no interior do cilindro por 5 minutos. Durante todo o treino o tempo de investigação social (focinho em um dos orifícios do cilindro) foi contabilizado usando um cronômetro digital.

As memórias de curta e longa-duração foram testadas respectivamente 90 minutos e 24 horas após o treino. Todas as sessões de teste foram antecedidas por um período de habituação à gaiola e ao cilindro, como no período de habituação pré-treino. Na sessão de teste, o tempo de investigação social também foi contabilizado durante 5 minutos (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUSMÃO et al., 2012a; MONTEIRO et al., 2014).

3.10 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de duas vias (*Two*

way ANOVA), seguida pelo *Post hoc* Bonferroni. A comparação entre dois grupos foi realizada utilizando o teste t pareado ou não pareado. Para comparações dentro do mesmo grupo foi utilizado a análise de variância de uma via (*One way ANOVA*). Para a análise estatística do índice de reconhecimento social foi utilizado o teste t para uma amostra com valor hipotético igual a 0,5. Se o valor do índice for menor que 0,5, significa que o animal se lembra do juvenil no dia do teste.

4. RESULTADOS

4.1 O isolamento social reduziu o volume do bulbo olfatório, sem alterar o volume total do cérebro.

Sabe-se que a privação olfatória pode levar à redução do volume do BO devido a diminuição do número de células nesta estrutura (CUMMINGS; HENNING; BRUNJES, 1997; GUARNIERI et al., 2020; KOROL; BRUNJES, 1992). Desta forma, ao considerar que o IS mantém os animais em um período de total privação olfatória, o volume do BO de animais isolados por 7 dias foi medido por imagem de ressonância magnética estrutural. Nossos resultados mostraram que este período de isolamento social reduziu o volume do BO em comparação com animais agrupados [$p=0,0002$], sem alterar o volume total do cérebro [$p=0,7578$].

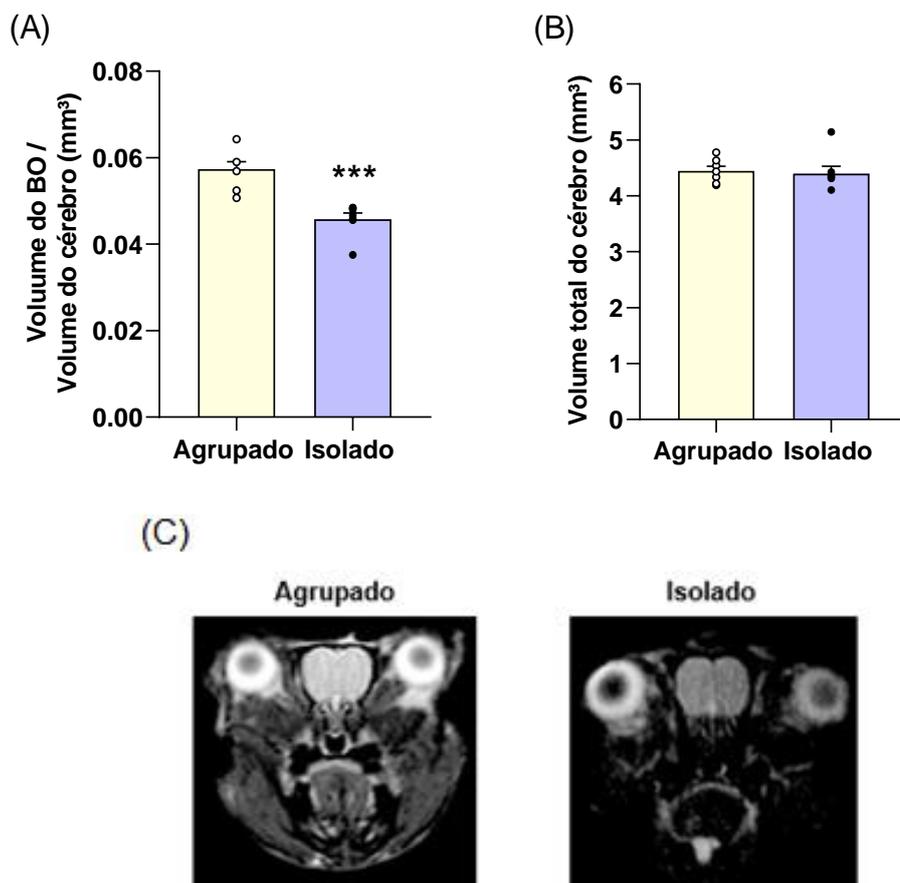
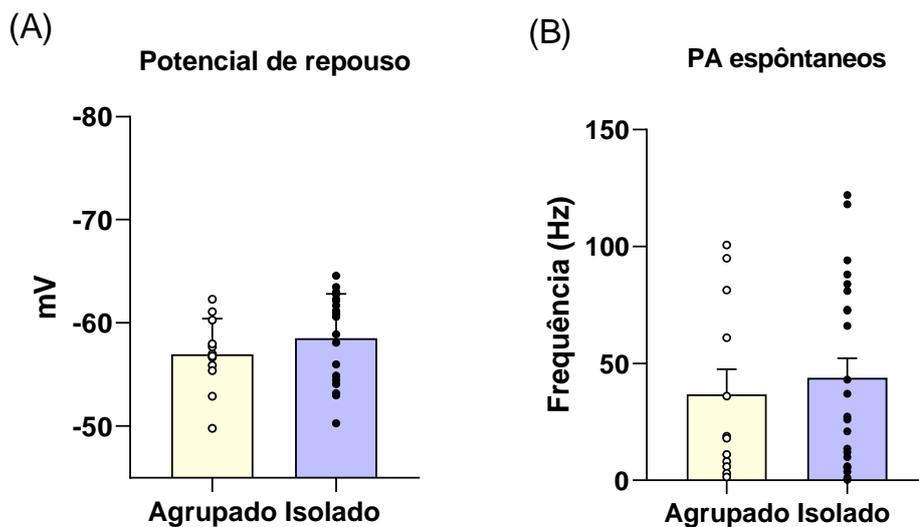


Figura 18 – (A) Sete dias de isolamento social reduziu o volume do bulbo olfatório, porém, (B) não alterou o volume total do cérebro. (C) Imagens representativas da ressonância magnética estrutural de um animal agrupado e isolado. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, *** $p<0,005$.

4.2 O isolamento social alterou a excitabilidade das células mitrais/tufadas, sem afetar o potencial de repouso e a resistência de entrada.

A atividade das células mitrais/tufadas é essencial para o processamento olfatório no circuito glomerular. Sabe-se que alterações estruturais no BO podem provocar danos a este circuito local comprometendo a sua função. Sendo assim, foi analisado se as propriedades intrínsecas destas células estariam alteradas após 7 dias de IS.

Neste experimento foram realizados registros eletrofisiológicos *in vitro* no modo *current clamp* para avaliar as principais características biofísicas que definem a atividade das células mitrais/tufadas. Nesta análise, o teste-t não pareado mostrou que o IS não altera o potencial de repouso [$p=0,2972$], a frequência dos potenciais de ação espontâneos [$p=0,6697$] e a resistência de entrada da membrana celular [$p=0,9526$]. No entanto, foi verificado uma redução na excitabilidade das células mitrais/tufadas de animais isolados quando comparados a células de animais agrupados [$p=0,0026$].



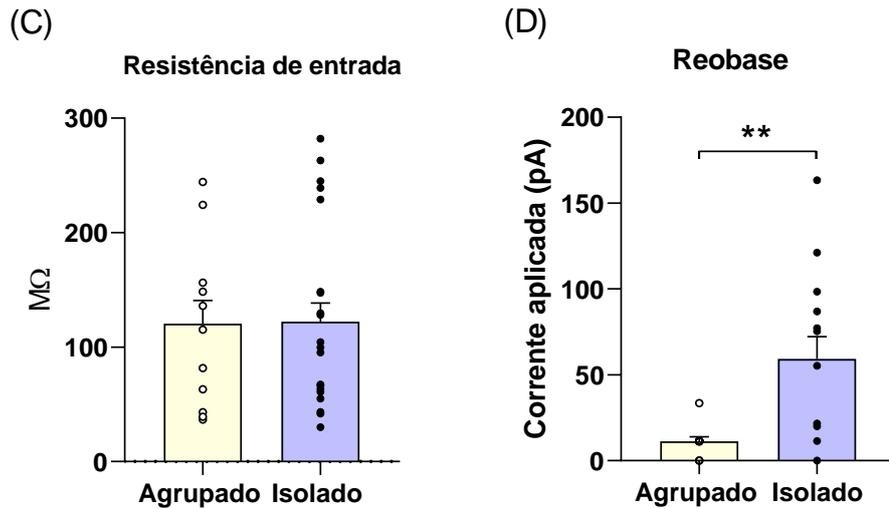


Figura 19 – Sete dias de isolamento social não alterou o (A) potencial de repouso, (B) a frequência dos potenciais de ação espontâneos e a (C) resistência de entrada das células mitrais/tufadas. Porém, a (D) excitabilidade da membrana celular foi reduzida pelo isolamento social. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, ** $p < 0,01$.

4.3 O isolamento social aumentou a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias nas células mitrais/tufadas.

Como animais isolados apresentaram alteração na excitabilidade das células mitrais/tufadas, avaliamos se o IS altera a atividade sináptica excitatória nestas células. Assim, foram realizados registros *in vitro* no modo *voltage clamp* das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas isoladas com uso de PicROTOXINA (antagonista não competitivo de receptores GABA_A).

O teste t não pareado utilizado nesta análise mostrou que a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas nas células mitrais/tufadas é maior em animais isolados em comparação com animais agrupados [$p = 0,0025$]. Deste modo, pode-se inferir que o IS altera a fisiologia do BO por aumentar a atividade excitatória nas células mitrais/tufadas.

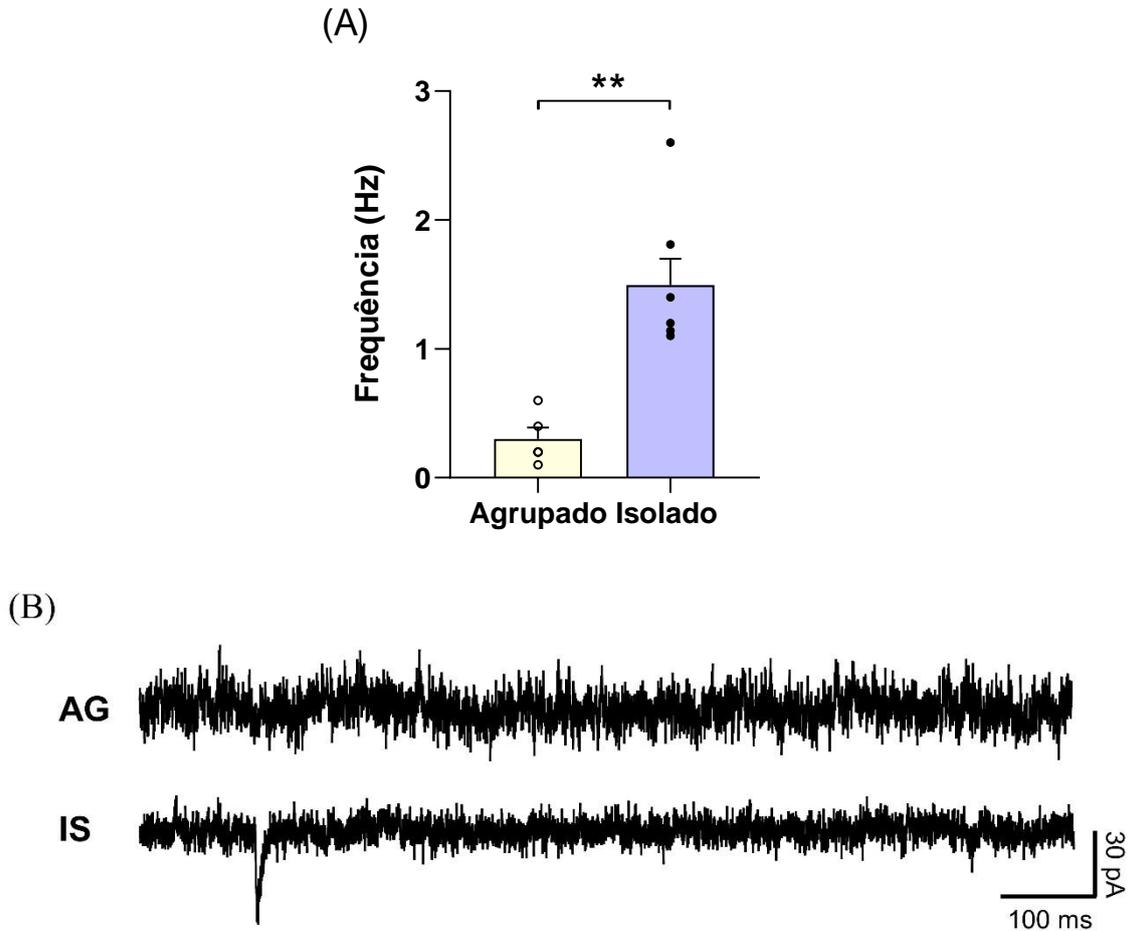


Figura 20 – (A) Sete dias de isolamento social aumentou a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas registradas nas células mitrais/tufadas. (B) Traçados que representam a média da frequência dos eventos excitatórios registrados. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, $**p < 0,005$.

4.4 O isolamento social não alterou a frequência das correntes pós-sinápticas inibitórias nas células mitrais/tufadas.

Foram realizados registros *in vitro* no modo *voltage clamp* das correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas isoladas com uso de NBQX e D-AP5, que são antagonistas dos receptores AMPA e NMDA, respectivamente.

O teste t não pareado mostrou que a frequência das correntes pós-sinápticas inibitórias nas células mitrais/tufadas não difere entre animais isolados e agrupados [$p = 0,2228$].

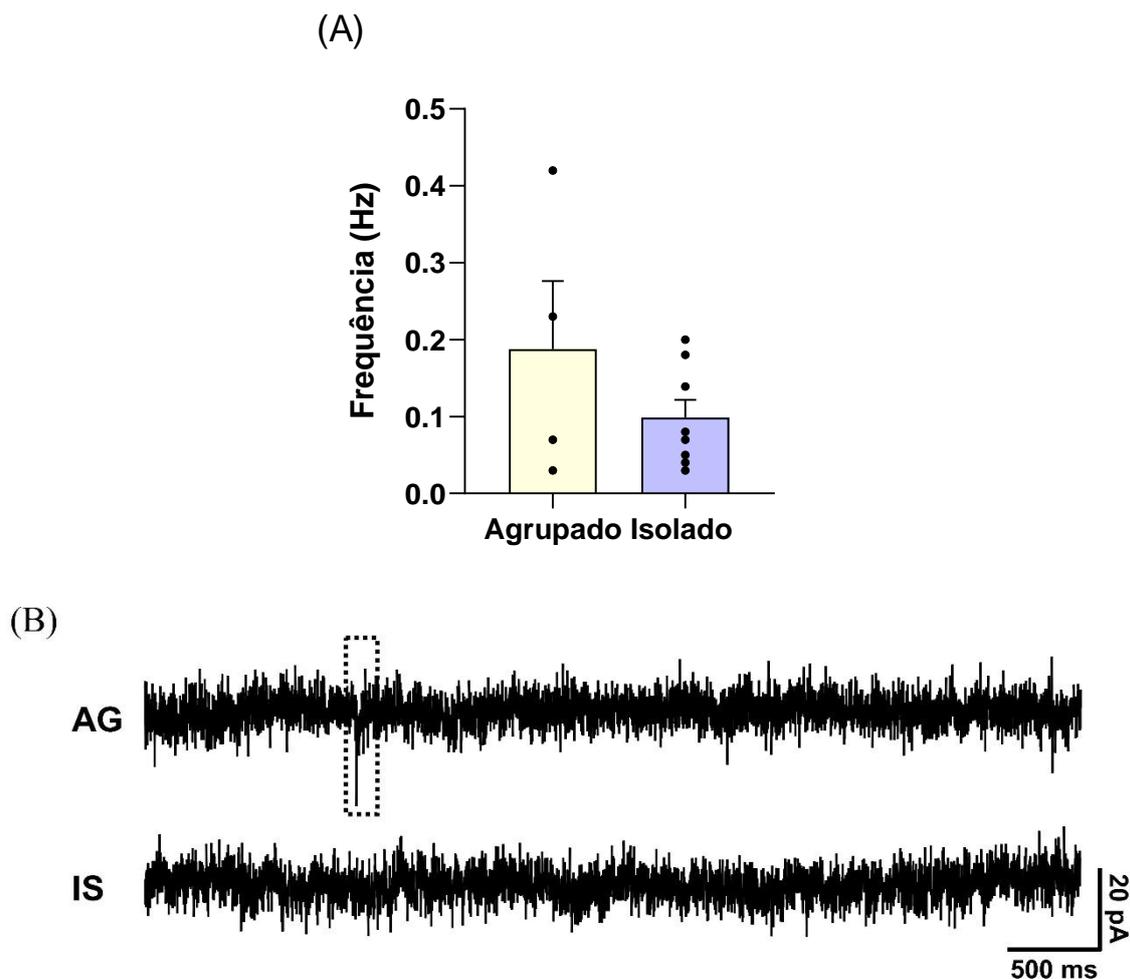


Figura 21 – (A) Sete dias de isolamento social não alterou a frequência das correntes pós-sinápticas inibitórias espontâneas registradas nas células mitrais/tufadas. (B) Traçados que representam a média da frequência dos eventos inibitórios registrados. A linha tracejada destaca a visualização de um evento inibitório em um período de 500 ms. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4.5. O isolamento social não alterou o comportamento exploratório.

Foi realizado o test-t não pareado para comparar a distância total percorrida e a exploração vertical entre agrupados e isolados. Entretanto, não foi observado diferença entre animais agrupados e isolados na distância total percorrida [$p=0,3687$] (Figura 22-A) e na exploração vertical [$p=0,5507$] (Figura 22-B). Desde modo, estes resultados mostram que o IS de 7 dias não é suficiente para alterar o comportamento exploratório.

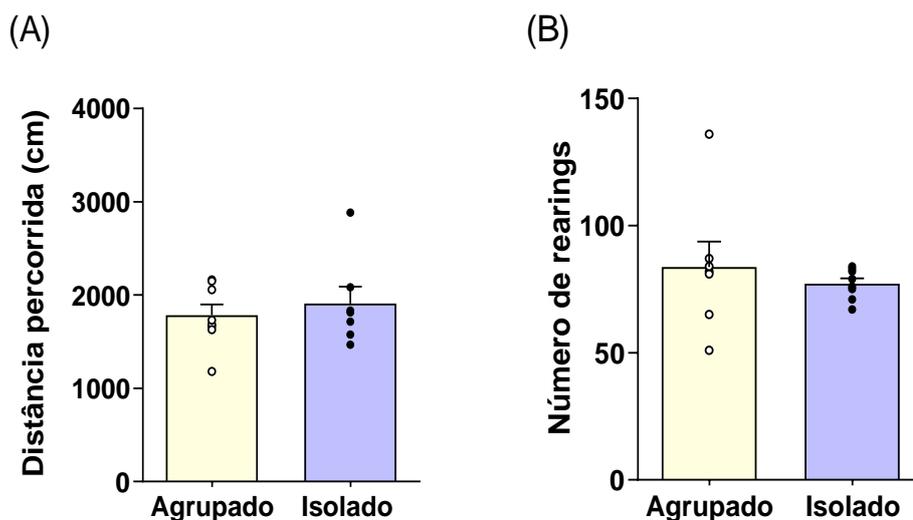


Figura 22 – O isolamento social não alterou a (A) distância total percorrida ou a (B) exploração vertical dos animais. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4.6 O isolamento social não induziu comportamento tipo-depressivo.

Avaliamos o comportamento tipo-depressivo após o IS utilizando a tarefa de suspensão pela cauda. O teste-t não pareado utilizado nesta análise mostrou que não há diferença no tempo de imobilidade entre animais agrupados e isolados no teste de suspensão pela cauda [$t_{(13)}=0,8754$; $p=0,3972$] (Figura 23). Assim, este resultado mostra que o IS de 7 dias durante a fase adulta não induz comportamento tipo-depressivo.

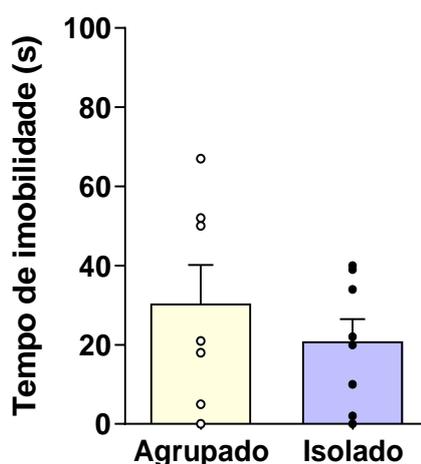


Figura 23 – Durante os 300 segundos de suspensão pela cauda, os animais agrupados e isolados permaneceram por tempo semelhante em imobilidade. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4.7 O isolamento social não induziu comportamento tipo-ansioso.

Avaliamos o comportamento tipo-ansioso dos animais utilizando o labirinto em cruz elevado. Nossos resultados demonstraram que 7 dias de IS não induziu comportamento tipo-ansioso. O teste-t não pareado mostrou que não há diferença significativa entre os grupos em relação à porcentagem de entrada [Agrupado x Isolado: $t_{(12)} = 0,3114$, $p = 0,7557$] ou tempo de permanência [Agrupado x Isolado: $t_{(12)} = 0,2911$, $p = 0,7759$] nos braços abertos (Figura 24-A e B). Também não há diferença entre os grupos quanto ao número de entradas nos braços fechados [Agrupado x Isolado: $t_{(12)} = 1,096$, $p = 0,2944$] (Figura 24-C).

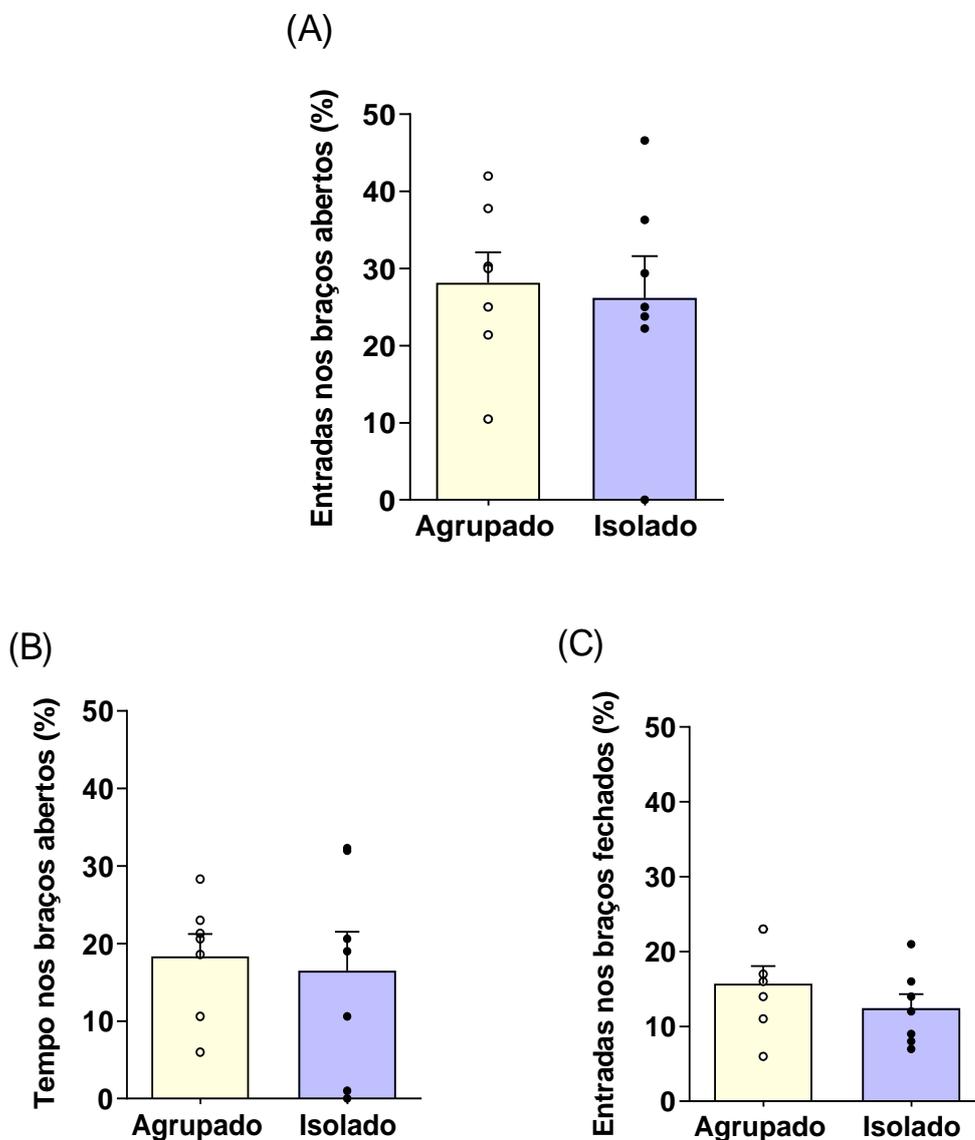


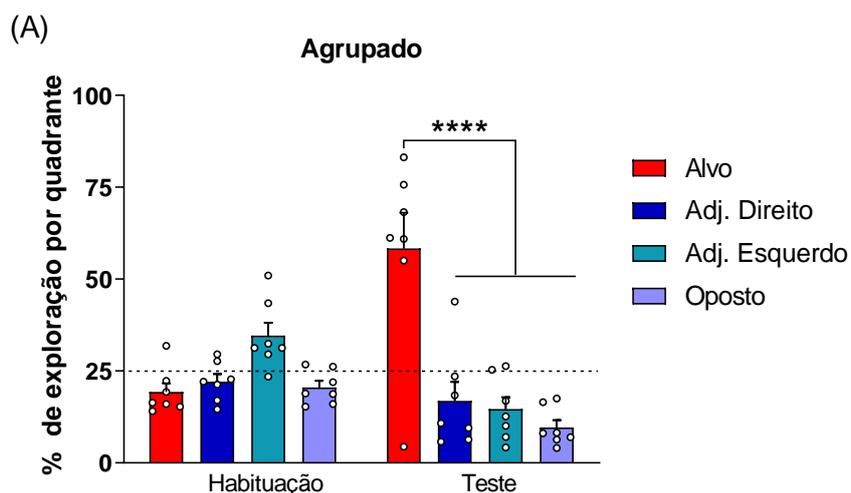
Figura 24 - (A e B) A porcentagem de entrada e permanência nos braços abertos não diferiu entre os animais agrupados e isolados. (C) Não houve diferença entre os grupos na porcentagem de entradas nos braços fechados. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

4.8 O isolamento social não prejudicou a detecção para odores sociais.

Para verificar a integridade do sistema olfatório após o IS de 7 dias, os animais foram submetidos ao teste de olfato, cujo estímulo olfatório é de natureza social, ou seja, maravalha proveniente da própria caixa do animal testado, contendo cheiro de urina e fezes dele e de seus co-específicos.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas com *Post hoc* Bonferroni, tendo-se como variáveis o comportamento exploratório em cada quadrante nos dois momentos (habituação e teste). Em seguida foi utilizado o teste t não pareado para comparar a porcentagem de exploração no quadrante alvo durante o teste entre animais agrupados e isolados.

O *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações mostrou que tanto animais agrupados [$p < 0,0001$] quanto animais isolados [$p < 0,0001$] apresentaram no momento do teste maior tempo de exploração no quadrante alvo, ou seja, foram capazes de detectar a presença da maravalha com estímulos sociais olfatórios (Figura 25-A e B). Desta forma, estes resultados mostram que a capacidade de detectar odores sociais está preservada mesmo após o isolamento social de 7 dias. Além disso, foi possível demonstrar que o comportamento de exploração de pistas sociais olfatórias no quadrante alvo não difere entre animais agrupados e isolados (Figura 25 – C).



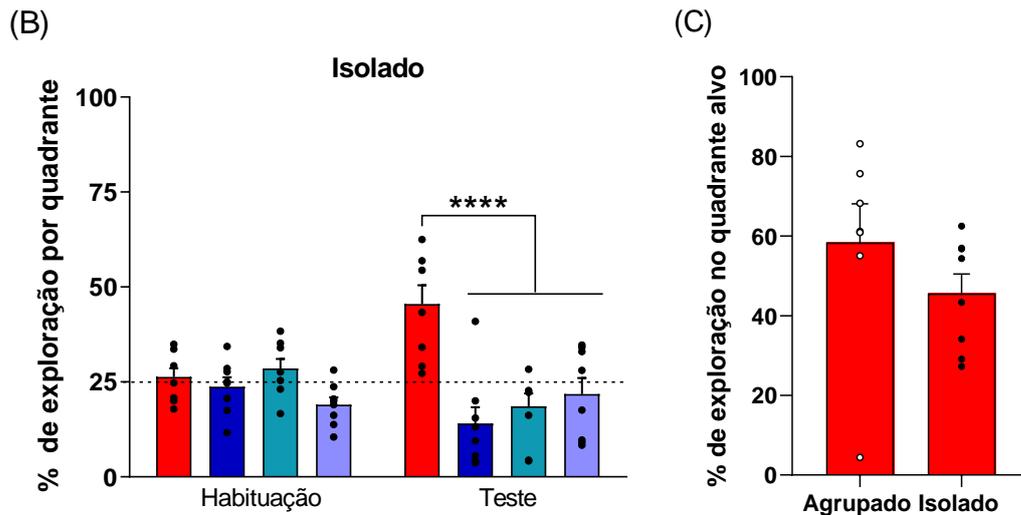


Figura 25 – Os gráficos (A) e (B) representam a porcentagem do tempo de exploração em cada quadrante durante a habituação e o teste. Os asteriscos (*) indicam a diferença do tempo de exploração entre o quadrante alvo e os demais quadrantes dentro do mesmo grupo. A linha tracejada mostra a porcentagem similar de exploração dos quatro quadrantes durante a habituação (ausência de estímulos sociais olfatórios). (C) Não existe diferença na porcentagem de exploração do quadrante alvo entre animais agrupados e isolados durante o teste. Os dados foram expressos como \pm erro padrão da média, **** $p < 0,0001$.

4.9 O isolamento social não prejudicou a capacidade discriminatória de odores sociais.

Para verificar se o IS de 7 dias altera a capacidade discriminatória de odores sociais, camundongos privados de contato social foram submetidos ao teste da habituação/desabituação. Nesta tarefa, foram utilizados como estímulo social, a urina de camundongos machos (odor 1) e de fêmeas (odor 2) da linhagem C57BL/6 para habituação e desabituação, respectivamente.

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas foi utilizada para comparar o tempo de exploração entre todos os ensaios da habituação e desabituação. O *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações mostrou que animais agrupados e isolados são capazes de discriminar odores sociais diferentes, pois há diferença no tempo de investigação no último ensaio da habituação com o tempo de investigação no teste [$p < 0,0001$] em ambos os grupos. Além disso, para mostrar que a habituação ocorreu, comparamos o tempo de exploração entre o primeiro e o último ensaio da habituação [$p < 0,05$]. Entre os grupos comparamos o tempo de exploração no teste, onde foi possível observar que animais isolados apresentam maior comportamento de exploração olfatória após a privação social [$p = 0,0064$].

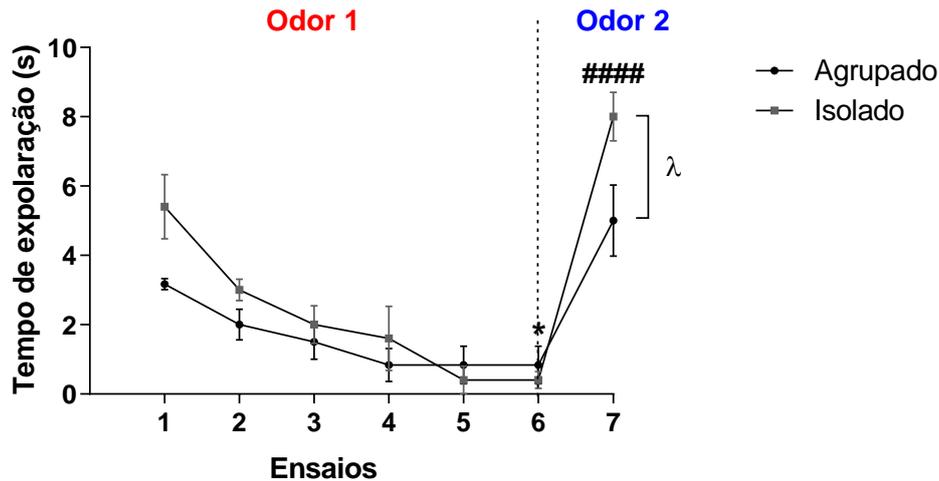


Figura 26 - O gráfico representa o tempo de exploração dos odores 1 e 2, em segundos, durante a habituação e o teste. O asterisco (*) indica diferença no tempo de exploração do odor 1 entre o 1º e 6º ensaio da habituação em ambos os grupos. Os quadrados (#) indicam diferença entre o último ensaio da habituação e o teste (desabituação). O lambda (λ) indica a diferença entre agrupados e isolados no teste. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, * $p < 0,05$; #### $p < 0,0001$; $\lambda p < 0,001$.

4.10 O isolamento social prejudicou a memória de condicionamento olfatório.

Para avaliar o efeito do IS em memórias olfatórias, primeiro foi analisada a memória de condicionamento olfatório usando um odor não-social como estímulo condicionado. O propósito deste experimento foi avaliar se o IS prejudica uma memória olfato-dependente que não seja relacionada a estímulos sociais.

Nossos resultados foram analisados utilizando a ANOVA de duas vias para comparar a média do comportamento de *freezing* pré-odor vs. odor [Interação: $F_{(1,25)} = 6,145$; $p = 0,0203$], [Tratamento $F_{(1,25)} = 6,245$; $p < 0,0001$], [Grupos: $F_{(1,25)} = 12,23$; $p = 0,0018$]. A análise *Post hoc* mostrou um aumento significativo do comportamento de *freezing* dos animais agrupados durante a apresentação do odor na sessão de teste [$p < 0,0001$]. Este resultado não foi observado para os animais isolados. Além disso, a análise mostrou diferença significativa no comportamento de *freezing* dos animais agrupados em relação aos animais isolados [$p < 0,01$], (Figura 27). Em resumo, estes resultados mostram que o contexto, por si só, não induziu comportamento de medo e que apenas os animais agrupados apresentam a memória de condicionamento olfatório preservada.

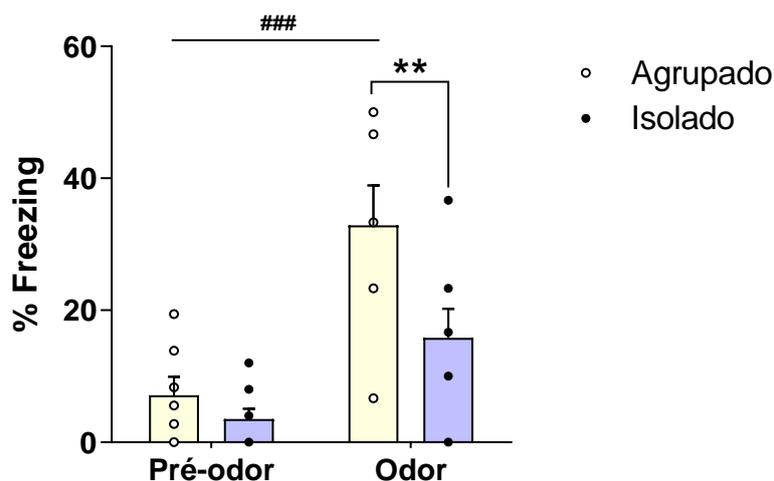


Figura 27 – Animais isolados quando expostos ao odor 24h após o treino não apresentaram aumento significativo no comportamento de medo, indicando que há um prejuízo na memória de condicionamento olfatório. Os asteriscos (*) indicam diferença na porcentagem de *freezing* entre os grupos e os quadrados (#) indicam diferença entre pré-odor e odor. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão ** $p < 0,01$, ### $p < 0,0001$.

4.11 O isolamento social prejudicou a memória de reconhecimento social de longa-duração, mas não a memória de curta-duração.

Nossos resultados mostram que o isolamento de 7 dias não afetou a memória de reconhecimento social de curta-duração, já que o tempo de investigação social durante o teste, foi significativamente menor em relação ao tempo de investigação durante o treino [$p = 0,002$] (Figura 28-A).

Este resultado foi confirmado pelo índice de reconhecimento social. Animais agrupados [$t_{(5)} = 9,980$; $p = 0,0002$], assim como os isolados [$t_{(4)} = 10,16$; $p = 0,0005$], apresentaram o índice de reconhecimento social de curta-duração menor que 0,5, ou seja, reconheceram o juvenil 90 minutos após o primeiro encontro (Figura 28-B).

No entanto, ocorreu um efeito amnésico sobre a memória de reconhecimento social de longa-duração em animais isolados, já que o tempo de investigação social entre o treino e o teste não apresentou diferença [$p = 0,2066$]. Ao contrário, animais agrupados apresentaram a memória de longa-duração intacta [$p < 0,001$] (Figura 28-A).

O índice de reconhecimento social confirmou estes resultados. Animais isolados [$t_{(5)} = 2,286$; $p = 0,0710$], diferentemente dos animais agrupados [$t_{(5)} = 6,028$; $p = 0,0018$], apresentaram o índice de reconhecimento social para a memória de longa-duração maior que 0,5, ou seja, não reconheceram o juvenil 24 após o primeiro encontro (Figura 28-C).

Esses achados confirmam dados da literatura utilizando as linhagens Swiss e C57BL/6 (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019; GUARNIERI et al., 2020; GUSMÃO et al., 2012a; MONTEIRO et al., 2014). Em outras palavras, em camundongos ICR-CD1, o IS de 7 dias também prejudica a memória de reconhecimento social de longa-duração, sem prejudicar a memória de curta-duração.

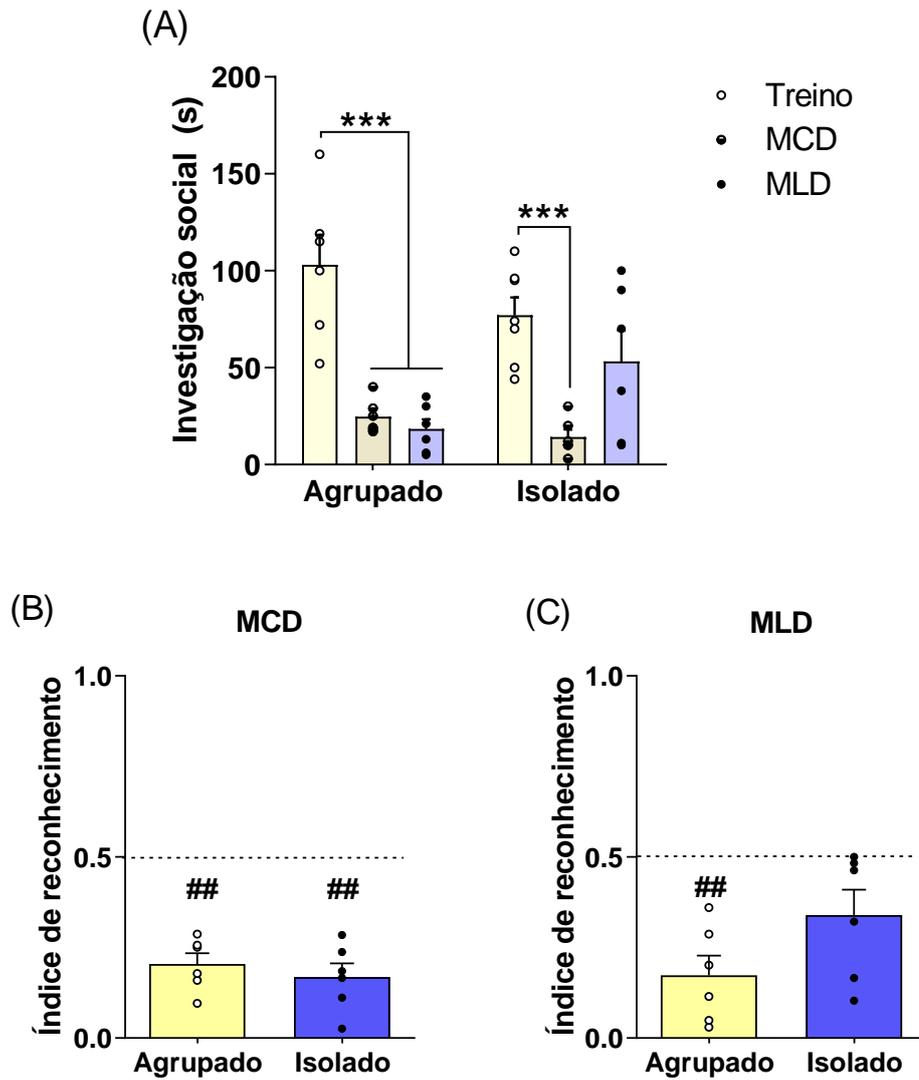


Figura 28 – (A) O isolamento social causou prejuízo da memória de reconhecimento social de longa-duração, sem alterar a memória de curta-duração. Os asteriscos (*) indicam diferença entre o treino e o teste dentro do mesmo grupo. (B e C) O índice de reconhecimento social da memória de longa-duração é menor que 0,5 apenas para animais agrupados. Os quadrados (#) indicam valor do índice de reconhecimento social estaticamente menor que 0,5. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, *** $p < 0,001$; ## $p < 0,01$.

Capítulo 2

Fator neurotrófico derivado do cérebro e a memória social: alvos comuns do isolamento social?

5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

5.1 Justificativa

Dentre as neurotrofinas, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) destaca-se por participar da formação e persistência da memória. Por meio da ativação do receptor TrkB, o m-BDNF pode ativar várias vias de sinalização intracelular que atuam para regular a plasticidade sináptica envolvida na formação da memória. Estudos mostram que o bloqueio do m-BDNF intra-hipocampal 12 horas após o treino é capaz de prejudicar a memória associativa, indicando que esta neurotrófina possui papel fundamental para a persistência da memória de longa-duração (BEKINSCHTEIN et al., 2007, 2008).

No entanto, ainda permanece desconhecida a participação do m-BDNF na consolidação da memória de reconhecimento social. Sendo assim, neste trabalho nos dedicamos a esclarecer como ocorre a expressão tempo-dependente do BDNF no BO durante a consolidação da memória de reconhecimento social. Além disso, foi realizada intervenção farmacológica com anticorpos anti-BDNF, num ponto específico da consolidação, para demonstrar se a interrupção da sinalização no BO prejudica a formação desta memória.

Ainda, considerando que o IS crônico pode reduzir a expressão do m-BDNF em várias áreas do cérebro (MURÍNOVÁ et al., 2017), avaliamos se a administração do BDNF recombinante humano intra-OB, neste mesmo ponto da consolidação, seria capaz de reverter o prejuízo da memória de reconhecimento social de longa-duração de animais isolados.

5.2 Objetivo

Avaliar a participação do BDNF do bulbo olfatório na consolidação da memória de reconhecimento social.

5.3 Objetivos específicos

- Analisar a expressão temporal do BDNF no bulbo olfatório durante a consolidação da memória de reconhecimento social;
- Verificar se o bloqueio do m-BDNF no bulbo olfatório prejudica a consolidação da memória reconhecimento social;
- Avaliar se a expressão do m-BDNF no bulbo olfatório durante a consolidação é um efeito do aprendizado da tarefa de reconhecimento social;

- Avaliar se os níveis de expressão do m-BDNF estão alterados no BO de animais isolados em um ponto específico da consolidação da memória de reconhecimento social;
- Verificar se a administração do BDNF recombinante humano no bulbo olfatório reverte o déficit da memória de reconhecimento social dos animais isolados.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Western Blotting

Para a coleta das amostras do BO, os animais foram anestesiados utilizando ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal e sacrificados por decapitação. O bulbo olfatório foi retirado e em seguida armazenado a -80°C até à sua utilização.

As amostras foram homogeneizadas em tampão de RIPA (NaCl 150 mM, 50 mM Tris pH = 7,4), 1 mM de EDTA, 1% de Nonidet P40, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM, deoxicolato de sódio a 0,5%) e centrifugados em 2040,35 G (Centrífuga Eppendorf 5415R⁰, Alemanha), a 4°C durante 15 min (Ferreira-Vieira et al., 2014). O sobrenadante foi então utilizado para a determinação da concentração de proteína através do método de Bradford, onde albumina de soro bovino (1 mg/mL) foi utilizada como o padrão. As amostras contendo 35 mg de proteínas totais foram então desnaturadas em tampão de amostra de proteína (100 mM Tris-HCl pH = 6,8, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, 20% de H₂O, 0,5% β -mercaptoetanol) a 100°C durante 4 min, separadas em gel de poliacrilamida-SDS 15% ou 12% e transferidas para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF Immobilon-P⁰, Millipore, MA) em um sistema de electroforese Bio-Rad (Bio-Rad⁰, Hercules).

As membranas passaram por um processo de bloqueio, durante 2h em temperatura ambiente, com TBS-T (soro fisiológico tamponado Tris com Tween a 0,1%) contendo 5% de leite em pó. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com TBS-T por 10 minutos e então incubadas a 4°C overnight com 3% de BSA e anticorpos primários contra as proteínas específicas: BDNF (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), pro-BDNF(1:1000, Santa Cruz, Biotechnology⁰), β -actina (1:3000, Santa Cruz Biotechnology⁰). Para a visualização quimioluminescente, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-coelho (1:5000, para a proteína BDNF) ou anti-camundongo (1:5000 – para pro-BDNF e β -actina) conjugado com HRP, à temperatura ambiente durante 2 horas. As bandas de proteína alvo foram detectadas utilizando o sistema de detecção Western ECL (Pierce) e a densidade das bandas de β -actina e proteínas específicas foram quantificadas pelo software ImageJ (Versão 1.44p, National Institute Health⁰, USA).

6.2 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias

Para implantação das cânulas guias no BO, inicialmente os animais receberam uma injeção intraperitoneal de pentabiótico 160mg/kg (160mg = 112.941,176 UI) e meia hora depois uma injeção de tramadol (5mg/kg). Após 30 minutos, os animais foram anestesiados com Ketamina (100 mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e posicionados ao aparelho estereotáxico. Os olhos dos animais foram protegidos com óleo oftálmico, para evitar ressecamento dos olhos já que estes animais não os fecham quando anestesiados. Ao detectarmos a ausência de resposta reflexa ao pinçar das patas, a região da cabeça foi tricotomizada e higienizada com 3 repetições de iodopovidona (PVPI 10%) seguida de etanol 70%, usando um cotonete. Em seguida, uma injeção subcutânea de lidocaína (2mg) foi administrada e após alguns minutos o crânio foi exposto através de uma incisão com bisturi. O periósteo foi removido, o bregma e o lambda foram alinhados. O bregma foi a referência para as coordenadas (adaptadas de PAXINOS) utilizadas para a implantação das cânulas guias. As cânulas foram implantadas no bulbo olfatório de ambos os hemisférios cerebrais (em mm: AP +4.3; LL \pm 1.0; DV -1.5).

Foi realizada a trepanação bilateral utilizando uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas anteroposterior e látero-lateral. As cânulas guias (22G, 7mm) foram colocadas num adaptador fixado a torre do estereotáxico e foram abaixadas lentamente através dos orifícios abertos anteriormente até atingirem a coordenada dorso-ventral. As cânulas foram fixadas com cimento de zinco e em seguida o adaptador foi retirado. Uma cânula oclusora foi colocada no interior de cada cânula guia para evitar o entupimento. Dois parafusos foram fixados sobre a calota craniana no osso frontal para aumentar a fixação do capacete. A região do crânio exposta foi coberta por resina acrílica formando o capacete. Após o procedimento cirúrgico os animais foram recolocados em suas caixas e receberam administração subcutânea de banamine (2,5mg/Kg) de 12/12h.

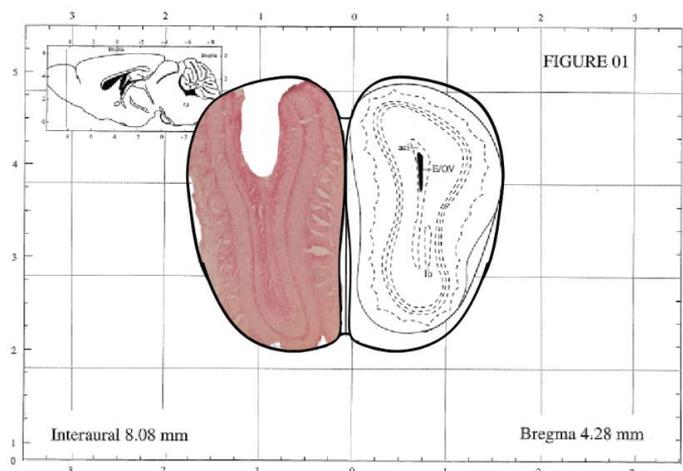


Figura 29 – Fotografia de corte histológico demonstrando o correto posicionamento da cânula guia no bulbo olfatório.

6.3 Tratamento farmacológico

Após uma semana de recuperação cirúrgica os animais realizaram a tarefa de reconhecimento social. Animais agrupados receberam administração intra-BO de anticorpos anti-BDNF (1 μ g/ μ L) 12h após o treino, a fim de verificar se o bloqueio do m-BDNF prejudica a consolidação da memória de reconhecimento social. Por outro lado, animais isolados receberam administração intra-BO de *hr*BDNF (BDNF recombinante humano 0,5 μ g/ μ l) 12h após o treino, para verificar se o aumento do BDNF neste ponto da consolidação reverte o déficit da memória de reconhecimento social.

As drogas foram administradas utilizando-se uma cânula injetora (30G, 12mm) acoplada a um tubo de polietileno e à uma seringa Hamilton[®] de 10 μ l. Foi administrado um volume de 0,5 μ l/lado, numa velocidade de 0,5 μ l/min. Para a administração das drogas, os animais foram contidos gentilmente pelo experimentador, sem anestesia ou sedação, visando evitar interferências da anestesia nos testes comportamentais. Os animais foram contidos pelo experimentador por 30s para colocação da cânula injetora, seguidos da administração, quando o animal permaneceu livre. Cada animal recebeu uma única administração da droga no tempo determinado pelos resultados da expressão temporal do BDNF durante a consolidação da memória social.

6.4 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de duas vias (*Two way ANOVA*), seguida pelo *Post hoc* Bonferroni. O teste t pareado foi utilizado para

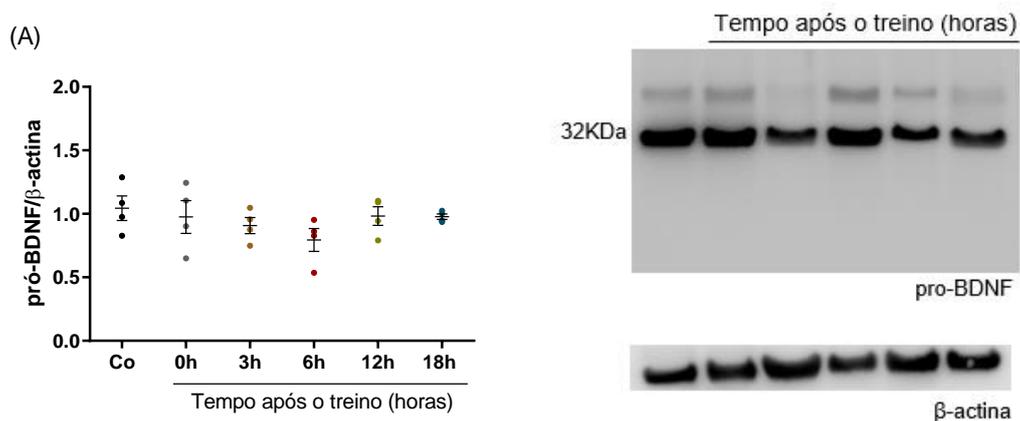
comparar os tempos de investigação social entre os turnos diurno e noturno. Para as comparações dentro do mesmo grupo foi utilizada a análise de variância de uma via (*One way ANOVA*). A análise estatística do índice de reconhecimento social foi realizada como citado anteriormente no item 3.10.

7. RESULTADOS

7.1 A expressão do m-BDNF no bulbo olfatório aumentou 12 e 18 horas após o treino da tarefa de reconhecimento social.

Para avaliar a participação do BDNF na consolidação da memória de reconhecimento social, inicialmente foi analisado o padrão de expressão temporal desta proteína no BO de animais agrupados. Neste experimento os animais realizaram o treino da tarefa de reconhecimento social as 8h da manhã e foram sacrificados imediatamente, 3, 6, 12 e 18 horas após o treino. Em seguida, os BOs foram dissecados e processados para análise dos níveis de expressão das isoformas pro-BDNF e m-BDNF através da técnica Western blotting.

Os resultados foram analisados utilizando o teste ANOVA de uma via com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. O teste comparou os níveis de expressão em cada tempo pós-treino com o grupo controle (treino sem o juvenil). As análises estatísticas mostraram que a expressão do pro-BDNF não sofreu variações drásticas após o treino da tarefa de reconhecimento social (Figura 30-A). Entretanto, a expressão do m-BDNF aumentou 12 [p<0,0123] e 18 horas [p<0,0078] após o treino (Figura 30-B). Deste modo, o aumento do m-BDNF na fase tardia da consolidação pode ter um papel fisiológico importante para a memória social de longa-duração.



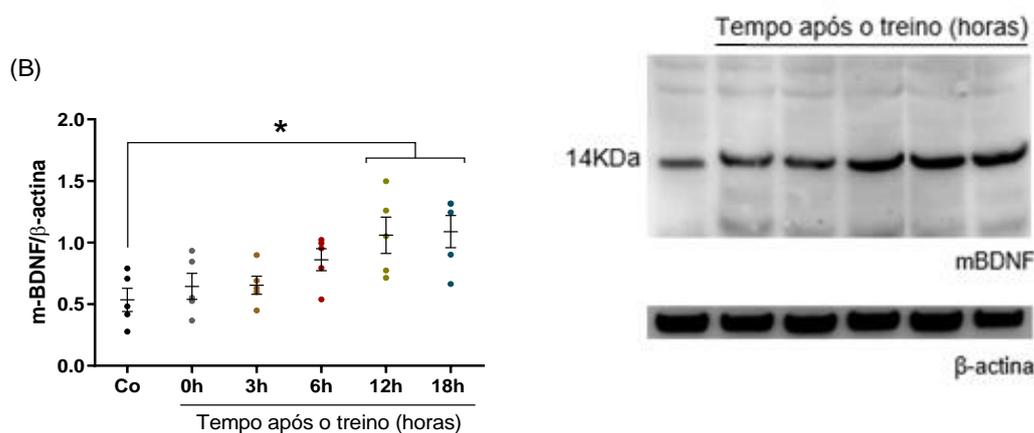


Figura 30 – (A) Expressão temporal do pro-BDNF e (B) m-BDNF no bulbo olfatório durante a consolidação da memória de reconhecimento social. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média * $p < 0,05$.

7.2 O bloqueio do m-BDNF no bulbo olfatório 12 horas após o treino prejudicou a consolidação da memória de reconhecimento social.

Considerando o resultado anterior, o tempo de 12 horas pós-treino parece ser um ponto importante para a consolidação da memória de reconhecimento social. Desta forma, optamos por realizar a administração intra-BO de anticorpos anti-BDNF ou salina 12 horas após o treino da tarefa de reconhecimento social. Este experimento foi realizado de duas formas distintas: (1) treino realizado as 08h da manhã com administração de anticorpos as 08h da noite e (2) treino realizado as 08h da noite com administração de anticorpos as 08h da manhã. Em ambos os casos a memória de longa-duração foi testada 24 horas pós-treino. O propósito deste experimento foi demonstrar se o m-BDNF 12 horas após o treino tem um papel crítico na consolidação da memória de reconhecimento social.

Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. O *Post hoc* comparou a média dos tempos de investigação social no treino com a média dos tempos de investigação no teste. A análise estatística mostrou que a administração de anticorpos anti-BDNF as 08h da manhã [$p = 0,3646$] e as 08h da noite [$p > 0,999$] prejudicou a memória de reconhecimento social de longa-duração. Diferentemente, animais que receberam administração de salina as 08h da manhã [$p = 0,0293$] e as 08h da noite [$p = 0,0098$] não apresentaram prejuízo da memória de reconhecimento social.

Estes resultados foram confirmados pelo índice de reconhecimento social. Os animais que receberam salina na fase clara [$t_{(6)}= 3,705$, $p=0,0100$] e escura [$t_{(8)}= 3,839$, $p=0,0050$] do ritmo circadiano apresentaram o valor do índice menor que 0,5, ou seja, reconheceram o juvenil 24 horas após o treino. No entanto, foi observado um efeito amnésico sobre a memória de reconhecimento social de longa-duração em animais que receberam administração de anticorpos anti-BDNF na fase clara [$t_{(9)}= 1,268$, $p= 0,2366$] e escura [$t_{(8)}= 0,02906$, $p= 0,9775$].

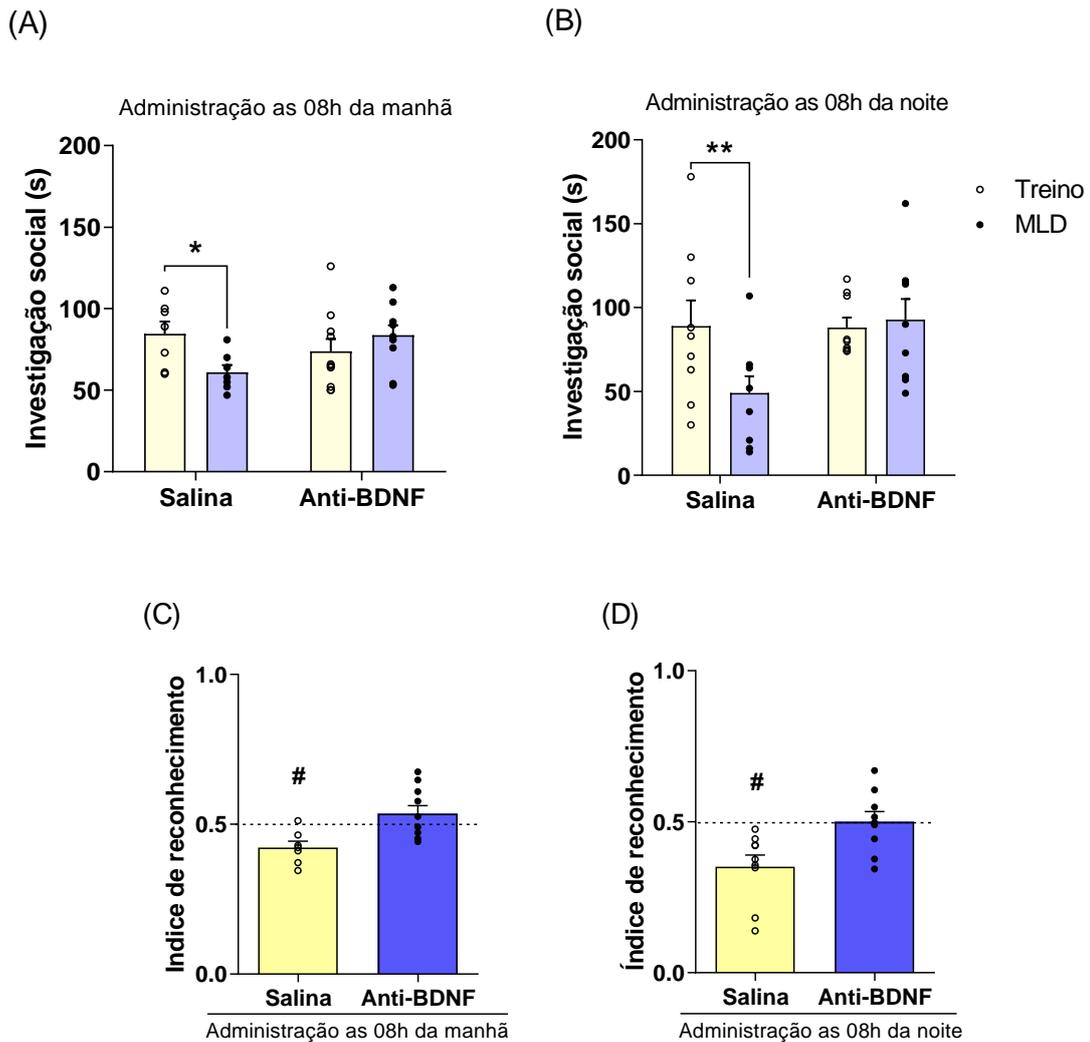


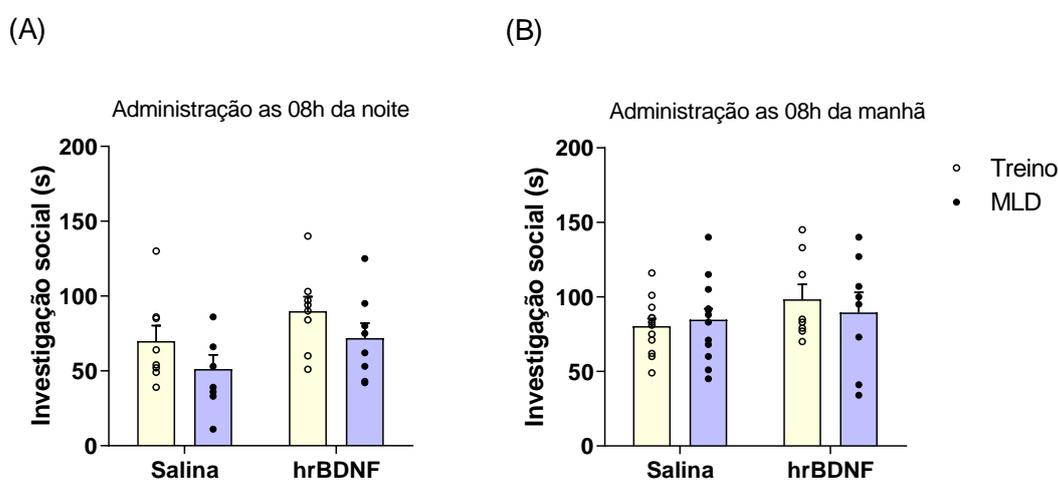
Figura 31 – O bloqueio do m-BDNF na fase clara (A e C) e escura (B e D) do ritmo circadiano causou prejuízo da memória de reconhecimento social de longa-duração. O asterisco (*) indica diferença no tempo de investigação social do juvenil entre o treino e o teste dentro do mesmo grupo. O quadrado (#) indica o valor do índice de reconhecimento social significativamente menor que 0,5. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média * $p<0,05$; ** $p<0,01$; # $p<0,05$.

7.3 A administração do *hr*BDNF no bulbo olfatório de animais isolados não teve efeito promnóstico na memória de reconhecimento social.

Considerando que o bloqueio do m-BDNF no BO 12 horas após o treino prejudica a consolidação da memória de reconhecimento social, avaliamos se administração do *hr*BDNF neste mesmo ponto da consolidação teria um efeito promnóstico na memória de reconhecimento social de animais isolados. Este experimento também foi realizado de duas formas distintas: (1) treino realizado as 08h da manhã com administração do *hr*BDNF as 08h da noite e (2) treino realizado as 08h da noite com administração do *hr*BDNF as 08h da manhã. Em ambos os casos a memória de longa-duração foi testada 24 horas após treino.

Os resultados foram analisados através do teste ANOVA de duas vias com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. O *Post hoc* comparou a média dos tempos de investigação social no treino com a média dos tempos de investigação no teste. A análise estatística mostrou que a administração do *hr*BDNF as 08h da manhã [$p=0,6785$] e as 08h da noite [$p=0,2394$] não teve um efeito promnóstico em reverter o déficit da memória reconhecimento social dos animais isolados. Nos grupos controle, animais que receberam administração de salina as 08h da manhã [$p=0,8610$] e as 08h da noite [$p=0,2189$] também apresentaram prejuízo da memória de reconhecimento social.

Estes resultados foram confirmados pelo índice de reconhecimento social. Animais que receberam salina na fase clara [$t_{(12)}=0,3589$, $p=0,7259$] e escura [$t_{(7)}=1,960$, $p=0,0908$] do ritmo circadiano não apresentaram o valor do índice estatisticamente menor que 0,5, ou seja, não reconheceram o juvenil 24 horas após o treino. Resultado semelhante foi observado em animais que receberam administração do *hr*BDNF na fase clara [$t_{(7)}=0,9316$, $p=0,3825$] e escura [$t_{(7)}=1,772$, $p=0,1197$].



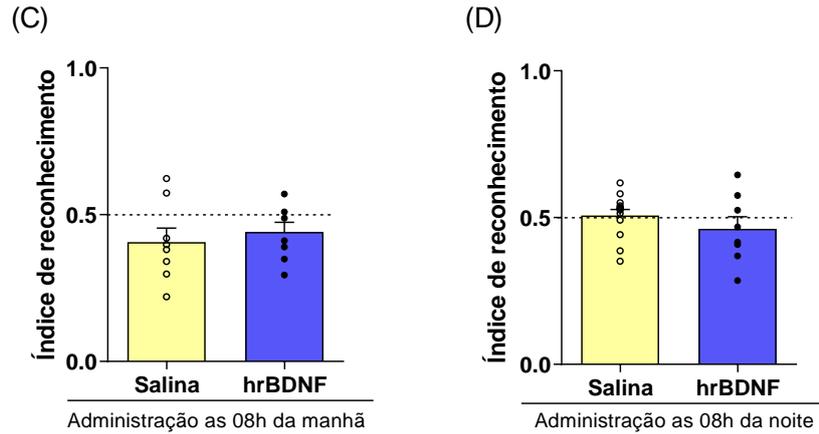


Figura 32 – (A e B) A administração do *hrBDNF* não reverteu o déficit de memória de reconhecimento social dos animais isolados. (C e D) Animais que receberam *hrBDNF* ou salina não apresentaram o valor do índice de reconhecimento social significativamente menor que 0,5. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

7.4 Não houve diferença no tempo de investigação social entre os treinos realizados nas fases clara e escura do ritmo circadiano.

Sabe-se que a atividade exploratória de camundongos pode variar com o ritmo circadiano (ROEDEL et al., 2006). Sendo assim, foi comparado o tempo de investigação social gasto nos treinos realizados nas fases clara e escura. O teste-t não pareado utilizado nesta análise mostrou que animais agrupados [$p=0,3001$] e isolados [$p=0,6972$] apresentam comportamento exploratório semelhante nas fases clara e escura do ritmo circadiano. Portanto, podemos considerar que a atividade exploratória durante a realização da tarefa de reconhecimento social não foi influenciada por variações fisiológicas circadianas.

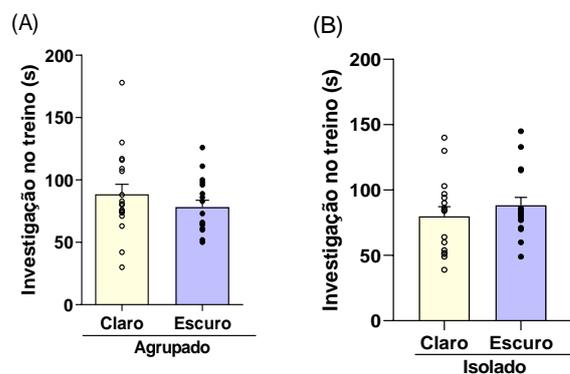
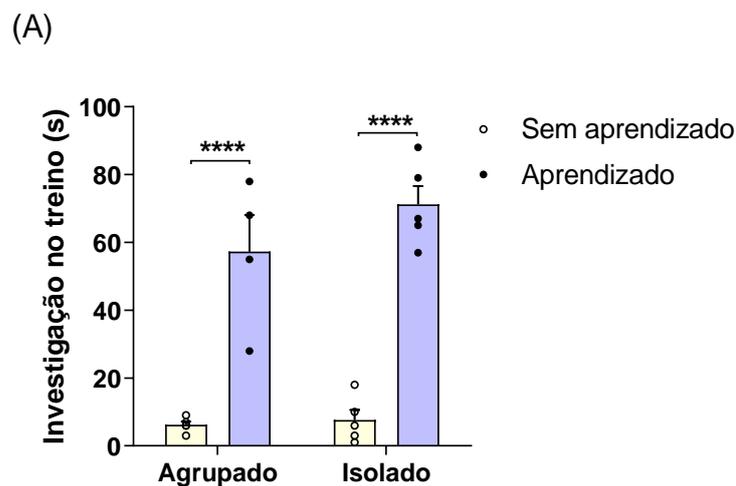


Figura 33 – Animais (A) agrupados e (B) isolados apresentaram o mesmo tempo de investigação social nos treinos realizados nas fases clara e escura de ritmo circadiano. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

7.5 Os níveis de expressão do BDNF 12 horas pós-treino, com ou sem aprendizado, não apresentaram diferença no bulbo olfatório de animais agrupados e isolados.

A seguir, nos perguntamos se o aumento na expressão do m-BDNF 12h pós treino (Figura 30-A) seria observado em animais isolados. Primeiramente, foi analisado o tempo de investigação durante o treino da tarefa de reconhecimento social. Os resultados foram analisados através do teste ANOVA de duas vias com *Post hoc* Bonferroni de múltiplas comparações. O *Post hoc* comparou a média dos tempos de investigação no treino sem aprendizado com a média dos tempos de investigação no treino com aprendizado. A análise estatística mostrou que o tempo de investigação é maior na presença do estímulo social que na ausência deste estímulo, tanto para animais agrupados quanto isolados [$p < 0,0001$] (Figura 34-A).

Estes mesmos animais foram sacrificados 12 horas pós-treino e o BO foi coletado para a quantificação do BDNF. Os resultados foram analisados usando o mesmo teste estatístico citado acima, comparando as médias dos valores de expressão das isoformas do BDNF de animais agrupados e isolados com ou sem aprendizado. As análises mostraram que a expressão do m-BDNF não difere em animais agrupados e isolados que vivenciaram a experiência do aprendizado [$p > 0,9999$] da tarefa de reconhecimento social (Figura 34-C). Resultado semelhante foi observado para a expressão do pro-BDFN [$p > 0,9999$] (Figura 34-B).



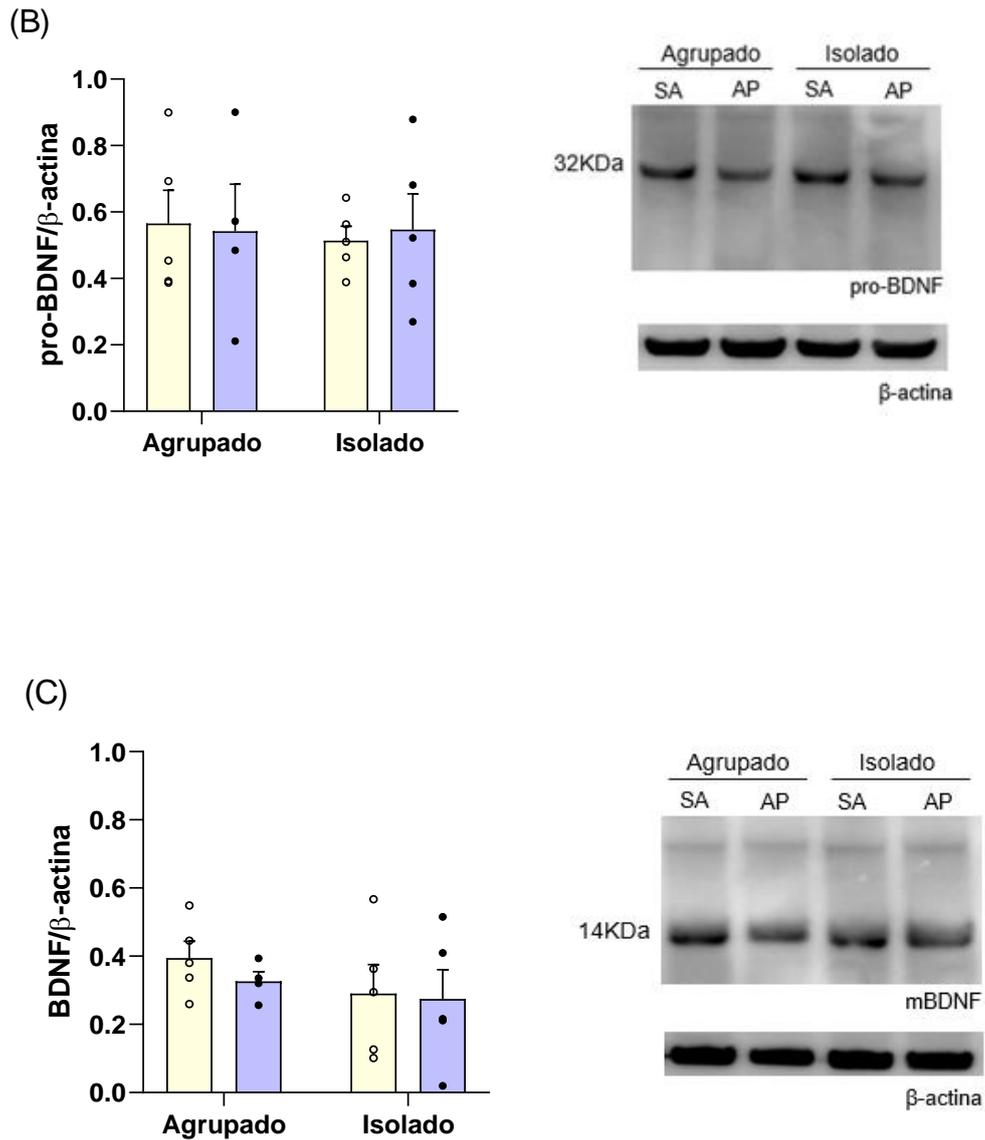


Figura 34 – (A) A presença do juvenil durante o treino (aprendizado) aumentou o tempo de investigação social. No entanto, os níveis de (B) pro-BDNF e (C) m-BDNF não foram induzidos pelo aprendizado da tarefa de reconhecimento social. Os asteriscos (*) indicam diferença no tempo de investigação social entre os treinos com aprendizado e sem aprendizado. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média *** $p < 0,05$; SA: sem aprendizado; AP: aprendizado.

8. DISCUSSÃO

Em conjunto, nossos resultados mostram que o IS de 7 dias de camundongos ICR-CD1 prejudica memórias olfato-dependentes, sem prejudicar comportamentos olfatórios e afetivos. Embora o IS tenha reduzido o volume do BO e diminuído a excitabilidade das células mitrais/tufadas, a capacidade dos animais isolados em executar tarefas que demandam detecção e discriminação de odores sociais não foi afetada. Desta forma, estes achados sugerem que os efeitos deletérios do IS sobre o BO parecem ser restritos ao processamento de memórias olfatórias.

Em relação a memória de reconhecimento social, o isolamento prejudicou a memória de longa-duração sem afetar a memória de curta-duração. Estes resultados estão de acordo com a literatura, na qual mostra que camundongos Swiss e C57BL/6 após o IS apresentam prejuízo na memória de longa-duração (GUSMÃO et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014). No entanto, diferente de camundongos Swiss e C57BL/6, o prejuízo da memória de reconhecimento social de camundongos ICR-CD1 não está relacionado ao comprometimento de comportamentos olfatórios ou afetivos, o que torna esta linhagem um modelo apropriado para investigar as alterações mnemônicas causadas pelo IS.

A partir desta observação, avaliamos se o IS afetaria outra memória olfato-dependente de longa-duração. O condicionamento olfatório com um odor não-social mostrou que 24 horas após o treino, camundongos isolados não apresentaram comportamento de medo quando foram reexpostos ao contexto do condicionamento. Desta forma, é possível que a privação social altere algum mecanismo fisiológico envolvido na consolidação de memórias olfatórias de longa-duração.

Dado que a consolidação de memórias olfatórias depende da atividade sináptica no BO (MANDAIRON; DIDIER; KERMEN, 2010), analisamos as correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas nas células mitrais/tufadas de animais isolados. Nesta análise mostramos que o IS aumentou a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias nas células mitrais/tufadas, incrementando a atividade excitatória destas células. Este resultado corrobora dados publicados pelo nosso grupo, onde foi demonstrado por sinaptossoma que o IS induz aumento da liberação de glutamato no BO (ALMEIDA-SANTOS et al., 2019).

Sendo assim, investigamos se o aumento da atividade excitatória nas células mitrais/tufadas de animais isolados estaria relacionado a redução da atividade inibitória dos interneurônios GABAérgicos. Para tal, realizamos registros *in vitro* das correntes pós-sinápticas inibitórias nas células mitrais/tufadas após o IS. Os resultados deste

experimento mostraram que o IS não alterou as correntes pós-sinápticas inibitórias nas células mitrais/tufadas, indicando que a inibição mediada pelas células granulares e justaglomerulares GABAérgicas se mantém intacta após o IS.

Por outro lado, a atividade inibitória das células justaglomerulares dopaminérgicas pode estar prejudicada no BO de animais isolados. Um trabalho recente do nosso grupo mostrou que após o IS, os níveis de dopamina diminuem no BO (GUARNIERI, dados não publicados), indicando uma possível redução da atividade inibitória deste neurotransmissor sobre os NSOs. Desta forma, o aumento observado na frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias nas células mitrais/tufadas de animais isolados pode estar associado a redução da inibição dopaminérgica no circuito glomerular durante a consolidação de memórias olfato-dependentes de longa-duração.

A redução da atividade inibitória mediada pela dopamina pode ocorrer em virtude da diminuição do número de células justaglomerulares TH positivas, já que o IS reduziu o volume do BO. Sabemos que estas células são continuamente renovadas pela neurogênese adulta da zona subventricular do ventrículo lateral (LLEDO; VALLEY, 2006; YOUNG et al., 2007). Porém, a sobrevivência e integração destas células ao circuito glomerular dependem da experiência sensorial olfatória (ALVAREZ-BUYLLA; GARCI, 2002; ROCHEFORT et al., 2002). Ao considerar que o IS manteve os animais em total privação de estímulos olfatórios, podemos especular que o aumento das correntes pós-sinápticas excitatórias nas células mitrais/tufadas pode ocorrer por redução do número de células justaglomerulares dopaminérgicas. Todavia, são necessários mais experimentos para confirmar esta hipótese.

Apesar do nosso trabalho não ter avaliado a ação da dopamina sobre os NSOs, nossos achados são consistentes com a ideia de que o aumento das correntes pós-sinápticas excitatórias nas células mitrais/tufadas ocorreu devido a redução da sinalização da dopamina. Uma vez que o aumento das correntes excitatórias fosse causado por outro fator prejudicial, o sistema de *feedback* inibitório mediado pelas células granulares e justaglomerulares GABAérgicas compensaria o aumento excitatório nas células mitrais/tufadas. Assim, o déficit de memórias olfato-dependentes em animais isolados pode estar relacionado a disfunção inibitória das células justaglomerulares dopaminérgicas no BO.

Além de investigar as alterações fisiológicas induzidas pelo IS no BO, avaliamos a expressão e a participação do m-BDNF na consolidação da memória social. Inicialmente, identificamos um aumento da expressão do m-BDNF 12 e 18 horas após o treino da tarefa

de reconhecimento social no BO de animais agrupados. Como já foi demonstrado por Bekinschtein e colaboradores (2007), que o m-BDNF 12 horas após o aprendizado é importante para a manutenção e persistência da memória de esquiiva inibitória, decidimos avaliar a atividade desta neurotrófina na consolidação da memória de reconhecimento social 12 horas após o treino. Demonstramos que o bloqueio do m-BDNF no BO neste ponto da consolidação impediu que camundongos agrupados reconhecessem o juvenil 24 horas após o treino, mostrando que a consolidação da memória de reconhecimento social no BO depende da expressão do m-BDNF.

Entre as proteínas sintetizadas na consolidação, o m-BDNF destaca-se por induzir a LTP necessária para o armazenamento de memórias a longo prazo (HERNANDEZ; ABEL, 2008; KRUG; LÖSSNER; OTT, 1984). Vários trabalhos da literatura mostram que a proteína m-BDNF atua tanto na indução quanto na manutenção da LTP no cérebro de indivíduos adultos (LU; CHRISTIAN; LU, 2008; PANJA; BRAMHAM, 2014; REX et al., 2007), resultando no aumento da eficiência sináptica que pode perdurar por tempo prolongado (ABRAHAM; WILLIAMS, 2003). Deste modo, propomos que 12 horas após o aprendizado da tarefa de reconhecimento social, o m-BDNF seja necessário para induzir a LTP tardia (L-LTP) no BO para que ocorra a consolidação da memória de reconhecimento social de longa-duração.

A L-LTP é uma forma de plasticidade que requer a ativação e fosforilação do fator de transcrição CREB para a transcrição de genes que medeiam as alterações na estrutura e função das sinapses (PATTERSON et al., 2001). Apesar deste trabalho não ter avaliado os níveis de fosforilação e ativação do CREB, acreditamos que o bloqueio do m-BDNF no BO possa reduzir a ativação deste fator de transcrição prejudicando a L-LTP de forma similar ao que ocorre em fatias hipocâmpais de ratos tratadas com anticorpos anti-BDNF (CHEN et al., 1999). Assim, a L-LTP prejudicada no BO pode reduzir vários processos plásticos necessários a consolidação, levando ao comprometimento da memória de reconhecimento social de longa-duração.

Sabemos que a LTP induzida pelo aprendizado de estímulos olfatórios em sinapses dendrodendríticas entre células mitrais/tufadas e células granulares está envolvida na consolidação de memórias olfatórias (SATOU; ANZAI; HURUNO, 2005). Portanto, esta é mais uma evidência de que o m-BDNF expresso na fase tardia da consolidação esteja envolvido na indução da L-LTP no BO.

Ao considerar que o IS alterou a fisiologia do BO e prejudicou a memória de reconhecimento social de longa-duração, avaliamos se a administração intra-BO do

*hr*BDNF 12 horas após o treino reverteria o déficit de memória social dos animais em IS. Nossos resultados mostraram que a administração do *hr*BDNF não reverteu o déficit de memória causado pelo isolamento, indicando que o prejuízo da memória de longa-duração não está relacionado à expressão do m-BDNF na fase tardia da consolidação.

Em seguida, ficamos instigados a desvendar se os níveis de expressão do m-BDNF 12 horas após o treino da tarefa de reconhecimento social é um produto da expressão gênica induzida pelo aprendizado. Nesta análise, observamos níveis similares do m-BDNF no BO de animais treinados na presença ou ausência do juvenil, ou seja, o aumento do m-BDNF na fase tardia da consolidação não foi induzido pelo aprendizado da tarefa de reconhecimento social.

Entretanto, a atividade do m-BDNF na fase tardia da consolidação parece ter um papel fisiológico importante, pois o bloqueio desta neurotrofina prejudicou a memória de reconhecimento social. Deste modo, é possível que o aprendizado desta tarefa possa modular a sinalização do m-BDNF através de outros mecanismos moleculares. Um possível mecanismo pelo qual o aprendizado possa regular a sinalização do m-BDNF é por meio da expressão dos receptores TrkB. Foi demonstrado que a expressão e a inserção de receptores TrkB na superfície de neurônios hipocâmpais ocorre em resposta a estímulos fisiologicamente relevantes (DU et al., 2000). Tais estímulos aumentam a inserção do receptor TrkB na superfície celular, permitindo que o m-BDNF atue preferencialmente em neurônios ativos (ZHAO et al., 2009). Assim, acreditamos que a L-LTP no BO possa ser regulada pela expressão tardia do m-BDNF e de seu receptor TrkB. Contudo, precisamos de mais experimentos para confirmar esta hipótese.

Em suma, nossos resultados sugerem que o m-BDNF é necessário para consolidação tardia da memória de reconhecimento social. No entanto, o aprendizado da tarefa não regula a expressão do m-BDNF na fase tardia da consolidação. Além disso, demonstramos que o prejuízo da memória de reconhecimento social em animais isolados está associado a alterações estruturais e fisiológicas no BO e não à redução do m-BDNF na fase tardia da consolidação. Portanto, novos experimentos precisam ser propostos para desvendar as alterações moleculares associadas ao déficit de memória causado pelo IS.

9. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que IS de 7 dias produz modificações fisiológicas e estruturais no bulbo olfatório de camundongos ICR-CD1 levando ao comprometimento de memórias olfato-dependentes. Tais modificações não influenciam na expressão do m-BDNF, que mostrou ser uma neurotrofina fundamental para a consolidação tardia da memória de reconhecimento social de longa-duração.

10. REFERÊNCIAS

53 © 2015. p. 53–74, 2015.

ABRAHAM, W. C.; WILLIAMS, J. M. Properties and Mechanisms of LTP Maintenance. **Neuroscientist**, v. 9, n. 6, p. 463–474, 2003.

ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. Consolidation. p. 1–18, 2015.

ALMEIDA-SANTOS, A. 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. 1–13, 2019.

ALONSO, M. et al. BDNF – Triggered Events in the Rat Hippocampus Are Required for Both Short- and Long-Term Memory Formation. v. 560, n. October 2001, p. 551–560, 2002.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCI, J. M. Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. v. 22, n. 3, p. 629–634, 2002.

ARAKAWA, H. et al. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Scent marking behavior as an odorant communication in mice. v. 32, p. 1236–1248, 2008.

AREVIAN, A. C.; KAPOOR, V.; URBAN, N. N. Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. v. 11, n. 1, p. 80–87, 2008.

ASOK, A. et al. Molecular Mechanisms of the Memory Trace. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 1, p. 14–22, 2019.

BARBACID, M. The Trk Family of Neurotrophin Receptors. 1994.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261–277, 2007.

BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2711–2716, 2008.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. Neuropharmacology Invited review BDNF and memory processing. **Neuropharmacology**, v. 5, p. 1–7, 2013.

BENDAHMANE, M. et al. Increased olfactory bulb acetylcholine bi-directionally modulates glomerular odor sensitivity. **Nature Publishing Group**, n. May, p. 1–13, 2016.

BERNARD, C.; CEDEX, F. V. Identification and localization of dopamine receptor subtypes in rat olfactory mucosa and bulb : a combined in situ hybridization and ligand binding radioautographic approach. v. 12, p. 243–257, 1997.

BERTOLUS, J. B. et al. Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: Evidence from odor fear conditioning. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. MAY, p. 1–12, 2014.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

BOURNE, J. N.; SCHOPPA, N. E.; STATES, U. HHS Public Access. v. 525, n. 3, p. 592–609, 2018.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**, v. 51, n. 4, p. 457–481, 1997.

CACIOPPO, J. T. et al. Loneliness as a specific risk factor for depressive symptoms: Cross-sectional and longitudinal analyses. **Psychology and Aging**, v. 21, n. 1, p. 140–151, 2006.

CARLETON, A. et al. Making scents of olfactory neurogenesis. **Journal of Physiology Paris**, v. 96, n. 1–2, p. 115–122, 2002.

CHEN, G. et al. Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 18, p. 7983–7990, 1999.

CHESS, A. et al. Allelic Inactivation Regulates Olfactory Receptor Gene Expression. v. 78, p. 823–834, 1994.

CONNOR, S. O.; JACOB, T. J. C. Neuropharmacology of the Olfactory Bulb. p. 181–

190, 2008.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 571–625, 2005.

CUMMINGS, D. M.; HENNING, H. E.; BRUNJES, P. C. Olfactory bulb recovery after early sensory deprivation. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 19, p. 7433–7440, 1997.

CURTIS, M. G. TESTOSTERONE AND SOCIAL ISOLATION INFLUENCE ADULT NEUROGENESIS IN THE DENTATE GYRUS OF MALE RATS. **NSC**, v. 195, p. 180–190, 2011.

DENIRO, D. A. Perceived alienation in individuals with residual-type schizophrenia. **Issues in Mental Health Nursing**, v. 16, n. 3, p. 185–200, 1995.

DIENI, S. et al. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. v. 196, n. 6, p. 775–788, [s.d.].

DOS SANTOS E ALHADAS, É. et al. Mechanisms and functional impact of Group I metabotropic glutamate receptor modulation of excitability in mouse MNTB neurons. **Synapse**, n. September, p. 1–13, 2019.

DU, J. et al. Activity- and Ca²⁺-dependent Modulation of Surface Expression of Brain-derived Neurotrophic Factor Receptors in Hippocampal Neurons. v. 150, n. 6, p. 1423–1433, 2000.

DUDAI, Y. *The Restless Engram : Consolidations Never End*. 2012.

DUDAI, Y.; KARNI, A.; BORN, J. The Consolidation and Transformation of Memory. **Neuron**, v. 88, n. 1, p. 20–32, 2015.

EISENBERGER, N. I. The neural bases of social pain: Evidence for shared representations with physical pain. **Psychosomatic Medicine**, v. 74, n. 2, p. 126–135, 2012.

EMPTAGE, N. J.; CAREW, T. J. Long-Term Synaptic Facilitation in the Absence of Short-Term Facilitation in Aplysia Neurons. n. 5, p. 253–256, [s.d.].

ENNIS, M. et al. Dopamine D2 Receptor – Mediated Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals. 2020.

FUKUNAGA, I. et al. Two Distinct Channels of Olfactory Bulb Output. **Neuron**, v. 75, n. 2, p. 320–329, 2012.

GAO, X. M. et al. Social memory in mice: Disruption with an NMDA antagonist and attenuation with antipsychotic drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 92, n. 2, p. 236–242, 2009.

GORIN, M. et al. Rhythmogenesis in a Subset of Accessory Olfactory Bulb Projection Neurons. v. 36, n. 11, p. 3127–3144, 2016.

GREENBERG, M. E. et al. New Insights in the Biology of BDNF Synthesis and Release : Implications in CNS Function. v. 29, n. 41, p. 12764–12767, 2009.

GUARNIERI, L. O. et al. Pro-neurogenic effect of fluoxetine in the olfactory bulb is concomitant to improvements in social memory and depressive-like behavior of socially isolated mice. **Translational Psychiatry 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

GUSMÃO, I. 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, 2012a.

GUSMÃO, I. 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, 2012b.

HAWKLEY, L. C.; CACIOPPO, J. T. Loneliness matters: A theoretical and empirical review of consequences and mechanisms. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 40, n. 2, p. 218–227, 2010.

HERNANDEZ, P. J.; ABEL, T. The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 293–311, 2008.

HITTI, F. L.; SIEGELBAUM, S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 88–92, 2014.

- HOFER, M. et al. Regional distribution. v. 9, n. 8, p. 2459–2464, 1990.
- HSIA, A. Y. et al. Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb. p. 1–4, 2020.
- HSIAO, Y.; CHANG, C.; GEAN, P. Impact of social relationships on Alzheimer ' s memory impairment : mechanistic studies. p. 1–8, 2018.
- HUPBACH, A. et al. Reconsolidation of episodic memories : A subtle reminder triggers integration of new information. p. 47–53, 2007.
- IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.
- IGARASHI, K. M. et al. Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 23, p. 7970–7985, 2012.
- IMAI, T. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 35, p. 180–188, 2014.
- IMAI, T.; SAKANO, H.; VOSSHALL, L. B. Topographic Mapping — The Olfactory System. p. 1–18, 2010.
- ISAACSON, J. S.; STROWBRIDGE, B. W. Olfactory Reciprocal Synapses : Dendritic Signaling in the CNS. v. 20, p. 749–761, 1998.
- ISHII, T. et al. Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. p. 71–78, 2001.
- IZQUIERDO, I. et al. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.
- IZQUIERDO, I. et al. Memory retrieval and its lasting consequences. **Neurotoxicity Research**, v. 4, n. 5–6, p. 573–593, 2002.
- IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural pharmacology**, v. 11, n. 7–

8, p. 517–534, 2000.

KABA, H.; NAKANISHI, S. Synaptic Mechanisms of Olfactory Recognition Memory. v. 141, p. 125–141, 1995.

KAGEYAMA, R.; IMAYOSHI, I. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. v. 8, n. May, p. 1–9, 2014.

KAY, L. M. et al. Olfactory oscillations : the what , how and what for. n. February, p. 207–214, 2009.

KIYOKAGE, E. et al. Molecular Identity of Periglomerular and Short Axon Cells. v. 30, n. 3, p. 1185–1196, 2010.

KOROL, D. L.; BRUNJES, P. C. Unilateral naris closure and vascular development in the rat olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 46, n. 3, p. 631–641, 1992.

KOSAKA, T.; KOSAKA, K. Tyrosine hydroxylase-positive GABAergic juxtglomerular neurons are the main source of the interglomerular connections in the mouse main olfactory bulb. v. 60, p. 349–354, 2008.

KOSTER, N. L. et al. Olfactory Receptor Neurons Express D2 Dopamine Receptors. v. 673, n. July 1998, p. 666–673, 1999.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 3, p. 579–593, 2018.

KRUG, M.; LÖSSNER, B.; OTT, T. Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 1, p. 39–42, 1984.

LAGIER, S. et al. GABAergic inhibition at dendrodendritic synapses tunes γ oscillations in the olfactory bulb. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 17, p. 7259–7264, 2007.

LEPOUSEZ, G.; LLEDO, P. M. Odor Discrimination Requires Proper Olfactory Fast Oscillations in Awake Mice. **Neuron**, v. 80, n. 4, p. 1010–1024, 2013.

LÉVY, F.; KELLER, M.; POINDRON, P. Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 3, p. 284–302, 2004.

LINNARSSON, S.; BJORKLUND, A.; ERNFORS, P. Learning Deficit in BDNF Mutant Mice. v. 9, p. 2581–2587, 1997.

LISTER, R. G. ETHOLOGICALLY-BASED ANIMAL MODELS OF ANXIETY DISORDERS. v. 46, p. 321–340, 1990.

LLEDO, P. M.; VALLEY, M. Adult olfactory bulb neurogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2016.

LTP, T.; EDELMANN, E. Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike- Article Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. **Neuron**, v. 86, n. 4, p. 1041–1054, 2015.

LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: A key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 312–323, 2008.

LÜSCHER DIAS, T. et al. c-Fos expression predicts long-term social memory retrieval in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 260–271, 2016.

MALNIC, B. et al. <Olfactory_Cell_article_Malnic.pdf>. v. 96, p. 713–723, 2000.

MANDAIRON, N.; DIDIER, A.; KERMEN, F. Consolidation of an Olfactory Memory Trace in the Olfactory Bulb Is Required for Learning-Induced Survival of Adult-Born Neurons and Long-Term Memory. v. 5, n. 8, 2010.

MATTHEWS, T. et al. Social isolation , loneliness and depression in young adulthood : a behavioural genetic analysis. **Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology**, v. 51, n. 3, p. 339–348, 2016.

MAZZOLA, A. A. Ressonância magnética : princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional Magnetic resonance : principles of image formation and applications in funcional imaging. v. 3, n. 1, p. 117–129, 2009.

MCGANN, J. P. Presynaptic Inhibition of Olfactory Sensory Neurons : New Mechanisms and Potential Functions. p. 459–474, 2013.

MEIRA, T. et al. CA1 critical for social memory dynamics. **Nature Communications**, n. 2018, p. 1–14, [s.d.].

MINICHELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. v. 10, n. December, p. 850–860, 2009.

MIZUI, T. et al. Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain- derived neurotrophic factor : Multi-ligand model of growth factor signaling. **Elsevier Ltd**, 2015.

MOMBAERTS, P. et al. Visualizing an Olfactory Sensory Map. v. 87, p. 675–686, 1996.

MONTEIRO, B. 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, 2014.

MORI, K.; SAKANO, H. How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain ? [s.d.].

MORRIS, S. J.; SEIDAH, N. G.; MURPHY, R. A. Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor *. v. 276, n. 16, p. 12660–12666, 2001.

MOSCOVITCH, M. et al. Functional neuroanatomy of remote episodic , semantic and spatial memory : a unified account based on multiple trace theory. p. 35–66, 2005.

MU, J.; LI, W. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. p. 259–265, 1999.

MUMTAZ, F. et al. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. December 2017, p. 1205–1222, 2018.

MURÍNOVÁ, J. et al. The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: A systematic review. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–10, 2017.

NADEL, L. et al. Multiple Trace Theory of Human Memory: Computational , Neuroimaging , and Neuropsychological Results ABSTRACT : n. February 2018, p. 352–368, 2000.

NADER, K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. p. 1–16, 2015.

NAGAYAMA, S.; HOMMA, R.; IMAMURA, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. SEP, p. 1–19, 2014.

NOACK, J. et al. Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, n. 4, p. 568–575, 2010.

PACKARD, M. G.; WHITE, M.; HA, Q. Differential Effects of Fornix and Caudate Radial Maze Tasks : Evidence for Multiple Nucleus Lesions on Two Memory Systems. n. May 1969, p. 1465–1472, 1978.

PANG, P. T.; LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus : role of secreted proteins tPA and BDNF. v. 3, p. 407–430, 2004.

PANJA, D.; BRAMHAM, C. R. BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. **Neuropharmacology**, v. 76, n. PART C, p. 664–676, 2014.

PATAPOUTIAN, A.; REICHARDT, L. F. Trk receptors : mediators of neurotrophin action. p. 281–286, [s.d.].

PATTERSON, S. L. et al. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. **Neuron**, v. 32, n. 1, p. 123–140, 2001.

PAUL, J. R.; SQUIRE, L. R. Parallel Brain Systems for Learning with and without Awareness. 2002.

PENA, R. R. et al. Anisomycin administered in the olfactory bulb and dorsal hippocampus impaired social recognition memory consolidation in different time-points. **Brain Research Bulletin**, v. 109, p. 151–157, 2014.

PENA, R. R. et al. Home-cage odors spatial cues elicit theta phase/gamma amplitude coupling between olfactory bulb and dorsal hippocampus. **Neuroscience**, v. 363, p. 97–106, 2017.

PISKOROWSKI, R. A.; CHEVALEYRE, V. ScienceDirect Memory circuits : CA2. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 52, p. 54–59, 2018.

PODHORNA, J.; BROWN, R. E. Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL / 6 and DBA / 2 mice. p. 96–110, 2002.

POWELL, T. R.; FERNANDES, C.; SCHALKWYK, L. C. Depression-Related Behavioral Tests. v. 2, n. June, p. 119–127, 2012.

QUIROGA, Q. The Hippocampus and Social Impairment in Psychiatric Disorders. v. LXXXIII, 2018.

REESE, S. z I -7. v. 56, p. 44–56, 1966.

REX, C. S. et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes long-term potentiation-related cytoskeletal changes in adult hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 3017–3029, 2007.

ROCHEFORT, C. et al. Enriched Odor Exposure Increases the Number of Newborn Neurons in the Adult Olfactory Bulb and Improves Odor Memory. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 2679–2689, 2002.

ROEDEL, A. et al. Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice. 2006.

ROSA-PRIETO, C. DE; INSAUSTI, R. Subicular and CA1 Hippocampal Projections to the Accessory Olfactory Bulb. v. 129, p. 124–129, 2009.

SAKAKIBARA, M.; ITO, E. Memory Consolidation. **Memory Consolidation**, p. 1–327, 2015.

SÁNCHEZ-ANDRADE, G.; JAMES, B. M.; KENDRICK, K. M. Neural Encoding of Olfactory Recognition Memory. v. 51, n. 5, 2005.

SANCHEZ-ANDRADE, G.; KENDRICK, K. M. The main olfactory system and social learning in mammals. **Behavioural Brain Research**, v. 200, n. 2, p. 323–335, 2009.

SATOU, M.; ANZAI, S.; HURUNO, M. Long-term potentiation and olfactory memory formation in the carp (*Cyprinus carpio* L.) olfactory bulb. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 191, n. 5, p. 421–434, 2005.

SCHACTER, D. L.; EICH, J. E.; TULVING, E. Richard Semon's theory of memory. **Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior**, v. 17, n. 6, p. 721–743, 1978.

SCHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress , stress hormones , and adult neurogenesis. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 12–21, 2012.

SCHOPPA, N. E. et al. Dendrodendritic Inhibition in the Olfactory Bulb Is Driven by NMDA Receptors. v. 18, n. 17, p. 6790–6802, 1998.

SCHOPPA, N. E.; WESTBROOK, G. L. Glomerulus-Specific Synchronization of Mitral Cells in the Olfactory Bulb. v. 31, p. 639–651, 2001.

SERIZAWA, S.; MIYAMICHI, K.; SAKANO, H. One neuron – one receptor rule in the mouse olfactory system. v. 20, n. 12, 2004.

SHAO, Z. et al. Reciprocal Inhibitory Glomerular Circuits Contribute to Excitation-Inhibition Balance in the Mouse Olfactory Bulb Reciprocal Inhibitory Glomerular Circuits Contribute to Excitation-Inhibition Balance in the Mouse Olfactory Bulb . Zuoyi Shao , Shaolin Liu. 2019.

SHAO, Z. et al. Two GABAergic Intraglomerular Circuits Differentially Regulate Tonic and Phasic Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals. p. 1988–2001, 2020.

SHEPHERD, B. Y. G. M. EXCITABILITY Volleys of impulses in the olfactory nerves (Shepherd , 1963) or anti-. p. 101–117, 1963.

SQUIRE, L. R. Nondeclarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning. v. 4, n. 3, 1984.

SQUIRE, L. R.; ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation : a

neurobiological perspective. p. 169–177, 1995.

STARESINA, B. P.; WIMBER, M. A Neural Chronometry of Memory Recall. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 23, n. 12, p. 1071–1085, 2019.

TEO, A. R.; LERRIGO, R.; ROGERS, M. A. M. The role of social isolation in social anxiety disorder: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Anxiety Disorders**, v. 27, n. 4, p. 353–364, 2013.

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, 1982.

TRIMMER, C.; MAINLAND, J. D. **The Olfactory System**. [s.l: s.n.].

TROMBLEY, P. Q. Noradrenergic Modulation of Synaptic Transmission Between Olfactory Bulb Neurons in Culture : Implications to Olfactory Learning. v. 35, n. 49, p. 473–484, 1994.

WACHOWIAK, M. et al. Inhibition of Olfactory Receptor Neuron Input to Olfactory Bulb Glomeruli Mediated by Suppression of Presynaptic Calcium Influx. p. 2700–2712, 2020.

WALKER, M. P.; BRAKEFIELD, T.; HOBSON, J. A. Dissociable stages of human memory consolidation and reconsolidation. v. 425, n. October, p. 8–12, 2003.

WILLS, G. D. et al. Discrimination by Olfactory Cues in Albino Rats Reflecting Familiarity and Relatedness among Conspecifics. v. 143, p. 139–143, 1983.

WILSON, R. S. et al. Loneliness and risk of Alzheimer disease. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 234–240, 2007.

WITTER, M. P. Organization of the entorhinal—hippocampal system: A review of current anatomical data. **Hippocampus**, v. 3, n. 1 S, p. 33–44, 1993.

WYATT, T. D. Pheromones and signature mixtures : defining species-wide signals and variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. p. 685–700, 2010.

WYATT, T. D. Pheromones. p. 739–743, 2017.

YANG, F. et al. Pro-BDNF–induced synaptic depression and retraction at developing neuromuscular synapses. v. 185, n. 4, p. 727–741, 2003.

YOKOI, M.; MORI, K.; NAKANISHI, S. Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 8, p. 3371–3375, 1995.

YOUNG, K. M. et al. Subventricular Zone Stem Cells Are Heterogeneous with Respect to Their Embryonic Origins and Neurogenic Fates in the Adult Olfactory Bulb. v. 27, n. 31, p. 8286–8296, 2007.

ZHAO, L. et al. Mechanism underlying activity-dependent insertion of TrkB into the neuronal surface. 2009.