

**Bráulio Marcone de Castro**

**DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR VESICULAR DE  
ACETILCOLINA EM FUNÇÕES COGNITIVAS ATRAVÉS DO USO DE  
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular**

**BELO HORIZONTE**

**Junho de 2009**

**Bráulio Marcone de Castro**

**DETERMINAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO TRANSPORTADOR VESICULAR DE  
ACETILCOLINA EM FUNÇÕES COGNITIVAS ATRAVÉS DO USO DE  
CAMUNDONGOS GENETICAMENTE MODIFICADOS**

Tese de doutorado submetida ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Marco Antônio Máximo Prado

Co-Orientadores: Vânia Ferreira Prado

Grace Schenatto Pereira

**BELO HORIZONTE  
Junho de 2009**

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- American Health Assistance Foundation
- Pronex-MG
- NIH-Forgaty
- Instituto do milênio

## *Agradecimentos*

A Deus.

Agradeço aos meus pais, irmãos e Cris pelo apoio, confiança e paciência.

Aos professores Marco Antônio e Vânia, pela oportunidade do aprendizado e pela orientação.

À professora Grace pela orientação, apoio, conselhos e pela amizade.

Ao professor Marcus Vinícius Gomez, pelo exemplo e pela oportunidade.

À Cristina Martins, companheira de trabalho e grande amiga.

Ao professor Márcio Flávio , pelo apoio nos experimentos e pelas sugestões.

Aos professores Rogélio (UFOP), Rafaela (Meritus), Geraldinho e José Maurício (ISA).

Aos alunos Greice, Bruno, Rodrigo e Patrícia pela ajuda, idéias e comprometimento.

A todos amigos e colegas dos laboratórios de Neurofarmacologia e Neurobiologia molecular.

Aos amigos Diogo, Danuza , Adriane e Rodrigo pelo apoio indispensável para a realização desse trabalho e pela amizade.

Aos amigos Janice, Melissa, Luciene, Geraldo, Bruno, Dani, Fabíola, Lucimar, Cristiane, Fabiana , Paulo, Monalise, Alessandra, Patrícia, Ivana, Iaci, Bento, Ernani, Ricardo, Magda, Juliana e Daniel pelo convívio e amizade.

À Nancy e Ana Cristina, pela amizade e exemplo.

À Diane, irmã de estrada.

Ao amigo Célio Júnior, pela ajuda.

Ao amigo Xavier, pelo apoio e trabalho.

Ao amigo Ricardo, pelos conselhos sempre sensatos.

Aos amigos Vitório e Leandro, pelo apoio nos tempos de Ouro Preto.

Aos amigos da PC02, pela alegria.

# SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 A NEUROTRANSMISSÃO QUÍMICA .....	13
1.2. A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA .....	14
1.2.1 SÍNTESE DE ACh.....	15
1.2.2 CAPTAÇÃO DE COLINA PELO TERMINAL PRÉ-SINÁPTICO.....	17
1.2.3 TRANSPORTE DE ACETILCOLINA PARA VESÍCULAS SINÁPTICAS .....	19
1.2.4 RECEPTORES COLINÉRGICOS .....	21
1.2.4.1 RECEPTORES NICOTÍNICOS .....	21
1.2.4.2 RECEPTORES MUSCARÍNICOS .....	23
1.2.5 A INATIVAÇÃO DA ACETILCOLINA.....	25
1.3 NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA CENTRAL .....	27
1.4 MEMÓRIA E NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA .....	28
1.4.1 MEMÓRIA SOCIAL .....	31
1.4.2 HABITUAÇÃO A UM NOVO AMBIENTE.....	34
1.4.2. ACETILCOLINA E APRENDIZADO MOTOR .....	36
1.5 MODELOS ANIMAIS DE HIPOFUNÇÃO COLINÉRGICA .....	38
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>40</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	40
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1- CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CAMUNDONGOS VAcHT NOCAUTE .....	42
3.1.1 GENOTIPAGEM.....	42
SOUTHERN BLOTTING E PCR.....	42
3.2 – QUANTIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO.....	44
3.3 - EXPRESSÃO PROTÉICA.....	46
3.4 – FUNÇÕES COGNITIVAS EM CAMUNDONGOS VAcHT KNOCKDOWN .....	48
3.5- APRENDIZADO MOTOR.....	51
3.5.1 - TESTE DA LOCOMOÇÃO FORÇADA EM CILINDRO GIRATÓRIO (ROTAROD).....	51
3.5.2 FOOT PRINT.....	51
3.6 - APRENDIZADO NÃO-ASSOCIATIVO (HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO) .....	52
3.6.1 HABITUAÇÃO INTRA-SESSÃO AO CAMPO ABERTO .....	52

3.6.2 - HABITUAÇÃO ENTRE SESSÕES AO CAMPO ABERTO .....	52
3.6.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA INDUZIDA POR COCAÍNA .....	52
3.6.4 PREFERÊNCIA CONDICIONADA PELO LUGAR (CPP) .....	53
3.6.5 Análise Estatística.....	53

#### **4. RESULTADOS .....55**

<b>4.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE CAMUNDONGOS VAcHT NOCAUTE.....</b>	<b>55</b>
4.1.1- IDENTIFICAÇÃO DOS CAMUNDONGOS .....	55
4.1.2- ANÁLISE DOS NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO DO VAcHT .....	57
4.1.3- STATUS DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA EM CAMUNDONGOS VAcHT DEL .....	62
4.1.4- ANÁLISE MORFOLÓGICA DA JUNÇÃO NEUROMUSCULAR.....	67
<b>4.2- FUNÇÕES COGNITIVAS EM CAMUNDONGOS VAcHT KNOCKDOWN .....</b>	<b>68</b>
4.2.1- MEMÓRIA SOCIAL.....	69
4.2.2 –HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO (APRENDIZADO NÃO-ASSOCIATIVO).....	77
4.2.3- APRENDIZADO MOTOR.....	88

#### **5. DISCUSSÃO .....95**

<b>O VAcHT É FUNDAMENTAL PARA A LIBERAÇÃO FISIOLÓGICA DE ACETILCOLINA .....</b>	<b>95</b>
<b>PAPEL DA LIBERAÇÃO DE ACETILCOLINA MEDIADA PELO VAcHT NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO SOCIAL.....</b>	<b>98</b>
<b>REDUÇÃO DA LIBERAÇÃO DE ACh E HABITUAÇÃO AO CAMPO ABERTO .....</b>	<b>101</b>
<b>REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DO VAcHT E O APRENDIZADO MOTOR.....</b>	<b>105</b>

#### **6. CONCLUSÕES .....108**

#### **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....110**

#### **8. ANEXOS.....**

Anexo I

MICE DEFICIENT FOR THE VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER ARE MYASTHENIC AND HAVE DEFICITS IN SOCIAL RECOGNITION

Anexo II

STORAGE OF ACETYLCHOLINE MEDIATED BY THE VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER IS REQUIRED FOR NEUROMUSCULAR DEVELOPMENT AND FUNCTION

Anexo III

REDUCED EXPRESSION OF THE VESICULAR ACETYLCHOLINE TRANSPORTER IN MICE CAUSES LEARNING DEFICITS

## Resumo

A liberação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) depende de sua estocagem em vesículas sinápticas, um passo controlado pela atividade do transportador vesicular de ACh (VACHT). A neurotransmissão mediada por ACh possui um importante papel em diferentes funções cognitivas, como memória, aprendizado e atenção. Por outro lado, disfunções do sistema colinérgico estão presentes em doenças que apresentam o comprometimento de funções cognitivas, como Doença de Alzheimer e Doença de Huntington. Interessados em determinar a importância do VACHT para funções fisiológicas do sistema colinérgico, nosso grupo desenvolveu, através de técnicas de recombinação homóloga, camundongos com diferentes níveis de redução na expressão do VACHT. Ao gerarmos e caracterizarmos camundongos nocaute para o VACHT, demonstramos a importância do transportador para a viabilidade dos animais e para o desenvolvimento normal do sistema neuromuscular. Entretanto, camundongos com a ausência do VACHT, devido à mortalidade precoce, são inviáveis para a realização de experimentos comportamentais. Passamos então a utilizar camundongos com redução na expressão do transportador (Knock-down), capazes de atingir a vida adulta e com desenvolvimento similar aos camundongos selvagens. Camundongos Knock-down heterozigoto (VACHT KD<sup>HET</sup>) e homozigoto (VACHT KD<sup>HOM</sup>) para o VACHT apresentam redução de 45% e 65% na expressão do VACHT, respectivamente. Realizamos experimentos capazes

de avaliar diferentes formas de memória e aprendizado. Demonstramos que a redução na expressão do VACHT, e conseqüentemente na liberação de ACh, é capaz de prejudicar a memória social, sendo tal prejuízo revertido pela elevação farmacológica do tônus colinérgico. A redução na expressão do VACHT também trouxe prejuízos sobre o aprendizado não – associativo, verificado através da habituação ao campo aberto. Experimentos utilizando cocaína, uma droga capaz de inibir a recaptação de dopamina, sugerem que o déficit observado na habituação ao campo aberto pode envolver disfunções no balanço entre o sistema colinérgico e dopaminérgico. O aprendizado de tarefas procedurais, avaliado através do uso do cilindro giratório, mostrou-se mais lento em camundongos com redução da expressão do VACHT. Dessa forma, demonstramos que a liberação de ACh mediada pelo VACHT é essencial para a sobrevivência, além disso a deficiência de liberação de acetilcolina pelo transportador compromete o desenvolvimento normal da junção neuromuscular em camundongos. Com o uso de camundongos Knock-down, demonstramos que a atividade do VACHT é capaz de limitar a capacidade de formação de distintas formas de memória, com conseqüências sobre o aprendizado, de forma similar ao encontrado em determinadas doenças humanas.



## Lista de Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
BuChE	Butilcolinesterase
Ch	Colina
ChAT	Colina acetiltransferase
CHT1	Transportador de colina de alta afinidade
DA	Doença de Alzheimer
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
HC-3	Hemicolinio-3
JNM	Junção neuromuscular
$K_i$	Constante de inibição
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
mAChRs	Receptores muscarínicos de Ach
nAChRs	Receptores nicotínicos de Ach
VAcHT	Transportador vesicular de Acetilcolina
VAcHT Del	Camundongos nocaute para o VAcHT
VAcHT <sup>WT/DEL</sup>	Camundongo nocaute heterozigoto para o VAcHT
VAcHT <sup>DEL/DEL</sup>	Camundongo nocaute homozigoto para o VAcHT
VAcHT KD <sup>HET</sup>	Camundongo “knock-down” heterozigoto para o VAcHT

VACht KD<sup>HOM</sup> Camundongo “knock-down” homozigoto para o VACht  
VMAT Transportador vesicular de monoaminas

## Lista de Figuras e Tabelas

**Figura 1:** Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica

**Figura 2:** Figura representativa da posição dos neurônios colinérgicos no sistema nervoso central de ratos.

**Figura 3:** Esquema do loco gênico colinérgico e a estratégia utilizada na construção do vetor para a geração dos animais VachT Del

**Figura 4:** Geração de camundongo VACht<sup>DEL/DEL</sup>

**Figura 5:** Quantificação da expressão de mRNA do VACht por PCR em tempo real.

**Figura 6:** Expressão do VACht em camundongos nocaute.

**Figura 7:** Imunofluorescência para o VACht em JNM de camundongos VACht nocaute.

**Figura 8:** Imunofluorescência para o CHT1 em JNM de camundongos VACht Del.

**Figura 9:** Dosagem de Acetilcolina em camundongos VACht nocaute.

**Figura 10:** Quantificação da expressão de mRNA da ChAT e CHT1 dos camundongos por PCR em tempo real.

**Figura 11:** Alterações na morfologia da junção neuromuscular de camundongos VACht Del detectadas por imunofluorescência em diafragma.

**Figura 12:** Memória social de camungos selvagens e KD<sup>HET</sup> avaliada através de um protocolo de habituação-desabituação a um camundongo juvenil.

**Figura 13:** Capacidade olfatória de camundongos medida através do tempo necessário para encontrar um pedaço de alimento sob a maravalha.

**Figura 14:** Habituação olfatória a um estímulo não social

**Figura 15:** Preferência por estímulo social em camundongos selvagens e VACht KD<sup>HET</sup>.

**Figura 16:** Memória social de camundongos WT e KD<sup>HET</sup>.

**Figura 17:** Tratamento com Galantamina reverte o déficit de memória social apresentado por camundongos  $KD^{HET}$

**Figura 18:** Camundongos  $KD^{HOM}$  apresentam déficit de memória social similar aos camundongos  $KD^{HET}$

**Figura 19:** Camundongos  $VChT\ KD^{HOM}$  apresentam redução na habituação intra-sessão ao campo aberto quando comparados aos camundongos selvagens.

**Figura 20:** Camundongos  $VChT\ KD^{HOM}$  não apresentam habituação ente sessões ao campo aberto.

**Figura 21:** Galantamina reduz a hiperatividade locomotora de camundongos com elevação crônica ou aguda do tônus dopaminérgico.

**Figura 22:** Atividade locomotora induzida por cocaína.

**Figura 23:** Condicionamento por lugar induzido por cocaína em camundongos selvagens e  $VChT\ KD^{HOM}$ .

**Figura 24:** Aprendizado motor no cilindro giratório (rotarod) de camundongos selvagens e  $VChT\ KD^{HET}$

**Figura 25:** Camundongos  $VChT\ KD^{HET}$  aprendem mais lentamente a tarefa do cilindro giratório que camundongos selvagens.

**Figura 26:** Padrão de passadas de camundongos selvagens e  $VChT\ KD$

**Figura 27:** Consolidação do aprendizado no rotarod entre as sessões

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para genotipagem dos camundongos  $VChT\ DEL$

**Tabela 2:** Iniciadores desenhados para PCR em tempo real



---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A neurotransmissão química

Até o século XIX, havia um consenso de que a comunicação entre neurônios ocorreria através de uma conexão física direta. Entretanto, estudos realizados por Ramon y Cajal, utilizando a coloração por prata desenvolvida por Golgi, foram capazes de convencer a comunidade científica de que essas conexões, hoje conhecidas como sinapses, são próximas em vez de contínuas (revisto por Taylor e Brown, 1999). Posteriormente, Otto Loewi demonstrou a natureza química da comunicação entre neurônios. Em um experimento clássico, ele estimulou o nervo vago do coração perfundido de uma rã e permitiu que o líquido de perfusão entrasse em contato com o coração de outra rã. Como resultado, a atividade do coração da rã receptora foi diminuída através da ação da “substância do vago”, denominada por ele de parassimpatina. Posteriormente a parassimpatina passou a ser denominada de acetilcolina (ACh) (revisto por Brown DA, 2006).

É aceito, portanto, que a transmissão química é a principal forma de comunicação entre neurônios. A neurotransmissão química clássica requer os seguintes passos: 1-Síntese do neurotransmissor no terminal pré-sináptico; 2-Estocagem do neurotransmissor em vesículas sinápticas; 3-Liberação regulada de neurotransmissor na fenda sináptica; 4-A presença de receptores específicos para o neurotransmissor no terminal pós-sináptico; 5-Uma forma de terminar a ação do neurotransmissor (revisto por Taylor e Brown, 1999).

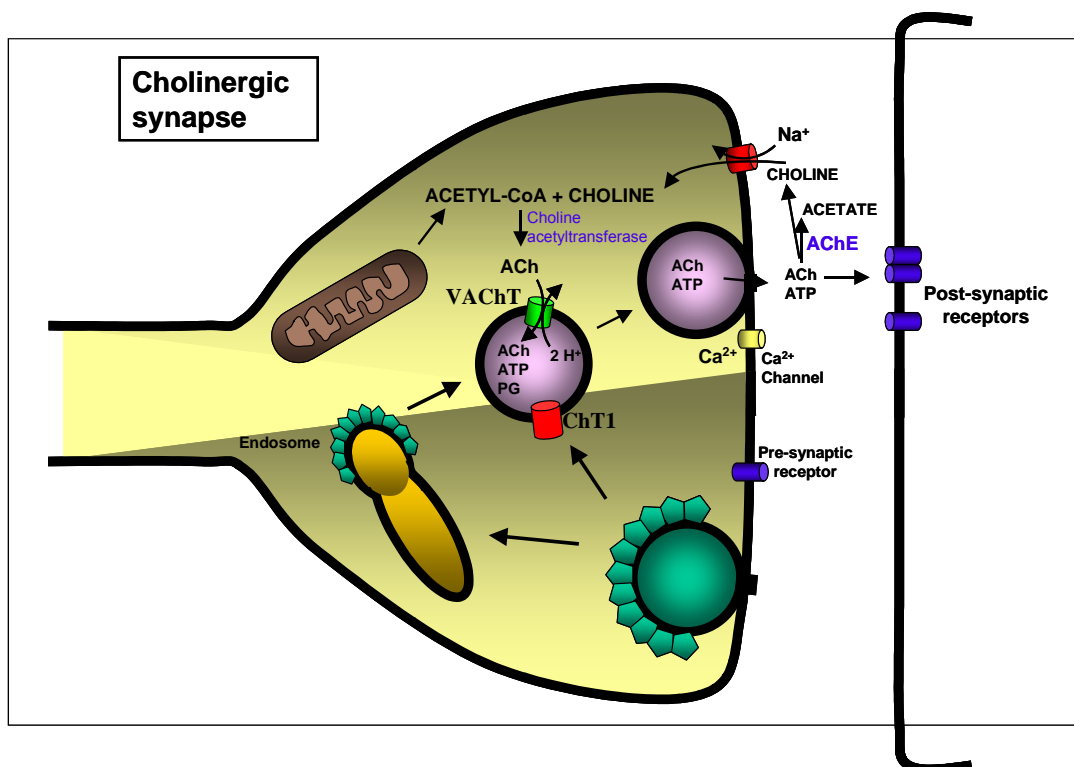
Os eventos pré e pós-sinápticos são altamente regulados e sujeitos às modificações dependentes do uso, que são a base da plasticidade sináptica. Um dos grandes desafios da neurociência é explicar como diferentes padrões de atividade de sistemas de neurotransmissores coordenam comportamentos complexos, e como alterações nesses sistemas participam de processos patológicos.

## 1.2. A neurotransmissão colinérgica

A ACh foi o primeiro neurotransmissor identificado, sendo proposta como mediadora da função celular por Hunt, em 1907. Em 1914, Dale demonstrou que sua ação era capaz de mimetizar a estimulação de nervos parassimpáticos. Loewi, em 1921, forneceu evidências claras de que há liberação de ACh após estimulação nervosa (revisado por Brown DA, 2006)

Hoje, sabe-se que a neurotransmissão colinérgica é essencial para o funcionamento do sistema nervoso. Seu bloqueio agudo é geralmente letal, enquanto sua perda gradual, como observada na Doença de Alzheimer, é associada com a deterioração progressiva de funções neurais (revisado por Hoffman e Taylor, 2006). A ACh participa do controle central e periférico do movimento, funcionamento do sistema nervoso autônomo, regulação do sono e de múltiplos processos cognitivos como memória, atenção e aprendizado (revisado por Sarter M e cols. 2005; Gold PE, 2003).

A ACh é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT), a partir dos substratos colina e acetato, e posteriormente transportada para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). Após ser liberada no terminal sináptico, a ACh interage com seus receptores e é hidrolisada em colina e acetato. A colina é então recaptada para o neurônio pré-sináptico, principalmente pelo transportador de colina de alta afinidade (CHT1), e utilizada para a síntese de novas moléculas de ACh (Ribeiro et al., 2006; Prado et al., 2002) (Figura1).



**Figura 1: Desenho esquemático da neurotransmissão colinérgica.** A acetilcolina (ACh) é sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) e armazenada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Com a excitação, o neurotransmissor pode interagir com receptores pré e pós sinápticos. É então rapidamente degradada pela acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina, que é recaptada para o terminal pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade (ChT1).

### 1.2.1 Síntese de ACh

A ChAT é a enzima responsável pela síntese de ACh, catalisando a transferência de um grupo Acetil, proveniente de uma molécula de Acetil-CoA, para uma molécula de colina. Dessa forma, a comunicação entre neurônios colinérgicos e tecidos alvo é dependente da atividade da ChAT. Os níveis de acetil-CoA são mantidos através do metabolismo da glicose, sob ação da enzima ATP-citrato liase,

que apresenta sua expressão aumentada em neurônios colinérgicos (Beigneux e cols., 2004, Tomaszewicz e cols., 2003). O suprimento de colina é provido principalmente da dieta, devido à incapacidade de neurônios em sintetizar colina (Fernstrom e cols., 1981; Zeisel e cols., 1981). A ChAT é encontrada predominantemente como uma proteína solúvel no citoplasma, com uma pequena parcela da população total da enzima associada a membranas ou ao núcleo (Gill SK e cols., 2003). A atividade da ChAT é influenciada por sua distribuição, interação com proteínas celulares e estado de fosforilação (revisto por Dobransky e Ryllet, 2005).

Ferramentas bioquímicas e farmacológicas indicam que a ChAT encontra-se em excesso cinético em relação aos seus substratos, sugerindo que sua ação não seja a etapa limitante da síntese de ACh (Blusztajn e Wurtman, 1983). Entretanto, uma redução da atividade da ChAT, encontrada em diferentes situações patológicas, pode afetar a disponibilidade de ACh (Oda Y, 1999). Na Doença de Alzheimer avançada, observa-se uma redução na concentração e atividade da ChAT no córtex cerebral e hipocampo (revisto por Mesulam, 2004). Entretanto, ainda é controverso se há redução na atividade da ChAT nos estágios leve e moderado da DA (Contestabile AE, 2008)

Na Doença de Huntington, a redução na síntese de ACh parece ser parcialmente responsável pelos movimentos involuntários observados em pacientes afetados pela doença. Embora a quantidade de neurônios colinérgicos no estriado esteja preservada, há uma redução significativa da atividade da ChAT (Cichetti F e cols., 2000). Mutações no gene da ChAT capazes de abolir ou reduzir a síntese de ACh foram encontradas em uma forma de miastenia frequentemente fatal, denominada Síndrome miastênica congênita com episódios de apnéia (Ohno e cols., 2001; Kraner e cols., 2003).

A utilização de camundongos nocaute tem se mostrado uma ferramenta poderosa para o estudo da função e regulação de proteínas envolvidas com a neurotransmissão colinérgica. Animais nocaute para o gene da ChAT foram gerados. Enquanto camundongos nocaute da ChAT são natimortos, camundongos haploinsuficientes para a ChAT (com redução de aproximadamente 50% na atividade enzimática) surpreendentemente não apresentaram nenhuma alteração fisiológica aparente. A caracterização neuroquímica dos animais heterozigotos



revelou um aumento na expressão do CHT1 de cerca de 50%. Sugere-se que o aumento na atividade do CHT1 tenha sido capaz de aumentar a disponibilidade de colina para a ChAT remanescente e dessa forma manter os níveis de ACh normais (Brandon e cols., 2004).

### 1.2.2 Captação de colina pelo terminal pré-sináptico

A incapacidade de neurônios colinérgicos em realizar a síntese *de novo* de colina torna a captação da colina para o interior neuronal essencial para manter a síntese de ACh (Zeisel, 1981). Existem dois sistemas de transporte de colina bem caracterizados e distintos entre si. A colina é transportada por um sistema de baixa afinidade ( $K_m$  de 100  $\mu\text{M}$ ), independente de íons sódio e inibido seletivamente por altas concentrações de hemicolinio-3 (HC-3), com  $K_i$  de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$ . Esse sistema encontra-se distribuído em vários tipos celulares e parece estar envolvido com a síntese de fosfatidilcolina. O outro é um sistema de transporte de alta afinidade por colina, com  $K_m$  de 1 a 5  $\mu\text{M}$ , depende de sódio e cloreto, e inibido por baixas concentrações de HC-3 ( $K_i$  de 10-100 nM) (Okuda T e cols., 2000; Ribeiro e cols., 2006). O sistema de alta afinidade está presente principalmente em neurônios colinérgicos e é responsável por suprir colina para a síntese de ACh. A captação de colina pelo sistema de transporte de alta afinidade é assumida como etapa limitante da síntese de ACh (Blakely e cols., 2004; Ribeiro FM e cols., 2006)

O transporte de colina de alta afinidade foi descrito nos anos de 1960. Entretanto, os genes para o transportador de colina de alta afinidade (CHT1) em ratos e *C. elegans* foram apenas recentemente clonados (Okuda T e cols., 2000). O CHT1 de humanos, que codifica uma proteína de 580 aminoácidos, apresenta alta homologia com os genes de rato (98%) e camundongo (93%) (Apparsundaram S e cols., 2000; Guermonprez e cols., 2002; Wang e cols., 2001). Modelos de estrutura secundária para o CHT1 predizem uma proteína transmembrana (contendo treze domínios transmembrânicos), com a porção amino-terminal com orientação extracelular e a região carboxi-terminal intracelular (Apparsundaram S e cols., 2000). Confirmou-se a orientação extracelular da região amino-terminal através do uso de epitopos "FLAG" fundidos com a região amino-terminal do ChT1, que posteriormente

foram detectados por anticorpos anti-“FLAG” em células vivas (Ribeiro FM e cols., 2005).

Embora sua função sugerisse que o CHT1 estivesse localizado prioritariamente na membrana plasmática, estudos recentes demonstraram que o CHT1, localiza-se majoritariamente em compartimentos intracelulares. Várias estratégias experimentais distintas indicam a presença do CHT1 em vesículas sinápticas (Ferguson SM e cols., 2003; Ribeiro FM e cols., 2003). A inesperada localização do CHT1 torna o tráfego vesicular um ponto de regulação atividade-dependente da síntese de ACh. O aumento da atividade neuronal leva à fusão de vesículas sinápticas com a membrana, o que é capaz de aumentar a disponibilidade de moléculas de CHT1 na membrana neuronal. Como o CHT1 realiza o passo limitante para a síntese de ACh, o aumento da captação de colina poderia sustentar um aumento na síntese de ACh, necessário durante situações de alta atividade neuronal (Ribeiro FM e cols., 2006). Tal hipótese é sustentada por diferentes observações: a captação de colina é aumentada agudamente pelo aumento da atividade neuronal, de uma forma cálcio-dependente (Collier e Katz, 1974; Simon e Kuhar, 1975; Kuhar e Murrin 1978; O'Regan e Collier, 1981; Saltarelli e cols., 1987); a despolarização neuronal leva a um aumento na velocidade máxima de transporte (Simon e Kuhar, 1975) e na quantidade de moléculas de CHT1 na membrana (Ferguson SM e cols., 2003).

Observa-se, portanto, um elegante mecanismo de plasticidade sináptica. Um experimento recente demonstra a possível importância desse processo para a cognição. Utilizando uma tarefa em ratos com alta demanda de atenção, Apparsundaram e cols., em 2005, demonstraram um aumento na velocidade máxima do transporte de colina de alta afinidade no córtex pré-frontal medial correlacionado com a performance dos animais. O resultado é condizente com dados anteriores, onde um aumento na liberação de ACh em estruturas corticais ocorre em tarefas com demanda de atenção (revisito por Sarter e cols., 2005).

Da mesma forma que camundongos nocaute para a ChAT, animais nocaute para o CHT1 morrem logo após o nascimento; enquanto animais haploinsuficientes para esse gene têm desenvolvimento aparentemente normal. Apesar de apresentarem uma redução de 50% na expressão do CHT1, observou-se nos animais heterozigotos uma taxa de transporte de colina equivalente à dos animais

selvagens. O mecanismo utilizado para manter a capacidade de transporte de colina normal, mesmo com redução da expressão do transportador, envolve mecanismos pós-traducionais. Observou-se um aumento na proporção de CHT1 na membrana em relação a compartimentos intracelulares. O aumento do CHT1 localizado na membrana foi capaz de compensar a redução da expressão da proteína e manter o transporte de colina em níveis normais (Ferguson SM e cols., 2003; Ferguson SM e cols., 2004).

Mudanças na expressão e atividade do CHT1 são relacionadas a doenças com comprometimento do sistema colinérgico. A avaliação *post mortem* do CHT1 em pacientes com Doença de Alzheimer revelou um aumento na presença do transportador na membrana plasmática, de forma específica para regiões corticais que sofrem degeneração (Slotkin TA e cols., 1994). A exposição aguda de células HEK expressando o CHT1 ao agente gerador de peroxinitrito, SIN-1, foi capaz de reduzir o transporte de colina de maneira tempo e dose – dependente, por aumentar a internalização do transportador para compartimentos intra-celulares (Pinthong M. e cols., 2008). É um resultado que mostra uma relação entre espécies nitrosativas, que parecem estar envolvidas com a patogênese da Doença de Alzheimer (revisto por Bossy- Wetzels E e cols., 2004), redução da capacidade de captação de colina e uma provável consequência negativa na síntese de ACh.

### **1.2.3 Transporte de Acetilcolina para vesículas sinápticas**

A ACh sintetizada no citoplasma é transportada para o interior de vesículas sinápticas. Como a relação entre a concentração de ACh vesicular e citoplasmática é de 100:1, é necessário um mecanismo de transporte ativo para que a ACh seja transportada para o interior da vesícula. O VACHT é capaz de realizar esse transporte utilizando um gradiente de prótons gerado por uma ATPase do tipo V. O transporte realizado pelo VACHT possui uma relação estequiométrica de dois prótons por molécula de ACh (Parsons e cols., 2003). O VACHT é uma glicoproteína de 500-600 aminoácidos. A análise de hidrofobicidade da seqüência primária dos seus aminoácidos prediz uma macromolécula com 12 domínios transmembrana, flanqueados por domínios amino e carboxi-terminal citoplasmáticos (Alfonso e cols., 1993; Varoqui e cols., 1994).

Em 1993, Alfonso e colaboradores clonaram e sequenciaram o cDNA correspondente ao gene *unc-17* de *C. elegans*. Foi proposto que o produto deste gene poderia ser um transportador vesicular, baseado em sua grande homologia com os transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs). Além disso, a expressão de mutantes do gene *unc-17* em *C. elegans* levou a fenótipos que indicam o comprometimento da função colinérgica. Em 1994, Varoqui e cols. identificaram o homólogo de *unc-17* expresso no órgão elétrico de Torpedo. Ainda em 1994, Erickson e Colaboradores e Roghani e colaboradores identificaram o homólogo das proteínas de *C. elegans* e Torpedo em rato. Erickson e cols. (1994) e Liu e Edwards (1997) demonstraram que essa proteína consiste em um transportador vesicular de acetilcolina funcional, através da reconstituição do transporte *in vitro*.

O gene do VACHT apresenta organização gênica particular, estando localizado no interior do primeiro íntron do gene que codifica a ChAT (Bejanin e cols. 1994). Acredita-se que os mRNAs de VACHT e ChAT sejam transcritos a partir de um mesmo promotor e sofram processamentos alternativos, envolvendo excisões de seqüências de aproximadamente 1 a 7 Kilobases (Bejanin e cols. 1994; Cervini e cols. 1995). Essa disposição sugere que a regulação da expressão destes dois genes possa ser semelhante (Cervini e cols. 1995).

Após o enchimento das vesículas sinápticas, essas são direcionadas para uma região subjacente à membrana sináptica denominada zona ativa. As vesículas são ancoradas à membrana sináptica e se tornam responsivas às mudanças na concentração intracelular de cálcio. Quando um potencial de ação atinge o terminal nervoso, canais de cálcio ativados por voltagem são abertos. As ondas de cálcio resultantes induzem a fusão de vesículas sinápticas com a membrana e a consequente liberação de ACh (revisto por Sudhof, 2004).

A resposta da célula pós-sináptica a um único evento exocítico (uma vesícula liberada) é denominada de tamanho quantal. Um acúmulo de evidências geradas a partir de estudos realizados nos últimos dez anos suporta a hipótese de que a expressão de transportadores vesiculares pode regular a quantidade de neurotransmissor contida em vesículas e consequentemente o tamanho quantal (Krantz e cols., 2008). O aumento na expressão do VACHT na junção neuromuscular imatura de *Xenopus* é capaz de duplicar o tamanho quantal. Já a expressão do

VACHT com mutações em resíduos de aspartato é capaz de reduzir o tamanho quantal (Song H e cols., 1997). Epinefrina e derivados de AMPc são capazes de aumentar o tamanho quantal, um efeito que é bloqueado por vesamicol e inibidores da PKA (Van der Kloot, 1991).

Alterações na expressão do VACHT são encontradas em doenças de distintas sintomatologias. Os níveis de VACHT se mostraram diminuídos no tecido estriatal de pacientes com Doença de Huntington (Smith e cols., 2006). Corroborando tal dado, a expressão do VACHT encontra-se reduzida no estriado e córtex de camundongos modelo da Doença de Huntington, mesmo sem haver perda de neurônios colinérgicos. Em um modelo roedor de sepse, há redução da expressão do VACHT, com consequências negativas sobre o aprendizado no labirinto radial (Semmler e cols., 2007). Lesões cerebrais traumáticas são caracterizadas por comprometimento cognitivo grave, que pode estar relacionado a disfunções do sistema colinérgico. Em estudo recente, foi demonstrado, em modelo roedor de trauma cerebral, que há redução na densidade do VACHT (de até 50%) em diferentes regiões do sistema nervoso central (Donat CK e cols., 2008). Há, ainda, estudos *post mortem* demonstrando uma redução da quantidade de VACHT no córtex e hipocampo de pacientes com a Doença de Alzheimer, através do uso do ligante benzovesamicol (Kuhl DE e cols., 1996). Em ratos tratados cronicamente com rivastigmina, um inibidor da AChE usado no tratamento da Doença de Alzheimer, foi observado um aumento na imunorreatividade do VACHT (Tayebati SK e cols., 2004)

#### **1.2.4 Receptores colinérgicos**

A ACh exerce suas diversas ações fisiológicas por ativar duas famílias estruturalmente e funcionalmente distintas de receptores: os receptores nicotínicos (nAChR) e os receptores muscarínicos (mAChR). Enquanto os nAChR são canais de cátions ativados por ACh, os mAChR são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (revisão por Caufield MP, 1998).

##### **1.2.4.1 Receptores nicotínicos**

Os receptores nicotínicos são proteínas integrais de membrana, parte da superfamília de canais iônicos ativados por ligante, que também inclui receptores de ácido gama aminobutírico (receptores GABA<sub>A</sub>), glicina e receptores de serotonina do tipo 5-HT<sub>3</sub> (revisto por Halliwell RF, 2007). Os receptores nicotínicos são combinações pentaméricas de sub-unidades individuais, organizadas ao redor de um poro central (Nai e cols., 2003). São descritos, em mamíferos, onze genes neuronais ( $\alpha 2$  à  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  à  $\beta 4$ ) e cinco musculares ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ) das subunidades. As combinações pentaméricas dessas subunidades tanto podem ser heteroméricas (2  $\alpha$  e 3  $\beta$ , por exemplo) quanto homoméricas ( $\alpha 7$ , por exemplo) (Le Novere e cols., 2002).

Baseado na distribuição anatômica, os receptores nicotínicos podem ser divididos em dois grupos: receptores musculares, encontrados na junção neuromuscular esquelética, e receptores neuronais, amplamente distribuídos no sistema nervoso central e nos gânglios do sistema nervoso periférico (Hogg e cols., 2003).

O receptor nicotínico humano, expresso na junção neuromuscular de humanos adultos, consiste de uma glicoproteína pentamérica constituída de duas subunidades  $\alpha$ , uma  $\beta$ , uma  $\delta$  e uma subunidade  $\epsilon$ . Todas cinco sub-unidades são homólogas, cada uma com quatro domínios transmembrana (M1 a M4). Quando cada subunidade  $\alpha$  é ocupada por uma molécula de ACh, induz-se uma mudança para uma conformação com maior permeabilidade a cátions de sódio, desencadeando os mecanismos que levam à contração muscular (revisto por Ruff e cols., 2003). Os receptores nicotínicos são alvo de várias doenças inatas e adquiridas, que são caracterizadas por prejuízos na transmissão neuromuscular e consequentemente fraqueza muscular. Miastenia gravis, uma doença auto-imune adquirida, é a mais comum e melhor estudada dessas doenças. A fraqueza muscular, principal sintoma da doença, é resultante da ligação de anticorpos aos receptores nicotínicos da junção neuromuscular (Kaminski, HJ., 2006).

Os receptores nicotínicos neuronais são amplamente expressos no sistema nervoso central e nos gânglios periféricos. A inervação colinérgica via receptores nicotínicos regula diferentes processos, tais como liberação de neurotransmissores e excitabilidade celular. Receptores pré-sinápticos de ACh agem como auto-receptores, regulando a liberação de vários neurotransmissores, particularmente

ACh, dopamina, norepinefrina, glutamato, 5-HT e GABA. Conseqüentemente, tais ações implicam os receptores nicotínicos em funções e estados fisiológicos como sono, alerta, fadiga, ansiedade, processamento central da dor e uma série de funções cognitivas (Gotti e cols; 2004; ).

A participação de alterações dos receptores nicotínicos na Doença de Alzheimer tem sido sugerida por diferentes estudos. A avaliação *post-mortem* direta da expressão de receptores seja por western blot (Burghaus e cols, 2000), seja por imunohistoquímica ( Sparks DL e cols., 1998) revelou a perda de receptores nicotínicos. A redução também foi demonstrada *in situ*, com o uso da tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Nordberg A e cols., 1995). Em 2000, Wang e cols. demonstraram uma interação direta entre receptores nicotínicos  $\alpha 7$  e o peptídeo amilóide  $\alpha\beta$  (1-42), com a ligação ocorrendo em concentrações picomolares.

#### **1.2.4.2 Receptores muscarínicos**

Estudos aplicando técnicas de clonagem molecular demonstraram a existência de 5 subtipos distintos de receptores muscarínicos em mamíferos, denominados M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> (revisto por Wess J, 1996). Os receptores M<sub>1</sub> a M<sub>5</sub> são subdivididos em duas classes, de acordo com o tipo de proteína G acoplada ao receptor. Os receptores M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> e M<sub>5</sub> são seletivamente acoplados às proteínas G da família G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, enquanto os receptores M<sub>2</sub> e M<sub>4</sub> ativam preferencialmente proteínas G da família Gi/Go. A ativação dos receptores muscarínicos colinérgicos inicia uma vasta amplitude de respostas bioquímicas e eletrofisiológicas (Langmead CJ e cols., 2008), sendo a natureza dessas respostas dependente da localização e identidade molecular do subtipo ativado.

Cada um dos cinco subtipos de mAChR exibe um padrão de distribuição distinto, com a expressão variando em várias regiões do sistema nervoso central e em tecidos periféricos (Abrams P 2006; Volpicelli LA, 2004). Os receptores M<sub>1</sub>, M<sub>4</sub> e M<sub>5</sub> são predominantemente expressos no sistema nervoso central, enquanto que os subtipos de receptores M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub> são distribuídos tanto no sistema nervoso central quanto nos tecidos periféricos. Em regiões corticais, incluindo o hipocampo, o subtipo M<sub>1</sub> é o dominante. O receptor M<sub>2</sub> é mais concentrado no córtex occipital e

no *nucleus basalis*. No putâmem, o M4 é o subtipo predominante (Ferrari-Dileo G e cols., 1994). Já os receptores M5 são expressos no hipocampo, substância nigra e área tegmentar ventral (Vilaro e cols., 1990). Os receptores muscarínicos periféricos são responsáveis pela mediação das bem conhecidas ações colinérgicas em tecidos efetores que são inervados por terminais parassimpáticos. Tais funções incluem, por exemplo, o cronotropismo cardíaco negativo gerado pela ACh (mediado por receptores M<sub>2</sub>) e o aumento na contratilidade da musculatura lisa (predominantemente mediado por receptores M<sub>3</sub>) (Hoffman e Taylor, 2006).

A identificação do papel fisiológico de cada receptor muscarínico recebeu, nos últimos anos, a contribuição de estudos feitos com camundongos nocaute para tais proteínas (revisto por Wess J e cols., 2007). A seguir são apresentadas algumas importantes contribuições de tal metodologia. A participação dos receptores M1 na plasticidade sináptica, em diferentes regiões do prosencéfalo, foi demonstrada através do uso de camudongos nocaute para tal gene (Shinoe T e cols, 2005; Origlia e cols, 2006) . Por outro lado, a avaliação fenotípica de camudongos nocaute para o receptor M2 demonstrou sua importância para memória, aprendizado e plasticidade sináptica hipocampal (Seeger T e cols., 2004). O uso desses camudongos permitiu, ainda, demonstrar a função auto-receptora dos receptores M2 em sinapses colinérgicas no córtex e hipocampo (Zhang W e cols, 2002), bem como sua função na analgesia induzida por agonistas muscarínicos (Gomez J e cols, 1999). A participação dos receptores M5 em funções cognitivas é também sugerida pelo uso de nocautes. Camudongos sem tal gene são deficientes em tarefas cognitivas dependentes do hipocampo, com redução da indução de LTP em fibras hipocampais (Araya R e cols, 2006). Já o nocauteamento de receptores M4 demonstrou a importância desses receptores no controle dos níveis sinápticos de dopamina. A microdiálise *in vivo* revelou um aumento significativo nos níveis de dopamina no *nucleus acumbens* desses animais, fato que pode ter relevância para o entendimento da fisiopatologia de doenças como esquizofreina e adição (Tzavara ET e cols, 2004).

Mudanças nos níveis de expressão e atividade de receptores muscarínicos foram relacionadas à fisiopatologia de várias doenças que afetam o SNC, como doença de Alzheimer e esquizofrenia. Recentemente foi proposto um sub-grupo de pacientes com esquizofrenia: aqueles (cerca de 25% dos pacientes) onde há uma



redução de 75% da expressão de receptores muscarínicos M1 corticais e onde são observados déficits cognitivos mais acentuados (Scarr e cols. 2008). A relação entre tal achado e os sintomas cognitivos presentes na doença formam as bases para a proposta do uso de agonistas muscarínicos para a melhora dos sintomas cognitivos presentes na esquizofrenia (Scarr e cols. 2009). O potencial de agonistas desse receptor para o tratamento da Doença de Alzheimer foi demonstrado com a administração do agonista seletivo AF267B em camundongos 3xTg-AD, um modelo da doença. A administração crônica da droga foi capaz de reduzir os níveis do peptídeo A $\beta$  e da proteína TAU fosforilada, tanto no hipocampo quanto no córtex, com consequente melhora na performance em tarefas que demandam capacidades cognitivas (Caccamo A e cols, 2006).

### **1.2.5 A inativação da Acetilcolina**

Como neurotransmissor clássico, a ACh possui um mecanismo específico para o término de sua ação. Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage reversivelmente com receptores muscarínicos e nicotínicos pré e pós-sinápticos. Após dissociação dos receptores, a ACh é hidrolisada pela enzima AChE em acetato e colina (que é recaptada pelo CHT1 para a síntese de novas moléculas de ACh). Portanto, cabe à AChE limitar as concentrações de ACh na fenda sináptica ( revisto por Silman I e cols., 2008). A hidrólise da ACh também pode ser catalisada por uma enzima relacionada à AChE, a Butilcolinesterase (BuChE). A BuChE apresenta menor especificidade para a ACh que a AChE, e sua função ainda é pouco entendida (Darvesh e cols., 2003). Além de seu papel clássico, tem sido atribuída à AChE a participação em processos distintos, como neuritogênese, adesão celular, sinaptogênese, agrupamento de fibras amilóides e hematopoiese (Soreq e Seidman, 2001).

A inibição da AChE é capaz de aumentar a duração de ação do neurotransmissor. A AChE é inibida por um grande repertório de toxinas animais, inseticidas (organofosforados e carbamatos) e fármacos que aliviam os sintomas de doenças que vão de glaucoma à Doença de Huntington. Os inibidores da AChE são especialmente úteis no tratamento de duas doenças com diferentes formas de

comprometimento do sistema colinérgico, Doença de Alzheimer e Miastenia (Silman I e cols; 2005).

Várias evidências sugerem que o principal sistema de neurotransmissor afetado na Doença de Alzheimer é o colinérgico. A hipótese colinérgica da Doença de Alzheimer sustenta que a redução da transmissão colinérgica possui uma relação direta com a deterioração cognitiva observada na doença (revisto por Terry e Buccafusco, 2003;). Baseado nessas observações, os inibidores da AChE passaram a ser utilizados para o tratamento da Doença de Alzheimer no final dos anos 1990. Para tal, foram selecionadas moléculas com lipossolubilidade suficiente para permitir a difusão através da barreira hemato-encefálica. As drogas atualmente utilizadas são Galantamina, Rivastigmina e Donepezil (Lleó e cols., 2006). Além do efeito potencializador da neurotransmissão colinérgica, os inibidores da AchE possuem efeitos neuroprotetores, que parecem ser mediados por receptores nicotínicos  $\alpha 7$  e  $\alpha 4\beta 2$  (Takada Y e cols. , 2003).

Sabe-se que a patogênese da Doença de Alzheimer envolve morte celular causada pelo depósito de placas senis, contendo oligômeros amilóides e emaranhados neurofibrilares (formados pela proteína TAU hiper-fosforilada). Além do efeito direto sobre os níveis de ACh, algumas evidências sugerem que a AchE, e conseqüentemente sua inibição, também modulem a formação de tais placas ( Francis PT e cols., 2005). Recentemente, foi demonstrado que a expressão da variante R da AchE reduz a formação de oligômeros beta amilóide insolúveis em cultura celular e de placas amilóides em camudongos modelo da Doença de Alzheimer. No mesmo estudo, foi relatada uma redução da expressão da variante em R no hipocampo de pacientes com Alzheimer comparada a indivíduos saudáveis (Berson A e cols., 2008).

Camudogos nocaute para a AChE sobrevivem após o nascimento por até 3 semanas, porém apresentam tremor, movimentos erráticos e alteração do padrão motor (W. Xie e cols. , 2000). Em 2002, Duysen e cols., com o uso de uma dieta líquida, foram capazes de mantê-los vivos até a vida adulta, dessa forma pôde ser observado que tais animais são mais fracos, possuem menor atividade locomotora e não se tornam sexualmente maduros. Foram observadas alterações que podem justificar a viabilidade desses animais, como atividade normal da BchE, redução da

expressão de receptores nicotínicos e remodelagem morfológica da placa motora (Adler M e cols., 2004).

### **1.3 Neurotransmissão colinérgica central**

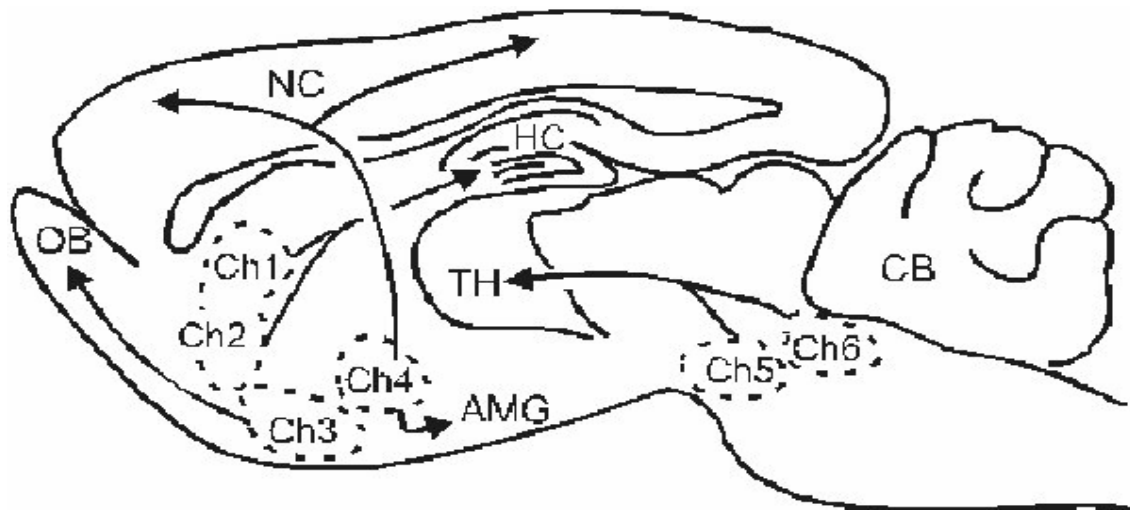
Vias colinérgicas centrais são filogeneticamente antigas e anatomicamente distribuídas ao longo de praticamente todo encéfalo. Sua presença é identificada através de marcadores como a AChE, receptores colinérgicos e a ChAT. Baseado na nomenclatura proposta por Mesulam em 1983 há seis principais grupos celulares colinérgicos, nomeados de Ch1 até Ch6 (Figura 2).

Dentro do grupo Ch1, estão os neurônios colinérgicos situados no núcleo septal medial que inervam o hipocampo. Já neurônios colinérgicos que partem da extremidade vertical da área de Broca fornecem inervação para o hipocampo, hipotálamo, córtex cingulado e bulbo olfatório e são classificados como integrantes do grupo Ch2. A maioria da inervação direcionada ao bulbo olfatório tem origem na extremidade horizontal da área de Broca, cujo grupo é denominado Ch3. O grupo celular Ch4, denominado núcleo basal magnocelular em ratos e núcleo basal de Meynert em primatas, fornece a principal projeção colinérgica para campos neocorticais e a amígdala. Os neurônios dos grupos Ch1-Ch4 estão contidos na região do prosencéfalo basal, de onde são emitidas as principais inervações colinérgicas para o córtex e o hipocampo. A inervação dessas regiões permite ao sistema colinérgico modular funções cognitivas como memória e atenção (Sarter e Bruno, 1997). O grupo celular Ch5 origina-se do núcleo pedunculopontino do tronco cerebral rostral e em conjunto com neurônios Ch6, originados do núcleo tegmental laterodorsal, inerva os núcleos reticular intralaminar do tálamo.

Todos os núcleos da base apresentam inervação colinérgica. A inervação colinérgica do estriado é principalmente intrínseca. A inervação de outras estruturas do núcleo basal, como o globus pallidus, o núcleo subtalâmico e a substância nigra pars compacta é exclusivamente extrínseca, originada principalmente dos grupos Ch5-Ch6.

No córtex cerebral de roedores, há interneurônios colinérgicos que respondem por aproximadamente 30% da inervação colinérgica em tal estrutura. Já

o córtex cerebral de primatas parece não apresentar inervação colinérgica intrínseca (Mesulam, 1983).



**Figura 2:** Figura representativa da posição dos neurônios colinérgicos no sistema nervoso central de ratos. Os neurônios Ch1 estão na região do septo medial, Ch2 e Ch3 localizam-se na extremidade vertical e horizontal da área de Broca, respectivamente. Neurônios Ch4 estão no núcleo basalis de Meynert. Neurônios Ch1-Ch4 situam-se na região do prosencéfalo basal. Ch5 e Ch6 localizam-se na região do mesencéfalo. Abreviações: (AMG) amígdala; (CB) cerebelo; (HC) hipocampo; (NC) neocórtex; (OB) bulbo olfatório; (TH) tálamo; Modificado de Mesulan e cols., 1983.

#### 1.4 Memória e neurotransmissão colinérgica

O comportamento é resultado da interação entre genes e ambiente. Os mecanismos mais importantes através dos quais o ambiente altera o comportamento são a aprendizagem e a memória. Aprendizagem é o processo através do qual se adquire conhecimento, enquanto a formação da memória representa o processo pelo qual o conhecimento é codificado, retido e, posteriormente recuperado (Kandel, 2001).

Várias evidências suportam a idéia de que ACh modula o aprendizado e a formação de memória. Há muito tempo, sabe-se que certos alcalóides, hoje

classificados como antagonistas de receptores muscarínicos colinérgicos, são capazes de levar ao aparecimento agudo de distúrbios cognitivos em indivíduos saudáveis. O uso de injeções diretas de antagonistas colinérgicos trouxe informações importantes relacionadas à participação da ACh na modulação da formação de memória em regiões específicas do sistema nervoso central (Gold, 2003). Por exemplo, a injeção de escopolamina, um antagonista muscarínico, na amígdala foi capaz de prejudicar a aquisição de uma tarefa dependente dessa estrutura, o aprendizado condicionado por lugar (McIntyre e cols., 1998). A importância da inervação colinérgica no hipocampo, proveniente do septo medial, também foi demonstrada através do uso de antagonistas e agonistas muscarínicos. Foi observado, através de diferentes estudos, que a intensificação da função colinérgica hipocampal é capaz de facilitar a formação de memória, enquanto seu bloqueio tem efeito contrário (Degroot e Parent, 2000, Wilkniss e Gold, 1997). Estudos realizados em humanos demonstram que o bloqueio de receptores muscarínicos prejudica a formação de novas memórias, mas não é capaz de alterar a evocação de memórias já formadas (Atri A e cols, 2004, Hasselmo e cols, 2004).

Diferentes evidências se completam para explicar como a ACh participa da formação de memórias. A ACh parece aumentar o sinal aferente para o hipocampo, enquanto reduz sua atividade basal por suprimir a atividade de conexões internas. Tal efeito favoreceria a codificação de novas memórias, amplificando a captação de sinais aferentes e reduzindo a interferência com memórias já formadas (Hasselmo, 2006). Foi proposto um modelo relacionando a modulação colinérgica, sono e formação de memória. Durante o estado de vigília, altos níveis de ACh reduziram a interferência de sinapses previamente modificadas no hipocampo, enquanto potencializariam a modificação de novas sinapses. Em contraste, durante o sono de ondas lentas, há redução dos níveis de ACh, o que permitiria o aumento da atividade hipocampal dirigida para o córtex. Portanto, durante a vigília ocorreria a aquisição de novas memórias no hipocampo, enquanto durante o sono de ondas lentas haveria consolidação dessas memórias em estruturas corticais (Power AE, 2003). Consistente com o modelo proposto, Gais SE e colaboradores, em 2004, demonstraram que o aprendizado de uma tarefa relacionada à memória declarativa é dependente de sono, e de baixos níveis de ACh durante o sono de ondas lentas. A administração de fisostigmina, um inibidor da AchE, após o aprendizado da tarefa e

imediatamente antes do sono de ondas lentas, eliminou completamente o efeito consolidador do sono sobre o aprendizado da tarefa.

A plasticidade sináptica parece ser a representação molecular dos mecanismos responsáveis pela formação de memória (Martin e cols., 2000). A participação do tônus colinérgico na indução de plasticidade sináptica é demonstrada por diferentes trabalhos (Disterhoft JF e cols., 2003; Disterhoft JF e cols., 1999) . Foi recentemente demonstrado que mecanismos de plasticidade no subiculum, uma região eferente do hipocampo e envolvida no aprendizado de tarefas com componentes espaciais, é dependente da ativação simultânea de receptores glutamatérgicos e de receptores muscarínicos (Moore SJ e cols., 2009).

A ACh também age modulando outra capacidade cognitiva importante para o aprendizado: a atenção. Capacidades atencionais são mediadas através de circuitos parietais e pré-frontais (Corbetta e cols., 2002). Projeções colinérgicas originadas do prosencéfalo basal representam um componente essencial do sistema de atenção no encéfalo (Everitt e Robbins, 1997; Sarter e cols., 2005). O aumento da liberação de acetilcolina, em eventos que demandam atenção, age amplificando o processamento cortical de sinais oriundos do tálamo (Sarter e cols., 2005). Interessantemente, observa-se um aumento do transporte de colina no córtex pré-frontal medial direito em ratos durante uma tarefa com alta demanda de atenção (Apparsundaram e cols., 2005). O prosencéfalo basal colinérgico é ativado por projeções provenientes de estruturas mesolímbicas, relacionando dessa forma a demanda de atenção com o estado motivacional do indivíduo (Sarter e cols, 2006).

Apesar de algumas tarefas comportamentais serem classicamente utilizadas para estudar as bases neuroquímicas da memória, sabe-se que diferentes tipos de memória apresentam diferentes bases moleculares. Sendo um sistema de ampla distribuição, o sistema colinérgico acaba por influenciar diferentes tipos de memória em situações fisiológicas e patológicas. A formação de memórias sociais, o aprendizado não associativo, e o aprendizado implícito são exemplos de capacidades cognitivas afetadas em diferentes doenças neurológicas, como Doença de Alzheimer e Doença de Huntington. Ambas as doenças guardam similaridades, em especial o fato de apresentarem um comprometimento do sistema colinérgico, que em muitos casos é correlacionado com déficits cognitivos.

### 1.4.1 Memória social

Relações sociais são construídas e mantidas a partir da interação entre indivíduos. Um tipo de memória crítica para a formação e estabilidade de relações sociais é a memória social. Em animais, a memória social compreende a capacidade do animal de aprender e lembrar a identidade do outro (Lai e cols, 2005). Aparentemente, a memória de reconhecimento social ou simplesmente memória social pode ser caracterizada como uma entidade complexa e única (Lai e cols, 2005).

Enquanto em humanos, a memória social é formada basicamente a partir da identificação visual, em roedores o reconhecimento de odores fornece as principais “dicas” utilizadas em sua formação. A destruição do bulbo olfatório, com preservação das regiões por ele inervadas, prejudica a formação da memória social (Kaba e cols., 1989). Luo e colaboradores, em 2003, investigaram a atividade unitária de neurônios do bulbo olfatório acessório de camundongos machos, durante o reconhecimento de parceiros por fêmeas, e observaram um aumento na atividade eletrofisiológica inibitória.

De particular importância para o reconhecimento social também está o órgão vomeronasal, o qual recebe projeções provenientes do bulbo olfatório (Bluthe e Dantzer, 1993). Do órgão vomeronasal, as projeções dirigem-se ao córtex piriforme e à amígdala medial, de onde partem projeções para o hipocampo, estrutura classicamente envolvida na formação e evocação de diferentes tipos de memória (revisto por Neves G e cols., 2008).

O reconhecimento social, em primatas e roedores, é dependente do hipocampo, já que a destruição de tal estrutura extingue a capacidade de reconhecimento (Kogan e cols, 2000). Disfunções hipocampais ocorrem em doenças que apresentam comprometimento da memória social, como Doença de Alzheimer (Zarow e cols., 2005) e esquizofrenia (Kuperberg e Heckers, 2000 ). Recentemente, Deacon e cols. demonstraram que há déficit no reconhecimento social em camundongos Tg2576 envelhecidos, um modelo da Doença de Alzheimer. Interessantemente, já foi reportado que tais animais apresentam prejuízo acentuado em tarefas dependentes da função hipocampal (Corcoran KA e cols., 2002).

As bases neuroquímicas do reconhecimento social têm sido caracterizadas pela participação de neurotransmissores clássicos e neuropeptídeos (Doanaldson e Young, 2008). Noradrenalina, um neurotransmissor clássico, parece participar da modulação dos estágios iniciais da formação da memória social. Durante a formação de memória social, há um aumento da quantidade de noradrenalina no bulbo olfatório, a partir de neurônios provenientes do locus ceruleus (Brennan e cols., 1995). Além do mais, foi demonstrado recentemente que a noradrenalina liberada, quando acompanhada da apresentação de odores de cunho social, age especificamente no bulbo olfatório para causar uma supressão específica a longo prazo da resposta a tais odores, fato que pode ser uma das bases da memória social (Stephen D. Shea e cols., 2008). O conhecimento da participação dos neuropeptídeos ocitocina e vasopressina, que vinha sendo estudada através de técnicas farmacológicas clássicas, foi recentemente ampliado através do uso de camundongos geneticamente modificados.

Sintetizado em neurônios do núcleo magnocelular do hipotálamo, a ocitocina é armazenada na pituitária posterior e liberada na corrente sanguínea, onde exerce suas ações clássicas: estímulo da contração uterina no parto e ejeção de leite durante a lactação (Kiss A e cols., 2005). Entretanto, é a liberação central de ocitocina que influencia o comportamento social de animais. A administração central de ocitocina teve efeito dose dependente e positivo sobre a memória social em ratos machos (Neumann ID, 2008), enquanto a administração direta do peptídeo no bulbo olfatório foi capaz de intensificar e prolongar a memória social (Dluzen De e cols., 1998). Camundongos nocaute para o gene da ocitocina possuem amnésia social, com a capacidade de aprendizado em tarefas não sociais intacta. A infusão de ocitocina na amígdala medial desses camundongos, antes do encontro inicial, restaura a capacidade de reconhecimento social (Ferguson e cols., 2000). Na ausência de ocitocina, a informação social parece ser processada por circuitos neurais alternativos, como regiões corticais e hipocampo, embora o déficit de reconhecimento social permaneça (Ferguson e cols., 2001). Camundongos nocaute para o receptor transmembrana CD38 também apresentam amnésia social, que foi revertida pela transfecção intraventricular utilizando um lentivírus contendo o gene de CD38. Foi demonstrado que CD38 controla a liberação de ocitocina no sistema nervoso central (Jin D e cols., 2007). Em uma tarefa de reconhecimento de faces por



humanos, foi observado que a administração intra-nasal prévia de ocitocina foi capaz de aumentar a capacidade de reconhecer faces familiares (Rimmelle U e cols., 2009). Também tem sido demonstrado que há associação entre determinados polimorfismos do gene da ocitocina e autismo, uma doença caracterizada por comprometimento de funções cognitivas de espectro social (Wu S. e cols, 2005).

A vasopressina é um neuropeptídeo lembrado por suas propriedades anti-diuréticas. Sua síntese ocorre nas células magnocelulares do núcleo supra-óptico do hipotálamo e no núcleo paraventricular, cujos axônios são projetados para a pituitária posterior, de onde é liberada para exercer suas funções endócrinas (Young e Gainer, 2003). Porém há outras regiões no cérebro que contêm neurônios que expressam vasopressina. Tais populações estão localizadas nos núcleos da estria terminal, amígdala medial e núcleo supraquiasmático. Há três tipos de receptores para vasopressina: Avpr1a, Avpr1b e Avpr2, sendo somente os dois primeiros encontrados no cérebro (Adkins-Regan E, 2009).

O papel “cerebral” da vasopressina tem sido elucidado nos últimos anos, através do uso de antagonistas específicos e de camundongos modificados geneticamente. A super-expressão de receptores V1aR no septo lateral de ratos foi capaz de intensificar a capacidade de reconhecimento social, tornando a memória formada mais persistente (Landgraf e cols., 2003). Camundongos com depleção do receptor de vasopressina V1aR não reconhecem um co-específico familiar, sendo que a reposição de receptores V1aR no septo lateral, mas não na amígdala, é capaz de reverter o déficit de reconhecimento social, sugerindo que a vasopressina provavelmente exerça seus efeitos no septo lateral e via receptores V1aR (Bielsky e cols., 2004). Já o nocauteamento de receptores V1bR apresenta um efeito menor, porém significativo, sobre a memória social (Wersinger S.R. e cols, 2002)

Alguns estudos sugerem a participação do sistema colinérgico no reconhecimento social. A administração prévia de antagonistas de receptores muscarínicos prejudicou a capacidade de reconhecimento social em camundongos e ovelhas (Camacho F, 1995; Levy F, 2003). Enquanto A-582941, um agonista nicotínico seletivo para os receptores  $\alpha 7$ , foi capaz de melhorar significativamente a capacidade de reconhecimento social de ratos adultos, de maneira dose dependente (Gopalakrishnam e cols, 2007). Em camundongos modelo da Doença de Alzheimer, foi demonstrado que os níveis de peptídeo AB, gerados após clivagem da proteína

percursora amilóide pela BACE1, foram diretamente relacionados à disfunção colinérgica, com reflexo sobre a capacidade de reconhecimento social desses animais (Ohno e cols., 2004)

No laboratório, a tendência de camudongos em investigar co-específicos foi usada para criar um paradigma residente-intruso, capaz de avaliar a memória social. O camudongo adulto investiga espontaneamente o animal mais jovem, sendo a duração dessa investigação um reflexo da familiaridade entre os animais (Alcino Silva, 2000). A exposição repetida ao mesmo camudongo juvenil, seguida de intervalos, resulta em diminuição no tempo de investigação. Portanto, a diferença no tempo de investigação entre a primeira e as sucessivas apresentações pode ser usada como um índice de memória social, sendo tal índice uma representação do que é denominado reconhecimento social (Winslow, 2003). O paradigma tem sido usado para a avaliação da memória social em uma variedade de camudongos modelo de doenças com comprometimento neurológico, como autismo (Nishijima I, 2006) e síndrome do X frágil (Mineur YS e cols., 2006).

#### **1.4.2 Habituação a um novo ambiente**

A habituação a um novo ambiente representa uma das mais elementares formas de aprendizado, seja em animais ou humanos. É definida como a diminuição da resposta, não relacionada à fadiga física, frente à apresentação contínua ou repetida de um estímulo indiferente (Thompson R. F. e Spencer W. A., 1966). Trata-se de uma forma de aprendizado implícito, não associativo, no qual um indivíduo é exposto repetidamente a um mesmo estímulo. Em roedores, a habituação é frequentemente analisada através do comportamento exploratório, especialmente durante a habituação seguida de apresentações repetidas a um novo ambiente. A exploração é medida através da atividade locomotora, utilizando variáveis tais como distância percorrida e número de cruzamentos. De acordo com a teoria do mapa cognitivo (O Keefe, 1990), um roedor, quando colocado em um novo ambiente, inicia a formação de uma representação interna do ambiente ao seu redor. Uma vez formado o mapa hipocampal do espaço ao redor, a exploração ao ambiente é reduzida e tem-se a habituação.

A habituação ao campo aberto pode ser medida intra-sessão (redução de atividade motora que ocorre dentro do período de exposição) e entre sessões (redução de atividade entre sessões separadas por intervalos). A primeira é tida como uma medida de adaptatividade, enquanto a última parece refletir a memória formada para o meio. São encontrados na literatura exemplos de camundongos com comprometimento da habituação intra-sessão, da habituação entre sessões, ou de ambos (Dere e cols., 2002).

Neuroanatomicamente, a habituação parece ser dependente do hipocampo. Estudos utilizando a hipocampectomia e administração de drogas em ratos demonstram a importância da estrutura na habituação intra e entre sessões (Wright e cols., 2004; Vianna e cols., 2000). Entretanto, estudos recentes demonstram que o hipocampo não é a única estrutura envolvida, já que uma experiência em um ambiente rico em complexidade é capaz de reduzir o comprometimento da formação de representação espacial em ratos com lesões hipocámpais (Winocur e cols., 2005).

Neuroquimicamente, quatro neurotransmissores parecem predominar sobre a modulação da habituação: serotonina, glutamato, dopamina e acetilcolina (Leussis e Bolivar, 2006). A depleção central de serotonina com o uso do inibidor da triptofano hidroxilase, PCPA, foi capaz de reduzir tanto a habituação intra quanto entre sessões (Bidzinski e cols., 1998). A administração sistêmica de MK-801, um antagonista glutamatérgico, teve o mesmo efeito que o agente depletor de 5-HT (Carey e cols., 1998). CNQX, um antagonista de receptores glutamatérgicos AMPA/Kainato, interfere com a habituação entre as sessões, quando administrado diretamente no hipocampo de ratos, logo após a exposição inicial ao novo ambiente (Vianna e cols., 2000). A participação da dopamina na habituação é bem demonstrada através do uso de camundongos nocaute para proteínas envolvidas na neurotransmissão dopaminérgica. Camundongos homocigotos nocaute para o transportador de dopamina, DAT, apresentam um aumento na permanência de dopamina na fenda sináptica e são hiperativos, com déficit significativo na habituação a um novo ambiente, enquanto heterocigotos não são diferentes dos selvagens (Giros e cols., 1996). Já camundongos nocaute para os genes dos receptores dopaminérgicos D1 e D3 são hiperativos e com prejuízo na habituação intra-sessão quando comparados aos animais selvagens (Wong e cols., 2003).

A participação do sistema colinérgico na habituação é sugerida por diferentes abordagens. A administração de escopolamina, anterior à aquisição, interfere tanto com a habituação intra quanto entre sessões (Ukai e cols., 1994). A indução de lesões em neurônios colinérgicos do septum medial com o uso da imunotoxina 192 IgG-saporina produziu déficits na habituação intra-sessão (Lamprea e cols., 2003). Entretanto, os estudos com antagonistas e de lesão apresentam o viés de haver redução na atividade locomotora, o que dificulta a interpretação dos dados. Já a administração de nicotina, diretamente no núcleo acumbens, imediatamente após a primeira exposição ao campo aberto, foi capaz de aumentar a habituação entre as sessões. Entretanto, se o agonista foi administrado 5 horas após a primeira exposição, seu efeito foi o contrário (Schildein e cols., 2002). Medições *in vivo* dos níveis de ACh, através da técnica de microdiálise, revelam um aumento na liberação hipocampal de ACh seja na apresentação ao novo ambiente, seja na reexposição (Thiel e cols., 1998). A administração de Rivastigmina, um inibidor da AchE, foi capaz de reverter o prejuízo observado na habituação ao campo aberto em ratos modelo de sepse (Comim e cols., 2008). Portanto, ainda são necessários estudos com novas abordagens para determinar como a ACh participa da habituação a um novo ambiente.

#### **1.4.2. Acetilcolina e aprendizado motor**

Em animais e humanos, o aprendizado de tarefas motoras é normalmente medido pela redução no número de erros e/ou por uma mudança na cinemática e sinergia dos movimentos. A maioria das tarefas motoras é adquirida implicitamente, de forma oposta a outras formas de memória que utilizam conhecimento explícito (memória episódica, por exemplo). Observa-se um padrão de aprendizado lento, que requer várias sessões de treinamento (revisado por Doyon e cols., 1997 e por Shadmehr e Holcomb, 1997). Uma tarefa classicamente utilizada para avaliar aprendizado motor é a do rotarod (cilindro giratório) acelerado. O animal é colocado sobre um cilindro rotatório que possui velocidade de rotação crescente e mede-se a latência para a queda. A avaliação da performance através de vários desafios fornece um índice de aprendizado motor.

Modelos produzidos a partir de trabalhos realizados com humanos e animais sugerem a participação de diferentes estruturas encefálicas no aprendizado de tarefas motoras. As principais estruturas implicadas são o estriado, cerebelo e regiões motoras corticais (Doyon e cols., 2003). Defeitos cerebelares resultam em déficit no teste de Rotarod, conforme demonstrado pela inativação específica de células de Purkinje utilizando técnicas de recombinação gênica (Karpova AY e cols., 2005). Em camundongos com mutações no gene de fator de transcrição FOPX2, as mesmas encontradas em um grupo de pessoas com distúrbios na fala, foi demonstrada uma redução no aprendizado de tarefas motoras. Interessantemente, os autores relataram que tais alterações eram acompanhadas de plasticidade sináptica anormal em circuitos neurais cerebelares e estriatais (Groszer M. e cols., 2008). A importância de mecanismos plásticos no estriado para o aprendizado de tarefas motoras foi reforçada pelo uso de camundongos nocaute para receptores NMDA do tipo 1. Em tais animais, paralelamente à dificuldade de aprendizado no rotarod, houve prejuízo na indução de LTP no estriado dorsal. Sugere-se, portanto, a indução de LTP no estriado ventral como um dos substratos sinápticos do aprendizado motor (Dang MT e cols., 2006).

A participação da ACh no aprendizado de tarefas motoras ainda não é bem esclarecida. Em estudo recente, foi demonstrado que lesão do nucleus basal magnocelular reduz as mudanças plásticas geradas no córtex pelo aprendizado de uma tarefa motora, tal déficit correlaciona-se com a dificuldade do aprendizado de tal tarefa nesses animais (Conner e cols., 2003). Uma redução do conteúdo de ACh estriatal foi observada em ratos com deprivação de vitamina A, esses animais foram incapazes de melhorar suas performances no rotarod (Carta e cols., 2006). Por outro lado, camundongos nocaute para receptores centrais nicotínicos apresentaram uma melhora no aprendizado de tal tarefa (Marubio e Paylor, 2004). Em um camundongo modelo da doença de Huntigton, foi demonstrada uma redução nos níveis de expressão do VACHT e da ChAT, sem a perda de neurônios colinérgicos (Smith R e cols., 2006). No mesmo trabalho, os autores reportam a redução da expressão do VACHT no estriado postmortem obtido de pacientes com Doença de Huntigton.

## 1.5 Modelos animais de hipofunção colinérgica

O interesse em se entender a participação da neurotransmissão colinérgica em processos comportamentais levou ao desenvolvimento de diferentes modelos animais. O uso de antagonistas muscarínicos e nicotínicos trouxe valiosas contribuições, mas as limitações geradas pela falta de seletividade e reprodutibilidade de parâmetros farmacocinéticos trouxe dados muitas vezes contraditórios. Uma outra abordagem foi realizada através do uso de excitotoxinas, mas a falta de seletividade contra neurônios colinérgicos limitou as conclusões obtidas a partir desses estudos ( Hepler e cols., 1985). O desenvolvimento de toxinas seletivas para neurônios colinérgicos veio com o intuito de sanar tais limitações, mas a interpretação dos resultados ainda é controversa, já que mesmo essas últimas parecem afetar outros grupos neuronais ou não inativam completamente neurônios colinérgicos (McGaughy e Sarter 1998; McGaughy e cols., 2000).

A utilização de camundongos geneticamente modificados em neurociência obteve um grande crescimento nos últimos anos, contribuindo para o conhecimento do papel de sistemas de neurotransmissores em processos comportamentais. As grandes vantagens geradas por essa técnica, especialmente ligadas à especificidade, trouxeram uma nova oportunidade de se gerar um animal modelo de disfunção colinérgica. Dessa forma, diferentes grupos de pesquisa realizaram a inativação de genes importantes para a maquinaria de síntese de ACh.

A inativação do gene responsável pela codificação da ChAT levou à morte precoce dos animais, fato também observado na inativação do gene do transportador de colina de alta afinidade (Misgeld e cols. 2002; Ferguson e cols 2004, Brandon e cols. 2004). Camundongos heterozigotos para ambos os genes apresentaram mecanismos adaptativos capazes de manter os níveis de síntese de ACh similares a camundongos selvagens. Esse fato demonstra a importância da ACh na manutenção da homeostase corporal, porém torna inviável a análise de parâmetros comportamentais nesses animais para entender como a disfunção colinérgica afeta aspectos cognitivos.

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem estudado a biologia molecular e as vias celulares utilizadas no direcionamento do VAcHT para vesículas

sinápticas (Barbosa Jr e cols., 1999; Santos e cols., 2001; Barbosa e cols., 2002; Prado e cols., 2002). Esse transportador controla o último passo da armazenagem de ACh. Interessados em avaliar as consequências fisiológicas da manipulação da expressão do gene do VACHT, nosso grupo gerou, através de técnicas de recombinação homóloga, camundongos com perda total da expressão do gene (nocautes) e com sua expressão reduzida (Knock-downs).

Para a geração de animais nocaute, foi utilizado o sistema cre/lox P. O sistema Cre/loxP permite a geração de camundongos nocaute condicionais em que há um controle temporal e espacial da expressão de um gene alvo (Morozov e cols., 2003). A enzima Cre é uma recombinase utilizada pelo vírus bacteriofago P1 para inserir seu DNA no genoma das bactérias. Esta recombinase atua como uma tesoura, clivando uma seqüência específica de 34 pares de bases chamada loxP. Esta pequena seqüência pode ser artificialmente inserida no genoma de mamíferos e utilizada para excisão precisa do DNA. Nesta técnica, portanto, deve-se gerar um animal que contenha o gene de interesse flanqueado por dois sítios de loxP para que possam cruzar com animais que expressem a recombinase sob ação de um promotor tecido específico. Dessa forma, a prole gerada terá abolida a expressão da proteína de interesse apenas nos tecidos onde a Cre estiver sendo expressa. O gene do VACHT foi então flanqueado por dois sítios de loxP. Os camundongos VACHT-loxP foram cruzados com camundongos que expressam a Cre sob o controle do promotor da cálcio calmodulina cinase II $\alpha$ . Alguns camundongos machos utilizados para cruzamento expressavam uma pequena quantidade de Cre nos testículos (detectado por qRT-PCR), um fenômeno já reportado em outra linhagem utilizando Cre (Rempe e cols., 2006). Portanto, em algumas das células germinativas geradas ocorreu a remoção do gene VACHT flanqueado pelas seqüências Flox. O alelo Flox recombinado foi nomeado de VACHT<sup>DEL</sup>, e os animais contendo tal gene foram então cruzados com camundongos C57BL/6/UNI e assim obtidos camundongos VACHT<sup>WT/DEL</sup>. Do cruzamento entre camundongos VACHT<sup>WT/DEL</sup> foram obtidos camundongos nocautes (VACHT<sup>DEL/DEL</sup>).

Para gerar camundongos com redução da expressão do VACHT, a estratégia utilizada foi a de interromper a região 5' não traduzida do gene, através da inserção de um cassete de 3.8 Kb, contendo o gene de resistência ao antibiótico neomicina e da enzima timidina cinase, nessa região. Dessa forma, foram obtidos

animais viáveis, heterozigotos (VACHT KD<sup>HET</sup>) e homozigotos (VACHT KD<sup>HOM</sup>). Animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram uma redução na expressão do VACHT de cerca de 45%, enquanto animais VACHT KD<sup>HOM</sup> tiveram uma redução próxima a 65% (Prado e cols., 2006, ver anexo).

---

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi de investigar o papel da armazenagem de acetilcolina pelo VACHT em funções mediadas pelo sistema colinérgico.

### 2.2. Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade e caracterizar molecularmente camundongos nocaute para o VACHT
- Avaliar a memória declarativa, utilizando o teste de reconhecimento social, de camundongos com redução na expressão do VACHT
- Avaliar a memória não-associativa, utilizando o teste de habituação ao campo aberto, de camundongos com redução na expressão do VACHT
- Avaliar a memória procedural, utilizando tarefas motoras, de camundongos com redução na expressão do VACHT



---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3. Geração de camundongos VAcHT nocaute

As técnicas de recombinação homóloga e a geração dos camundongos fundadores foram feitas no laboratório de animais transgênicos da Universidade Duke, pela professora Vânia Ferreira Prado. Para a geração de camundongos nocaute, o gene do VAcHT foi flanqueado por dois sítios de loxP. Os camundongos VAcHT-loxP foram cruzados com camundongos que expressam a Cre sob o controle do promotor da cálcio calmodulina cinase II $\alpha$ . Alguns camundongos machos utilizados para cruzamento expressavam uma pequena quantidade de Cre nos testículos (detectado por qRT-PCR), um fenômeno já reportado em outra linhagem utilizando Cre (Rempe, D e cols., 2006) . Portanto, em algumas das células germinativas geradas ocorreu a remoção do gene VAcHT flanqueado pelas sequências Flox. O alelo Flox recombinado foi nomeado de VAcHT<sup>DEL</sup>, e os animais contendo tal gene foram então cruzados com camundongos C57BL/6/UNI e assim obtidos camundongos VAcHT<sup>WT/DEL</sup>. Do cruzamento entre camundongos VAcHT<sup>WT/DEL</sup> foram obtidos os camundongos nocautes (VAcHT<sup>DEL/DEL</sup>).

Os protocolos foram realizados observando-se as normas internacionais contidas no, "GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS" editado por "US NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH publication n:85 -23, revised 1996). Os estudos realizados com os camundongos nocaute para o transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

### **3.1- Caracterização molecular de camundongos VChT nocaute**

#### **3.1.1 Genotipagem**

##### **Extração de DNA genômico**

Fragmentos da cauda dos camundongos foram colocados em solução de lise (50mM Tris.HCl pH 8.0, 5mM EDTA; SDS 1%; NaCl 0,25M; proteinase K 0,125mg) e incubados a 55°C por 16 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e prosseguiu-se uma extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamínico. O DNA foi precipitado com 500µL de isopropanol, ressuspendido em 100µL de água deionizada e deixado em banho-maria a 37°C até completa dissolução.

##### **Southern Blotting e PCR**

O DNA extraído foi utilizado para genotipagem dos camundongos através de análise por Southern blotting e da reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de PCR foram feitas em um volume final de 20 µL por tubo, utilizando-se 2.5µL tampão Promega 10X (100mM KCl; 100mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 200mM Tris-Cl, pH 8.75; 20mM MgSO<sub>4</sub>; 1% Triton X-100<sup>®</sup>; 1000µg/mL BSA), 250 µM de dNTP, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 µM dos iniciadores (Tabela 1 ), 0.4 U de Taq polimerase (PROMEGA), 10% DMSO e 0.5 µL de DNA genômico.

Iniciador	Sequência	Tm
P1	5' TCATAGCCCCAAGTGGAGGGAGA 3'	55°C
P2	5'-GGAAGCTTCCTGACTAGGGGAGGAG-3'	55°C
P3	5'-GGTTCATATCCCCGAGCTCAGGAG 3'	55°C

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para genotipagem dos camundongos VACHT DEL.

Foram realizados 35 ciclos, sendo que cada ciclo consistiu-se de desnaturação a 94°C por 3 minutos, anelamento dos iniciadores a 55°C por 45 segundos, seguido de extensão do DNA a 68°C por 1 minuto. Após os ciclos, fez-se uma extensão final por 10 minutos a 68°C e os produtos amplificados foram mantidos a 4°C. As amostras amplificadas foram corridas em gel de agarose 0.7%.

Para as análises de Southern, 40 µL do DNA genômico foram digeridos com 1µL da enzima de restrição *Bam*H1 e *Sac*1, BSA1X, num volume total de 20 µL por 24 horas. Após a digestão, o DNA foi corrido em gel de agarose 0,7% por 20 horas. Em seguida, o gel foi lavado 2 vezes com solução A (1.5M NaCl; 0.5M NaOH) por 30 minutos cada e 2 vezes com solução B (1M acetato de amônio; 20mM NaOH) por 30 minutos cada. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon (Gibco) por 16 horas e fixado à membrana através de exposição à luz ultravioleta. A membrana foi bloqueada com solução de hibridização (6x SSC, 5 x solução Denhardt, 0.5% SDS, 50% formamida e 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão) e hibridizada a 42°C com a sonda (fragmento *Xho*I-*Hind*III), por 16 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com solução 2x SSC; 0,1% SDS a temperatura ambiente por 15 minutos, lavada com solução 0,2x SSC; 0,1% SDS a 60°C por 20 minutos e exposta em autoradiografia (Bio-Max KODAK) a -80°C por 4 a 7 dias.

## **3.2 – Quantificação do RNA mensageiro**

### **Extração do RNA total**

O encéfalo inteiro de embriões com 18.5 dias foi utilizado para a extração de RNA. O tecido foi triturado em nitrogênio líquido e o RNA total extraído com Trizol (Invitrogene) de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico por 30 segundos e o homogenato centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, foi adicionado clorofórmio (200µL/100mg tecido), misturado por inversão durante 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000g por 20 minutos a 4°C. Recuperou-se a fase aquosa e a esta adicionou-se isopropanol (500µL/100mg tecido) para a precipitação do RNA. Centrifugou-se a 12.000xg por 15 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 75% (1mL/100mg tecido) e centrifugado a 7500xg por 5 minutos. O RNA foi ressuspenso em 60 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Alíquotas dos RNAs foram dosadas por espectrofotometria.

### **Tratamento com Dnase I**

Amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Ambion). As amostras foram diluídas para uma concentração de 10µg/50µL, adicionou-se 0.1 volumes de tampão da DNase 10X e 0.5µL da enzima. Após 30 minutos de incubação a 37°C adicionou-se mais 0.5µL da DNase I e, novamente, incubou-se por 30 minutos a 37°C. Ao término da incubação, foram adicionados 0.1 volumes de reagente inativador de DNase e manteve-se a reação por 2 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 2 minutos a temperatura ambiente, recolheu-se o sobrenadante e o RNA foi novamente quantificado.

## **Síntese de cDNA**

A síntese de cDNA foi realizada com o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, cerca de 1 µg de RNA foi misturado a 1 µL de oligo dT e 1 µL de dNTPs em um volume total de 10 µL, incubados a 65°C por 5 minutos e resfriado no gelo por cerca de 2 minutos. Seguiu-se à incubação das amostras em uma mistura contendo tampão da transcriptase reversa 1X, 0,01M DTT, 5mM MgCl<sub>2</sub> e 40 unidades do inibidor da ribonuclease recombinante Rnase OUT™ (40u/µL). Esta reação foi mantida em banho-maria a 42°C por 2 minutos e posteriormente, colocada no gelo. Adicionou-se 200 unidades da transcriptase reversa (200u/ µL) às amostras e estas foram incubadas a 42°C por 50 minutos, em seguida a 70°C por 15 minutos. Ao final da reação de transcrição reversa, adicionou-se 20 unidades de Rnase H (2u/µL) e as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Em toda a reação de síntese de cDNA foi realizado um controle negativo em que a transcriptase reversa não foi adicionada.

## **Reação de PCR em tempo real**

Foram desenhados iniciadores para analisar a transcrição de RNA mensageiro do VACHT, ChAT e CHT1. As reações de PCR em tempo real foram corridas em termociclador da Applied Biosystem modelo 7500 usando o corante fluorescente SYBR Green I. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL em que se adicionou 10,0 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem), 0,5µM de cada iniciador e 1µL da amostra de cDNA original diluída quatro vezes. Foram realizados 40 ciclos, consistindo de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores (TABELA 3) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A fluorescência foi medida em cada ciclo. Após o último ciclo, a especificidade da PCR foi checada pela análise da curva de “melting” para todas as amostras. Em todas as corridas, foram utilizados controles negativos com amostras em que não foi adicionada a transcriptase reversa. Adicionalmente, os produtos de amplificação foram corridos em gel de acrilamida 6.5% e corados com nitrato de prata.

Gene	Par de Iniciadores	T <sub>m</sub> °C	Fragmento pb
ChAT	ChATF2 5'-CATCTTCTGGCACTGAGGGAGCTG-3'	68	240
	ChATR2 5'-CGTGAAAGCTGGAGATGCAGAAGG-3'	69	
Actina	Actin F 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGA-3'	68	120
	Actin R 5'-AATGCCTGGGTACATGGTGGTA-3'	63	
VACHT	SUPERVACHT F : 5' - GGC ATT GCC ATG ATC GCC GAC AAG - 3'	75	180
	SUPERVACHT R: 5' - GTC GAA GAG CGA CAC GGC GGC GAG - 3'	65	
CHT1	CHT1RTF 5'-CGGCGAGTTCTATGTTTGCTCGG-3'	69	191
	CHT1RTR 5'-GATGATGATGTAGACAAGGTCAG-3'	56	

**Tabela 2:** Iniciadores desenhados para PCR em tempo real

### 3.3 - Expressão Protéica

#### Western Blotting

Após dissecação, os tecidos dos camundongos foram congelados rapidamente em gelo seco/etanol e mantidos a -80°C até a utilização. Para preparar o extrato bruto protéico, masseramos a medula espinhal em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton e coquetel de inibidores de protease (Sigma) e mantidos no gelo por 15 minutos. Após centrifugação a 10.000xg por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e o conteúdo protéico dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em cada dosagem, uma curva padrão de calibração com BSA (1 a 30 µg) foi utilizada.

Amostras de 50 microgramas de extrato bruto foram resolvidas em gel de SDS-PAGE de acordo com Laemmli e cols., 1970. As amostras foram misturadas ao

tampão de amostra 2X (SDS 0,2% (p/v), glicerol 0,2% (v/v), 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v), azul de bromofenol 0,0001% (p/v) e Tris-HCl 12,5mM, pH 6.8, aquecidas a 37°C por 15 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 4-12% (Invitrogene).

O Western blotting foi realizado como descrito por Towbin e cols., 1979. Ao término da eletroforese, o gel foi lavado em tampão de transferência (48mM Tris; 39mM glicina; 20% metanol (v/v); 0,13mM SDS) e montado um sanduíche com papéis Watmamm 1 e membrana de PVDF (Amersham) previamente molhada em metanol. A transferência foi realizada a 24V, 300mA, por 2 horas e em seguida, a membrana foi incubada por uma hora com TBS (137mM NaCl; 20mM Tris.HCl; pH 7.6); Tween 0,1% (v/v) e 5% de leite desnatado (Molico). Adicionou-se o anticorpo e incubou-se por 1 hora. A membrana foi então lavada 3 vezes, 10 minutos cada lavagem, com TBS/Tween e incubada 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído em TBS/Tween e leite. Ao término da incubação, o processo de lavagem foi repetido. Os anticorpos utilizados foram anti-VACHT 1:1500 (synaptic system), anti-sinaptofisina 1:3000 (Sigma Chemical Co., SP, Brazil), anti-tubulina 1:10.000 (Synaptic Systems Gottingen, Germany), anti-actina 1:10.000 (Chemicon, California, USA) e Anti-Sintaxina 1:30.000 (Sigma).

A detecção foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o kit ECL™ (Amersham). A detecção da quimioluminescência foi realizada com o aparelho ImageQuant (GE Helthcare).

### **Imunofluorescência**

Os experimentos de imunofluorescência foram realizados como descrito por Brandon e cols., em 2003. O diafragma dos embriões foi rapidamente dissecado e fixado em solução de paraformaldeído em PBS 4%, pH 7.4, por 4 dias . Os tecidos foram então crioprotetidos em solução 4% PFA com 10% de sacarose por 6 horas a 4°C, rapidamente congelados em isopentano/gelo seco e armazenados a -80 °C. Os diafragmas inteiros foram lavados em PBS e incubados por 1 hora em solução 0,1M de glicina em PBS pH 7.4. Após a lavagem em PBS, os músculos foram incubados por 30 minutos em PBS contendo 0.5% de Triton X-100 e bloqueados por 18 horas em solução de bloqueio (0,15M NaCl; 0,01M tampão fosfato; 3% albumina bovina;

5% soro normal de cabra; 5% soro de burro e 0,01% de timerosal). Ao término do bloqueio, os tecidos foram incubados com os anticorpos primários, anti-VACHT (rabbit polyclonal, Sigma Chem. Co), anti-CHT1 (25) or anti-neurofilament 150 (rabbit polyclonal, Chemicon), em solução de bloqueio por 48 horas a 4°C. Os músculos foram então lavados 3 vezes em PBS contendo 0.5% de Triton uma hora cada, e incubados por 18 horas em solução de bloqueio contendo  $\alpha$ -bungarotoxina conjugada com Alexa Flúor 555 e Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (Molecular Probes) a 4°C.

As imagens foram adquiridas em microscópio Axiovert 200M usando o sistema ApoTome para obter as seções ópticas de cada tecido. As objetivas utilizadas foram 20x seca, 40X imersão em água (1.2 NA) e 63x de imersão em óleo (1.4 NA). Alternativamente, algumas imagens foram feitas com microscópio confocal Leica SP5.

A análise da intensidade de fluorescência foi realizada o programa Image J (NIH image tool). As imagens foram convertidas para “grayscale” e um limiar (threshold) de intensidade de fluorescência foi aplicado em cada imagem baseado na média dos limiares automaticamente obtidos para cada imagem.

### **3.4 – Funções cognitivas em camundongos VACHT Knockdown**

#### **3.4.1. Memória social**

Para a avaliação da memória social, utilizamos dois protocolos distintos. O primeiro protocolo de reconhecimento social utilizado foi baseado naquele descrito por Choleris e colaboradores, em 2003. Trata-se de um protocolo de habituação-desabituação. Camundongos adultos e machos que seriam avaliados foram mantidos individualmente em gaiolas, por 4 dias, para que fosse estabelecida dominância do território. Para avaliar o tempo de interação social, foi colocado em cada gaiola um camundongo juvenil swiss, denominado de intruso. O camundongo intruso foi colocado dentro de um aparato de acrílico transparente contendo furos,



que permitiam a investigação olfativa pelo camundongo avaliado. O tempo de investigação foi medido como a quantidade de tempo que o animal avaliado mantinha seu focinho nos furos da caixa de acrílico. O primeiro passo consistiu em manter o camundongo adulto habituando ao aparato de acrílico vazio por 10 minutos, e então foi introduzido na gaiola o aparato contendo o intruso. Foi permitida a exploração livre por 5 minutos, e novamente re-introduzido o aparato de acrílico vazio por mais dez minutos. O procedimento foi repetido por mais 3 vezes, até que o intruso foi substituído por outro camundongo juvenil swiss. Os experimentos foram filmados e o tempo de investigação cronometrado por um avaliador treinado, cego para os genótipos.

Um segundo experimento consistiu em expor o animal avaliado ao mesmo intruso por duas vezes, durante 5 minutos, com um intervalo de 30 minutos entre as duas exposições. Para avaliar a contribuição de déficits colinérgicos agudos para o fenótipo observado, salina ou galantamina (Merck) 1 mg/Kg foi administrada (via sub-cutânea) 30 minutos antes da primeira apresentação ao intruso.

Para auxiliar na interpretação dos resultados observados no experimento de reconhecimento social, realizamos experimentos para avaliar a capacidade olfatória e sociabilidade dos animais.

### **3.4.2 Capacidade olfatória**

Utilizamos dois testes capazes de medir a capacidade olfatória de camundongos. O primeiro consistiu em testar a capacidade dos animais, sob jejum, de encontrar um pedaço de chocolate escondido entre a maravalha (Ferguson e cols., 2000). Inicialmente, por um dia, a ração dos camundongos foi substituída por chocolate. No dia seguinte, a dieta normal foi reestabelecida e por uma noite os animais foram novamente mantidos sob jejum. Na manhã seguinte, os camundongos foram colocados individualmente em uma caixa contendo um pedaço de chocolate entre a maravalha. Foi medido, por um observador treinado e cego para os genótipos, o tempo gasto pelos animais para encontrar o alimento. Os animais sempre foram colocados na caixa em um ponto diametralmente oposto àquele onde encontrava-se o chocolate.

O segundo teste realizado mediu a capacidade dos animais em habituar a um estímulo olfatório e discriminar entre dois estímulos distintos (Bielsky e cols., 2005). O teste foi realizado com os mesmos camundongos avaliados no teste de reconhecimento social, 7 dias após sua realização. Para este teste, utilizamos um pequeno tubo eppendorf com furos, contendo um pedaço de algodão embebido com 10 ul de essência comercial de morango. Individualmente em gaiolas, camundongos foram apresentados por 1 minuto ao tubo por 4 vezes por 1 minuto, com intervalos de 10 minutos. Em uma quinta apresentação, o tubo contendo a essência de morango foi substituído por um tubo contendo 10 ul de essência comercial de baunilha. O tempo de exploração olfatória sobre o tubo foi medido em cada apresentação por um observador treinado e cego para os genótipos.

### **3.4.3 Teste de sociabilidade**

O teste de sociabilidade consiste em oferecer ao animal um estímulo social (um outro camundongo) e um estímulo inanimado. A escolha entre os dois estímulos fornece um parâmetro para a mensuração da sociabilidade. Adaptamos o protocolo descrito por Know e colaboradores, em 2006. O teste foi feito em uma caixa de acrílico, de 15x90x18,5 cm, dividida em três compartimentos de 15x29 cm, separados por portas divisórias 3,8x3,8 cm. Em um compartimento lateral foi colocado um estímulo social, enquanto no outro foi colocado um estímulo não social. Os estímulos sociais e não-sociais foram variados entre os testes, e consistiram de um camundongo contido em um aparato de acrílico com furos (estímulo social) e apenas o aparato de acrílico (estímulo não-social), respectivamente. Na etapa de habituação, o camundongo pode explorar toda a caixa por 10 minutos, e depois foi mantido no compartimento central por 5 minutos. Após esse período, as portas foram abertas e aos animais foi permitido, por 10 minutos, interagir livremente com outro camundongo ou explorar o estímulo não-social. Os resultados foram expressos como porcentagem do tempo de exploração total para os diferentes estímulos.

### **3.5- Aprendizado motor**

#### **3.5.1 - Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (Rotarod)**

Para avaliar o aprendizado motor, utilizamos o rotarod (cilindro giratório), um aparelho no qual o camundongo deve caminhar continuamente sobre o cilindro em rotação para evitar a queda. Nos testes realizados, utilizamos o rotarod com detector automático de queda (Insight Equipamentos. Ribeirão Preto, Brasil). O Rotarod é um cilindro rotatório com raio de aproximadamente 2,7 centímetros e altura de 40 cm. O aparelho possui 4 baias, com espaço de 3 centímetros para cada camundongo, de modo que quatro animais são avaliados por vez. Os animais foram mantidos na sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelo menos 2 horas antes do experimento. Para avaliar o padrão de aprendizado, os animais foram treinados no Rotarod por 8 dias seguidos. A capacidade de retenção do aprendizado foi avaliada dez dias depois. Os animais foram inicialmente mantidos sobre os cilindros por 5 minutos, para habituação ao aparato. Cinco minutos após o período de habituação, os camundongos foram novamente colocados sobre o rotarod e a velocidade de rotação foi aumentada de 5 a 35 rotações por minuto (RPM) num intervalo de 300 segundos. A latência para queda dos animais foi medida automaticamente através de um sensor mecânico localizado no chão do aparato. Foram realizados dez testes por dia e com intervalos de 30 segundos entre eles, com os animais sendo matidos em suas caixas de origem durante esse intervalo. No intervalo entre a troca dos animais, o cilindro foi limpo com etanol comercial. Os testes foram realizados nas últimas cinco horas da fase clara do ciclo circadiano.

#### **3.5.2 Foot print**

Para realização do teste de foot print, segundo Barlow C. e cols., 1996, utilizamos tinta nanquim preta para marcar as patas traseiras dos camundongos. Os camundongos foram então colocados na entrada de um túnel escuro (9.0 x 6.3 x 35.5 cm), contendo em seu chão um papel branco para registro dos passos dados pelos animais. Para determinação da largura dos passos, foi medida a distância

entre cada pata do mesmo lado do corpo do camundongo. Para cada animal foi determinado tamanho médio dos passos.

### **3.6 - Aprendizado não-associativo (habituação ao campo aberto)**

#### **3.6.1 Habituação intra-sessão ao campo aberto**

Para avaliar o padrão de habituação intra-sessão ao campo aberto, os animais foram mantidos na sala de realização dos experimentos por pelo menos um dia antes dos testes. A atividade locomotora, sob diferentes parâmetros, foi medida automaticamente (Accuscan Instruments, Inc. Columbus, OH). Os camundongos foram então introduzidos na caixa de acrílico e permitidos explorar o ambiente livremente por 120 minutos (Sotnikova e cols., 2004). Os resultados foram expressos em distância total percorrida (em cm) por intervalo de 5 minutos, e como distância total percorrida (em cm) por intervalo de uma hora.

#### **3.6.2 - Habituação entre sessões ao campo aberto**

Para avaliar o padrão de habituação entre as sessões, os animais foram apresentados ao campo aberto por 3 dias seguidos, com intervalos de 24 horas entre as exposições. Os resultados foram expressos em distância total percorrida por intervalo de 2 horas, em cada dia de teste. Foi calculado um índice de habituação através da divisão da atividade locomotora no terceiro dia pela atividade locomotora no primeiro dia, seguida da multiplicação por 100.

#### **3.6.3 Atividade locomotora induzida por cocaína**

O efeito da cocaína sobre a atividade locomotora foi avaliado da seguinte forma: os camundongos foram mantidos no campo aberto por uma hora, explorando o ambiente livremente. Após esse período, receberam uma dose de cocaína, i.p., 20 mg/kg, ou apenas salina. A atividade locomotora continuou sendo monitorada por mais duas horas. Os resultados foram expressos como distância total percorrida (em cm) por intervalos de 5 minutos. Os resultados também foram expressos através da

medida da atividade locomotora nos 15 minutos anteriores e nos 15 minutos posteriores à administração da droga.

O efeito da galantamina sobre a atividade locomotora induzida por cocaína foi avaliado da seguinte forma: 15 minutos após a administração de cocaína, os animais foram colocados no campo aberto. Os animais puderam explorar o ambiente livremente por 15 minutos, quando receberam uma injeção intra peritonial contendo galantamina na dose de 1 mg/kg. A atividade locomotora continuou a ser monitorada por mais 105 minutos. Os resultados foram expressos em distância total percorrida (em cm) por intervalos de 5 minutos.

### **3.6.4 Preferência condicionada pelo lugar (CPP)**

O experimento de preferência condicionada pelo lugar (CPP) foi adaptado do protocolo descrito por Bohn L. M. e cols., em 2003. Para a realização do experimento foi utilizada uma caixa retangular, de acrílico, dividida em três compartimentos, separados por portas removíveis. A caixa foi colocada no interior de uma outra caixa de madeira, para atenuar a interferência sonora, e cada compartimento foi iluminado por uma lâmpada separada, localizada no teto da caixa de madeira. A localização do camundongo foi determinada manualmente, por um observador treinado e cego para os genótipos.

Cada um dos três compartimentos teve características distintas. O compartimento central apresentava 25 cm<sup>2</sup>, com o chão e paredes revestidos por motivos brancos. Os dois compartimentos para escolha tinham 30 cm<sup>2</sup>. Um compartimento era revestido por um motivo contendo linhas pretas e brancas alternadas, na vertical e o chão revestido por um suporte plástico liso e removível. Enquanto o outro compartimento continha as mesmas listras, porém na horizontal, e o chão revestido por um suporte plástico ondulado e removível. Em um dos lados, foi colocado um pequeno compartimento circular, contendo um sachê comercial de chá verde envolvido por maravalha. No outro lado foi colocado o compartimento contendo apenas maravalha. O experimento consistiu de três fases: pré-condicionamento, condicionamento e pós-condicionamento.

Pré-condicionamento: Durante a fase de pré-condicionamento, os camundongos foram colocados no compartimento central por 5 minutos, e as portas foram então abertas. O tempo passado em cada compartimento foi medido por um período de 30 minutos. Se o camundongo passou mais que 60% dos 30 minutos em um dos compartimentos foi eliminado do experimento. A fase de condicionamento começou no dia seguinte.

Condicionamento: A fase de condicionamento consistiu de injeções alternadas de salina e cocaína em 6 dias. Nos dias 1,3 e 5 os animais receberam cocaína (merck), dissolvida em salina, e nos dias 2, 4 e 6 apenas salina. O protocolo foi desenhado randomicamente, de forma que metade dos animais de cada genótipo recebeu a droga em um dos lados e a metade no outro. Ao receberem a injeção, os animais ficaram confinados por 30 minutos no compartimento anteriormente determinado. Portanto, cada animal recebeu cocaína e foi mantido sempre do mesmo lado, para que fosse gerado o condicionamento. O teste ocorreu no dia seguinte ao sexto dia de condicionamento.

Teste pós-condicionamento: Nesse dia, os animais não receberam nenhuma injeção, seja de salina ou cocaína. Foram colocados no compartimento central por 5 minutos, e a partir de então as portas foram abertas e foi permitido que explorassem livremente qualquer dos compartimentos por 30 minutos. O tempo de permanência em cada compartimento foi computado manualmente.

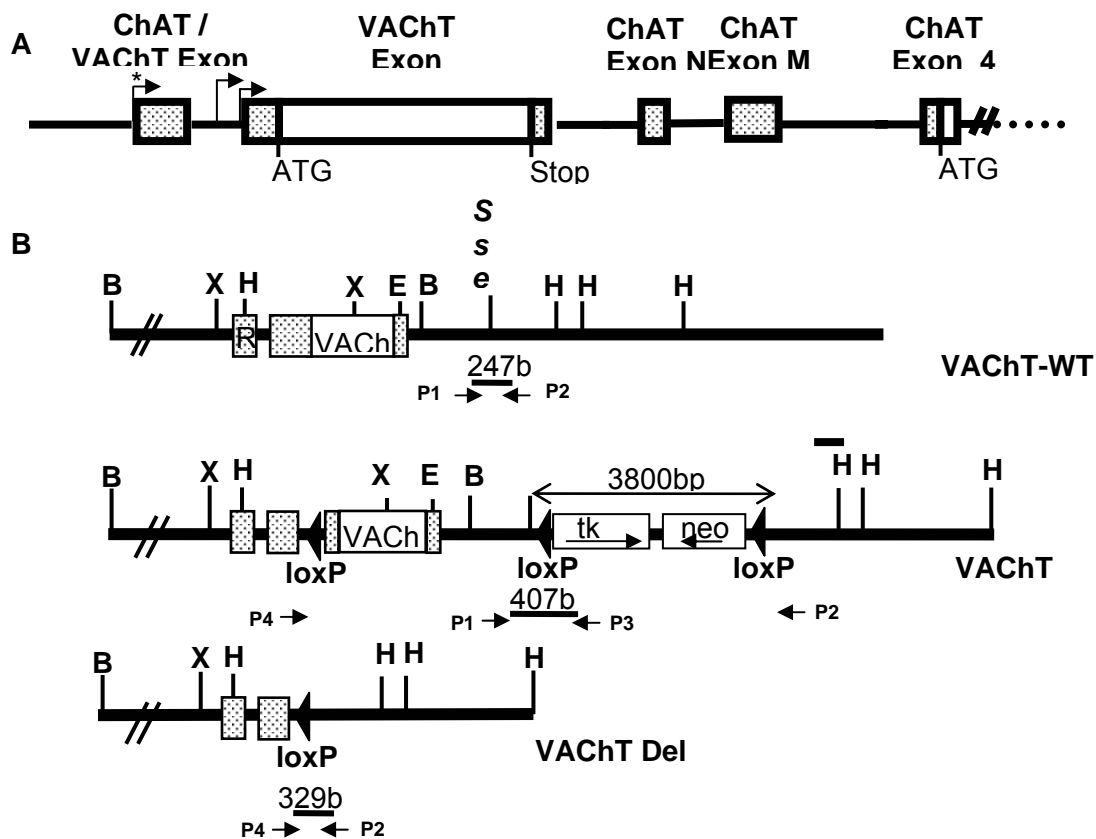
### **3.5 Análise estatística**

Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do programa GraphPad prism 4. Durante descrição dos resultados de cada experimento, são apresentados os testes utilizados para análise estatística.

### 4.1 Caracterização bioquímica de camundongos VChT nocaute

#### 4.1.1- Identificação dos camundongos

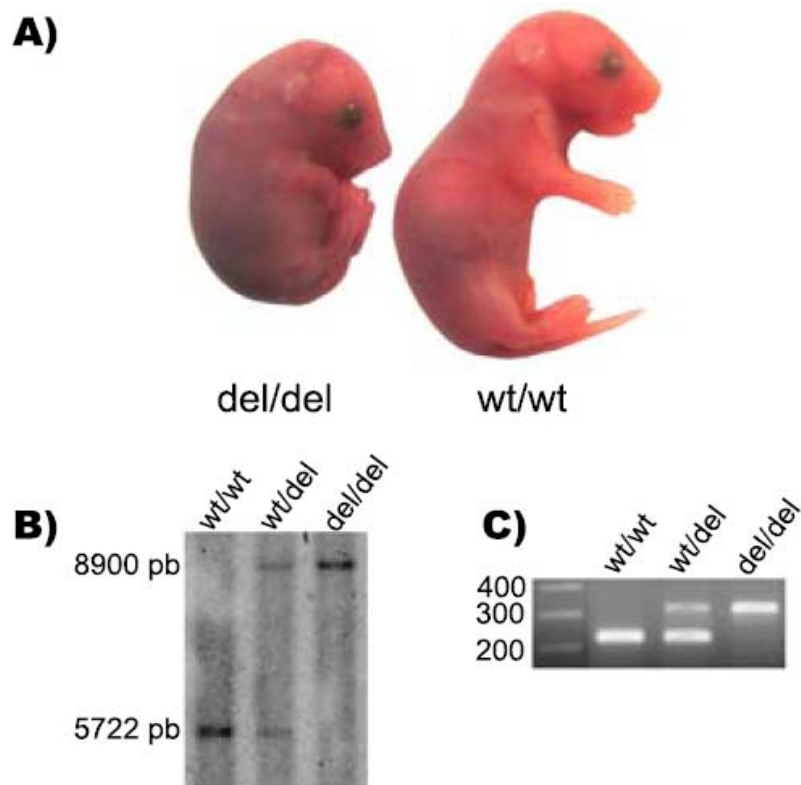
Nosso grupo de pesquisa gerou camundongos com deleção do gene do VChT através da tecnologia Cre/Lox (Figuras 3A e B). Observamos que camundongos VChT<sup>DEL/DEL</sup> morrem por volta de 5 minutos após o nascimento, e portanto passamos a utilizar camundongos no dia 18.5 de desenvolvimento embrionário para a caracterização inicial desses animais. Esses animais homocigotos mutantes mostraram semelhança de fenótipo com os nocautes para o gene da ChAT (Misgeld T.e cols., 2002), com sinais de cianose e flacidez muscular (Figura 4A). A genotipagem dos animais foi realizada através das técnicas de Southern blotting e PCR. Para a identificação por Southern blotting, realizamos a digestão do DNA genômico com as enzimas *Bam*H1 e *Sac*1, e posterior hibridização com a sonda gerada a partir do fragmento de DNA do VChT *Nde*I/*Pme*I (Figura 4B). O alelo recombinante apresenta uma banda de 8900 pb enquanto o alelo selvagem (WT) apresenta uma banda de 5722 pb (Figura 4B). Como apresentado na Figura 4B, observou-se apenas a banda de 8900 pb nos animais VChT<sup>DEL/DEL</sup>, sendo a intensidade da banda referida menor em animais VChT<sup>WT/DEL</sup>. Foi observado que a proporção entre os camundongos de diferentes genótipos apresentava uma distribuição mendeliana.



**Figura 3: Esquema do loco gênico colinérgico e a estratégia utilizada na construção do vetor para a geração dos animais VachT Del.** A) As caixas representam diferentes exons para ChAT e VACHT. As caixas abertas mostram a janela aberta de leitura e as caixas cinza representam as regiões não traduzidas. O gene do VACHT está dentro do primeiro íntron do gene da ChAT. As setas indicam potenciais sítios de início de transcrição para o VACHT. A seta marcada com asterisco representa o sítio de início de transcrição que é comum entre ChAT e VACHT. B) Representação esquemática do loco selvagem do VACHT, o vetor construído flanqueado pelas sequências Flox e o loco do VACHT após deleção. As setas indicam P1, P2, P3 e P4 mostrando as posições dos iniciadores usados para genotipagem e a barra (probe) mostra a localização das sondas utilizadas no Southern.

Routineiramente, os animais utilizados nos experimentos foram genotipados pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Fragmentos da cauda dos animais eram retirados e o DNA genômico extraído para genotipagem. Conforme observado na figura 4C, para os animais selvagens (WT) foi amplificado um fragmento próximo a 230 pb, para os camundongos homocigotos ( $VACHT^{DEL/DEL}$ ) uma banda próxima a 330 pb, enquanto nos heterocigotos ( $VACHT^{WT/DEL}$ ) foram observadas as duas bandas.



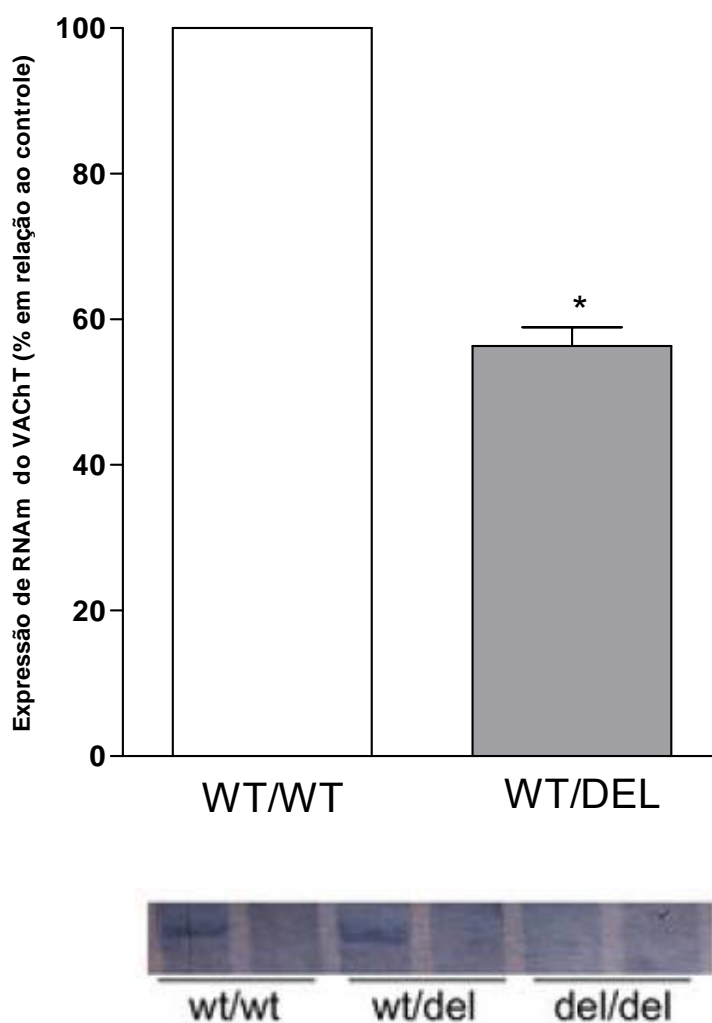


**Figura 4: Geração de camundongo  $VACHT^{DEL/DEL}$ :** **A)** Camundongo nocaute para o VACHT ( $VACHT^{DEL/DEL}$ ) morre rapidamente após o nascimento. Embriões E18.5 apresentam flacidez muscular e cifose. **B) Análise de Southern confirma a presença do alelo Del.** Animais cujo gene do VACHT não sofreu recombinação (WT) apresentam uma banda de 5722 pb, enquanto os animais  $VACHT^{DEL/DEL}$  apresentam uma banda de 8900 pb. **C) PCR para genotipagem dos camundongos.** Animais selvagens geram um fragmento de 230pb ao passo que a amplificação de amostras provenientes de animais  $VACHT^{DEL/DEL}$  produz uma banda de 330pb.

#### 4.1.2- Análise dos níveis de transcrição e tradução do VACHT

Para avaliar as conseqüências da manipulação genética realizada sobre os níveis de transcrição do VACHT, utilizamos a técnica de PCR em tempo real (qPCR), uma técnica sensível e que possibilita a detecção de variações sutis na transcrição gênica (Bustin SA., 2002). Comparado aos camundongos selvagens da mesma ninhada, camundongos  $VACHT^{WT/DEL}$

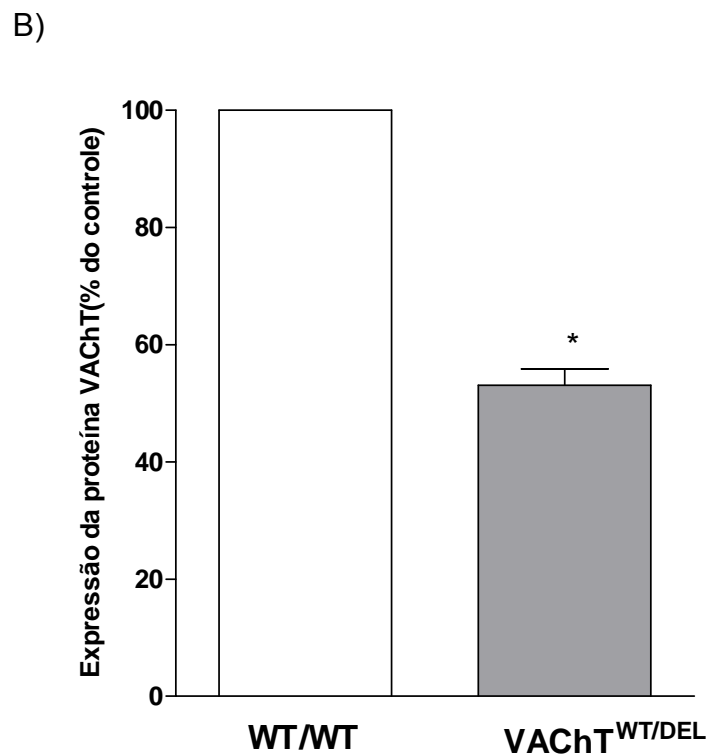
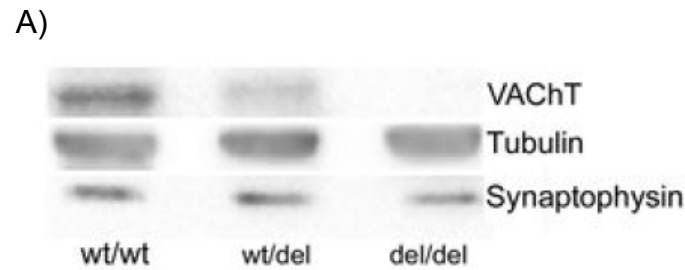
apresentaram transcrição do VACHT em torno de 50%, enquanto não foram detectados transcritos do VACHT em tecidos de camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup> (Figura 5). A especificidade do produto amplificado foi confirmada através da presença de banda no tamanho esperado em gel de acrilamida (Figura 5) e ausência da banda em camundongos mutantes. O nível de transcrição do VACHT entre os grupos foi comparado através do teste T não pareado.



**Figura 5: Quantificação da expressão de mRNA do VACHT por PCR em tempo real.** Amostras de RNA extraídas do cérebro de camundongos mutantes (barra cinza) e controles (barra branca) foram reversamente transcritas. Para a reação de qPCR foram utilizados iniciadores específicos para o gene do VACHT, que produziu um fragmento de tamanho esperado. O gráfico representa a média de 4 experimentos  $\pm$  erro padrão da média \* Estatisticamente significativo em relação ao WT,  $p < 0,005$ . Abaixo do gráfico é mostrado o

gel de acrilamida no qual foram resolvidos os produtos de amplificação para cada genótipo, acompanhado dos controles negativos. Não foi detectado produto de amplificação para o VACHT em amostras provenientes de camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>.

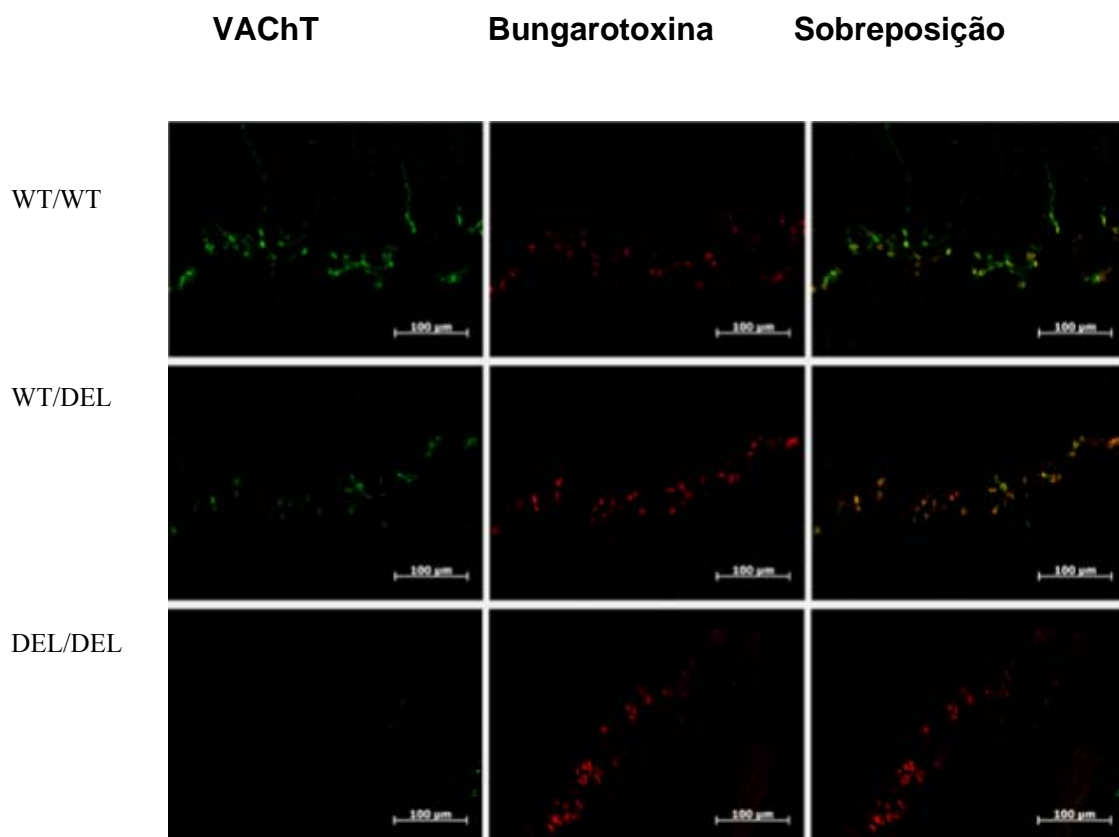
Para mensurar os níveis protéicos de VACHT na medula espinhal, utilizamos a técnica de Western blot. O anticorpo anti-VACHT reconheceu uma banda de aproximadamente 70 KDa, o que corresponde à massa molecular aparente esperada para o transportador (Figura 6A). A análise densitométrica revelou redução similar à encontrada nos níveis de RNAm transcritos para a expressão da proteína VACHT em camundongos heterozigotos, e conforme esperado não foi detectada a expressão do VACHT em camundongos nocaute (figura 6B). Em todas as análises, a imunorreatividade da tubulina foi utilizada para normalizar as quantidades de extrato aplicadas no gel.



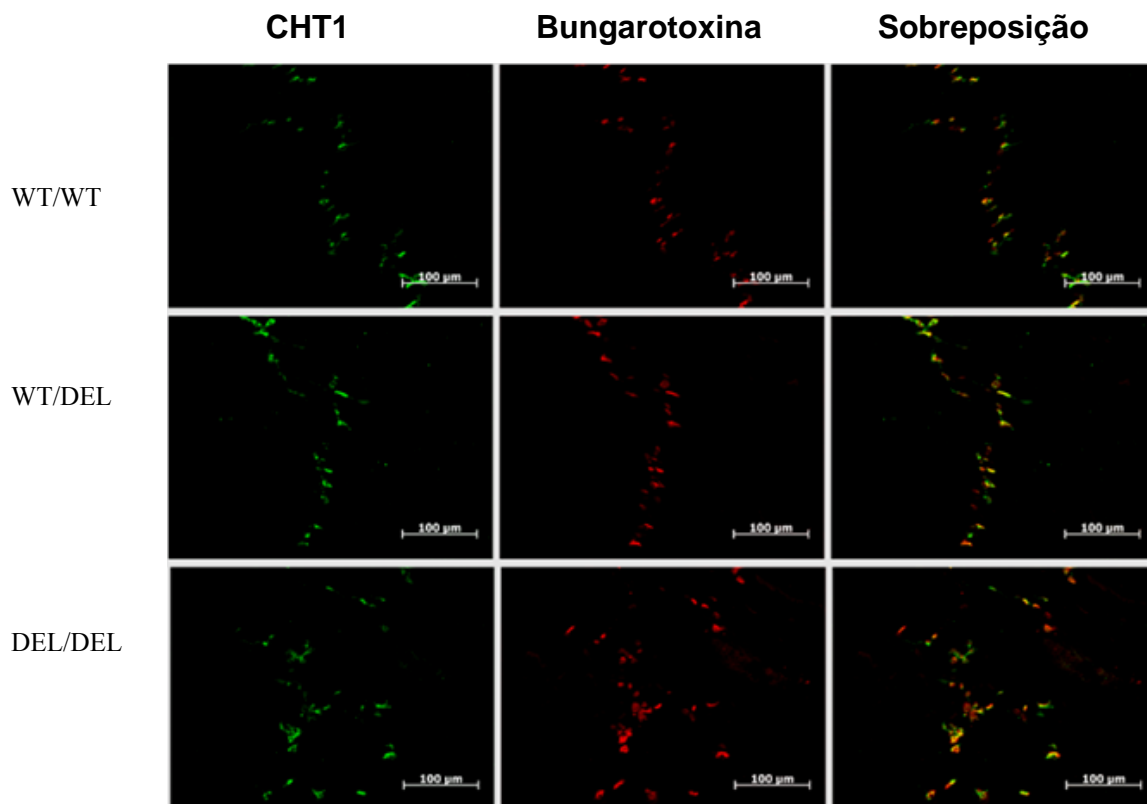
**Figura 6: Expressão do VACHT em camundongos nocaute.** A) **Imunorreatividade para VACHT, Sinaptofisina e Tubulina.** Análise por imunoblot da expressão de VACHT, Sinaptofisina e Tubulina na medula espinal de animais selvagens, VACHT<sup>WT/Del</sup> e VACHT<sup>DEL/DEL</sup>. Não foi observada imunorreatividade para o VACHT em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>. B) **Gráfico representativo mostrando a expressão do transportador nos genótipos analisados.** (\*\*\*) Estatisticamente significativo em relação ao grupo de animais selvagens, n=4 para cada genótipo (teste t, p< 0,05). A barra branca representa o grupo de animais selvagens, enquanto a barra cinza representa o grupo de camundongos heterozigotos.

Adicionalmente, foi realizada a imunofluorescência em junção neuromuscular de camundongos selvagens, VACHT<sup>WT/DEL</sup> e VACHT<sup>DEL/DEL</sup>. Fatias foram incubadas com o anticorpo anti-VACHT e como pode ser observado pela figura 7, houve uma marcante imunorreatividade em camundongos selvagens e

VACHT<sup>WT/DEL</sup>, mas nenhuma marcação em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>. A imunorreatividade do CHT1 foi facilmente detectada em todos os genótipos (Figura 8). Tais dados confirmam os resultados observados através do imunoblot e do qPCR.



**Figura 7: Imunofluorescência para o VACHT em JNM de camundongos VACHT nocaute.** VACHT foi detectado em camundongos selvagens e em camundongos heterozigotos, porém foi ausente em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>.

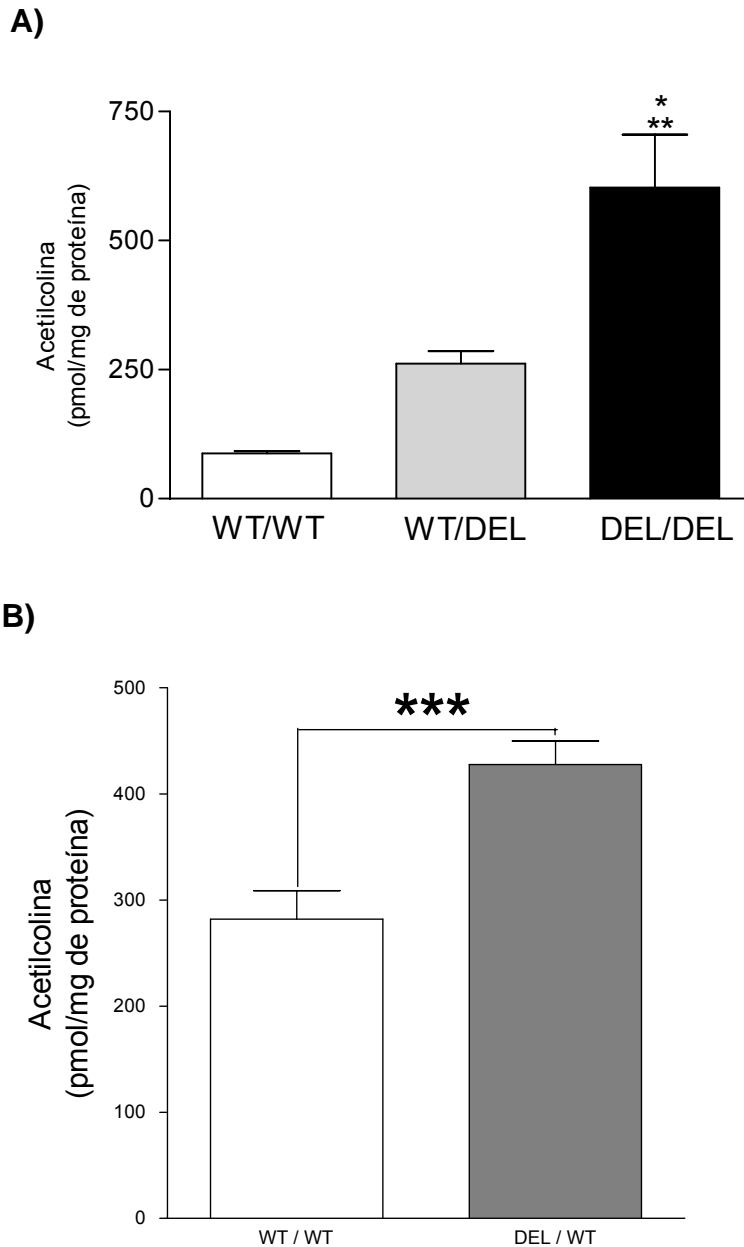


**Figura 8: Imunofluorescência para o CHT1 em JNM de camundongos VACHT Del.** O CHT1 foi detectado nos três genótipos, ao contrário do transportador vesicular de Acetilcolina.

#### 4.1.3- Status da neurotransmissão colinérgica em camundongos VACHT DEL

Para determinar as consequências da ausência de expressão do VACHT sobre a neurotransmissão colinérgica, nosso grupo de pesquisa realizou diferentes experimentos. Primeiramente, utilizamos preparações neuromusculares a partir do diafragma de embriões E18.5 para avaliar diferentes parâmetros eletrofisiológicos dependentes de ACh. Esses experimentos foram realizados por Ricardo de Freitas Lima, no laboratório de eletrofisiologia celular da UFMG (em Castro e cols., anexo II). Os resultados demonstraram não haver diferença com relação à amplitude de MEPPs quando preparações provenientes de camundongos selvagens e

VACHT<sup>WT/DEL</sup> são comparadas (Castro e cols., em anexo). Surpreendentemente, mesmo na ausência do transportador vesicular, em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>, foram detectados MEPPs de pequenas amplitudes e de baixa frequência (Castro e cols., anexo II). Por outro lado, em experimentos realizados com embriões E18.5, com a colaboração de Cristiane Alves Silva Menezes, foi demonstrado um aumento de cerca de 5 vezes no conteúdo de ACh no cérebro de embriões VACHT<sup>DEL/DEL</sup> quando comparados a animais selvagens (Figura 9A). Embriões de VACHT<sup>WT/DEL</sup> apresentaram valores de conteúdo de ACh intermediários entre selvagens e VACHT<sup>DEL/DEL</sup> (Figura 9A), embora a diferença em relação a camundongos selvagens não tenha sido significativa. A medida dos níveis de ACh em camundongos adultos, realizada por Xavier De Jaeger, confirmou o aumento observado em camundongos heterozigotos (Figura 9B).

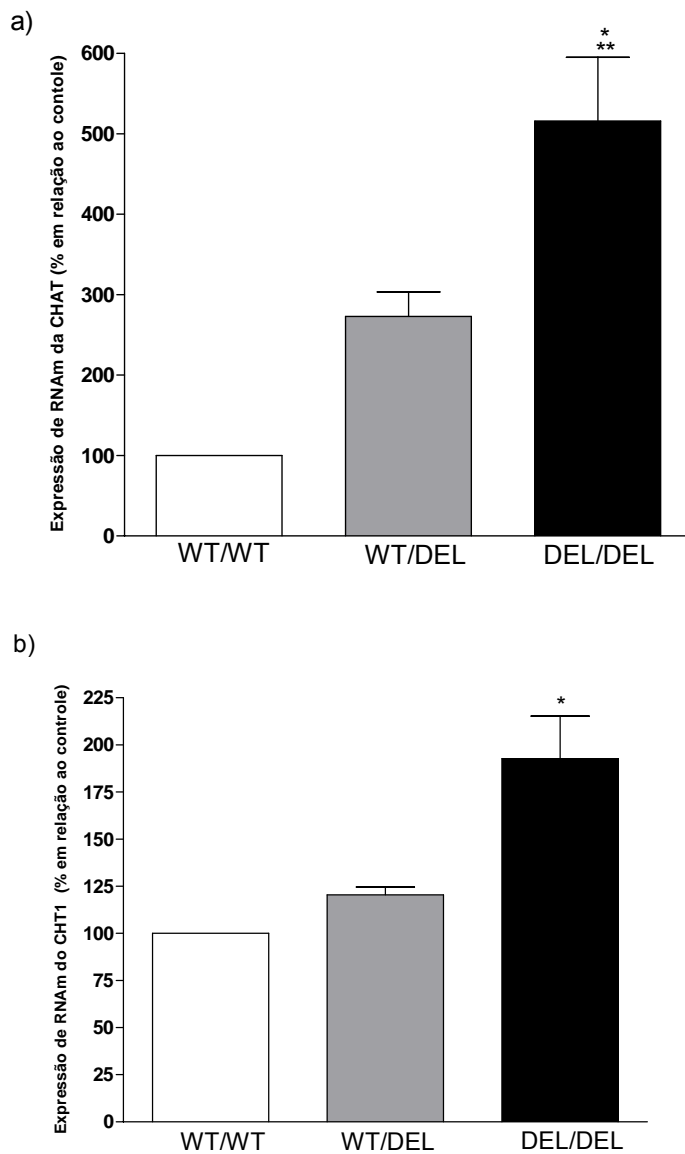


**Figura 9: Dosagem de Acetilcolina em camundongos VACHT nocaute.** A) Medida do conteúdo tecidual de acetilcolina no cérebro de embriões E18.5 selvagens (barra branca), VACHT<sup>WT/DEL</sup> (barra cinza) e VACHT<sup>DEL/DEL</sup> (Barra preta) respectivamente. O gráfico representa a média de 3-5 experimentos  $\pm$  erro padrão da média. \* indica diferença estatística



observada com o Anova de uma via seguido pelo teste post hoc de Bonferroni [F(2,10=12,72)]. **B)** Dosagem de acetilcolina no cérebro de animais adultos WT e VACHT<sup>WT/DEL</sup>. As barras representam a média de 4-6 experimentos  $\pm$  erro padrão da média. \*\*\* indica diferença estatística observada pelo Teste T,  $p < 0.001$ .

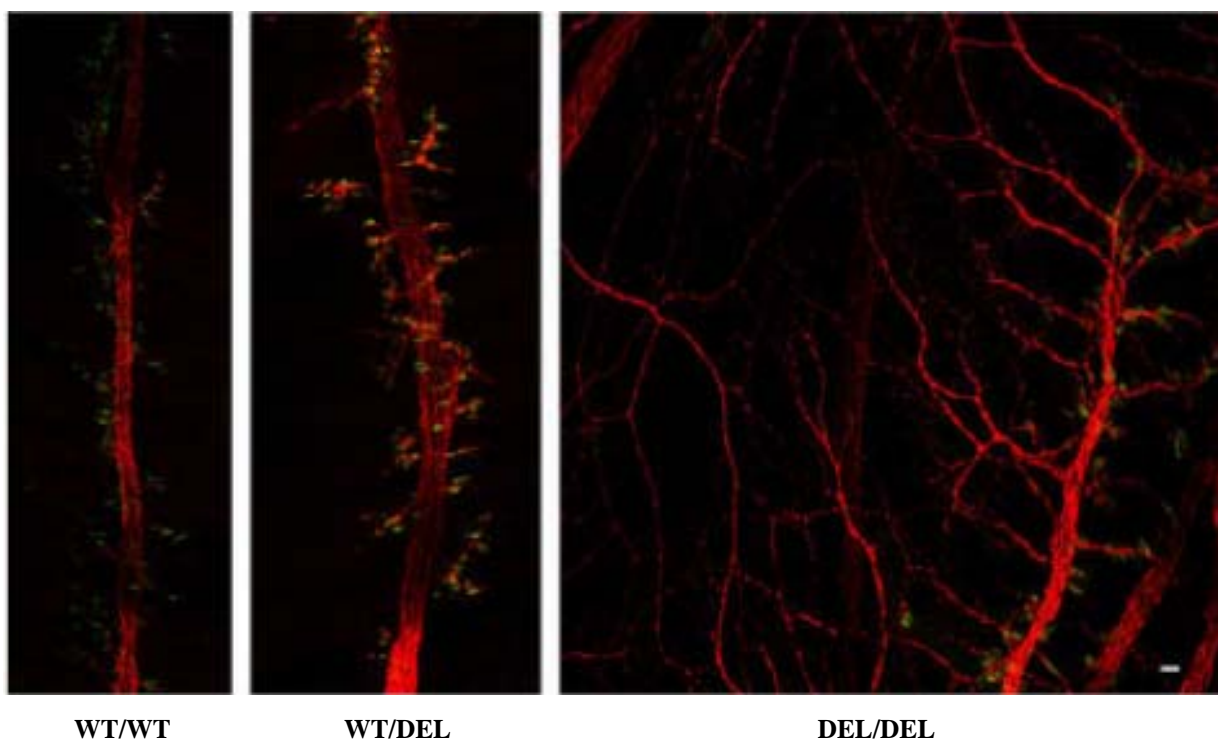
Mudanças nos níveis de expressão de proteínas diretamente relacionadas à síntese de ACh, como ChAT e CHT1, poderiam ser uma possível explicação para o aumento de conteúdo de ACh. Para verificar tal possibilidade, realizamos qPCR em cérebros provenientes de embriões E18.5. Encontramos um aumento de duas vezes nos níveis de RNAm da ChAT em embriões de VACHT<sup>WT/DEL</sup>, enquanto VACHT<sup>DEL/DEL</sup> tiveram os níveis de transcritos da ChAT aumentados em 4 vezes (Figura 10A). Já quando medimos os níveis de RNAm de CHT1, não observamos diferença entre selvagens e VACHT<sup>WT/DEL</sup>, entretanto foi observado um aumento de 2 vezes no nível de RNAm transcrito para o CHT1 em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup> quando comparados a selvagens (Figura 10B). Como as duas enzimas participam das vias envolvidas na síntese de ACh, o aumento observado nos níveis de transcrição dos dois genes pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento na quantidade de ACh tecidual.



**Figura 10: Quantificação da expressão de mRNA da ChAT e CHT1 dos camundongos por PCR em tempo real.** A) Amostras de RNA extraídas da região do cérebro de camundongos mutantes e controles foram reversamente transcritas. Para a reação de PCR foram utilizados iniciadores específicos para o gene do ChAT. O gráfico representa a média de 4 experimentos  $\pm$  erro padrão da média \* Estatisticamente significativo em relação ao WT,  $p < 0,005$ ,  $[F(2,9)=18,28]$ , após a realização do teste Anova de uma via B) Quantificação de RNAm do CHT1 por PCR em tempo real, \* indica estatisticamente significativo em relação ao controle,  $[F(2,11)=2,52]$ , com  $N=5$ , após a realização do teste Anova de uma via. A barra branca representa camundongos selvagens, a barra cinza os camundongos  $VChT^{WT/DEL}$  e a barra preta representa os camundongos  $VChT^{DEL/DEL}$

#### 4.1.4- Análise morfológica da junção neuromuscular

Animais que não possuem a ChAT apresentam alterações significativas no desenvolvimento da junção neuromuscular (Misgeld e cols., 2002). Para determinar as consequências da ausência do VAcHT sobre arborização neuronal e direcionamento axonal, realizamos imunofluorescência em diafragma de embriões E18.5. A marcação foi realizada com anticorpos específicos contra receptores nicotínicos ( $\alpha$ -bungarotoxina Alexa-Fluor 488) (Figura 11, verde) e com anticorpo anti-neurofilamento (Figura 11, vermelho). Os experimentos demonstraram não haver nenhuma diferença entre camundongos selvagens e camundongos VAcHT<sup>WT/DEL</sup> quanto à arborização ou direcionamento axonal. Entretanto, a morfologia da junção neuromuscular de camundongos VAcHT<sup>DEL/DEL</sup> foi bastante diversa daquela presente em camundongos selvagens. Camundongos VAcHT<sup>DEL/DEL</sup> apresentaram um aumento na arborização neuronal, com uma alteração evidente no direcionamento axonal, caracterizada por localização alterada de receptores nicotínicos (figura 11). Além disso, experimentos realizados por outros pesquisadores demonstraram um aumento na quantidade de neurônios motores e de terminais nervosos na JNM de camundongos VAcHT<sup>DEL/DEL</sup> (Castro e cols., anexo II). Os dados demonstram que a ausência de VAcHT, apesar de causar um aumento no conteúdo intracelular de ACh, resultou em alterações na junção neuromuscular tão severas quanto as geradas pela ausência da ChAT (Misgeld e cols., 2002).



**Figura 11: Alterações na morfologia da junção neuromuscular de camundongos VACHT Del detectadas por imunofluorescência em diafragma.** Hemidiafragmas foram incubados com anticorpos anti-neurofilamento (vermelho) e posteriormente com marcador de receptor nicotínico, a  $\alpha$ -bungarotoxina (verde). Observa-se aumento da arborização axonal na junção neuromuscular de camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>.

#### 4.2- Funções cognitivas em camundongos VACHT Knockdown

A geração e a caracterização de animais nocaute para o VACHT trouxeram informações relevantes para o estudo do sistema colinérgico, bem como sobre a participação da liberação de ACh mediada pelo VACHT sobre o desenvolvimento da junção neuromuscular. Entretanto, nosso interesse em determinar as consequências da redução da expressão do VACHT sobre funções cognitivas foi inviabilizada pela mortalidade precoce dos camundongos. Embora animais heterozigotos possam ser utilizados para estudos comportamentais, a disponibilidade de uma outra linhagem de camundongos que apresentam diminuição de expressão do VACHT, sem aumento concomitante da ChAT e CHT1, animais

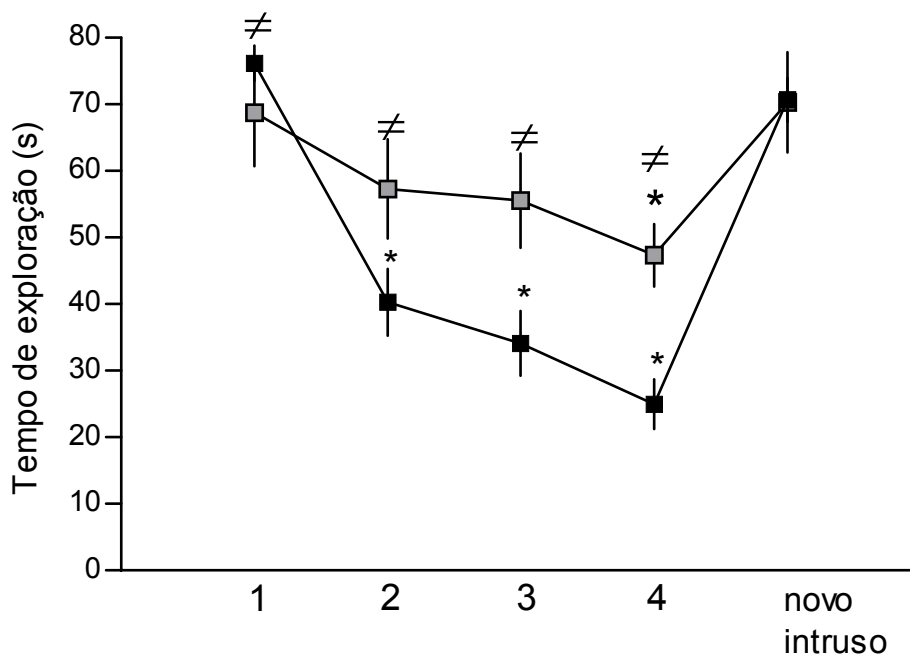
VAC<sub>h</sub>T KD, nos levou a estudar predominantemente tal linhagem. Camundongos VAC<sub>h</sub>T Knockdown foram gerados conforme descrito por Prado e colaboradores, anexo I. Foram utilizados camundongos selvagens, heterozigotos (VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup>) e homozigotos (VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup>). Animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> apresentaram uma redução na expressão do VAC<sub>h</sub>T de cerca de 45%, enquanto animais VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HOM</sup> tiveram uma redução próxima a 65%. A redução da expressão do VAC<sub>h</sub>T teve consequências diretas sobre a quantidade de ACh liberada no sistema nervoso central, conforme demonstrado pela técnica de microdiálise *in vivo* (Prado e cols., 2006, anexo I). Além disso, estudos eletrofisiológicos caracterizaram em detalhes as alterações na liberação de ACh devido à redução do VAC<sub>h</sub>T (Prado e cols., 2006, anexo I).

O sistema de neurotransmissão colinérgico apresenta ampla distribuição, sendo portanto capaz de influenciar a formação e evocação de diferentes tipos de memória. A formação de memórias sociais, o aprendizado não associativo e o aprendizado implícito são exemplos de capacidades cognitivas cuja participação do sistema colinérgico parece ser relevante. Entretanto, o uso de um modelo de hipofunção colinérgica geneticamente gerada pode trazer informações relevantes para o entendimento da participação da ACh na formação de memórias, bem como ajudar a entender como déficits colinérgicos em doenças neurológicas, como Doença de Alzheimer e Doença de Huntington contribuem para alterações cognitivas.

#### **4.2.1- Memória social**

A capacidade de reconhecer indivíduos familiares da mesma espécie é a base das interações sociais (Winslow e Insel, 2004). Há evidências sugerindo a participação de receptores colinérgicos na capacidade de reconhecimento social (Prediger e cols., 2006, Van Kampen e cols., 2004), enquanto foi sugerido em um modelo murino de Doença de Alzheimer que o seu comprometimento estaria relacionado à disfunção colinérgica (Ohno e cols., 2004). Camundongos VAC<sub>h</sub>T KD<sup>HET</sup> apresentam redução na expressão do VAC<sub>h</sub>T para níveis de cerca de 45% do apresentado pelos camundongos selvagens, com similar redução nos níveis extra-

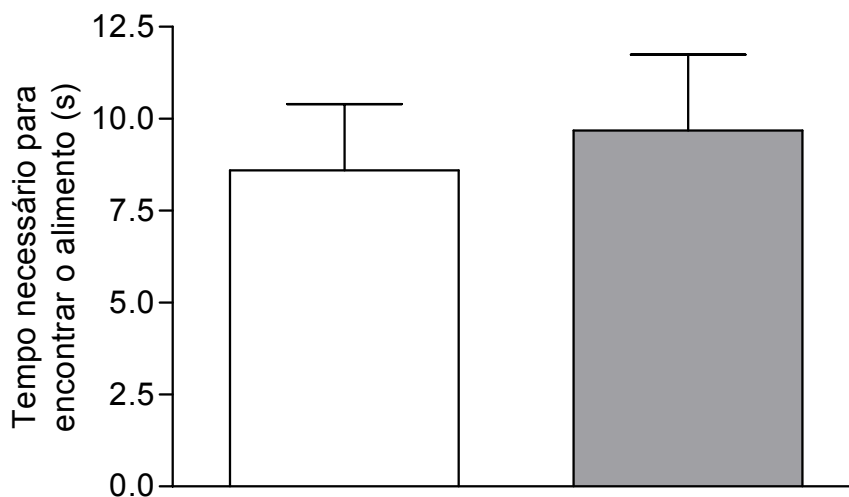
celulares de ACh no sistema nervoso central, medidos através da técnica de microdiálise *in vivo* (Prado e cols., 2006, anexo I). Por outro lado, esses animais não apresentam fraqueza muscular, enquanto os animais homozigotos são miastênicos (ver Prado e cols., 2006, anexo I). Em função disso, resolvemos estudar em maior profundidade animais heterozigotos, embora em vários experimentos os animais homozigotos também tenham sido utilizados. Portanto, nós testamos as consequências da redução do tônus colinérgico sobre a memória de reconhecimento social. Para tanto, utilizamos inicialmente um protocolo de habituação-desabituação (Choleris e cols., 2003). Os camundongos selvagens exploraram intensivamente o camundongo juvenil durante o primeiro contato. Com as apresentações subsequentes, o tempo de exploração foi diminuindo, indicando que os animais selvagens habituaram ao camundongo intruso [ $F(4,11)=60.93$ ,  $p < 0.01$ , Anova de uma via com teste pos-hoc de Bonferroni] (Figura 12). Depois de quatro apresentações, o camundongo juvenil foi substituído por outro. Quando foi apresentado o novo animal, o nível de interesse dos animais selvagens pelo camundongo intruso foi renovado, com o tempo de exploração retornando a valores próximos ao da primeira apresentação (Figura 12). Tal resultado demonstra que a redução progressiva na exploração, durante as apresentações ao camundongo juvenil, não foi devido à falta de motivação ou exaustão física. Os camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram um padrão de habituação totalmente diverso daquele dos animais selvagens (Figura 12). A exploração dos animais VACHT KD<sup>HET</sup> durante o primeiro contato foi significativamente menor que a dos camundongos selvagens ( $p < 0,05$ , Anova de duas vias com teste pos-hoc de Bonferroni). Em todos os quatro pontos de apresentação ao primeiro intruso, a atividade exploratória dos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> foi diferente daquela apresentada pelos animais selvagens ( $p < 0,001$ , Anova de duas vias com teste pos-hoc de Bonferroni). O tempo de exploração sobre o intruso pelos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> só se tornou diferente do tempo da primeira apresentação durante a quarta introdução do intruso na gaiola do camundongo adulto [ $F(4,10)= 5.293$ ]. A introdução de um novo camundongo juvenil foi capaz de elevar a exploração, indicando que a redução observada durante a quarta apresentação não foi devida à falta de motivação ou exaustão física (Figura 12).



**Figura 12: Memória social de camundongos selvagens (em preto) e KD<sup>HET</sup> (cinza) avaliada através de um protocolo de habituação-desabituação a um camundongo juvenil.** São apresentados 4 períodos sucessivos de exploração olfatória ao mesmo camundongo, com intervalos de 15 minutos. Após o quarto período, é apresentado um novo camundongo. \* indica diferença dentro do mesmo genótipo, em relação ao primeiro trial,  $p < 0.05$ , enquanto # diferencia entre selvagens e heterozigotos,  $p < 0.05$ .  $N = 10$  para selvagens e  $N = 12$  para camundongos heterozigotos.

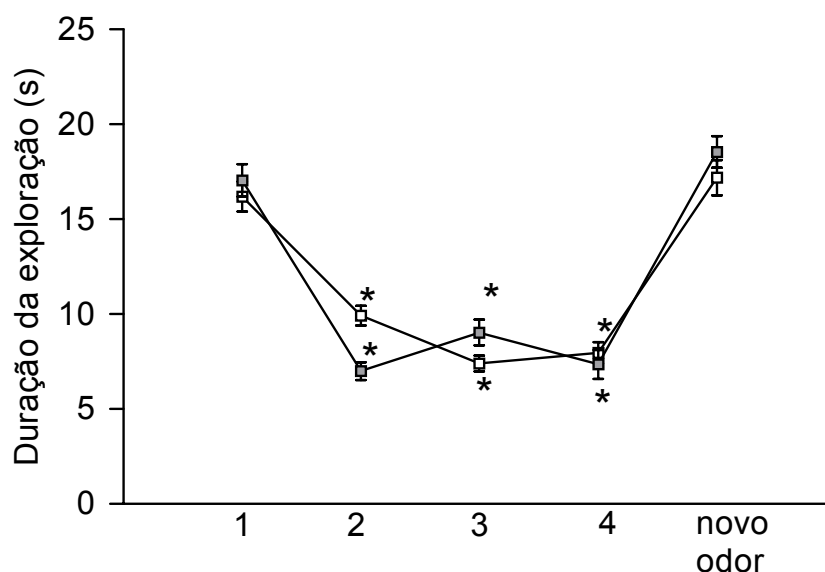
Um comprometimento na capacidade olfatória poderia justificar o prejuízo na capacidade de habituação apresentado pelos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>, para testar esta hipótese, nós utilizamos um protocolo onde mediu-se o tempo gasto pelos animais, sob jejum, para encontrar um alimento escondido na maravalha de suas gaiolas. O teste demonstrou que ambos animais foram capazes de encontrar o alimento com tempos similares, indicando não haver comprometimento da função olfatória em camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> (figura 13). Além de tal teste, utilizamos um protocolo de habituação-desabituação a odores artificiais (Ferguson e cols., 2000). Os animais foram apresentados 4 vezes a um mesmo odor, com intervalos de 5 minutos entre as apresentações. Observamos uma redução progressiva na

exploração em ambos genótipos (selvagem,  $F(4,6)= 11,35$  e VACHT  $KD^{HET}$ ,  $F(4,6)= 18,11$ ,  $p < 0,05$ , por Anova de medidas repetidas com teste pos-hoc de Bonferroni), sem qualquer diferença portanto (figura 14). A capacidade de discriminar entre dois odores foi determinada pela apresentação a uma nova essência após a quarta apresentação. Nos dois grupos, a introdução de um novo odor, diferente daquele que gerou habituação, foi capaz de elevar o tempo de exploração a valores similares aos da primeira apresentação. Assim, tanto camundongos selvagens quanto camundongos VACHT  $KD^{HET}$  foram capazes de habituar a um estímulo olfatório de origem não-social e de discriminar entre dois odores diferentes.



**Figura 13: Capacidade olfatória de camundongos medida através do tempo necessário para encontrar um pedaço de alimento sob a maravalha.** Camundongos selvagens (branco) e  $KD^{HET}$  (cinza) gastaram em média 8 segundos para encontrar o alimento escondido sob a maravalha.  $N=8$  para ambos genótipos.

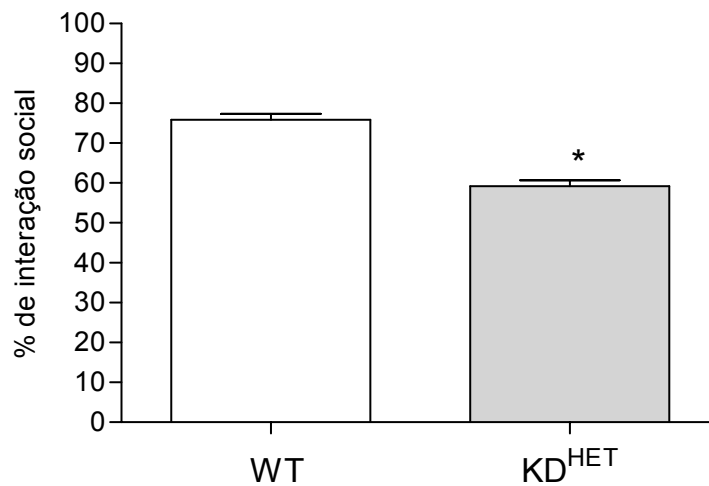




**Figura 14: Habituação olfatória a um estímulo não social.** Camundongos foram apresentados por 4 vezes seguidas a uma essência de morango, por 1 minuto, com intervalo entre as apresentações de 10 minutos. Em uma quinta apresentação, foi utilizada uma essência diferente (de baunilha). Não foi observada diferença entre selvagens (branco) e heterozigotos (cinza). \* indica diferença em relação à primeira apresentação dentro de um mesmo genótipo. N=8 para ambos genótipos.

Outra possível explicação para o déficit no reconhecimento social observado em camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> seria a de que esses animais apresentam um comportamento social mais exarcebado em relação aos camundongos selvagens. Seria uma característica contrária à apresentada por camundongos modelo de autismo (Jamain S. E cols., 2008). Para testar tal possibilidade, nós avaliamos a escolha de um camundongo adulto entre um estímulo social (um camundongo adulto em um cilindro de acrílico que permitia somente exploração olfatória) e um estímulo não social (apenas o cilíndrico de acrílico, que nunca havia sido apresentado ao camundongo). Para a realização do experimento, foi confeccionada uma caixa de 3 compartimentos: um compartimento central, e 2 compartimentos laterais, um deles contendo o estímulo social e o outro o estímulo não-social (Kwon e cols., 2006). Ambos genótipos demonstraram preferência pelo estímulo social, entretanto os camundongos selvagens apresentaram maior sociabilidade que os camundongos

VACHT KD<sup>HET</sup> (Figura 15) ( $p < 0.05$ , teste T de student). O tempo de exploração gasto pelo camundongo em cada tipo de estímulo foi computado. Os camundongos selvagens despenderam cerca de 75% do tempo de exploração total com estímulo social, enquanto os camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> gastaram aproximadamente 60% do tempo com o estímulo social (Figura 15). Portanto, não se pôde afirmar que o motivo do déficit de habituação social dos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> foi devido a uma excessiva sociabilidade desses animais, na verdade eles foram menos sociáveis que os selvagens.

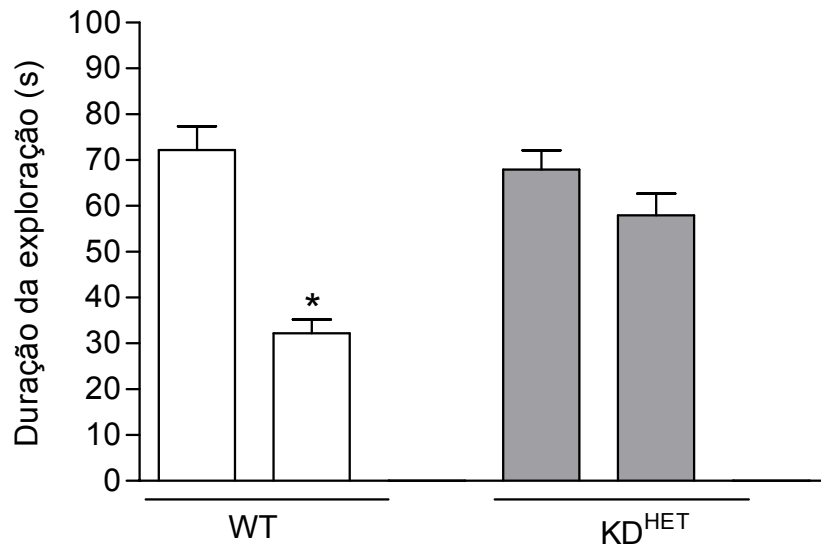


**Figura 15: Preferência por estímulo social em camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>.** No gráfico, é mostrada a porcentagem de tempo passado explorando o estímulo social, sendo o valor apresentado por camundongos selvagens significativamente maior que aquele apresentado por camundongos heterozigotos ( $p > 0.05$ ). N=8 para ambos genótipos.

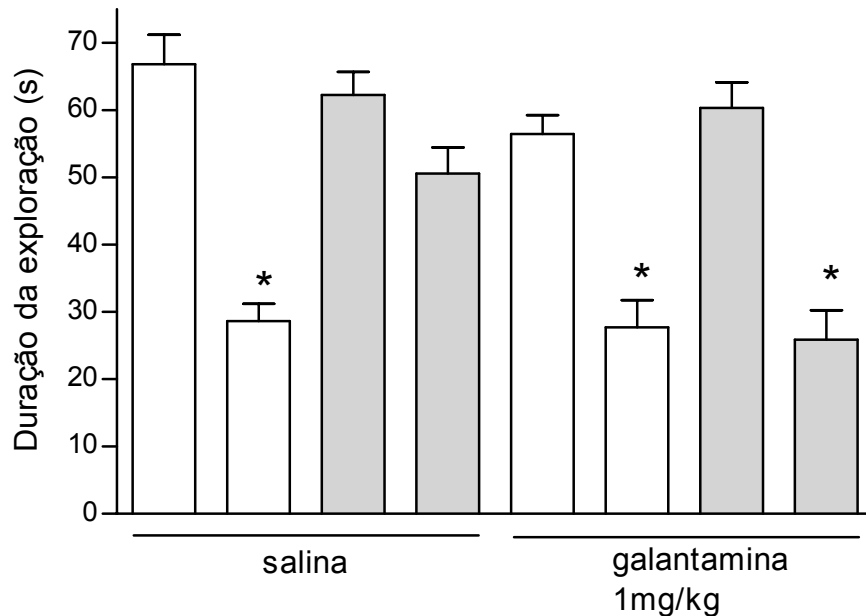
Demonstramos que camundongos selvagens são capazes de reter a memória social por 30 minutos (Figura 16), já que expostos por 5 minutos a um camundongo intruso e apresentados novamente ao mesmo animal após um intervalo de 30 minutos tiveram a atividade exploratória inicial significativamente reduzida ( $F(5,70)=17,21$ ,  $p < 0.001$ ). Entretanto, camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> não reduziram sua atividade exploratória quando apresentados novamente ao mesmo camundongo juvenil (figura 16). Os resultados sugerem portanto que os camundongos VACHT

KD<sup>HET</sup> apresentam um déficit na memória social, demonstrado por dois protocolos diferentes.

Alterações fisiológicas em camundongos nocaute podem ocorrer devido a alterações ocorridas durante o desenvolvimento ou pela ausência da função desencadeada pela proteína. Portanto, uma pergunta que fizemos foi se o déficit na memória social foi devido a alterações ocorridas durante o desenvolvimento ou à redução da liberação de ACh. Se o motivo do déficit foi a redução na liberação de ACh, o aumento agudo de seus níveis sinápticos deveria ser capaz de reverter momentaneamente o fenótipo observado. Para respondermos a tal pergunta, utilizamos Galantamina, um inibidor da enzima AChE utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer. A administração de Galantamina (s.c., 1mg/Kg), 30 minutos antes da primeira apresentação ao camundongo intruso, foi capaz de restaurar temporariamente a capacidade de reconhecimento social dos camundongos VAcHT KD<sup>HET</sup> (figura 17). A administração de salina em vez de galantamina, não teve nenhum efeito sobre a capacidade de reconhecimento social, seja de camundongos selvagens ou VAcHT KD<sup>HET</sup> (Figura 17). Portanto, a redução do tônus colinérgico parece ser a responsável pelo prejuízo na memória social observado em camundongos VAcHT KD<sup>HET</sup>.

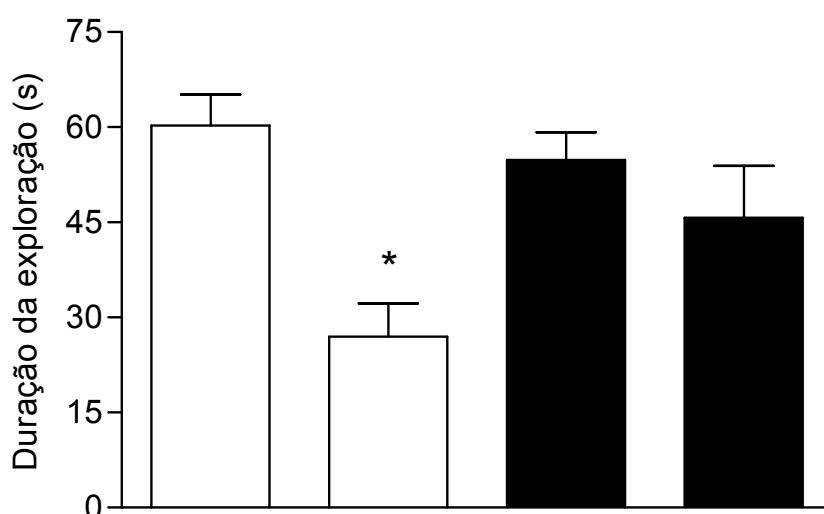


**Figura 16: Memória social de camundongos WT (barras brancas, n=14) e KD<sup>HET</sup> (barras cinzas, n=14).** Os camundongos foram apresentados a um animal juvenil por 5 minutos, e após intervalo de 30 minutos reapresentados ao mesmo juvenil. Os dados representam a média +- erro padrão do tempo de exploração dos camundongos adultos sobre os juvenis. \* representa diferença em relação à primeira apresentação para o mesmo genótipo, p< 0.05



**Figura 17: Tratamento com Galantamina reverte o déficit de memória social apresentado por camundongos KD<sup>HET</sup>.** Camundongos adultos selvagens e KD<sup>HET</sup> foram tratados com salina ou galantamina, 30 minutos antes da primeira exposição ao camundongo juvenil. \* representa diferença em relação à primeira apresentação para o mesmo genótipo, p< 0.05 N=9 para camundongos selvagens e N=8 para camundongos KD<sup>HET</sup>

Nós também observamos o déficit de reconhecimento social em camundongos VACHT  $KD^{HOM}$  (figura 18), demonstrando que o mesmo fenótipo foi observado em camundongos com diferentes níveis de redução da expressão do VACHT. Embora para alguns testes de comportamento a miastenia desses animais seja um problema, a tarefa de memória social não demanda grande atividade física.



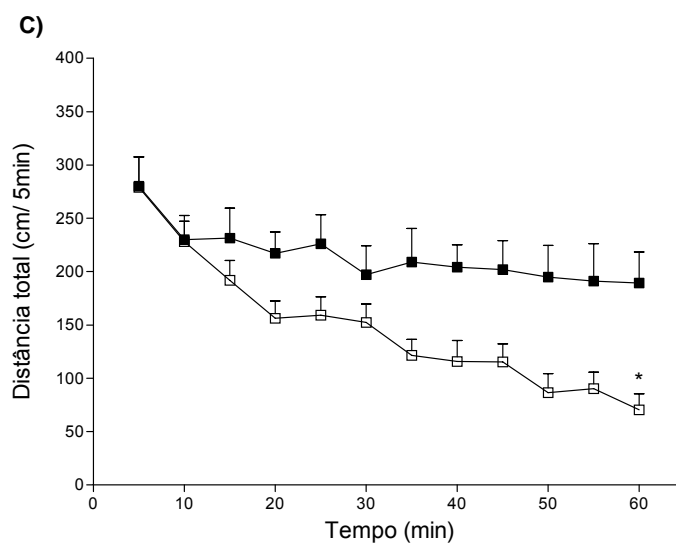
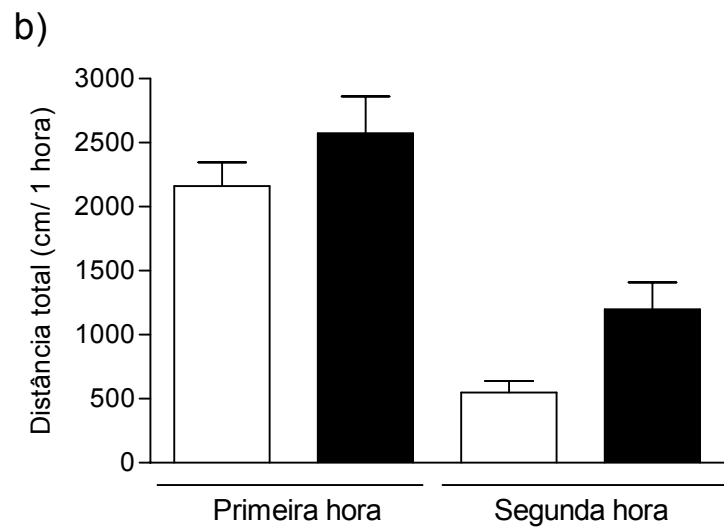
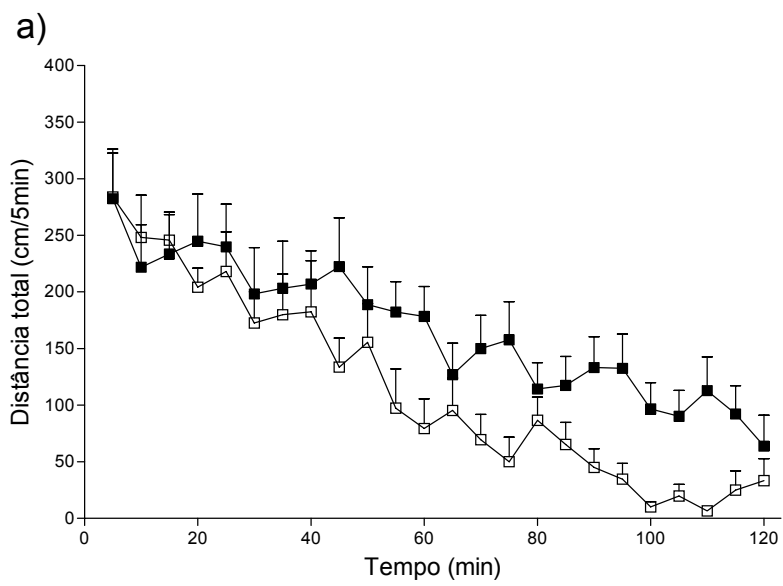
**Figura 18: Camundongos  $KD^{HOM}$  apresentam déficit de memória social similar aos camundongos  $KD^{HET}$ .** Os camundongos foram apresentados a um animal juvenil por 5 minutos, e após intervalo de 30 minutos reapresentados ao mesmo juvenil. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão do tempo de exploração dos camundongos adultos sobre os juvenis. \* representa diferença em relação à primeira apresentação para o mesmo genótipo,  $p < 0.05$ .  $N = 7$  para selvagens (barra branca) e homocigotos (barra preta).

#### 4.2.2 –Habituação ao campo aberto (aprendizado não-associativo)

Diversas evidências sugerem o envolvimento da ACh na habituação ao campo aberto, seja através da administração de drogas ou através da medida direta dos níveis extra-celulares de ACh durante a habituação (Lamprea e cols., 2003, Thiel e cols., 1998). Camundongos VACHT Knockdown apresentam redução na

liberação de ACh “in vivo” (Prado e cols., 2006, anexo I), representando um modelo único de hipofunção colinérgica gerada geneticamente.

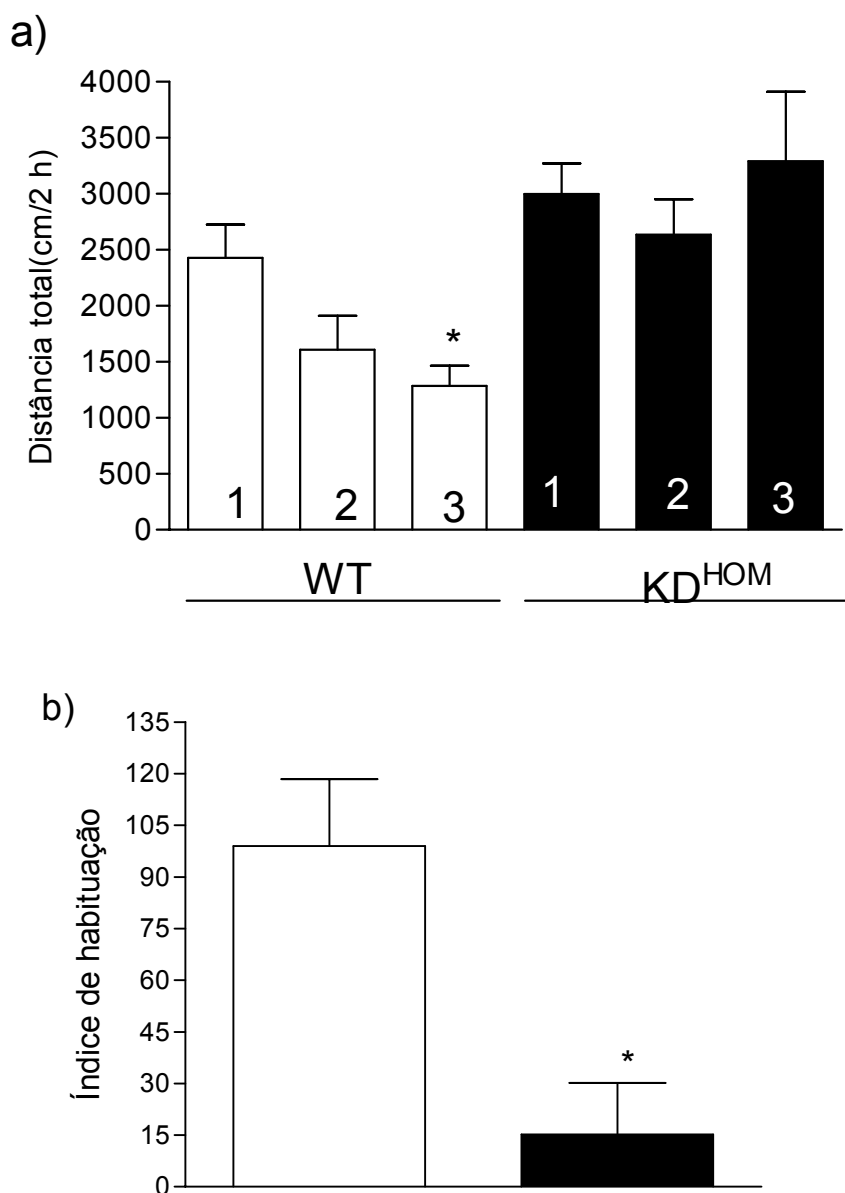
Experimentos iniciais demonstraram que animais heterozigotos não apresentaram alteração na exploração, sugerindo que talvez o deficit colinérgico não afete essa tarefa. Por outro lado, como temos a disponibilidade de usar animais com alterações ainda maiores na liberação de acetilcolina, para avaliar as consequências da redução da liberação de ACh na habituação ao campo aberto, expomos animais selvagens e VACHT KD<sup>HOM</sup> por duas horas ao novo ambiente. Nós observamos uma redução na atividade locomotora com o decorrer do tempo entre os dois grupos, entretanto, apesar de partirem de um mesmo nível de atividade inicial, camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> percorreram uma distância maior que os animais selvagens (Figura 19A) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do Teste pos Hoc de Bonferroni ( $F_{(1, 30)} = 4.431$ ,  $p < 0.05$ ), principalmente quando observa-se a segunda hora de exposição ao campo aberto (Figura 19B). Quando ambos genótipos foram reexpostos ao campo aberto, observou-se que os animais VACHT KD<sup>HOM</sup> mantinham o padrão de atividade locomotora superior aos animais selvagens (Figura 19C). O teste de Anova de duas vias com medidas repetidas demonstrou um efeito significativo do genótipo ( $F_{(1, 45)} = 9.047$ ,  $p < 0.01$ ), do tempo ( $F_{(11, 45)} = 17.991$ ,  $p < 0.001$ ) e interação entre tempo e genótipo ( $F_{(11, 45)} = 3.238$ ,  $p < 0.001$ ). Os camundongos mutantes mantiveram o mesmo nível de atividade locomotora durante os 60 minutos de exposição (o teste post-hoc não mostrou nenhuma diferença entre a atividade aos 10 minutos com a atividade locomotora aos 60 minutos), enquanto os camundongos selvagens apresentaram redução significativa na atividade ( $p < 0.001$  entre 10 e 60 minutos). Tais dados demonstram que os camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentam uma redução na habituação intra-sessão quando comparados aos animais selvagens. Não observamos qualquer diferença quanto à habituação intra-sessão entre camundongos selvagens e heterozigotos. É importante salientar que mesmo com a miastenia descrita para os animais homozigotos (Prado e cols., 2006, Anexo I), eles foram capazes de explorar o ambiente de maneira ainda mais pronunciada que animais selvagens, indicando que essa resposta seja devido ao déficit colinérgico no sistema nervoso central.



**Figura 19: Camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentam redução na habituação intra-sessão ao campo aberto quando comparados aos camundongos selvagens.** A) Camundongos selvagens (n= 10, quadrados brancos) e camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=11, quadrados pretos) foram expostos ao campo aberto pela primeira vez durante 2 horas. Camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentam maior distância total percorrida que selvagens (ANOVA de duas vias com medidas repetidas ( $F_{(1, 30)} = 4.431$ ,  $p < 0.05$ ). B) Quando a distância percorrida pelos grupos é analisada separando-se a primeira e a segunda hora de exploração, observa-se maior atividade, na segunda hora, dos camundongos knockdown homozigotos (barra preta) em relação aos selvagens (barra branca). C) Em animais já expostos ao campo aberto, a atividade locomotora de animais VACHT KD<sup>HOM</sup> continuou superior àquela apresentada pelos animais selvagens. \* indica diferença entre a atividade aos 60 minutos e 10 minutos para o mesmo genótipo ( $p < 0.001$ )

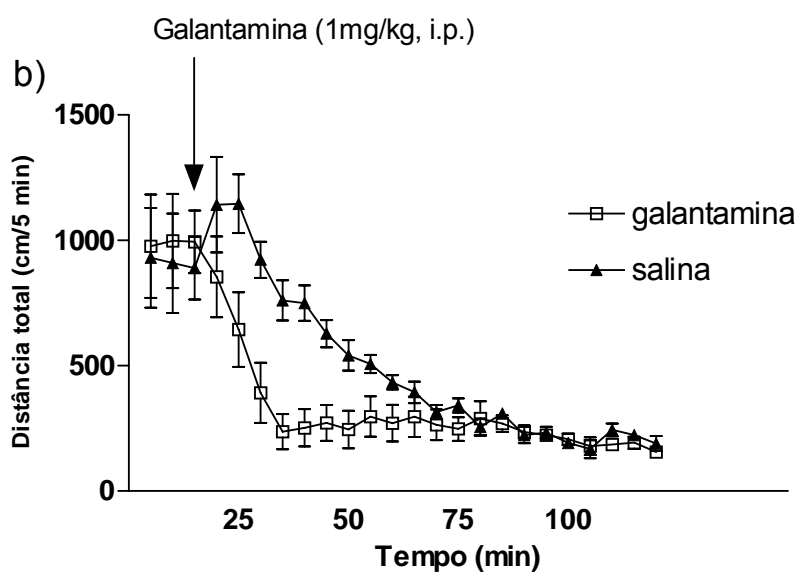
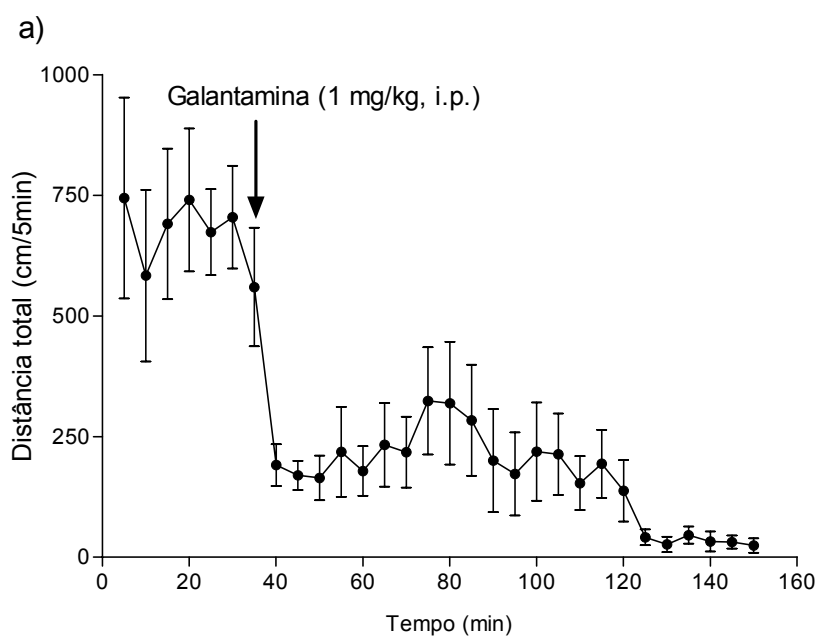
Para determinar se o déficit também se estendia à habituação entre sessões, utilizamos um protocolo que consistiu de três apresentações ao campo aberto separadas por 24 horas. Os camundongos selvagens apresentaram uma redução na atividade locomotora quando comparadas as distâncias totais percorridas em cada dia, entretanto os camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> não apresentaram tal redução. O ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou um efeito significativo do genótipo ( $F_{(1, 36)} = 7.677$ ,  $p < 0.05$ ) e uma interação entre genótipo e dia ( $F_{(2, 36)} = 2.474$ ,  $p < 0.05$ ). O teste post-hoc de Bonferroni demonstrou uma diferença entre selvagens e VACHT KD<sup>HOM</sup> no terceiro dia da exposição ao campo aberto ( $p < 0.001$ ) e uma diferença significativa entre o primeiro e o terceiro dia para os selvagens, mas não para os mutantes (Figura 20a). O cálculo do índice de habituação, através da divisão da atividade locomotora no terceiro dia pela atividade no primeiro dia, demonstrou claramente a diferença de habituação entre os genótipos ( $t_{(18)} = 3.464$ ,  $p = 0.01$ ) (Figura 20b).





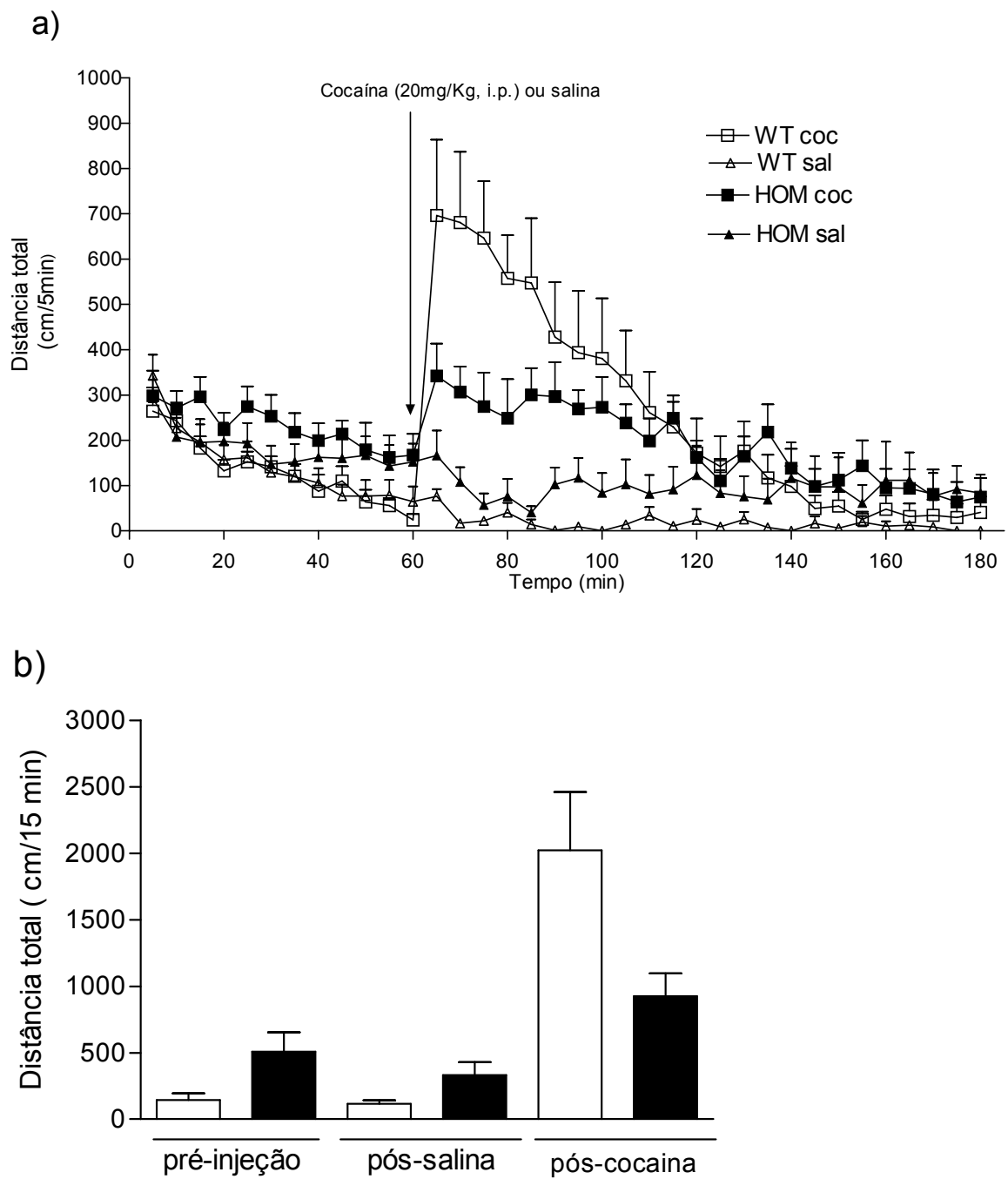
**Figura 20: Camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> não apresentam habituação ente sessões ao campo aberto.** A) A atividade total por cada dia de exposição ao campo aberto é mostrada para selvagens (n=9) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=11). Camundongos selvagens apresentaram redução na atividade locomotora entre as sessões, separadas por 24 horas, enquanto camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> mantêm o mesmo padrão de atividade durante os três dias. \* indica diferença, dentro do mesmo genótipo, entre a distância total percorrida entre o primeiro e terceiro dia. B) O índice de habituação foi calculado dividindo-se a distância percorrida no terceiro dia pela distância percorrida no primeiro dia. \* indica diferença estatisticamente significativa entre os genótipos ( Teste T de student,  $p < 0.001$ )

O balanço entre os sistemas de neurotransmissão colinérgico e dopaminérgico parece ser determinante no controle da atividade locomotora e habituação ao campo aberto (Calabresi P. E cols., 2006, Drenan, R. M. cols., 2008). O nocauteamento completo e a redução da expressão do DAT (transportador de dopamina) em camundongos levaram a fenótipos caracterizados por hiperatividade e dificuldade de habituação ao campo aberto (Giros e cols., 1996; Spielwoy C. E cols., 2000, Zhuang X. E cols., 2001). Em experimento realizado pelo professor Marco Prado, foi demonstrado que a galantamina, uma droga capaz de elevar agudamente o tônus colinérgico, foi capaz de abolir o quadro de hiperatividade locomotora em camundongos nocaute para o DAT (Figura 21A). Portanto, um fenótipo causado por um quadro hiperdopaminérgico crônico foi temporariamente revertido pela elevação do tônus colinérgico. A cocaína é uma droga de abuso capaz de induzir hiperatividade locomotora ao inibir a recaptção de dopamina pelo DAT (E. J., Nestler, 1997). Nós demonstramos que a administração de galantamina foi capaz de reduzir a hiperatividade locomotora agudamente induzida pela cocaína. Após a injeção de galantamina, camundongos selvagens tiveram sua atividade locomotora diminuída mais rapidamente que os animais que receberam salina (Figura 21B).



**Figura 21: Galantamina reduz a hiperatividade locomotora de camundongos com elevação crônica ou aguda do tônus dopaminérgico. A)** Camundongos DAT nocaute (n=8) exploraram livremente o campo aberto por 40 minutos e então receberam Galantamina, inibidor da AchE. **B)** Camundongos receberam cocaína e foram introduzidos no campo aberto, e após quinze minutos receberam galantamina ou salina. N=8 para ambos genótipos

Para determinar qual o efeito da elevação aguda do tônus dopaminérgico sobre o fenótipo hiperativo apresentado pelos camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup>, nós realizamos a administração aguda de cocaína em animais expostos ao campo aberto. Após uma hora de livre locomoção no campo aberto, camundongos selvagens e VAcHT KD<sup>HOM</sup> receberam cocaína, 20 mg/kg, i.p., ou salina. Surpreendentemente, observamos que os camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup> foram menos sensíveis ao efeito psicoestimulante da cocaína do que os animais selvagens (Figura 22). Entretanto, limitações na capacidade física podem ter sido responsáveis pela aparente insensibilidade. Camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup> apresentam fraqueza muscular (Prado e cols., 2006, anexo I) e disfunção cardíaca de origem autonômica (Lara e cols., submetido), esse último um fenótipo descoberto apenas recentemente e que tem grande possibilidade de restringir a capacidade física dos animais homocigotos. Apesar de tais alterações não terem impedido a hiperatividade desses animais, a demanda de capacidade física após a administração de cocaína é intensa (a atividade dos animais selvagens foi aumentada cerca de 10 vezes), e possivelmente os camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup> foram incapazes de suportá-la. Impossibilitados de testar a relação entre função hiperdopaminérgica e o sistema colinérgico nos experimentos de atividade locomotora, resolvemos testar se outras respostas à cocaína poderiam estar alteradas em animais VAcHT KD<sup>HOM</sup>. Portanto, para determinar se a redução da liberação de ACh foi capaz de alterar a resposta à cocaína, passamos a utilizar um protocolo independente de tal viés.

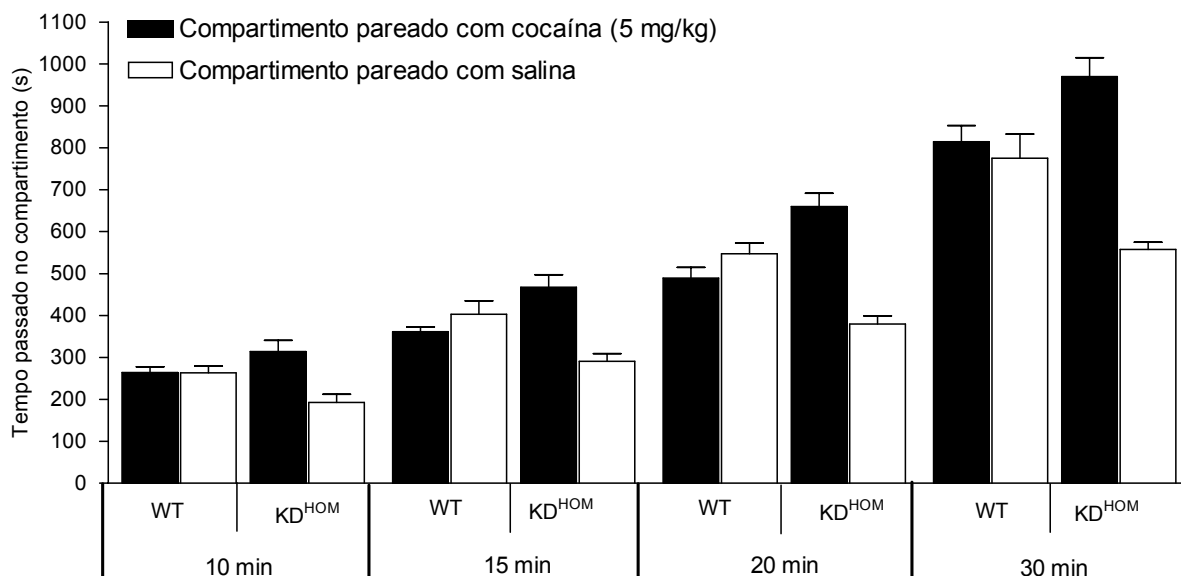


**Figura 22: Atividade locomotora induzida por cocaína:** a) Camundongos selvagens e camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> receberam cocaína (20 mg/Kg, i.p.) ou salina, após permanecerem por 60 minutos no campo aberto. b) No gráfico de barras, é mostrada a atividade locomotora acumulada durante 15 minutos anteriores e posteriores à administração de salina ou cocaína. Selvagens (barra branca) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (barra preta)

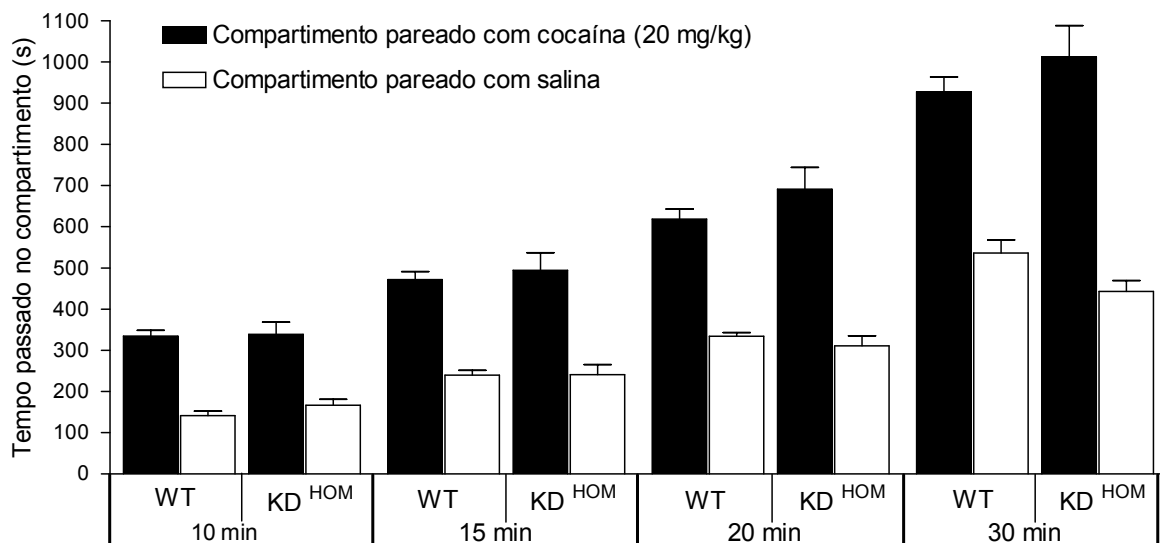
Para tanto, passamos a avaliar um outro fenômeno induzido pela elevação dos níveis de dopamina por cocaína: a adição. O protocolo de preferência condicionada por lugar (CPP) é capaz de determinar alterações no comportamento aditivo frente a uma droga de abuso. Portanto, com esse protocolo podemos avaliar se a redução do tônus colinérgico foi capaz de alterar o desenvolvimento de dependência à cocaína.

Camundongos que não demonstraram preferência por nenhum dos lados do aparato, na fase de pré – condicionamento, foram condicionados por 6 dias. Após o condicionamento, os animais puderam livremente permanecer em qualquer dos três compartimentos, por 30 minutos. Ambos os genótipos exploraram similarmente o ambiente, (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1, 11)} = 0.658$ ,  $p = 0.4350$ ), com uma interação significativa entre compartimento e genótipo ( $F_{(1, 11)} = 14.717$ ,  $p < 0.01$ ). A dose de 5 mg/ kg de cocaína foi incapaz de induzir uma preferência pelo compartimento associado à injeção de cocaína em animais selvagens, entretanto os camundongos VChT KD<sup>HOM</sup> passaram mais tempo no compartimento associado à administração de cocaína do que naquele associado à administração de salina (Figura 23A) (Post hoc,  $p < 0.05$ ). Já a dose de 20 mg/kg foi capaz de gerar condicionamento em ambos grupos, não sendo observado nenhum efeito do genótipo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas;  $F_{(1, 11)} = 0.0163$ ,  $p = 0.900$ ) (Figura 23B). Tais dados demonstram uma maior sensibilidade aos efeitos aditivos da cocaína em camundongos com redução do tônus colinérgico. Esses resultados demonstram que enquanto o aumento do tônus colinérgico diminui a resposta à cocaína, a diminuição do tônus colinérgico parece favorecer a sensibilidade aos efeitos da cocaína.

a)



b)



**Figura 23: Condicionamento por lugar induzido por cocaína em camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HOM</sup>.** A) Camundongos foram condicionados com cocaína na dose de 5 mg/kg e o condicionamento avaliado por determinar o tempo dispendido em cada compartimento. Camundongos selvagens (n=7) não apresentaram CPP para tal dose, entretanto o fenômeno foi observado no grupo de camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=7). B) Com a dose de 20 mg/kg, a fase de condicionamento foi capaz de induzir a preferência pelo compartimento relacionado à administração de cocaína em ambos genótipos. (n=7 para selvagens e para VACHT KD<sup>HOM</sup>).

### 4.2.3- Aprendizado motor

Para determinarmos as consequências da redução do tônus colinérgico no curso e na retenção do aprendizado de tarefas motoras, utilizamos um protocolo capaz de permitir que os animais atinjam o máximo de eficiência na execução da tarefa. Camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> foram incapazes de permanecer por mais que 30 segundos no rotarod, provavelmente devido à fraqueza muscular apresentada por esses animais (Prado e cols., 2006. Anexo I). Portanto, através de um protocolo que consistiu de 8 dias seguidos de treinamento mais um dia de teste (10 dias após o último dia de treinamento), treinamos e testamos camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>.

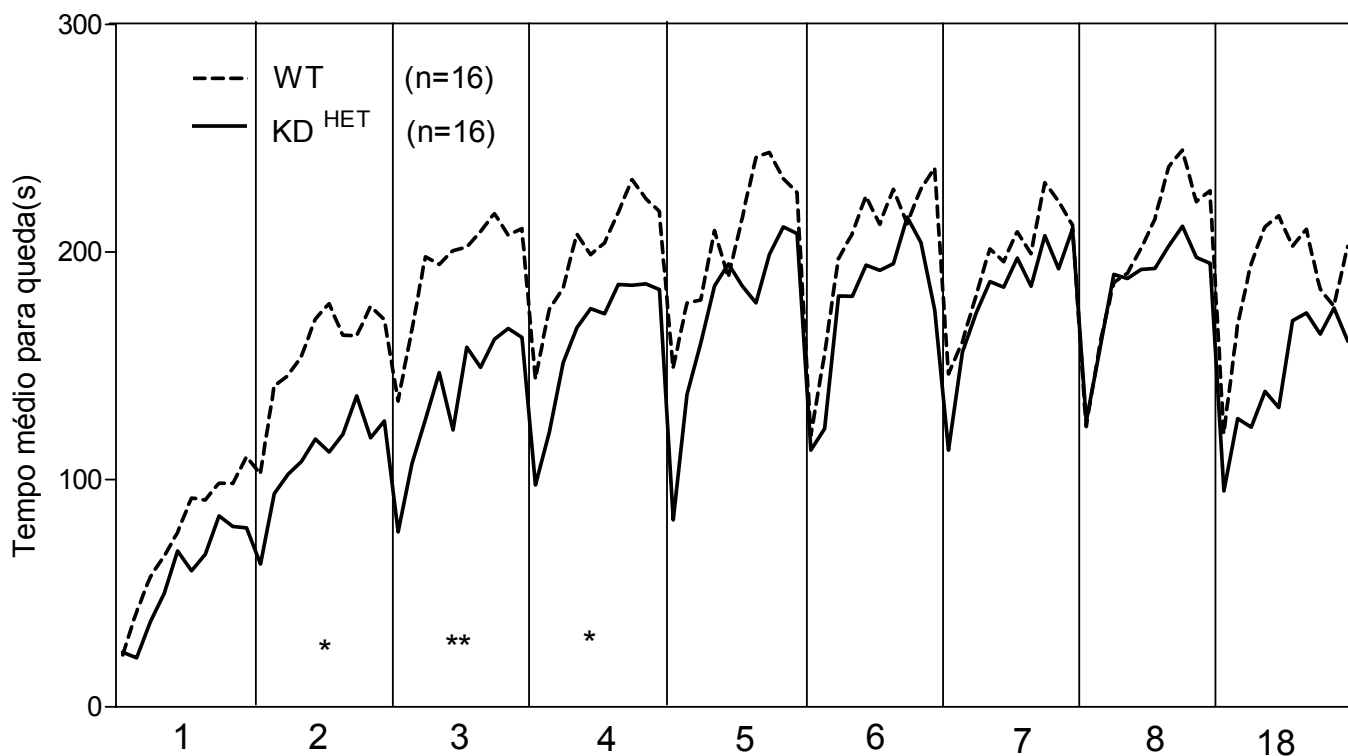
A análise do aprendizado pode ser feita dentro de uma sessão ou entre elas. Camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup> tiveram melhora em sua performance, observada dentro de uma sessão de treinamento, bem como entre sessões sucessivas (Figura 24). Entretanto, pôde ser observado que o aprendizado entre as sessões dos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> foi mais lento que o apresentado pelos animais selvagens. A performance dos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> foi inferior nos dias 2, 3 e 4, demonstrado pela detecção de um efeito do genótipo com o Anova de duas vias em tais dias [ $F(1,270) = 5.109; 8.049; 4.735$ ] (figura 24 A e B). Somente a partir do quinto dia, a performance de ambos genótipos tornou-se similar, sugerindo portanto que camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> apresentam um curso de aprendizado mais lento, apesar de capazes de aprender a tarefa.



a)

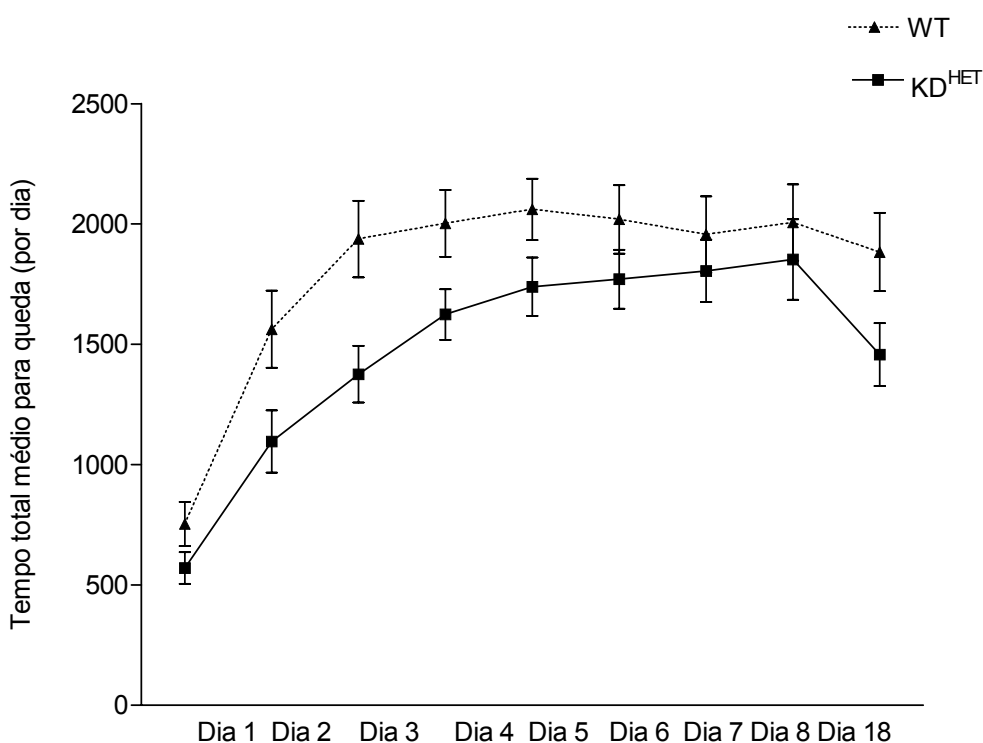
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 18
$F_{(1,270)}$	3.84	10.37	0.0081	7.43	4.91	2.82	1.04	0.95	8.59
P	0.1143	< 0.05	< 0.01	<0.05	0.0783	0.1946	0.4646	0.5107	0.0524

b)



**Figura 24: Aprendizagem motor no cilindro giratório (rotarod) de camundongos selvagens e VChT KD<sup>HET</sup>.** A) Camundongos foram treinados no rotarod durante 8 dias seguidos e após um intervalo de 10 dias testados. A análise estatística demonstrou performance inferior dos camundongos VChT KD<sup>HET</sup> nos dias 2, 3 e 4. B) Em cada dia de treinamento, os animais foram sujeitos a 10 tentativas. No gráfico foram plotados os tempo médios de queda em cada tentativa. \* significa diferença significativa entre os genótipos, com n=16 para ambos genótipos.

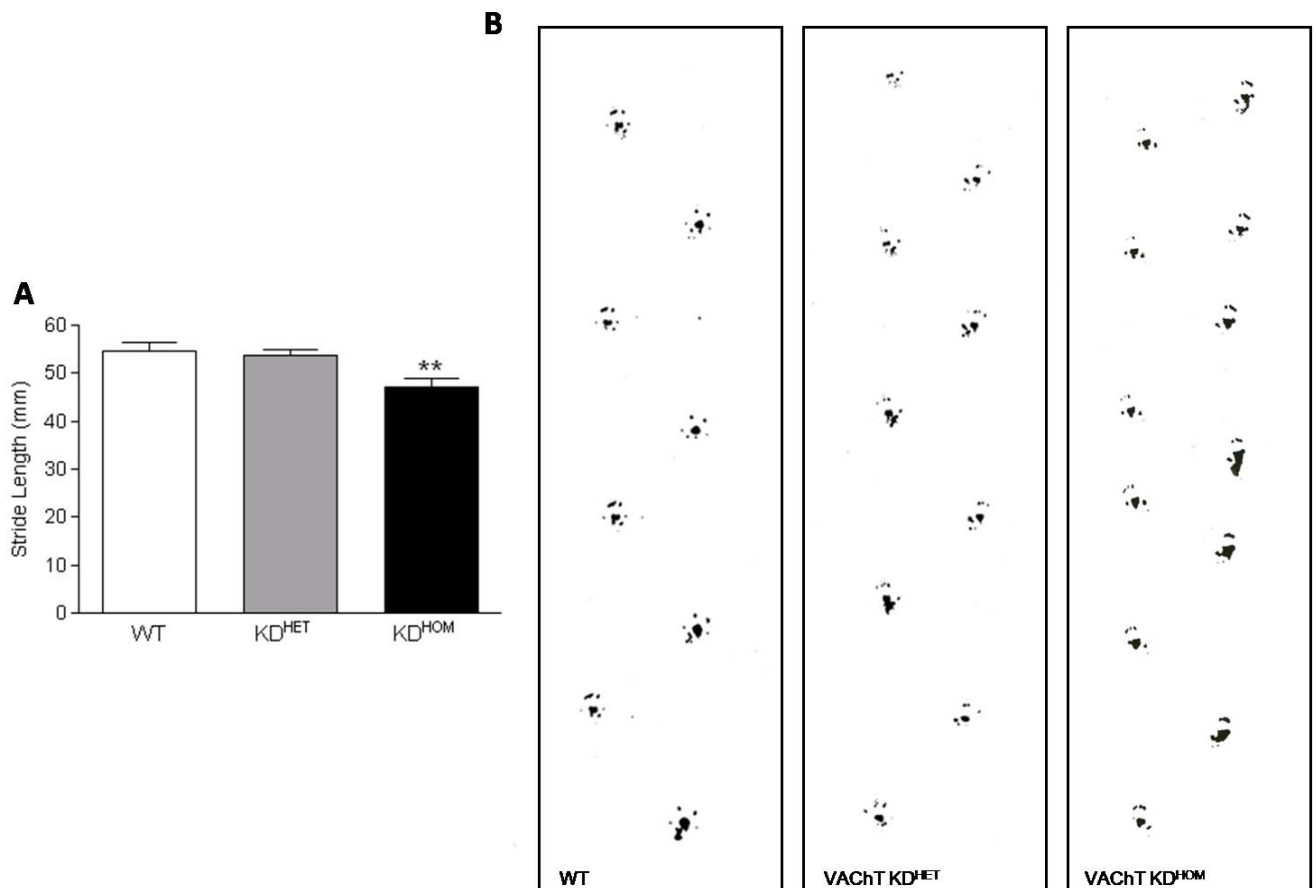
Em conjunto com essa observação, fizemos uma análise da performance através da média do tempo passado por cada animal no rotarod por dia de treinamento (sendo cada dia constituído da soma dos dez tentativas). Através desta análise, podemos observar que os camundongos selvagens já atingem sua performance máxima no terceiro dia de treinamento (Figura 25), enquanto que os camundongos VACHT  $KD^{HET}$  só atingiram o platô de suas performances no quarto dia de treinamento (Figura 25).



**Figura 25: Camundongos VACHT  $KD^{HET}$  aprendem mais lentamente a tarefa do cilindro giratório que camundongos selvagens.** A análise através do tempo médio de permanência por dia no rotarod demonstrou que camundongos selvagens atingem o platô de suas performances no terceiro dia de treinamento, enquanto camundongos VACHT  $KD^{HET}$  o fazem no quarto dia de treinamento. N=16 para ambos genótipos.

Para avaliar se alterações no padrão de passadas poderiam ser responsáveis pelo aprendizado mais lento apresentado pelos camundongos VACHT  $KD^{HET}$  em relação aos camundongos selvagens, nós realizamos o teste de *foot print*.

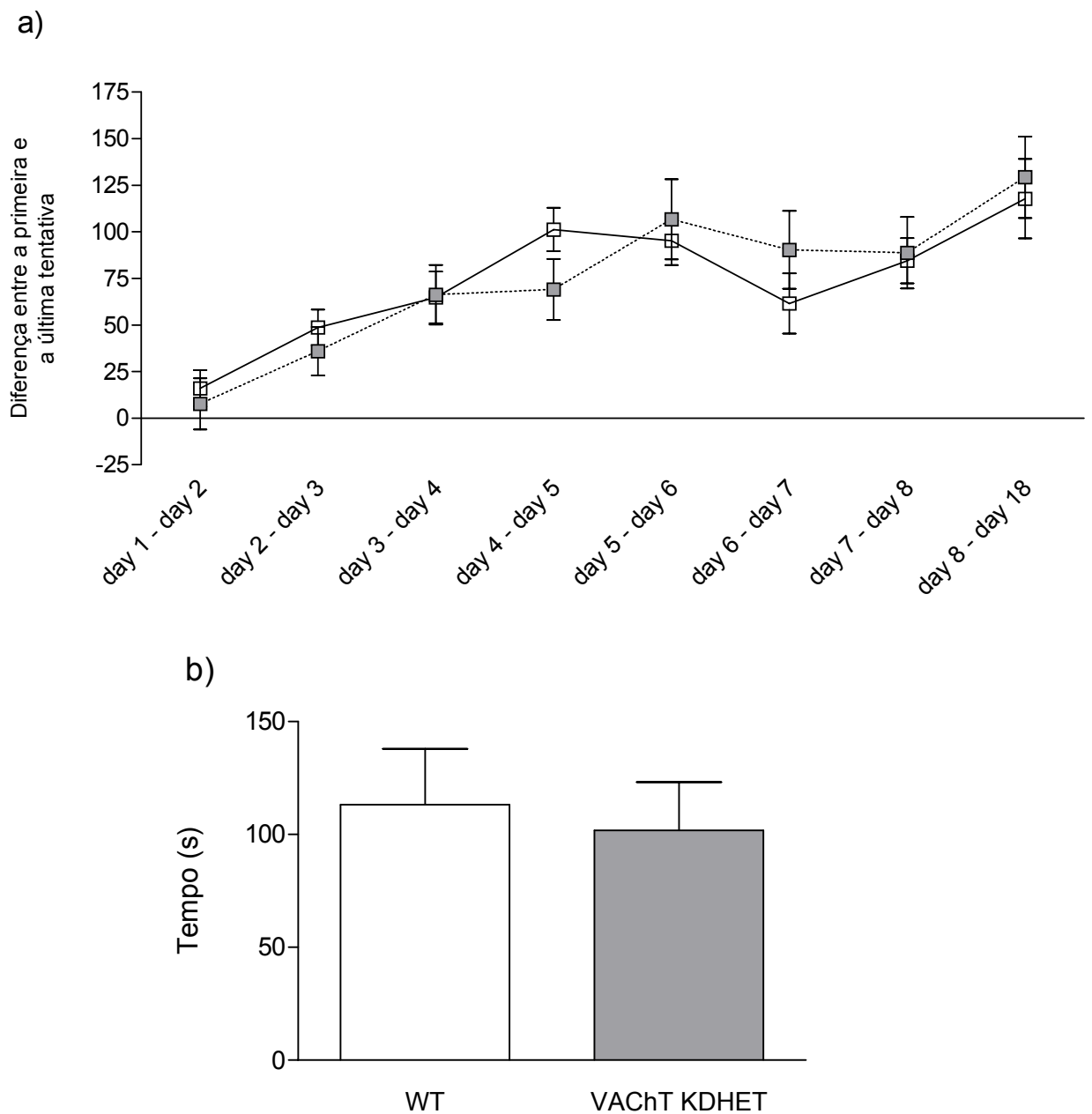
Camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup> apresentaram padrão de passadas similares (Figura 26), com valores de largura das passadas por volta de 50 mm. Entretanto, camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> apresentaram uma menor valor médio de passadas quando comparados a camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>.



**Figura 26: Padrão de passadas de camundongos selvagens e VACHT KD.** Através da técnica de *foot print* avaliamos a largura da passada de camundongos selvagens (n=12), VACHT KD<sup>HET</sup> (n=13) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (n=8). Não foi observada diferença entre camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>, mas entre selvagens e VACHT KD<sup>HOM</sup> a diferença foi significativa (Anova de uma via, teste pos hoc de Bonferroni, P< 0.001).

Visto que ambos genótipos são capazes de aprender a tarefa, embora VACHT KD<sup>HET</sup> o faça de forma mais lenta, fomos avaliar se a redução da expressão do VACHT foi capaz de alterar a capacidade de retenção do aprendizado. Para tanto, mensuramos a capacidade de consolidação entre os dias de aprendizado e a

capacidade de evocar o que foi aprendido dez dias após o último dia de treinamento. Para o primeiro parâmetro, comparamos a performance entre a última tentativa de cada dia com a primeira tentativa do dia seguinte (Figura 27A). Ambos animais foram capazes de consolidar o aprendizado entre os dias de treinamento, não havendo diferença significativa entre os genótipos. Para avaliarmos a capacidade de retenção a longo prazo, nós comparamos a performance dos animais na última tentativa do oitavo dia de treinamento com a performance da primeira tentativa dez dias após o fim do treinamento (18° dia) (Figura 27B). Não encontramos diferença entre os genótipos (Teste T de student,  $p=0.6999$ ), sugerindo que ambos são capazes de reter o aprendizado da tarefa. Portanto, os dados sugerem que camundongos VChT KD<sup>HET</sup> são capazes de evocar normalmente uma tarefa motora aprendida, embora o aprendizado da tarefa seja mais lento.



**Figura 27: Consolidação do aprendizado no rotarod entre as sessões.** A) A consolidação do aprendizado é demonstrada através da diferença de performance entre a última tentativa de cada dia e a primeira tentativa do dia seguinte. Não houve diferença na consolidação entre os genótipos. Não foi detectada diferença entre selvagens (quadrado branco) e heterozigotos (quadrado cinza). B) A retenção do aprendizado dez dias após o fim do treino foi medida pela diferença entre a performance na última tentativa do oitavo dia e a performance da primeira tentativa do décimo-oitavo dia. A análise estatística ( $p=0.6999$ ) mostrou não haver diferença na retenção entre selvagens (barra branca) e camundongos VACht KD<sup>HET</sup> (barra cinza).



### **O VACHT é fundamental para a liberação fisiológica de acetilcolina**

A primeira molécula identificada como um neurotransmissor foi a acetilcolina. Atualmente suas vias de síntese e degradação são bem caracterizadas. Sua síntese ocorre a partir dos precursores colina e acetil-CoA, em uma reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase, enquanto que a rápida degradação na fenda sináptica é realizada pela enzima acetilcolinesterase. Dois produtos são gerados a partir da quebra da ACh, acetato e colina. O último é recaptado para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de colina de alta afinidade e utilizado para a síntese de novas moléculas de ACh. Um passo intermediário entre a síntese e liberação de ACh é seu armazenamento no interior de vesículas sinápticas. O transportador vesicular de acetilcolina é o responsável por levar moléculas de ACh presentes no citoplasma para o interior das vesículas, utilizando para tanto um gradiente eletroquímico gerado por uma próton-ATPase de membrana (Ribeiro FM e cols., 2006).

Diferentes estudos relacionam variações na atividade de transportadores vesiculares a alterações na resposta sináptica, com consequências sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais. O nocauteamento do transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) - expresso em neurônios serotoninérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos e histaminérgicos- aboliu a liberação exocítica de monoaminas e reduziu drasticamente o conteúdo cerebral de monoaminas, com consequências sobre funções fisiológicas e na resposta a psicoestimulantes (Fon e cols., 1997; Wang e cols., 1997). Por outro lado, a super-expressão do VMAT2 em cultura celular causou um aumento no tamanho quantal (Pothos e cols., 2000). Já a captação de glutamato é mediada por três transportadores vesiculares diferentes (VGLUT1 a VGLUT3). O nocauteamento do VGLUT2 em camundongos demonstrou que em neurônios talâmicos, onde tal isoforma é predominante, o conteúdo vesicular de glutamato é extremamente sensível a variações nos níveis de tal transportador (Moechars D e cols., 2006). Já a super-expressão do transportador em drosófilas foi capaz de aumentar o tamanho quantal (Daniels RW e cols., 2004). Também foi

observado um aumento no tamanho quantal com a super-expressão do VACHT em neurônios de *Xenopus* em cultura (Song e cols., 1997) .

Nosso grupo de pesquisa gerou, através de técnicas de recombinação homóloga, camundongos com diferentes níveis de redução na expressão do transportador vesicular de acetilcolina. Visto que a expressão do transportador parece ser capaz de regular a quantidade de ACh presente em vesículas sinápticas, tais animais representam modelos únicos para o estudo do impacto da hipofunção colinérgica sobre funções fisiológicas, além de permitirem a compreensão do papel do VACHT no sistema nervoso central e periférico.

A primeira estratégia utilizada foi a de gerar camundongos nocaute para o VACHT. Observamos que camundongos selvagens, heterozigotos e homozigotos nascem em uma proporção mendeliana, entretanto camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup> morrem, em média, 5 minutos após o nascimento. A morte precoce de filhotes já havia sido observada em camundongos nocaute para outras proteínas envolvidas na manutenção da neurotransmissão colinérgica. Os camundongos nocaute para a ChAT morrem logo após o nascimento, com os mesmos sinais de incapacidade em manter a função respiratória observada em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup> (Misgeld e cols., 2002; Brandon e cols., 2002 e 2003). Da mesma forma, animais nocaute para o CHT1 também morrem logo após o nascimento (Ferguson e cols., 2003). Demonstramos por qPCR em tempo real, por imunoblot e imuno-histoquímica a ausência da expressão do VACHT em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>, enquanto que aproximadamente metade da proteína foi expressa em camundongos VACHT<sup>WT/DEL</sup>. A necessidade da expressão de um transportador vesicular de acetilcolina funcional para a sobrevivência também foi observada em outros organismos, como *Drosophila* (Kitamoto e cols., 2000) e *C. elegans* (Alfonso e cols., 1993).

A deleção do VACHT teve consequências sobre a transcrição de ChAT e CHT1, proteínas necessárias para a manutenção da transmissão colinérgica. Foi observado um aumento de cerca de cinco vezes nos níveis de RNAm da ChAT em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>, com valores intermediários entre os encontrados para selvagens e homozigotos em camundongos VACHT<sup>WT/DEL</sup>. A mudança observada pode estar relacionada a mecanismos compensatórios, ou mesmo devido à manipulação genética feita para remover o gene do VACHT. Com a remoção do gene, que localiza-se no primeiro íntron do gene da ChAT, houve uma aproximação



entre as regiões promotoras dos dois genes, o que pode ter sido responsável pelo aumento na transcrição. Além do aumento na transcrição da ChAT, observamos um aumento em transcritos do CHT1 em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>, com nenhuma diferença entre selvagens e VACHT<sup>WT/DEL</sup>. O aumento da expressão do CHT1 foi também observada em camundongos nocaute para a ChAT (Brandon e cols., 2004) e pode representar um mecanismo de adaptação frente à reduzida liberação de ACh. Tanto o aumento na expressão da ChAT quanto do CHT1 pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento próximo a cinco vezes na quantidade de ACh encontrada no cérebro de embriões VACHT<sup>DEL/DEL</sup>.

Experimentos de eletrofisiologia realizados por Ricardo Freitas, a partir da JNM de embriões E 18.5, demonstraram a existência de MEPPs de pequena amplitude em camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup>, com nenhuma diferença observada quanto a tal parâmetro entre camundongos selvagens e VACHT<sup>WT/DEL</sup>. Foi um resultado surpreendente, visto que demonstra a ocorrência de liberação quantal de ACh na ausência de VACHT (Castro e cols., anexo II). Os mecanismos responsáveis pelo fato podem envolver o aumento (cerca de 5 vezes) que encontramos no conteúdo intra-celular de ACh e na expressão de CHT1 e ChAT.

Apesar do aumento na quantidade de ACh tecidual e da liberação de ACh na ausência de VACHT, o desenvolvimento da Junção neuromuscular de camundongos foi completamente alterado (Para mais detalhes, ver Castro e cols., anexo II). Experimentos realizados no laboratório do professor R. W. Oppenheim demonstraram um aumento no número de neurônios motores, fato consistente com o já observado em camundongos nocaute para a ChAT (Misgeld e cols., 2002) e tratados com antagonistas de receptores nicotínicos musculares (Oppenheim e cols., 2000; Oppenheim e cols., 2008). Nós ainda observamos um aumento no brotamento axonal e alteração na localização de receptores nicotínicos na junção neuromuscular de camundongos VACHT<sup>KD<sup>HOM</sup></sup>, alterações semelhantes às observadas em camundongos nocaute para a ChAT (Misgeld e cols., 2002).

Portanto, a avaliação neuroquímica e morfológica de camundongos VACHT<sup>DEL/DEL</sup> demonstrou a importância do transporte de ACh mediado pelo VACHT para o desenvolvimento normal da Junção neuromuscular, além das mudanças na maquinaria de neurotransmissão colinérgica desencadeadas pela ausência do VACHT. Entretanto, a mortalidade precoce dos animais VACHT nocaute os tornava

inviáveis para satisfazer o nosso interesse em determinar as consequências da redução da expressão do VAcHT sobre funções cognitivas.

### **Papel da liberação de acetilcolina mediada pelo VAcHT na memória de reconhecimento social**

Com o objetivo de se obter um modelo de hipofunção colinérgica viável para estudos comportamentais, nosso grupo gerou camundongos com redução da expressão do VAcHT (knockdown), através da alteração da região 5' não traduzida do gene. Dessa forma, foram obtidos animais viáveis, heterozigotos (VAcHT KD<sup>HET</sup>) e homozigotos (VAcHT KD<sup>HOM</sup>). Animais VAcHT KD<sup>HET</sup> apresentaram uma redução na expressão do VAcHT de cerca de 45%, enquanto animais VAcHT KD<sup>HOM</sup> tiveram uma redução próxima a 65% (Prado e cols., 2006 anexo I).

Tanto na junção neuromuscular quanto no sistema nervoso central, foram detectados sinais de hipofunção colinérgica em camundongos VAcHT KD. A análise da liberação quantal de ACh na JNM revelou uma pequena alteração na distribuição do tamanho quantal em animais VAcHT KD<sup>HET</sup> sem alteração na frequência de MEPPs. Entretanto, observou-se uma redução na amplitude e na frequência de MEPPs em animais VAcHT KD<sup>HOM</sup>, (Prado e cols., 2006, anexo I). Estas alterações eletrofisiológicas observadas nos camundongos KD refletiram-se em déficits funcionais. Em testes capazes de avaliar força muscular e resistência física, demonstramos não haver diferença quanto a tais parâmetros entre camundongos selvagens e camundongos VAcHT KD<sup>HET</sup>, entretanto camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup> apresentaram um quadro de fraqueza muscular similar ao apresentado por camundongos modelo de miastenia (Prado e cols., 2006, Anexo I). Estes dados indicam que uma redução em torno de 45% na expressão do VAcHT não é suficiente para superar a margem de segurança da junção neuromuscular, similar aos dados que encontramos em camundongos VAcHT wt/del, entretanto uma redução próxima a 65% já é capaz de precipitar o aparecimento de sintomas miastênicos (Prado e cols., 2006, Anexo I).

Utilizando a técnica de microdiálise *in vivo*, foi demonstrado que animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentam uma redução de por volta de 30% na liberação de ACh, em estruturas do sistema nervoso central como o estriado e córtex frontal (Prado e cols., 2006, anexo I). Portanto, a redução na expressão do VACHT foi capaz de limitar a quantidade de ACh liberada no sistema nervoso central, gerando animais com grande potencial para o estudo das consequências da redução da liberação de ACh sobre funções cognitivas e seu significado para diferentes doenças. A fraqueza muscular observada em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>, que poderia ser um viés na interpretação de experimentos comportamentais, nos levou a utilizar, inicialmente, camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> em testes cognitivos.

Inicialmente, avaliamos as consequências da redução da expressão do VACHT sobre a formação de memórias de cunho social. Nos experimentos, demonstramos que camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> apresentam dificuldade em reconhecer um camundongo intruso. Entretanto, a capacidade de discriminação social foi conservada em camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>, visto que após habituarem ao intruso na quarta apresentação foram capazes de elevar o tempo de exploração quando apresentados a um novo intruso. A formação da memória social envolve uma complexa rede de estruturas corticais, sub-corticais e o sistema olfatório (Bielsky e Young, 2004). Através de dois testes distintos fomos capazes de demonstrar o não comprometimento da função olfatória e da capacidade de discriminação entre odores em camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>, o que é consistente com estudos anteriores que demonstraram não haver efeito da escopolamina sobre a discriminação entre odores em ratos (Doty e cols., 2003).

A administração prévia de antagonistas de receptores muscarínicos prejudicou a capacidade de reconhecimento social em camundongos e ovelhas (Camacho F, 1995; Levy F, 2003). Já a intensificação da função colinérgica através da administração do agonista de receptores nicotínicos  $\alpha 7$ , A-582941, foi capaz de melhorar a capacidade de reconhecimento social de ratos, de maneira dose dependente (Gopalakrishnam e cols, 2007). Um outro agonista de receptores  $\alpha 7$ , AR-R 17779, foi capaz de reverter o déficit de reconhecimento social induzido pela administração de escopolamina, um antagonista de receptores muscarínicos. Interessantemente, determinados polimorfismos do gene do receptor  $\alpha 7$  foram

relacionados à Doença de Alzheimer, uma doença onde ocorre prejuízo da memória social (Carson R e cols., 2007).

Dois estudos recentes realizados com ratos relacionam o aumento na liberação de ACh com a melhora na capacidade de reconhecimento social. Em 2008, Millan e cols. demonstraram que a administração de antagonistas de receptores do hormônio concentrador de melanina (MHC1) foi capaz de aumentar os níveis de ACh no córtex frontal, observado por microdiálise *in vivo*, e de reverter o déficit na memória social induzido por escopolamina. Já a administração de galantamina foi capaz de melhorar a capacidade de reconhecimento social em um protocolo com maior intervalo entre as apresentações do intruso (Di cara e cols., 2007). Em animais submetidos ao mesmo protocolo, agonistas de receptores dopaminérgicos D1 foram capazes de aumentar os níveis de ACh no córtex frontal e hipocampo, e ao mesmo tempo intensificar a capacidade de reconhecimento social (Di cara e cols., 2007). Portanto, o déficit na memória social observado em camundongos VACHT KD parece envolver a ativação insuficiente tanto de receptores muscarínicos quanto nicotínicos, gerada pela redução da liberação de ACh. De fato, fomos capazes de reverter temporariamente o déficit observado ao elevar agudamente os níveis sinápticos de ACh, através da administração de galantamina antes da primeira apresentação ao camundongo intruso. Podemos demonstrar ainda que o déficit de reconhecimento social também se estende a camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>, o que reforça a tese de que a limitação na liberação de ACh gerada pela redução da expressão do VACHT é capaz de prejudicar a capacidade de formação de memória social.

A participação do neuropeptídeo vasopressina na formação da memória social é bem descrita, tanto em animais quanto humanos (Meyer LA, 2008). Madeira e cols., em 2004, demonstraram que a destruição do *nucleus basalis magnocellularis* (NBM), principal estrutura de projeção colinérgica para regiões corticais em ratos, foi capaz de reduzir a expressão de vasopressina em neurônios do núcleo supraquiasmático. Portanto, a participação da ACh na modulação do reconhecimento social pode envolver ainda mecanismos relacionados à regulação da expressão de peptídeos importantes para a cognição social.

## Redução da liberação de ACh e habituação ao campo aberto

A redução da habituação a um estímulo social observada nos despertou o interesse em determinar o impacto da redução da atividade do VAcHT sobre a capacidade de habituação a um novo ambiente, um tipo de aprendizado não-associativo. Diferente do observado quanto à formação de memória social, não observamos diferença na habituação ao campo aberto entre camundongos selvagens e VAcHT KD<sup>HET</sup>, entretanto camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup> apresentaram uma clara redução na habituação ao campo aberto tanto intra quanto entre sessões.

Alguns trabalhos demonstram a importância da liberação de ACh para a habituação ao campo aberto. A monitoração direta do tônus colinérgico, pela técnica de microdiálise *in vivo*, demonstrou a ocorrência de seu aumento no hipocampo durante a habituação a um novo ambiente (Thiel e cols., 1998). A redução do tônus colinérgico através da indução de lesões em neurônios colinérgicos com o uso da imunotoxina 192 IgG-saporina foi capaz de reduzir a habituação intra-sessão ao campo aberto (Lamprea e cols., 2003). Em experimentos realizados com camundongos modelo da Doença de Alzheimer, foi observado que alterações na liberação de ACh hipocampal foram acompanhadas de redução na habituação ao campo aberto. Após o tratamento com anticorpo anti-A $\beta$  foi observada a normalização na liberação de ACh hipocampal, e também da habituação ao campo aberto (Bales RK e cols., 2006). Por outro lado, o comprometimento de mecanismos colinérgicos pós-sinápticos também são capazes de prejudicar a habituação ao campo aberto. Camundongos nocaute de receptores muscarínicos M1 apresentaram redução na habituação intra sessão (Miyakawa T e cols., 2001), já camundongos nocaute de receptores M2 têm comprometida a habituação entre sessões (Bainbridge NK e cols., 2008).

Nossos dados reforçam a importância do tônus colinérgico para a habituação a um novo ambiente e demonstram que diferentes níveis de redução da liberação de ACh são capazes de comprometer diferentes aspectos da função cognitiva. Uma redução próxima a 45% na expressão do VAcHT, observada em camundongos VAcHT KD<sup>HET</sup>, foi capaz de comprometer a capacidade de reconhecimento social, avaliada através da habituação a um co-específico. Entretanto, o mesmo nível de

redução do transportador foi incapaz de comprometer a habituação a um novo ambiente, que mostrou-se prejudicada em camundongos maior redução da expressão do transportador (camundongos VAcHT KD<sup>HOM</sup>). A observação, através de modelos geneticamente modificados, do comprometimento de diferentes funções cognitivas e sua co-relação com o grau de hipofunção colinérgica pode ter relevância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes à Doença de Alzheimer, caracterizada por comprometimento progressivo da função colinérgica e da cognição (Terry AV e cols., 2003).

A habituação ao campo aberto possui um componente locomotor, que parece ser modulado pela interação entre os sistemas de neurotransmissão colinérgico e dopaminérgico (Calabresi e cols., 2006; Calabresi e cols., 2008). Demonstramos que a elevação do tônus colinérgico, através da administração de galantamina, foi capaz de reduzir a hiperatividade locomotora observada naturalmente em camundongos nocaute para o transportador de dopamina, caracterizados por apresentar um estado hiperdopaminérgico crônico. Através da administração de galantamina, também fomos capazes de reduzir o aumento na atividade locomotora induzido por cocaína, uma droga capaz de induzir um estado hiperdopaminérgico agudo. Portanto, nossos dados apresentam um efeito antagônico entre o tônus dopaminérgico e colinérgico sobre a atividade locomotora. Há diversas evidências na literatura que suportam tais resultados. Particularmente no estriado, uma estrutura do gânglio basal, a interação entre ACh e dopamina modula processos cognitivos, funções motoras e comportamentos relacionados à recompensa (Calabresi e cols., 2006). Neurônios colinérgicos provenientes do núcleo tegmental pedunculopontino e núcleo tegmental laterodorsal inervam estruturas como a *substância nigra pars compacta* e a área tegmental ventral, modulando negativamente o efluxo de dopamina (Floresco e cols., 2003; Blaha CD e cols., 1996). Na doença de Parkinson, uma doença neurodegenerativa caracterizada pelo comprometimento motor, ocorre uma intensa redução da transmissão dopaminérgica no estriado. Através de estudos *post mortem* com tecidos provenientes de pacientes afetados pela doença de parkinson, foi demonstrada a ocorrência de hiper-inervação colinérgica na *substância nigra pars compacta* (Hirsch EC, 2000).

A participação direta de receptores muscarínicos e nicotínicos na modulação do tônus dopaminérgico é demonstrada através de estudos com animais. Em

camundongos nocaute para a subunidade  $\beta 2$ , uma componente de receptores nicotínicos presentes no sistema nervoso central, foi observado um aumento significativo na liberação *in vivo* de dopamina no estriado. O aumento do tônus dopaminérgico refletiu-se em aumento da atividade locomotora no campo aberto, fenômeno que foi revertido pelo resgate gênético da subunidade  $\beta 2$  na *substância nigra pars compacta* (Avale M E e cols., 2008). Receptores muscarínicos, especialmente do tipo M4, também parecem participar da modulação da função dopaminérgica pela ACh. Camundongos nocaute para o receptor apresentam maior atividade locotora basal que animais selvagens, e um maior efeito na atividade locomotora em resposta a um agonista de receptores dopaminérgicos do tipo D1 (Gomez J. e cols., 1999). Usando a técnica de microdiálise *in vivo*, Tzavara e cols., em 2004, demonstraram que o nocauteamento de receptores M4 levou a um aumento na liberação de dopamina no nucleus acumbens, tanto basal quanto em resposta à administração de Anfetamina. De acordo com tais observações, a administração de potenciadores alostéricos altamente seletivos para receptores M4 foi capaz de inibir a hiperatividade locomotora induzida por anfetamina em ratos (Brady EA e cols., 2008). Receptores do tipo M1 também parecem participar da modulação da transmissão dopaminérgica. O nocauteamento do receptor em camundongos elevou a transmissão dopaminérgica no estriado e a atividade locomotora no campo aberto, além de aumentar a resposta motora frente à administração de anfetamina (Gerber e cols., 2001).

Dessa forma, um dos componentes responsáveis pela reduzida habituação de camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> pode envolver um distúrbio no balanço entre a neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica. Recentemente, foi demonstrado que o nocauteamento do transportador vesicular de glutamato do tipo 3 (VGLUT3) desencadeou uma redução no enchimento vesicular de ACh no estriado, com consequente redução da liberação do neurotransmissor em tal estrutura. Interessantemente, a alteração neuroquímica foi acompanhada por um aumento na atividade locomotora basal. Os autores ainda demonstraram um aumento na indução de atividade locomotora em resposta à administração de cocaína (Gras C e cols., 2008). Assim, nos interessamos em determinar as consequências da redução da expressão do VACHT sobre a indução da atividade locomotora por cocaína. Ao contrário do observado por Gras C e cols., observamos uma redução na atividade

locomotora induzida por cocaína em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> quando comparados a camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>. Apesar de não podermos descartar a influência das alterações neuroquímicas centrais no resultado observado, a fraqueza muscular e o comprometimento de funções autonômicas observados em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> podem ter limitado a capacidade desses animais em elevar a atividade locomotora em resposta à cocaína. Dessa forma, qualquer interpretação do resultado torna-se duvidosa.

Para verificarmos se a redução do tônus colinérgico em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> foi capaz de gerar consequências na resposta à cocaína, sem o viés anteriormente mencionado, utilizamos o paradigma de preferência condicionada por lugar. O protocolo de preferência condicionada por lugar (CPP) é capaz de determinar alterações no comportamento aditivo frente à cocaína, droga capaz de elevar o tônus dopaminérgico. Observamos que tanto camundongos selvagens quanto VACHT KD<sup>HOM</sup> desenvolveram o condicionamento com a dose de cocaína igual a 20 mg/kg. Entretanto, com a dose de 5 mg/kg apenas camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> passaram a preferir o lado do aparato relacionado à administração de cocaína. Nossos dados sugerem portanto uma maior sensibilidade ao efeito aditivo da cocaína em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup> quando comparados a camundongos selvagens. São encontrados na literatura outros exemplos de aumento da sensibilidade aos efeitos aditivos da cocaína frente ao comprometimento da função colinérgica. Um importante substrato neural para o desenvolvimento de adição por cocaína é o sistema dopaminérgico mesolímbico, que origina-se da área tegmentar ventral e projeta para núcleo accumbens (a parte ventral do estriado), bem como para outras regiões cerebrais (Thomas MJ e cols., 2008). Utilizando imunotoxinas específicas, Hikida e cols., em 2001, foram capazes de destruir neurônios colinérgicos presentes no núcleo accumbens e avaliar as consequências sobre as respostas crônicas à administração de cocaína. Foi observado um aumento na sensibilidade aos efeitos aditivos da cocaína em decorrência do tratamento, similar ao que observamos em camundongos VACHT KD<sup>HOM</sup>. Por outro lado, o pré-tratamento sistêmico com o inibidor da AChE, donepezil, na fase de condicionamento, foi capaz de prevenir o comportamento aditivo gerado pela cocaína (Hikida e cols., 2003). Nossos dados demonstram que um quadro geral de hipofunção colinérgica gerado pela redução da expressão do VACHT é capaz de



alterar o comportamento frente à administração crônica de cocaína, sugerindo uma possível alteração no balanço entre acetilcolina e dopamina, que pode ser um dos mecanismos responsáveis pela alteração na atividade locomotora basal, e portanto na habituação ao campo aberto em camundongos VChT KD<sup>HOM</sup>.

### **Redução da expressão do VChT e o aprendizado motor**

O aprendizado de tarefas motoras é um mecanismo adaptativo essencial na vida de humanos e animais. Trata-se de um tipo de aprendizado implícito, que diferentemente do aprendizado explícito, não depende diretamente de processos conscientes. Esse tipo de aprendizado é construído lentamente, com forte dependência da repetição (Doyon e cols., 1997). Parece ser independente do hipocampo, com a participação de circuitos neuronais envolvendo o córtex motor, o cerebelo e o gânglio basal (, Gould e cols., 2002, Hikosaka e cols., 2002). O Rotarod tem sido o paradigma mais comumente utilizado para avaliar o aprendizado de tarefas motoras em camundongos, especialmente em modelos de doença humanas (Hamm e cols., 1994; Mizoguchi e cols., 2002). É um teste com resultados de fácil quantificação, no qual os animais devem manter-se em um cilindro giratório para evitar suas quedas. A performance é diretamente medida pelo tempo de permanência no aparelho (Brandon e cols., 1998).

Utilizando um protocolo de Rotarod simples, constituído de algumas tentativas, fomos capazes de observar o comprometimento do desempenho de camundongos VChT KD<sup>HET</sup> (Prado e cols., 2006, Anexo I). Para determinar o impacto da redução da expressão do VChT sobre a consolidação e retenção do aprendizado de tarefas implícitas, passamos a utilizar um protocolo de Rotarod acelerado conduzido por vários dias. Realizamos os experimentos somente com camundongos selvagens e VChT KD<sup>HET</sup> devido à excessiva fadigabilidade dos camundongos VChT KD<sup>HOM</sup>, que impossibilitou a permanência desses animais no rotarod por mais que 30 segundos. Tal fato pode ser justificado pela fraqueza muscular observada nesses animais (Prado e cols., 2006, Anexo I), mas não se

deve desconsiderar a possibilidade de disfunções na adaptação autonômica ao exercício.

Os animais selvagens apresentaram um padrão de melhora gradual na performance ao longo dos dias, da mesma forma que camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>. Entretanto o aprendizado de camundongos heterozigotos foi mais lento quando comparado ao apresentado por animais selvagens. Tal fato é observado comparando-se as performances dos grupos entre os dias de treinamento. Entretanto, a retenção do aprendizado não foi diferente entre camundongos selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>. Nosso dados demonstram portanto, que a redução da expressão do VACHT torna camundongos mais lentos no aprendizado da tarefa, porém não afeta a capacidade de rete-la depois de aprendida.

O aprendizado do rotarod acelerado requer mudanças no padrão de marcha do animal, de maneira independente da melhora na capacidade física do animal (Buitargo e cols., 2004). Portanto, o aprendizado motor parece ser o principal responsável pela melhora da performance dos animais ao longo das sessões de treinamento. De maneira similar à observada para a formação de memórias explícitas, foi demonstrado que o aprendizado motor no rotarod é prejudicado pela administração sistêmica de um inibidor da síntese de proteínas (Luft R e cols., 2004). Animais VACHT KD<sup>HET</sup> também apresentaram prejuízo em outros tipos de memória, como as memórias de reconhecimento social e de objetos (Prado e cols., anexo I). Portanto, a redução da liberação de ACh causada pela redução da atividade do VACHT parece ter consequências em diferentes tipos de memória, dentre elas a necessária para o aprendizado de tarefas motoras. Outras abordagens também têm demonstrado a importância do sistema colinérgico central no aprendizado de tarefas motoras. A indução de lesões específicas do núcleo basal magnocelular em ratos reduz as mudanças plásticas geradas no córtex pelo aprendizado de uma tarefa motora, tal redução correlaciona-se com a dificuldade do aprendizado da tarefa (Conner e cols., 2003). Em outro estudo, demonstrou-se uma relação entre deprivação de vitamina A e disfunção colinérgica estriatal, com consequente prejuízo na performance no Rotarod (Carta e cols., 2006).

A doença de Huntington é caracterizada por um alto grau de comprometimento motor. Em camundongos modelo da doença, houve redução nos níveis de expressão do VACHT e da ChAT, sem a perda de neurônios colinérgicos (Smith R. E cols.,

2006). Interessantemente, camundongos expressando o gene relacionado à patogênese da doença apresentam pobre performance no rotarod (Van Raamsdonk e cols., 2005). Nossos dados sugerem que a redução da expressão do VACHT pode ter significado clínico para a ocorrência das alterações motoras presentes na doença.

O aprendizado motor é acompanhado por plasticidade substancial de representações corticais e estriatais (Nudo e cols., 1996; Costa e cols., 2004). O tônus colinérgico parece ser necessário para a codificação de sinais (Gioanni e cols., 1999) e para a modulação da plasticidade sináptica no córtex (Dringenberg e cols., 2007). No estriado, região rica em interneurônios colinérgicos, a Ach foi capaz de influenciar a indução de depressão a longo prazo (LTD), uma forma de plasticidade sináptica, em neurônios gabaérgicos (Wang e cols., 2006). Tais mecanismos podem estar envolvidos nos processos modulados pelo tônus colinérgico que participam do aprendizado de tarefas motoras. A redução da expressão do VACHT pode ter limitado a quantidade de Ach presente nas sinapses necessária para a codificação de informações subjacentes ao aprendizado motor. Futuros experimentos utilizando camundongos nocaute tecido-específico e a administração de drogas, em regiões específicas, capazes de aumentar o tônus colinérgico são necessários para que se compreenda de maneira mais elucidativa a participação do VACHT e conseqüentemente da liberação vesicular de ACh sobre o aprendizado de tarefas motoras. Interessantemente, os dados de aprendizado locomotor são de alguma maneira similares aos dados de memória de reconhecimento social, onde os camundongos mutantes necessitaram de uma maior quantidade de estímulos para atingirem uma performance similar aos camundongos selvagens.

---

## 6. CONCLUSÕES

- A liberação de ACh mediada pelo VACHT é essencial para a sobrevivência, além disso a falta de liberação de acetilcolina pelo transportador compromete o desenvolvimento normal da junção neuromuscular em camundongos.
- A atividade do VACHT é capaz de limitar a capacidade de formação de distintas formas de memória, com consequências sobre o aprendizado.
- Uma redução próxima a 45% nos níveis de expressão do VACHT é capaz de comprometer a capacidade de reconhecimento social e o aprendizado de tarefas motoras, sem prejuízo na capacidade de habituação ao campo aberto.
- Uma redução próxima a 65% nos níveis de expressão do VACHT prejudica a capacidade de habituação ao campo aberto.
- A redução da expressão do VACHT em camundongos leva ao comprometimento de determinadas funções cognitivas similar ao encontrado em determinadas doenças humanas.
- Camundongos VACHT nocaute e VACHT Knockdown representam novos modelos de hipofunção colinérgica, úteis portanto para o entendimento de mecanismos fisiopatológicos e para o desenvolvimento de novos tratamentos de doenças com comprometimento do sistema colinérgico.



---

## **7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abrams P, Andersson KE, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, Kay G, Laties A, Nathanson NM, Pasricha PJ, Wein AJ (2006) Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol* 148:565-578.
- Adkins-Regan E (2009) Neuroendocrinology of social behavior. *Ilar J* 50:5-14.
- Adler M, Manley HA, Purcell AL, Deshpande SS, Hamilton TA, Kan RK, Oyler G, Lockridge O, Duysen EG, Sheridan RE (2004) Reduced acetylcholine receptor density, morphological remodeling, and butyrylcholinesterase activity can sustain muscle function in acetylcholinesterase knockout mice. *Muscle Nerve* 30:317-327.
- Alfonso A, Grundahl K, Duerr JS, Han HP, Rand JB (1993) The *Caenorhabditis-Elegans* Unc-17 Gene - A Putative Vesicular Acetylcholine Transporter. *Science* 261: 617-619
- Apparsundaram S, Ferguson SM, George AL, Jr., Blakely RD (2000) Molecular cloning of a human, hemicholinium-3-sensitive choline transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 276:862-867.
- Apparsundaram S, Martinez V, Parikh V, Kozak R, Sarter M (2005) Increased capacity and density of choline transporters situated in synaptic membranes of the right medial prefrontal cortex of attentional task-performing rats. *J Neurosci* 25:3851-3856.
- Araya R, Noguchi T, Yuhki M, Kitamura N, Higuchi M, Saido TC, Seki K, Itohara S, Kawano M, Tanemura K, Takashima A, Yamada K, Kondoh Y, Kanno I, Wess J, Yamada M (2006) Loss of M5 muscarinic acetylcholine receptors leads to cerebrovascular and neuronal abnormalities and cognitive deficits in mice. *Neurobiol Dis* 24:334-344.
- Atri A, Sherman S, Norman KA, Kirchhoff BA, Nicolas MM, Greicius MD, Cramer SC, Breiter HC, Hasselmo ME, Stern CE (2004) Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. *Behav Neurosci* 118:223-236.

- Avale ME, Faure P, Pons S, Robledo P, Deltheil T, David DJ, Gardier AM, Maldonado R, Granon S, Changeux JP, Maskos U (2008) Interplay of beta2\* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15991-15996.
- Bainbridge NK, Koselke LR, Jeon J, Bailey KR, Wess J, Crawley JN, Wrenn CC (2008) Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. *Behav Brain Res* 190:50-58.
- Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, Nomikos GG (2006) Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A beta antibody. *J Clin Invest* 116:825-832.
- Barbosa J, Jr., Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA (1999) Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem* 73:1881-1893.
- Barbosa J, Jr., Ferreira LT, Martins-Silva C, Santos MS, Torres GE, Caron MG, Gomez MV, Ferguson SS, Prado MA, Prado VF (2002) Trafficking of the vesicular acetylcholine transporter in SN56 cells: a dynamin-sensitive step and interaction with the AP-2 adaptor complex. *J Neurochem* 82:1221-1228.
- Beigneux AP, Kosinski C, Gavino B, Horton JD, Skarnes WC, Young SG (2004) ATP-citrate lyase deficiency in the mouse. *Journal of Biological Chemistry* 279: 9557-9564.
- Bejanin S, Cervini R, Mallet J, Berrard S (1994) A unique gene organization for two cholinergic markers, choline acetyltransferase and a putative vesicular transporter of acetylcholine. *J Biol Chem* 269:21944-21947.
- Berson A, Knobloch M, Hanan M, Diamant S, Sharoni M, Schuppli D, Geyer BC, Ravid R, Mor TS, Nitsch RM, Soreq H (2008) Changes in readthrough acetylcholinesterase expression modulate amyloid-beta pathology. *Brain* 131:109-119.



- Bidzinski A, Siemiatkowski M, Czlonkowska A, Tonderska A, Plaznik A (1998) The effect of serotonin depletion on motor activity habituation, and [3H]muscimol binding in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 353:5-12.
- Bielsky IF, Young LJ (2004) Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25:1565-1574.
- Bielsky IF, Hu SB, Szegda KL, Westphal H, Young LJ (2004) Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 29:483-493.
- Blaaha CD, Allen LF, Das S, Inglis WL, Latimer MP, Vincent SR, Winn P (1996) Modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens after cholinergic stimulation of the ventral tegmental area in intact, pedunculo-pontine tegmental nucleus-lesioned, and laterodorsal tegmental nucleus-lesioned rats. *J Neurosci* 16:714-722.
- Blusztajn JK, Wurtman RJ (1983) Choline and Cholinergic Neurons. *Science* 221: 614-620.
- Bluthe RM, Dantzer R (1993) Role of the vomeronasal system in vasopressinergic modulation of social recognition in rats. *Brain Res* 604:205-210.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-9.
- Brady AE, Jones CK, Bridges TM, Kennedy JP, Thompson AD, Heiman JU, Breining ML, Gentry PR, Yin H, Jadhav SB, Shirey JK, Conn PJ, Lindsley CW (2008) Centrally active allosteric potentiators of the M4 muscarinic acetylcholine receptor reverse amphetamine-induced hyperlocomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 327:941-953.
- Brandon EP, Logue SF, Adams MR, Qi M, Sullivan SP, Matsumoto AM, Dorsa DM, Wehner JM, McKnight GS, Idzerda RL (1998) Defective motor behavior and neural gene expression in R11beta-protein kinase A mutant mice. *J Neurosci* 18:3639-3649.
- Brandon EP, Mellott T, Pizzo DP, Coufal N, D'Amour KA, Gobeske K, Lortie M, Lopez-Coviella I, Berse B, Thal LJ, Gage FH, Blusztajn JK (2004) Choline

- transporter 1 maintains cholinergic function in choline acetyltransferase haploinsufficiency. *J Neurosci* 24:5459-5466.
- Brennan PA, Kendrick KM, Keverne EB (1995) Neurotransmitter release in the accessory olfactory bulb during and after the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience* 69:1075-1086.
- Brown DA (2006) Acetylcholine. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S120-126.
- Buitrago MM, Schulz JB, Dichgans J, Luft AR (2004) Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem* 81:211-216.
- Burghaus L, Schutz U, Krempel U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Wevers A, Lindstrom J, Schroder H (2000) Quantitative assessment of nicotinic acetylcholine receptor proteins in the cerebral cortex of Alzheimer patients. *Brain Res Mol Brain Res* 76:385-388.
- Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM (2006) M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* 49:671-682.
- Calabresi P, Di Filippo M (2008) ACh/dopamine crosstalk in motor control and reward: a crucial role for alpha 6-containing nicotinic receptors? *Neuron* 60:4-7.
- Calabresi P, Picconi B, Parnetti L, Di Filippo M (2006) A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine-acetylcholine synaptic balance. *Lancet Neurol* 5:974-983.
- Carey RJ, Dai H, Gui J (1998) Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology (Berl)* 137:241-246.
- Carson R, Craig D, McGuinness B, Johnston JA, O'Neill FA, Passmore AP, Ritchie CW (2008) Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor gene and reduced risk of Alzheimer's disease. *J Med Genet* 45:244-248.
- Carta M, Stancampiano R, Tronci E, Collu M, Usiello A, Morelli M, Fadda F (2006) Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. *Neuroscience* 139:1163-1172.

- Caulfield MP, Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50:279-290.
- Cervini R, Houhou L, Pradat PF, Bejanin S, Mallet J, Berrard S (1995) Specific vesicular acetylcholine transporter promoters lie within the first intron of the rat choline acetyltransferase gene. *J Biol Chem* 270:24654-24657.
- Cicchetti F, Prensa L, Wu Y, Parent A (2000) Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 34:80-101.
- Collier B, Katz HS (1974) Acetylcholine synthesis from recaptured choline by a sympathetic ganglion. *J Physiol* 238:639-655.
- Comim CM, Pereira JG, Steckert A, Petronilho F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F (2008) Rivastigmine Reverses Habituation Memory Impairment Observed in Sepsis Survivor Rats. *Shock*.
- Conner JM, Culbertson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH (2003) Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38:819-829.
- Contestabile A, Ciani E, Contestabile A (2008) The place of choline acetyltransferase activity measurement in the "cholinergic hypothesis" of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 33:318-327.
- Conti-Fine BM, Milani M, Kaminski HJ (2006) Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest* 116:2843-2854.
- Corbetta M, Shulman GL (2002) Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nat Rev Neurosci* 3:201-215.
- Corcoran KA, Lu Y, Turner RS, Maren S (2002) Overexpression of hAPP<sup>swe</sup> impairs rewarded alternation and contextual fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Learn Mem* 9:243-252.
- Costa RM, Cohen D, Nicoletis MA (2004) Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol* 14:1124-1134.

- Dang MT, Yokoi F, Yin HH, Lovinger DM, Wang Y, Li Y (2006) Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15254-15259.
- Daniels RW, Collins CA, Gelfand MV, Dant J, Brooks ES, Krantz DE, DiAntonio A (2004) Increased expression of the *Drosophila* vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J Neurosci* 24:10466-10474.
- Darvesh S, Hopkins DA, Geula C (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 4:131-138.
- Degroot A, Parent MB (2000) Increasing acetylcholine levels in the hippocampus or entorhinal cortex reverses the impairing effects of septal GABA receptor activation on spontaneous alternation. *Learn Mem* 7:293-302.
- Dere E, De Souza Silva MA, Topic B, Fiorillo C, Li JS, Sadile AG, Frisch C, Huston JP (2002) Aged endothelial nitric oxide synthase knockout mice exhibit higher mortality concomitant with impaired open-field habituation and alterations in forebrain neurotransmitter levels. *Genes Brain Behav* 1:204-213.
- Di Cara B, Panayi F, Gobert A, Dekeyne A, Sicard D, De Groote L, Millan MJ (2007) Activation of dopamine D1 receptors enhances cholinergic transmission and social cognition: a parallel dialysis and behavioural study in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:383-399.
- Disterhoft JF, Matthew Oh M (2003) Modulation of cholinergic transmission enhances excitability of hippocampal pyramidal neurons and ameliorates learning impairments in aging animals. *Neurobiol Learn Mem* 80:223-233.
- Disterhoft JF, Kronforst-Collins M, Oh MM, Power JM, Preston AR, Weiss C (1999) Cholinergic facilitation of trace eyeblink conditioning in aging rabbits. *Life Sci* 64:541-548.
- Dluzen DE, Muraoka S, Engelmann M, Landgraf R (1998) The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. *Peptides* 19:999-1005.

- Dobransky T, Rylett RJ (2005) A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *Journal of Neurochemistry* 95: 305-313.
- Donaldson ZR, Young LJ (2008) Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322:900-904.
- Donat CK, Schuhmann MU, Voigt C, Nieber K, Deuther-Conrad W, Brust P (2008) Time-dependent alterations of cholinergic markers after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* 1246:167-177.
- Doty RL, Bagla R, Misra R, Mueller E, Kerr KL (2003) No influence of scopolamine hydrobromide on odor detection performance of rats. *Chem Senses* 28:761-765.
- Doyon J (1997) Skill learning. *Int Rev Neurobiol* 41:273-294.
- Doyon J, Penhune V, Ungerleider LG (2003) Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia* 41:252-262.
- Duysen EG, Stribley JA, Fry DL, Hinrichs SH, Lockridge O (2002) Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 137:43-54.
- Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* 269:21929-21932.
- Everitt BJ, Robbins TW (1997) Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48:649-684.
- Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* 9:1425-1436.
- Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001) Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 21:8278-8285.
- Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT (2000) Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 25:284-288.

- Ferguson SM, Blakely RD (2004) The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv* 4:22-37.
- Ferguson SM, Bazalakova M, Savchenko V, Tapia JC, Wright J, Blakely RD (2004) Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8762-8767.
- Ferguson SM, Savchenko V, Apparsundaram S, Zwick M, Wright J, Heilman CJ, Yi H, Levey AI, Blakely RD (2003) Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. *J Neurosci* 23:9697-9709.
- Fernstrom JD (1981) Effects of Precursors on Brain Neurotransmitter Synthesis and Brain Functions. *Diabetologia* 20: 281-289.
- Ferrari-Dileo G, Waelbroeck M, Mash DC, Flynn DD (1994) Selective labeling and localization of the M4 (m4) muscarinic receptor subtype. *Mol Pharmacol* 46:1028-1035.
- Ferreira G, Poindron P, Levy F (2003) Involvement of central muscarinic receptors in social and nonsocial learning in sheep. *Pharmacol Biochem Behav* 74:969-975.
- Floresco SB, Grace AA (2003) Gating of hippocampal-evoked activity in prefrontal cortical neurons by inputs from the mediodorsal thalamus and ventral tegmental area. *J Neurosci* 23:3930-3943.
- Fon EA, Pothos EN, Sun BC, Killeen N, Sulzer D, Edwards RH (1997) Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron* 19:1271-1283.
- Francis PT, Nordberg A, Arnold SE (2005) A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol Sci* 26:104-111.
- Gais S, Born J (2004) Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2140-2144.
- Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S (2001) Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to

- amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15312-15317.
- Gill SK, Bhattacharya M, Ferguson SS, Rylett RJ (2003) Identification of a novel nuclear localization signal common to 69- and 82-kDa human choline acetyltransferase. *J Biol Chem* 278:20217-20224.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606-612.
- Gold PE (2003) Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 80:194-210.
- Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, Wess J (1999a) Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1692-1697.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J (1999b) Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10483-10488.
- Gotti C, Clementi F (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74:363-396.
- Gould TJ, Rowe WB, Heman KL, Mesches MH, Young DA, Rose GM, Bickford PC (2002) Effects of hippocampal lesions on patterned motor learning in the rat. *Brain Res Bull* 58:581-586.
- Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, Poirel O, Vinatier J, Herbin M, Dumas S, Tzavara ET, Wade MR, Nomikos GG, Hanoun N, Saurini F, Kemel ML, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2008) The vesicular glutamate transporter VGLUT3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci* 11:292-300.
- Groszer M, Keays DA, Deacon RM, de Bono JP, Prasad-Mulcare S, Gaub S, Baum MG, French CA, Nicod J, Coventry JA, Enard W, Fray M, Brown SD, Nolan PM, Paabo S, Channon KM, Costa RM, Eilers J, Ehret G, Rawlins JN, Fisher SE (2008) Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice

- with a point mutation implicated in human speech deficits. *Curr Biol* 18:354-362.
- Guermonez L, O'Regan S, Meunier FM, Morot-Gaudry-Talarmin Y (2002) The neuronal choline transporter CHT1 is regulated by immunosuppressor-sensitive pathways. *J Neurochem* 82:874-884.
- Halliwel RF (2007) A short history of the rise of the molecular pharmacology of ionotropic drug receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:214-219.
- Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW (1994) The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 11:187-196.
- Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16:710-715.
- Hasselmo ME, McGaughy J (2004) High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. *Prog Brain Res* 145:207-231.
- Hepler DJ, Wenk GL, Cribbs BL, Olton DS, Coyle JT (1985) Memory impairments following basal forebrain lesions. *Brain Res* 346:8-14.
- Hikida T, Kitabatake Y, Pastan I, Nakanishi S (2003) Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine and morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6169-6173.
- Hikida T, Kaneko S, Isobe T, Kitabatake Y, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S (2001) Increased sensitivity to cocaine by cholinergic cell ablation in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13351-13354.
- Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H (2002) Central mechanisms of motor skill learning. *Curr Opin Neurobiol* 12:217-222.
- Hirsch EC (2000) Nigrostriatal system plasticity in Parkinson's disease: effect of dopaminergic denervation and treatment. *Ann Neurol* 47:S115-120; discussion S120-111.
- Hoffman, B.B. & Taylor, P. *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York (2006).



- Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147:1-46.
- Jin D, Liu HX, Hirai H, Torashima T, Nagai T, Lopatina O, Shnayder NA, Yamada K, Noda M, Seike T, Fujita K, Takasawa S, Yokoyama S, Koizumi K, Shiraishi Y, Tanaka S, Hashii M, Yoshihara T, Higashida K, Islam MS, Yamada N, Hayashi K, Noguchi N, Kato I, Okamoto H, Matsushima A, Salmina A, Munesue T, Shimizu N, Mochida S, Asano M, Higashida H (2007) CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion. *Nature* 446:41-45.
- Kaba H, Rosser A, Keverne B (1989) Neural basis of olfactory memory in the context of pregnancy block. *Neuroscience* 32:657-662.
- Kandel E. R., (2001) *Princípios da Neurociência*, Editora Manole
- Karpova AY, Tervo DG, Gray NW, Svoboda K (2005) Rapid and reversible chemical inactivation of synaptic transmission in genetically targeted neurons. *Neuron* 48:727-735.
- Kiss A, Mikkelsen JD (2005) Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocr Regul* 39:97-105.
- Kitamoto T, Xie X, Wu CF, Salvaterra PM (2000) Isolation and characterization of mutants for the vesicular acetylcholine transporter gene in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* 42:161-171.
- Kogan JH, Frankland PW, Silva AJ (2000) Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10:47-56.
- Kraner S, Laufenberg I, Strassburg HM, Sieb JP, Steinlein OK (2003) Congenital myasthenic syndrome with episodic apnea in patients homozygous for a CHAT missense mutation. *Arch Neurol* 60:761-763.
- Kuhar MJ, Murrin LC (1978) Sodium-dependent, high affinity choline uptake. *J Neurochem* 30:15-21.
- Kuhl DE, Minoshima S, Fessler JA, Frey KA, Foster NL, Ficaro EP, Wieland DM, Koeppe RA (1996) In vivo mapping of cholinergic terminals in normal aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 40:399-410.

- Kuperberg G, Heckers S (2000) Schizophrenia and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 10:205-210.
- Lai WS, Ramiro LL, Yu HA, Johnston RE (2005) Recognition of familiar individuals in golden hamsters: a new method and functional neuroanatomy. *J Neurosci* 25:11239-11247.
- Lamprea MR, Cardenas FP, Silveira R, Walsh TJ, Morato S (2003) Effects of septal cholinergic lesion on rat exploratory behavior in an open-field. *Braz J Med Biol Res* 36:233-238.
- Landgraf R, Frank E, Aldag JM, Neumann ID, Sharer CA, Ren X, Terwilliger EF, Niwa M, Wigger A, Young LJ (2003) Viral vector-mediated gene transfer of the vole V1a vasopressin receptor in the rat septum: improved social discrimination and active social behaviour. *Eur J Neurosci* 18:403-411.
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C (2008) Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117:232-243.
- Le Novere N, Corringier PJ, Changeux JP (2002) The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.
- Leussis MP, Bolivar VJ (2006) Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1045-1064.
- Liu Y, Edwards RH (1997) Differential localization of vesicular acetylcholine and monoamine transporters in PC12 cells but not CHO cells. *J Cell Biol* 139:907-916.
- Lleo A, Greenberg SM, Growdon JH (2006) Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med* 57:513-533.
- Luft AR, Buitrago MM, Kaelin-Lang A, Dichgans J, Schulz JB (2004) Protein synthesis inhibition blocks consolidation of an acrobatic motor skill. *Learn Mem* 11:379-382.
- Luo M, Fee MS, Katz LC (2003) Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 299:1196-1201.
- Madeira MD, Pereira PA, Silva SM, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM (2004) Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of

- neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 125:889-901.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711.
- Marubio LM, Paylor R (2004) Impaired passive avoidance learning in mice lacking central neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 129:575-582.
- McGaughy J, Sarter M (1998) Sustained attention performance in rats with intracortical infusions of 192 IgG-saporin-induced cortical cholinergic deafferentation: effects of physostigmine and FG 7142. *Behav Neurosci* 112:1519-1525.
- McGaughy J, Everitt BJ, Robbins TW, Sarter M (2000) The role of cortical cholinergic afferent projections in cognition: impact of new selective immunotoxins. *Behav Brain Res* 115:251-263.
- McIntyre CK, Ragozzino ME, Gold PE (1998) Intra-amygdala infusions of scopolamine impair performance on a conditioned place preference task but not a spatial radial maze task. *Behav Brain Res* 95:219-226.
- Mesulam M (2004) The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem* 11:43-49.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 10:1185-1201.
- Meyer-Lindenberg A (2008) Impact of prosocial neuropeptides on human brain function. *Prog Brain Res* 170:463-470.
- Millan MJ, Gobert A, Panayi F, Rivet JM, Dekeyne A, Brocco M, Ortuno JC, Di Cara B (2008) The melanin-concentrating hormone<sup>1</sup> receptor antagonists, SNAP-7941 and GW3430, enhance social recognition and dialysate levels of acetylcholine in the frontal cortex of rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1105-1122.
- Mineur YS, Huynh LX, Crusio WE (2006) Social behavior deficits in the Fmr1 mutant mouse. *Behav Brain Res* 168:172-175.

- Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR (2002) Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36:635-648.
- Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J (2001) Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Neurosci* 21:5239-5250.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Nagata M, Ishige A, Sasaki H, Tabira T (2002) Dopamine-receptor stimulation in the prefrontal cortex ameliorates stress-induced rotarod impairment. *Pharmacol Biochem Behav* 72:723-728.
- Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G, Buist A, Cik M, van der Spek P, Kass S, Meert T, D'Hooge R, Rosenmund C, Hampson RM (2006) Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci* 26:12055-12066.
- Moore SJ, Cooper DC, Spruston N (2009) Plasticity of burst firing induced by synergistic activation of metabotropic glutamate and acetylcholine receptors. *Neuron* 61:287-300.
- Morozov A, Kellendonk C, Simpson E, Tronche F (2003) Using conditional mutagenesis to study the brain. *Biol Psychiatry* 54:1125-1133.
- Nai Q, McIntosh JM, Margiotta JF (2003) Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Mol Pharmacol* 63:311-324.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TV (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9:65-75.
- Nishijima I, Yamagata T, Spencer CM, Weeber EJ, Alekseyenko O, Sweatt JD, Momoi MY, Ito M, Armstrong DL, Nelson DL, Paylor R, Bradley A (2006) Secretin receptor-deficient mice exhibit impaired synaptic plasticity and social behavior. *Hum Mol Genet* 15:3241-3250.

- Nordberg A, Lundqvist H, Hartvig P, Lilja A, Langstrom B (1995) Kinetic analysis of regional (S)(-)-11C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains--in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9:21-27.
- Nudo RJ, Milliken GW, Jenkins WM, Merzenich MM (1996) Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci* 16:785-807.
- O'Keefe J (1990) A computational theory of the hippocampal cognitive map. *Prog Brain Res* 83:301-312.
- O'Regan S, Collier B (1981) Effect of increasing choline, in vivo and in vitro, on the synthesis of acetylcholine in a sympathetic ganglion. *J Neurochem* 36:420-430.
- Oda Y (1999) Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int* 49:921-937.
- Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Harper CM, Bajzer Z, Udd B, Beyring R, Robb S, Kirkham FJ, Engel AG (2001) Choline acetyltransferase mutations cause myasthenic syndrome associated with episodic apnea in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2017-2022.
- Okuda T, Haga T (2000) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett* 484:92-97.
- Oppenheim RW, Prevet D, D'Costa A, Wang S, Houenou LJ, McIntosh JM (2000) Reduction of neuromuscular activity is required for the rescue of motoneurons from naturally occurring cell death by nicotinic-blocking agents. *J Neurosci* 20:6117-6124.
- Oppenheim RW, Caldero J, Cuitat D, Esquerda J, McArdle JJ, Olivera BM, Prevet D, Teichert RW (2008) The rescue of developing avian motoneurons from programmed cell death by a selective inhibitor of the fetal muscle-specific nicotinic acetylcholine receptor. *Dev Neurobiol* 68:972-980.
- Origlia N, Kuczewski N, Aztiria E, Gautam D, Wess J, Domenici L (2006) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice show distinct synaptic plasticity impairments in the visual cortex. *J Physiol* 577:829-840.

- Parent MB, Laurey PT, Wilkniss S, Gold PE (1997) Intraseptal infusions of muscimol impair spontaneous alternation performance: infusions of glucose into the hippocampus, but not the medial septum, reverse the deficit. *Neurobiol Learn Mem* 68:75-85.
- Pinthong M, Black SA, Ribeiro FM, Pholpramool C, Ferguson SS, Rylett RJ (2008) Activity and subcellular trafficking of the sodium-coupled choline transporter CHT is regulated acutely by peroxynitrite. *Mol Pharmacol* 73:801-812.
- Pothos EN, Larsen KE, Krantz DE, Liu Y, Haycock JW, Setlik W, Gershon MD, Edwards RH, Sulzer D (2000) Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *J Neurosci* 20:7297-7306.
- Power AE, Vazdarjanova A, McGaugh JL (2003) Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 80:178-193.
- Prado MA, Reis RA, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG (2002) Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochem Int* 41:291-299.
- Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MF, Gomez MV, Guatimosim C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MA (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51:601-612.
- Rempe D, Vangeison G, Hamilton J, Li Y, Jepson M, Federoff HJ (2006) Synapsin I Cre transgene expression in male mice produces germline recombination in progeny. *Genesis* 44:44-49.
- Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA (2006) The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem* 97:1-12.
- Ribeiro FM, Black SA, Cregan SP, Prado VF, Prado MA, Rylett RJ, Ferguson SS (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J Neurochem* 94:86-96.

- Ribeiro FM, Alves-Silva J, Volkandt W, Martins-Silva C, Mahmud H, Wilhelm A, Gomez MV, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2003) The hemicholinium-3 sensitive high affinity choline transporter is internalized by clathrin-mediated endocytosis and is present in endosomes and synaptic vesicles. *J Neurochem* 87:136-146.
- Rimmele U, Hediger K, Heinrichs M, Klaver P (2009) Oxytocin makes a face in memory familiar. *J Neurosci* 29:38-42.
- Roghani A, Feldman J, Kohan SA, Shirzadi A, Gundersen CB, Brecha N, Edwards RH (1994) Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10620-10624.
- Ruff RL (2003) Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. *Ann N Y Acad Sci* 998:1-10.
- Saltarelli MD, Lowenstein PR, Coyle JT (1987) Rapid in vitro modulation of [3H]hemicholinium-3 binding sites in rat striatal slices. *Eur J Pharmacol* 135:35-40.
- Santos MS, Barbosa J, Jr., Veloso GS, Ribeiro F, Kushmerick C, Gomez MV, Ferguson SS, Prado VF, Prado MA (2001) Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem* 78:1104-1113.
- Sarter M, Bruno JP (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev* 23:28-46.
- Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* 6:48-56.
- Sarter M, Gehring WJ, Kozak R (2006) More attention must be paid: the neurobiology of attentional effort. *Brain Res Rev* 51:145-160.
- Scarr E, Dean B (2009) Role of the cholinergic system in the pathology and treatment of schizophrenia. *Expert Rev Neurother* 9:73-86.
- Schildein S, Huston JP, Schwarting RK (2002) Open field habituation learning is improved by nicotine and attenuated by mecamylamine administered posttrial into the nucleus accumbens. *Neurobiol Learn Mem* 77:277-290.

- Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomeza J, Basile AS, Alzheimer C, Wess J (2004) M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci* 24:10117-10127.
- Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT (2007) Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol* 204:733-740.
- Shadmehr R, Holcomb HH (1997) Neural correlates of motor memory consolidation. *Science* 277:821-825.
- Shea SD, Katz LC, Mooney R (2008) Noradrenergic induction of odor-specific neural habituation and olfactory memories. *J Neurosci* 28:10711-10719.
- Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T (2005) Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 25:11194-11200.
- Silman I, Sussman JL (2005) Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 5:293-302.
- Silman I, Sussman JL (2008) Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chem Biol Interact* 175:3-10.
- Simon JR, Kuhar MG (1975) Impulse-flow regulation of high affinity choline uptake in brain cholinergic nerve terminals. *Nature* 255:162-163.
- Slotkin TA, Nemeroff CB, Bissette G, Seidler FJ (1994) Overexpression of the high affinity choline transporter in cortical regions affected by Alzheimer's disease. Evidence from rapid autopsy studies. *J Clin Invest* 94:696-702.
- Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, Liu YJ, Roos RA, Faull RL, Brundin P, Li JY (2006) Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15:3119-3131.
- Song H, Ming G, Fon E, Bellocchio E, Edwards RH, Poo M (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* 18:815-826.



- Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2:294-302.
- Sparks DL, Beach TG, Lukas RJ (1998) Immunohistochemical localization of nicotinic beta2 and alpha4 receptor subunits in normal human brain and individuals with Lewy body and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurosci Lett* 256:151-154.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27:509-547.
- Takada Y, Yonezawa A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Sugimoto H, Akaike A (2003) Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 306:772-777.
- Tayebati SK, Di Tullio MA, Amenta F (2004) Effect of treatment with the cholinesterase inhibitor rivastigmine on vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in rat brain. *Clin Exp Hypertens* 26:363-373.
- Taylor e Brown (1999) *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects sixth edition*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Terry AV, Jr., Buccafusco JJ (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306:821-827.
- Thiel CM, Huston JP, Schwarting RK (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85:1253-1262.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154:327-342.
- Thompson RF, Spencer WA (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73:16-43.
- Timmermann DB, Gronlien JH, Kohlhaas KL, Nielsen EO, Dam E, Jorgensen TD, Ahring PK, Peters D, Holst D, Chrsitensen JK, Malysz J, Briggs CA, Gopalakrishnan M, Olsen GM (2007) An allosteric modulator of the alpha7

- nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 323:294-307.
- Tomaszewicz M, Rossner S, Schliebs R, Cwikowska J, Szutowicz A (2003) Changes in cortical acetyl-CoA metabolism after selective basal forebrain cholinergic degeneration by 192IgG-saporin. *Journal of Neurochemistry* 87: 318-324.
- Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, McKinzie DL, Felder C, Nomikos GG (2004) M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related CNS pathologies. *Faseb J* 18:1410-1412.
- Ukai M, Kobayashi T, Kameyama T (1994) Characterization of the effects of scopolamine on the habituation of exploratory activity: differential effects of oxotremorine and physostigmine. *Gen Pharmacol* 25:433-438.
- Van der Kloot W (1991) Down-regulation of quantal size at frog neuromuscular junctions: possible roles for elevated intracellular calcium and for protein kinase C. *J Neurobiol* 22:204-214.
- Van Raamsdonk JM, Murphy Z, Slow EJ, Leavitt BR, Hayden MR (2005) Selective degeneration and nuclear localization of mutant huntingtin in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 14:3823-3835.
- Veenema AH, Neumann ID (2008) Central vasopressin and oxytocin release: regulation of complex social behaviours. *Prog Brain Res* 170:261-276.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I (2000) Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem* 7:333-340.
- Vilaro MT, Palacios JM, Mengod G (1990) Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett* 114:154-159.
- Volpicelli LA, Levey AI (2004) Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in cerebral cortex and hippocampus. *Prog Brain Res* 145:59-66.

- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP (2000) Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75:1155-1161.
- Wang Y, Cao Z, Newkirk RF, Ivy MT, Townsel JG (2001) Molecular cloning of a cDNA for a putative choline co-transporter from *Limulus* CNS. *Gene* 268:123-131.
- Wang YM, Gainetdinov RR, Fumagalli F, Xu F, Jones SR, Bock CB, Miller GW, Wightman RM, Caron MG (1997) Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* 19:1285-1296.
- Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50:443-452.
- Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ, Young WS, 3rd (2002) Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry* 7:975-984.
- Wess J, Eglen RM, Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 6:721-733.
- Wess J, Blin N, Yun J, Schoneberg T, Liu J (1996) Molecular aspects of muscarinic receptor assembly and function. *Prog Brain Res* 109:153-162.
- Winocur G, Moscovitch M, Fogel S, Rosenbaum RS, Sekeres M (2005) Preserved spatial memory after hippocampal lesions: effects of extensive experience in a complex environment. *Nat Neurosci* 8:273-275.
- Winslow JT (2003) Mouse social recognition and preference. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 16.
- Winslow JT, Camacho F (1995) Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology (Berl)* 121:164-172.

- Wong JY, Clifford JJ, Massalas JS, Kinsella A, Waddington JL, Drago J (2003) Essential conservation of D1 mutant phenotype at the level of individual topographies of behaviour in mice lacking both D1 and D3 dopamine receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 167:167-173.
- Wright JW, Murphy ES, Elijah IE, Holtfreter KL, Davis CJ, Olson ML, Muhunthan K, Harding JW (2004) Influence of hippocampectomy on habituation, exploratory behavior, and spatial memory in rats. *Brain Res* 1023:1-14.
- Wu S, Jia M, Ruan Y, Liu J, Guo Y, Shuang M, Gong X, Zhang Y, Yang X, Zhang D (2005) Positive association of the oxytocin receptor gene (OXTR) with autism in the Chinese Han population. *Biol Psychiatry* 58:74-77.
- Xie W, Stribley JA, Chatonnet A, Wilder PJ, Rizzino A, McComb RD, Taylor P, Hinrichs SH, Lockridge O (2000) Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 293:896-902.
- Young WS, 3rd, Gainer H (2003) Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology* 78:185-203.
- Zarow C, Vinters HV, Ellis WG, Weiner MW, Mungas D, White L, Chui HC (2005) Correlates of hippocampal neuron number in Alzheimer's disease and ischemic vascular dementia. *Ann Neurol* 57:896-903.
- Zeisel SH (1981) Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu Rev Nutr* 1:95-121.
- Zhang W, Basile AS, Gomeza J, Volpicelli LA, Levey AI, Wess J (2002) Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22:1709-1717.