

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Matheus Guimarães Hofner

Estudo de plasticidade paralela baseado em fEPSP no
Hipocampo CA1

Belo Horizonte

2018

Estudo de plasticidade paralela baseado em fEPSP no Hipocampo CA1

Matheus Guimarães Hofner

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica e
Imunologia da Universidade
Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para a
obtenção do título de
Mestre,

Orientador: Professor Doutor Jader dos Santos Cruz

Co-orientador: Professor Doutor Christopher Kushmerick

Belo Horizonte

2018

Agradecimento

Agradeço aos meus Professores Jader Cruz e Christopher Kushmerick pela orientação.

Agradeço pela luz de meus amigos e colegas da Biologia, do Laboratório de Membranas Excitáveis e do Laboratório de Eletrofisiologia Celular, Jaimin, Ênio, Cesinha, Gudi, Cabide, Tarço, Daniel Lobo, Thais Tunes, Artur Miranda, Christiane Freitas, Leidiane Pinho, Flávio Macêdo, Everton Alhadas, Ana Correa, Jennifer Diniz, Aline Medrado, Carolina Bolaños, Wallace Camargo e Professora Lígia Naves.

Agradeço pela ajuda e colaboração do Professor Ricardo Leão, Priscila Borges e Alexandra Cunha da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, à CAPES, ao CNPQ e à FAPEMIG.

Agradeço à minha família.

*“Monograms on the brain
Decide what's working and what's moved on
To the last phase”
-MGMT*

Lista de Abreviações

aCSF – *Artificial Cerebrospinal Fluid*

AMPA – *α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico Receptor*

CA – *Cornus Ammons*

fEPSP – *Field Excitatory Post Synaptic Potential*

Hz – *Hertz*

HFS – *High Frequency Stimulation*

I/O – *Inward/Outward*

ITDP – *Input Timing Dependent Plasticity*

KAR – *Kainate Receptor*

LTD – *Long Term Depression*

LTP – *Long Term Potentiation*

mRNA – *Messenger RNA*

NMDAR – *N-metil-D-aspartate Receptor*

PKC – *Protein Kinase C*

PPF – *Paired Pulse Facilitation*

PPR – *Paired Pulse Ratio*

STDP – *Spike Timing Dependent Plasticity*

TBS – *Theta Burst Stimulation*

VGCC – *Voltage Gated Calcium Channels*

Lista de Figuras

Figura 1 – O Hipocampo.

Figura 2 – Loop do Hipocampo.

Figura 3 - *Place e Grid Cells*.

Figura 4 – Relação espaço-temporal de células piramidais e interneurônios.

Figura 4 – Sinalização para a LTP em um botão sináptico.

Figura 5 – Modelo ilustrativo de um microcircuito em CA1.

Figura 6 - Fatia ilustrativa do encéfalo de camundongo em Bregma -2mm.

Figura 7 - *Theta Burst Stimulation – TBS*.

Figura 8 - Traço típico de um fEPSP

Figura 9 - Algoritmo para experimento de estimulação fixa.

Figura 10 - Algoritmo para experimento de registro fixo.

Figura 11 - Região representativa do Hipocampo dorsal.

Figura 12 - Experimento com posição fixa de estimulação.

Figura 13 - Decaimento do fEPSP pré e pós TBS em função do espaço.

Figura 14 - Taxa de decaimento do sinal de fEPSP em 150 μ m.

Figura 15 - Curva de entrada e saída – I/O.

Figura 16 - Facilitação por pulso pareado – PPF.

Figure 17 - Experimento de potencialização com registro fixo.

Figura 18 - Análise individual da potencialização gerada por TBS sequencial.

Figura 19 - Relação entre as taxas de potencialização.

Figura 20 - Taxa de potencialização em relação ao fEPSP pré TBS.

Figura 21 - Taxa de potencialização em relação ao PPF.

Resumo

O Hipocampo é uma estrutura altamente relacionada à formação e resgate da memória. A neurofisiologia aponta grandes evidências para existência de uma segregação espaço temporal de microcircuitos nessa região e um dinamismo quanto à atividade regido por eventos de plasticidade sináptica. A partir da neurobiologia computacional, é possível combinar parâmetros eletrofisiológicos e anatômicos à estudos comportamentais e modelos matemáticos capazes de elucidar novos caminhos em busca do conhecimento do funcionamento do cérebro. Em nosso trabalho nos baseamos na hipótese de segregação de microcircuitos da região CA1 do Hipocampo para procurar diferenças na susceptibilidade de vias a se potencializarem frente à estimulação de alta frequência. Encontramos padrões de geração de LTP que sugerem uma susceptibilidade intrínseca de potencialização da via ativada, quando estimulamos em uma posição fixa e registramos em posição variada, que independe de valores basais de fEPSP e da distância da posição de registro. Ao aplicarmos três estímulos tetânicos sequencias em intervalos de 15 minutos não encontramos padrões plausíveis que se encaixem em um cenário homogêneo de populações neuronais. Futuras análises permitirão estudar esse fenômeno, que a princípio sugere uma possível segregação espaço-temporal de vias, quanto à susceptibilidade de potencialização evocada por TBS na região dorsal de CA1 do Hipocampo.

Abstract

Hippocampus is highly correlated with memory formation and rescue. Neurophysiology shows great evidences for the existence of a spatio-temporal segregation of microcircuits in this region a dynamism regarding its activity dictated by synaptic plasticity events. By computational neurobiology, it is possible to combine electrophysiological and anatomical patterns to behavioral studies and mathematical models that are able to elucidate new directions on the way for the knowledge of brain's physiology. In our study we based on the hypothesis of microcircuits segregation on CA1 region of Hippocampus to look for differences in the susceptibility of microcircuits to potentiate in front of high frequency stimulation. We found patterns of LTP that suggest an intrinsic susceptibility of potentiation of the activated microcircuit, when we stimulate in a fixed position and register in a varied position, that is independent of basal values of fEPSP and the distance of the registration position. By three consecutive tetanic stimuli, with 15 minutes intervals, we did not find plausible patterns that fit into a homogeneous setting of neuronal populations. Future analyzes will allow the study of this phenomenon, which at first suggests a possible space-time segregation of microcircuits regarding its susceptibility of potentiation evoked by TBS in the dorsal CA1 region of Hippocampus.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. O Hipocampo	1
1.2. Anatomia e Conectividade	2
1.3. Memória e Navegação Espacial	5
1.4. Ritmo	8
1.5. Plasticidade Sináptica	10
1.6. Potencialização de Longa Duração – LTP	10
1.7. LTP Biofísica e Bioquímica	11
1.8. Arquitetura eletrônica no Hipocampo CA1	13
2. Hipótese	16
3. Justificativa	17
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo Geral	18
4.2. Objetivo Específico	18
5. Materiais e Métodos	19
5.1. Animais	19
5.2. Fatias do Hipocampo	19
5.3. Eletrofisiologia	20
5.3.1. Set-up	20
5.4. Estratégia experimental	22
5.4.1. Protocolos de estimulação	22
5.4.1.1. Linha de base	22
5.4.1.2. Curva de entrada e saída – <i>Inward/Outward</i> - I/O	22
5.4.1.3. Facilitação por pulso pareado – PPF	23
5.4.1.4. Estimulação tetânica, <i>Theta Burst Stimulation</i> – TBS	23
5.4.2. Análise do Potencial Pós-sináptico Excitatório em Campo – fEPSP	24
5.4.3. Experimentos	26
5.4.3.1. Protocolo para avaliar dispersão da LTP com posição fixa de estimulação	26
5.4.3.2. Protocolo para avaliar dispersão da LTP com posição fixa de registro	27

5.4.4. Estatística	29
6. Resultados	30
6.1. Potencialização com posição fixa de estimulação	30
6.1.1. LTP	30
6.1.2. Entrada e saída - I/O	34
6.1.3. Facilitação por pulso pareado – PPF	36
6.2. Potencialização com posição fixa de registro	38
6.2.1. LTP	38
6.2.2. fEPSP basal e LTP	42
6.2.3. PPF	43
7. Discussão	44
7.1. LTP com posição fixa de estimulação	44
7.2. LTP com posição fixa de registro	48
7.3. Próximos passos	51
8. Conclusão	53
9. Referências.....	54

1. Introdução

1.1. O Hipocampo

O Hipocampo sempre foi uma das estruturadas preferidas de estudo entre neurocientistas, principalmente por seu alto grau da organização anatômica, que garante um estudo ideal de fisiologia sináptica e funcionamento de neurônios e pela alta evidência de sua correlação com padrões comportamentais que envolvem principalmente eventos de memória (Shepherd, 1990).

Foi descrito pela primeira vez em 1587 pelo anatomista Aranitus em referência ao que é denominado hoje como Giro Dentado. A tradução do grego se refere ao animal cavalo-marinho, e à uma criatura mitológica grega metade cavalo e metade sereia. O termo 'Cornus Ammons', do latim, chifre de Ámon, referente às subestruturas CA1, CA2, CA3 e CA4 do Hipocampo foi descrito pela primeira vez em 1742 por Garengot em referência ao deus egípcio Ámon, "o oculto", a personificação dos ventos, representado como possuindo chifres de carneiros (Walther, 2002)

Mas foi na década de 1950 que o Hipocampo teve sua popularidade significativamente ampliada, após o famoso caso do paciente H.M. Um caso cirúrgico de remoção do Hipocampo e parte do Lobo temporal em um grande esforço de se curar um quadro intratável de epilepsia tirou desse paciente também a capacidade de se formar novas memórias declarativas, entretanto a memória formada anteriormente à cirurgia 'permaneceu intacta' o que foi considerado então um caso de amnesia anterógrada (Squire, 2009).

Em pequenos roedores, especialmente camundongos, utilizados em nosso trabalho, o Hipocampo está altamente envolvido com a memória espaço-temporal. Estudos de eletrofisiologia *in vivo* concomitante à testes comportamentais de navegação sugerem uma especificidade de células piramidais CA1 em disparar em locais específicos (Ahmed, 2007).

1.2. Anatomia e Conectividade

A Formação Hipocampal é uma estrutura componente do Sistema Límbico, localizada no lóbulo temporal medial do Cérebro. É composta pelo Hipocampo, Giro Dentado, Subiculum, Parasubiculum e Córtex Entorrinal. Internamente o Hipocampo pode ser subdividido em quatro regiões (CA1, CA2, CA3, CA4). Áreas específicas dentro dessas sub-regiões usualmente são classificadas em relação ao eixo sagital do Hipocampo, Dorsal ou Ventral, ou em relação à proximidade com a região conectada justaposta, como por exemplo CA1 proximal ou CA1 distal à CA3 (Andersen, 2007).

A maior fonte de abastecimento sináptico para o Hipocampo é o Córtex Entorrinal. Esta estrutura é subdividida em relação ao eixo axial, como Córtex Entorrinal Medial e Lateral e coronariamente em bandas dorsolateral, intermediária e ventromedial. As camadas mais superficiais recebem informações do córtex, que são transmitidas para o Hipocampo, enquanto que as informações provenientes do Hipocampo abastecem as camadas mais profundas do Córtex Entorrinal. (Canto, 2008).

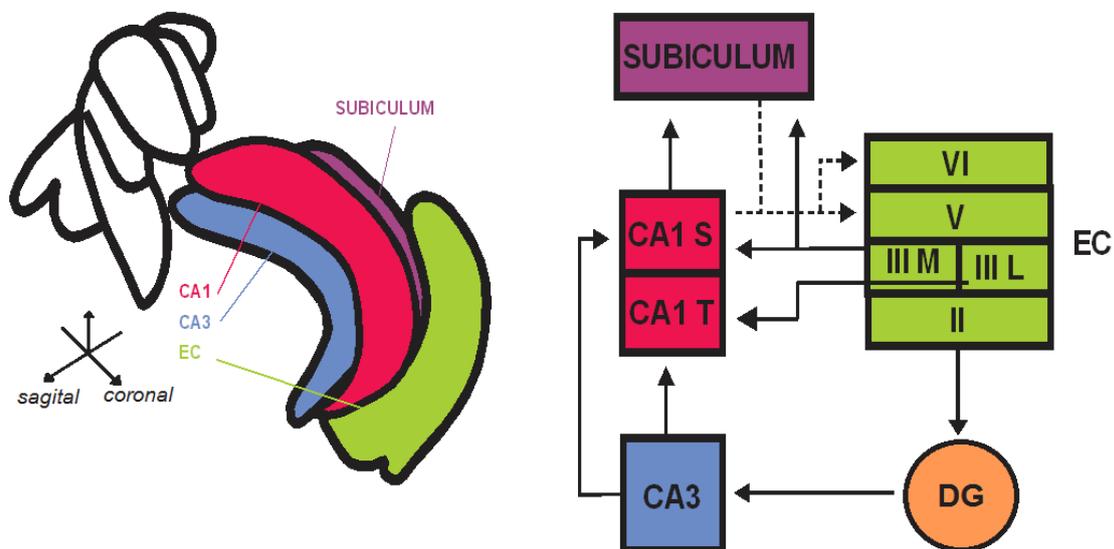


Figura 2 – O Hipocampo. Ilustração tridimensional da Formação Hipocampal, à esquerda, retirada de Allen Mouse Brain, modificada. Esquema ilustrativo do loop conectivo entre CA3, CA1 T: CA1 Temporal; CA1 S: CA1 Septal, Subículo, DG: Giro Dentado e as camadas II, III M: III Medial; III L: III Lateral, V e VI do Córtex Entorrinal.

A circuitaria básica na Formação Hipocampal se conecta em um circuito fechado em forma de *loop*. Entradas sinápticas provenientes de vias sensoriais abastecem o Córtex Entorrinal. Das camadas II e III do Córtex Entorrinal as projeções de Células Estreladas e Piramidais se conectam com Células Granulares do Giro Dentado através de uma via chamada *Perforant Path* (Steward, 1976). As Células Granulares do Giro Dentado projetam seus axônios à região CA3 em fibras denominadas como *Mossy Fiber* (Claiborne, 1986). Enquanto os axônios das Células Piramidais de CA3 projetados ao *Stratum Radiatum* e *Stratum Oriens* de CA1 são chamados de *Schaffer Collateral* (Shepherd, 1990). A maior parte dos axônios de CA1 se projeta ao *Subiculum* e de lá o fluxo de Inputs segue para as camadas V e VI do Córtex Entorrinal. No Córtex Entorrinal as camadas profundas se conectam às camadas superficiais, fechando o loop (Kohler, 1986; Brown e Zador, 1990).

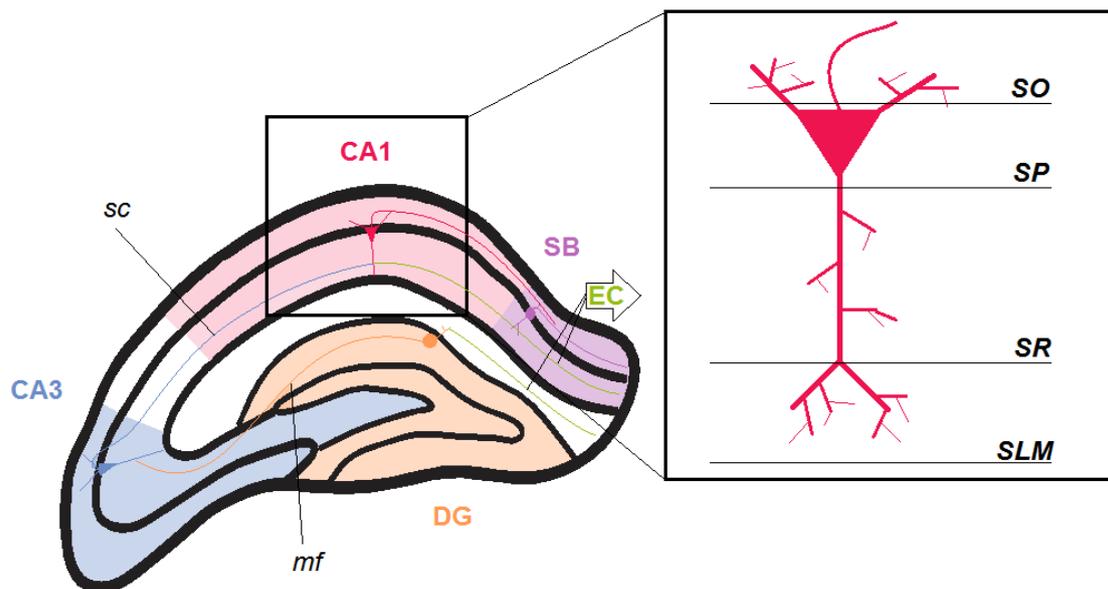


Figura 2 – Loop do Hipocampo. Representação da conectividade em uma fatia do Hipocampo dorsal. Em laranja o Giro Dentado (DG), Azul CA3, Rosa CA1, Roxo Subículo (SB) e verde as projeções para o Córtex Entorrinal (EC). *Sc*: *schaffer collare*; *mf*: *mossy fiber*. No quadro à direita estão mostradas as divisões da camada CA1, *SO*: *Stratum oriens*, *SP*: *Stratum pyramidale*, *SR*: *Stratum radiatum*, *SLM*: *Stratum lacunosum-moleculare*, em relação à um neurônio piramidal.

Obviamente a arquitetura eletrônica na Formação Hipocampal não é tão simples como descrita acima. *Outputs* excitatórias se comunicam com as estruturas adjacentes ao Hipocampo à partir de todas as sub-regiões supracitadas, e se comunicam dentro do Hipocampo, não exclusivamente transversalmente, mas também seguindo o eixo sagital. (Swason, 1978, Yang, 2014)

Existe também uma extensa malha inibitória exercida por pelo menos 13 tipos de interneurônios dispostos heterogeneamente em todo o Hipocampo, classificados a partir de marcadores de membrana e diferenciados pelo modo como seus dendritos e axônios se projetam (Somogyi, 2005). Na região de CA1 os interneurônios mais bem caracterizados são as *Basket cells*, que formam sinapses inibitórias com os dendritos e corpos celulares dos neurônios piramidais e recebem inputs excitatórias dessas mesmas células, mediando inibição *feedforward* e *feedback* (Brown e Zador, 1990). Apesar da quantidade relativamente pequena de interneurônios, sua conectividade inibitória é essencial para regular os aspectos de operação, fluxo de informação e oscilação de toda a rede hipocampal (Sik, 1995).

O foco desse trabalho se concentra nas sinapses CA3-CA1 de *Schaffer Collateral* no *Stratum Radiatum*. A região de CA1 é dividida em *Stratum Oriens* onde se projetam os dendritos basais e os axônios dos neurônios piramidais; *Stratum Pyramidale*, a camada de corpo celular; *Stratum Radiatum* e *Stratum lacunosum-moleculare* onde se projeta a árvore dendrítica apical dos neurônios piramidais (Cajal, 1911).

1.3. Memória e Navegação Espacial

Em 2014 John O'Keefe, May-Britt e Edvard Moser dividiram o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta das *Place* e *Grid cells* na formação hipocampal à partir de estudos de eletrofisiologia *in vivo* concomitante à testes comportamentais de navegação. Um grande avanço no entendimento de memória espacial e redes neurais. *Place cells* no Hipocampo CA1 são neurônios piramidais cuja frequência de disparo se altera especificamente quando um roedor em navegação passa por um determinado ponto do espaço. As demais células piramidais, que não possuem essa especificidade em responder à navegação, são chamadas então de *Silent cells*. (Ahmed, 2007). Mais de dois terços das células piramidais de CA1 não possuem *place fields*, ou seja, não disparam enquanto um roedor navega, e por isso são consideradas silenciosas (Thompson, 1989).

Neurônios que codificam informação espacial na formação hipocampal também podem ser classificadas como *Head direction cells*, que disparam quando o indivíduo encara uma direção particular (Taube, 1990) e *Border cells* que responde a regiões de bordas e barreiras de um ambiente fechado (Hartley, 2013).

As *Grid cells* descritas por Moser estão no Córtex Entorrinal e também respondem à lugares específicos, mas diferentemente das *Place cells* de CA1, disparam em mais de um lugar. São chamadas de Grid pois sua susceptibilidade de ativação em resposta à navegação se dispõem em forma de grade, formando triângulos equiláteros ao longo da superfície do ambiente (Moser, 2015). Evidências sugerem que as *Grid cells* no Córtex Entorrinal medial são as principais fontes de *inputs* para as *Place cells* no Hipocampo (Solstad, 2007).

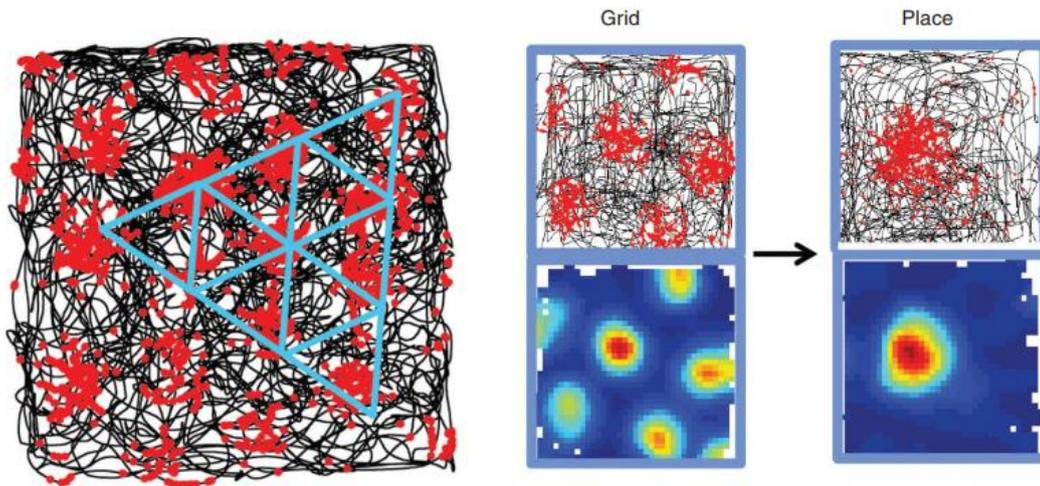


Figura 3 - Place e Grid Cells. Padrão em grade triangular da relação de disparo de uma *Grid cell* observada por eletrofisiologia *in vivo*, de um roedor em movimento, à esquerda. Padrão de disparo de *Grid* e *Place cells* (pontos vermelhos), em relação à trajetória (traços pretos), direita acima, e mapa de codificação para estas células, mostrando em cores quentes alta atividade e cores frias baixa atividade (Moser, 2015).

A soma dos inputs à região CA1, e o balanço entre inibição e excitação, determina se uma célula funciona como *Place cell* ou permanece silenciosa. A região de CA1 mais próxima à CA3 recebe maior parte de *inputs* da camada III do Córtex Entorrinal Medial, formado por uma combinação entre *Grid cells* e *Head direction cells*, enquanto a região mais distante de CA3 recebe maior parte dos inputs da camada III do Córtex Entorrinal Lateral, uma região com pouca codificação espacial descrita. Não coincidentemente, o maior número de *Place cells* de CA1 está na região dorsal, enquanto a região ventral apresenta *place fields* de 4 a 5 vezes maiores que a parte dorsal (Ahmed, 2009). A coativação via Córtex Entorrinal e CA3 aumenta a taxa de despolarização dendrítica em CA1, em relação à ativação via sinapse unitária, levando à maior probabilidade de geração de potenciais de ações dendríticos, prevenindo a taxa de filtragem dendrítica e diminuindo a chance de inibição desses sinais via inputs inibitórios concomitantes, levando assim à um aumento na probabilidade dessa despolarização elétrica da membrana dendrítica se propagar ao corpo celular do neurônio piramidal CA1 e eventualmente engatilhar o disparo de um potencial de ação axonal (Jarsky, 2005).

A modulação da atividade destes neurônios codificadores de memória espacial, em curtas e longas escalas temporais está relacionada à eventos de plasticidade sináptica e metaplasticidade. Como por exemplo a diminuição observada no tamanho de *place fields* com o tempo de exposição de um animal ao ambiente e o aumento na taxa de disparo de *place cells* nos primeiros momentos de exposição de um animal àquele *place field* (Ahmed, 2009).

Interneurônios também possuem *place fields*, com altas taxas de disparos e ativação em quase todo o percurso de navegação (Wilent, 2007). A estimativa de que a quantidade de sinapses inibitórias à CA1 seja pelo menos o dobro daqueles excitatórios leva ao entendimento de um regime inibitório dominante nessa região. E um regime inibitório dominante pode explicar o grande número de *Silent cells* e a quase nula taxa de disparo de um neurônio piramidal fora de seu *place field* (Ahmed, 2009).

Diferenças entre neurônios piramidais de CA1 dorsais e ventrais também existem quanto à excitabilidade intrínseca. As células da região ventral são intrinsecamente mais excitáveis que na região dorsal, devido à maior resistência de entrada e à um potencial de repouso mais despolarizado observado no corpo celular e nos dendritos apicais dos neurônios ventrais. Morfologicamente os neurônios da região dorsal apresentam uma maior superfície dendrítica, o que pode afetar a diferença desses parâmetros eletrofisiológicos (Dougherty, 2012).

1.4. Ritmo

Análises de Eletroencefalograma de roedores durante navegação e exploração espacial demonstram um padrão de oscilação em torno de 6~10 Hz, chamado ritmo Theta, acoplado a uma oscilação mais rápida de frequência entre 30~90 Hz, Gamma, na região CA1 (Allen, 2016). Esse padrão é gerado principalmente pela combinação de *Inputs* via Córtex Entorrinal, CA3 e por correntes de Ca^{2+} via canais dependentes de voltagem dos dendritos das células piramidais de CA1 (Buzsáki, 2002).

Amplas evidências sugerem o envolvimento de interneurônios no processamento fásico do ritmo de oscilação hipocampal. Por exemplo, na camada de células piramidais esses neurônios disparam na fase descendente da onda Theta e consequentemente sugeridos como responsáveis pela magnificação da onda Gamma dessa fase (Bragin, 1995). Entretanto existem diversas populações de interneurônios espalhadas pelas demais camadas da região CA1 que não atendem ao mesmo padrão de ativação em relação à oscilação na mesma rede, e provavelmente estão atribuídos à outras funções (Klausberger, 2008)

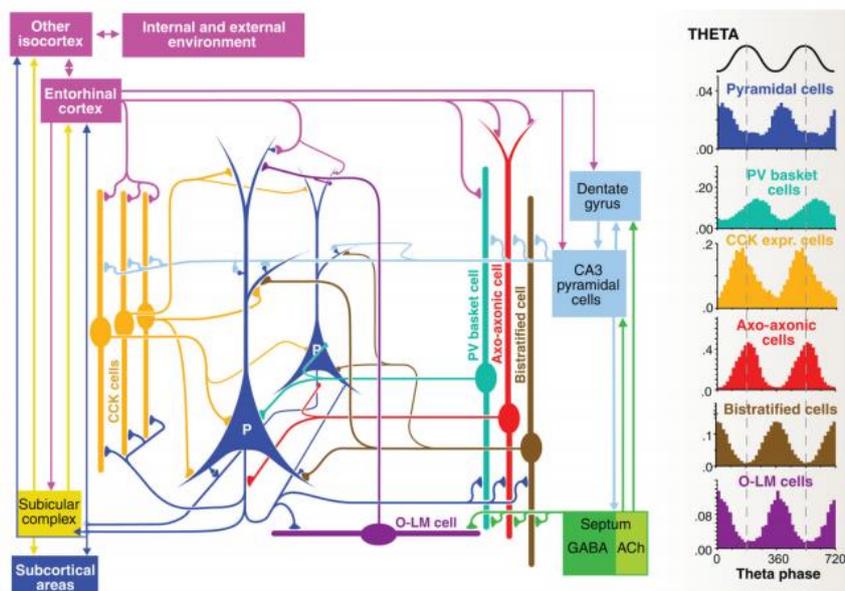


Figura 4 – Relação espaço-temporal de células piramidais e interneurônios. Diferentes padrões de conectividade entre as subpopulações de interneurônios em CA1 com células piramidais à esquerda. Taxa de disparo desses interneurônios em relação à oscilação tetânica, histograma à direita (Klausberger, 2008).

A amplitude e a fase da oscilação tetânica se alteram de acordo com a profundidade, atingindo amplitude máxima e frequência mais regular no *Stratum lacunosum-moleculare*, entretanto não apresenta variação em relação ao eixo sagital do tecido (Buzsáki, 2002).

Uma *place cell* tende a disparar cada vez mais cedo dentro do ciclo de oscilação tetânica, quando o animal entra no *place field* desta célula. Este processamento fásico quanto ao tempo do disparo é capaz de gerar um código temporal em função da posição do animal no ambiente (Ahmed, 2009).

Acredita-se que o ritmo tetânico seja um mecanismo ideal para sinalizar a plasticidade sináptica capaz de unir temporalmente a despolarização pós-sináptica nos dendritos das células piramidais de CA1 com os potenciais de ação que invadem esses dendritos retrogradamente (Buzsáki, 2002).

Dessa forma protocolos de estimulação de alta frequência utilizados para indução de potencialização sináptica na região de CA1 mimetizam a frequência de oscilação endôgena tetânica, estímulos repetidos em alta frequência (100 Hz) agrupados e separados entre si em frequência menor (5 Hz) e de experimentos relatam que estes protocolos são mais efetivos na indução de potencialização de longa duração em CA1(Larson, 2015).

1.5. Plasticidade Sináptica

A mais de um século atrás, neurofisiologistas começavam a estudar coativação de processos cerebrais, definidos como atividade sináptica, para explicar fenômenos de aprendizagem associativa (James, 1890; Tanzi, 1893). O conceito de “Plasticidade sináptica” surgiu em 1928, quando Wood-Jones e Portens propuseram uma hipótese biofísica de plasticidade baseada na “diminuição da resistência entre conexões fibrosas” que facilitaria a transmissão de impulsos nervosos e estaria correlacionada com o aprendizado (Wood-Jones e Portens, 1928). Em 1949 Hebb elaborou a hipótese que possivelmente desencadearia esse fortalecimento, baseada em alterações metabólicas nas células pré e pós- sinápticas, que aumentariam a eficácia da célula pré-sináptica desencadear o disparo na célula pós-sináptica (Hebb, 1949).

De acordo com Hebb, a proposta para formação e armazenamento de memória estaria baseada na duração da alteração desses padrões sinápticos desencadeados durante o aprendizado. Desde então, o avanço na neurociência permitiu o desenvolvimento dessa hipótese de níveis qualitativos à quantitativos, ao que é conhecido atualmente como mecanismo sináptico Hebbiano (Brown,1990).

1.6. Potencialização de Longa Duração - LTP

Em 1973, Bliss e Lomo relataram pela primeira vez um fenômeno de potencialização sináptica induzida por estimulação elétrica em alta frequência, no Giro dentado, região do encéfalo já conhecida por participar na formação da memória. Esse evento foi denominado de “Potencialização de Longa Duração”, abreviado em inglês como LTP (Bliss, 1973). A relativa facilidade eletrofisiológica, capacidade de manipulação, e gigantesca capacidade de correlação desse tipo de experimentação com outros tipos de experimentos, tais como estudos comportamentais e farmacológicos, tornaram a LTP uma ferramenta muito popular entre os neurocientistas.

Análises a fundo quanto a Potencialização sináptica induzida por estímulo de alta frequência corroboram a teoria de plasticidade sináptica proposta por Hebb. Com o passar dos anos estudos de LTP se expandiram a todo encéfalo, mas sua popularidade continua à cerca da fisiologia sináptica no Hipocampo, e à busca da correlação desse tipo de evento com a aprendizagem e a memória (Nicoll, 2017).

1.7. LTP Biofísica e Bioquímica

Classicamente a Potencialização sináptica entre CA3-CA1 é descrita como dependente de NMDAR (Receptor N-metil-D-aspartato), AMPAR (Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico), KAR (Receptor cainato), e VGCC (Canais de cálcio dependentes de voltagem) na membrana pós-sináptica. NMDAR, AMPAR e KAR são receptores para glutamato classicamente descritos com função ionotrópica. (Bliss, 2011).

NMDA também é ativado por variação no potencial de membrana, como são os VGCC, porém por mecanismos distintos. No caso de receptores NMDA, sua sensibilidade à voltagem é essencial para liberar Mg^{2+} que ocupa o poro do receptor NMDA enquanto a membrana plasmática está em um potencial de repouso. Mg^{2+} deve ser excluído do poro, coincidentemente à ligação do glutamato ao receptor para que seja possível o fluxo catiônico. Por isso, LTP em *Schaffer colaterals* é usualmente descrita como um fenômeno associativo quanto à atividade de NMDA.

A despolarização necessária capaz de liberar Mg^{2+} de NMDAR é relativamente forte, o que leva a crer em uma necessidade de ativação concomitante de vários axônios pré-sinápticos para que haja indução de LTP, por sua vez um fenômeno descrito como cooperativo (Siegelbaum, Kandel; 2014).

O Glutamato liberado pelo neurônio pré-sináptico, em um botão sináptico, se liga a seus receptores supracitados, e desencadeia um influxo de cátions, principalmente Ca^{2+} e Na^+ na célula pós-sináptica. A entrada de carga positiva para dentro da célula gera uma despolarização da membrana plasmática capaz de ativar canais sensíveis à voltagem e intensificar esse influxo iônico. O influxo de Ca^{2+} , por sua vez, é capaz de ativar cascatas de sinalização essenciais para a plasticidade sináptica (Blaustein, 2012). Especificamente para esse sistema a entrada de Ca^{2+} via VGCC se dá principalmente por corrente do tipo-L (Westenbroek, 1990; Moosmang, 2005).

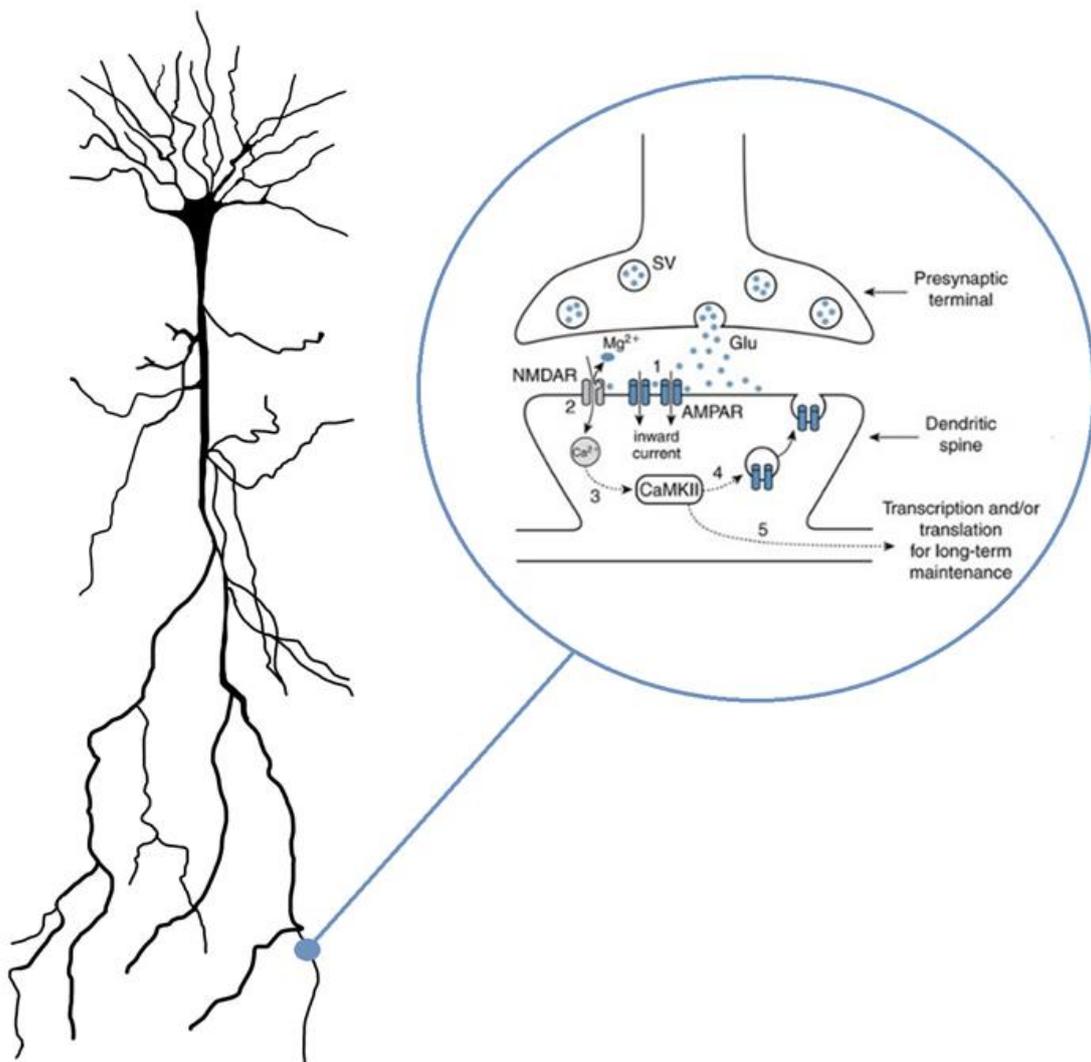


Figura 4 – Sinalização para a LTP em um botão sináptico. Ilustração de uma célula piramidal à esquerda e ilustração da via clássica simplificada da geração de LTP a partir da sinalização por Ca^{2+} via ativação de NMDAR e AMPAR.

À curto prazo, Ca^{2+} promove o tráfego de receptores AMPA, de vesículas intracelulares, à membrana plasmática. Esse aumento de disponibilidade de receptores aumenta a resposta pós-sináptica à determinada quantidade de neurotransmissor. Quanto à potencialização sináptica de longa duração, são descritas várias vias secundárias de ativação genética, mRNA, e síntese de novos receptores, e dendritogênese via sinalização de Ca^{2+} , por calpaína, CamKII, PKC e tirosinas-quinase, por exemplo (Blaustein, 2012).

Existem também grandes indícios de que potenciais de ação dendríticos participem nessa regulação da flutuação do potencial de membrana dendrítica e regulem o fluxo de carga, via NMDA e VGCC, e sinalização intracelular (Bono, 2017).

Como nosso trabalho se restringe a análise dessa variação de potencial extracelular pós-sináptico, não entramos à fundo nas vias bioquímicas da LTP, tanto quanto no participação pré-sináptica desse tipo de evento apesar de diversos trabalhos mostrarem o papel pré-sináptico da LTP (Madison, 1991; Hardingham, 2013) e das cascatas de sinalização para desencadeamento e manutenção deste tipo de potencialização (Briz, 2016; Baudry, 2015)

1.8. Arquitetura eletrônica no Hipocampo CA1

Apesar da maioria dos estudos farmacológicos e comportamentais combinados com dados eletrofisiológicos considerarem a população de células piramidais na região de CA1 como homogênea, o avanço na neurobiologia mostra cada vez mais evidências da existência de uma segregação espacial e temporal quanto a atividade biofísica desses neurônios e os circuitos em que eles integram.

Todas as informações citadas anteriormente, como segregação de conectividade, disponibilidade heterogênea espaço-temporal de atividade de interneurônios, diferença na capacidade de neurônios em responder ou não à navegação espacial, sugerem que a formação hipocampal não deve ser tratada como um circuito único, mas como uma rede integrada de microcircuitos.

Hebb já havia postulado em 1949 a hipótese de *cell assemblies*, onde populações de neurônios trabalham juntos na codificação e decodificação de informação através do sistema nervoso. Essa propriedade se baseia no fato de um único neurônio estar mais susceptível a erros na propagação de informação a partir de falhas no disparo de potenciais de ação. Atribuir essa informação à atividade elétrica de mais de um neurônio reduz essa taxa de erro, uma vez que a informação é relativa agora a população de neurônios funcionando em cooperação (Hebb, 1949).

Relativo à memória esse conceito se expande às hipóteses de *neuron ensembles* e engramas neurais, onde a memória não possui sítios fixos e unitários de armazenamento, mas padrões de conectividade baseados em conjuntos de neurônios e sinapses ao longo de diversas regiões do sistema nervoso central, formando microcircuitos segregados e interconectados (Poo, 2016). Essa clusterização espacial e concomitante da atividade elétrica de neurônios individuais pode ser observada no Hipocampo à partir de estudos ópticos de fluorescência gerada por transiente de Ca^{2+} ao longo de experimentos comportamentais com abordagens focadas no estudo da memória (Cai, 2016).

Entretanto esse conceito não se restringe à abordagens cognitivas, novos estudos baseados em modelagens computacionais sugerem a existência de microcircuitos em sub-regiões do Hipocampo, baseados em padrões de anatomia, conectividade e excitabilidade intrínseca, que sejam capazes de fornecer informações sobre os papéis funcionais das diferentes famílias de neurônios e interneurônios no processamento de informação, plasticidade sináptica e oscilações de redes (Cutsuridis, 2009).

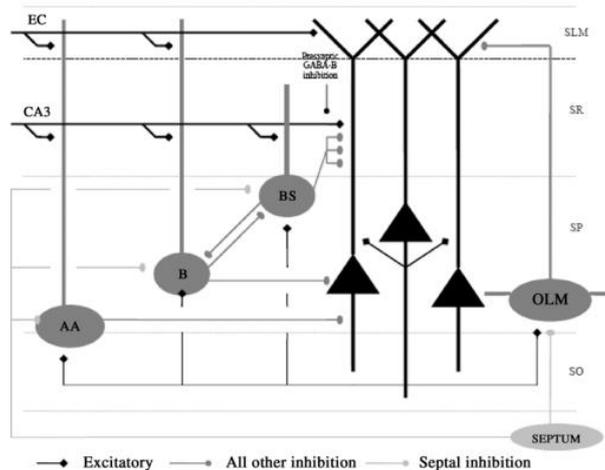


Figura 5 – Modelo ilustrativo de um microcircuito em CA1. Segregação de células piramidais (preto), a partir dos diferentes padrões de inibição exercidos pelos interneurônios (cinza). AA: Axo-axonic cell, B: basket cell; BS: bistratified cell; OLM: oriens lacunosum-moleculare cell (Cutsuridis, 2009).

À cerca da heterogeneidade populacional dos neurônios piramidais em CA1, a modelagem computacional sugere a existência de microcircuitos isolados espaço-temporalmente por interneurônios, capaz de gerar o padrão de oscilação tetânica a partir da adaptação na frequência de disparo de potenciais de ação e recuperação pós-inibitória (Ferguson, 2017).

A atividade temporal de interneurônios na modulação da plasticidade sináptica restrita à microcircuitos é evidente, por exemplo, em estudos de potencialização de células unitárias por *patch-clamp*, como na chamada plasticidade dependente do tempo de disparo ou de *input* (*Spike timing-dependent plasticity – STDP, Input timing-dependent plasticity - ITDP*), onde o nível de potencialização é estipulado por um balanço LTP/LTD, dependente da combinação temporal, *timing*, entre o potencial de ação pré e pós-sináptico. Neste sistema a janela de coincidência entre os *spikes* é controlada diretamente por inibição via GABA (Leroy, 2017; Cutsuridis, 2009; Bono, 2017).

A existência de subdivisões espaço-temporais de células piramidais promovida por interneurônios inibitórios permite a criação de modelos mais próximos da realidade biológico em relação à modelos de rede artificiais e dá novas direções a compreensão do armazenamento fisiológico das diversas formas de memórias atribuídas ao Hipocampo (Klausberger, 2008; Cutsuridis, 2010).

2. Hipótese

Há grande quantidade de evidências relatada na literatura que sugere uma segregação espaço-temporal em microcircuitos no hipocampo controlada pela conectividade através de interneurônios e por características intrínsecas quanto às propriedades eletrofisiológicas dos neurônios piramidais.

Este código de controle espaço-temporal é aplicado ao estudo da geração e modulação dos padrões de oscilação do Hipocampo frente aos diversos padrões comportamentais de um roedor. Também é utilizado para explicar como células específicas à codificação de localização espacial no Hipocampo e Córtex Entorrinal comunicam entre si de modo efetivo para formação da memória.

A dependência entre o balanço excitatório/inibitório em CA1 é evidente para formação de formas singulares de plasticidade, restrita à análise de células independentes, como em eventos de STDP e ITDP por exemplo, regido pela comunicação entre neurônios piramidais e interneurônios.

A formação da memória e correlação desta com o ritmo de oscilação do Hipocampo não se restringe apenas à conectividade, e dessa forma não pode ser explicada apenas pela disposição heterogênea de microcircuitos. Existe também uma necessidade de dinamismo para o padrão de conectividade entre os microcircuitos, capaz de gerar padrões de segregação temporal na atividade dos neurônios hipocampais. Essa dinâmica entre a conectividade é conferida à partir de diversos eventos de plasticidade sináptica, tanto àqueles que podem levar a potencialização ou depressão de uma sinapse.

Frente à essa evidente segregação de microcircuitos na região de CA1, diretamente relacionada ao ritmo de oscilação e à plasticidade sináptica, hipotetizamos haver também uma segregação de susceptibilidade de potencialização sináptica induzida por estímulo tetânico em campo, a partir de uma segregação de vias regida possivelmente por padrões similares àqueles que controlam a segregação de microcircuitos.

3. Justificativa

Estudos de Potencialização de longa duração induzida por estimulação por alta frequência e registrada por variação de potencial extracelular em campo usualmente consideram como homogêneas as vias pré e pós-sinápticas estudadas, o que confere uma alta variabilidade nas taxas de LTP obtidas em regiões hipoteticamente estáticas do hipocampo. Apesar de grande parte destes trabalhos de LTP induzida por TBS ou HFS e registrada por fEPSP não terem como o objetivo o estudo à cerca de micro-conectividade, mas sim de testes farmacológicos e comportamentais, acreditamos não ser essa uma forma fidedigna de se estudar potencialização sináptica frente à grande variabilidade que uma única fatia de uma região do hipocampo pode apresentar quanto à susceptibilidade de plasticidade em diferentes regiões da mesma.

Neste trabalho buscamos estudar a existência de uma segregação de vias quanto à susceptibilidade de potencialização sináptica frente à estimulação tetânica capaz de ser medida por registro de variação de potencial extracelular em campo.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Avaliar como a potencialização de longa duração induzida por estimulação tetânica e registrada por variação de potencial de campo excitatório pós-sináptico pode variar em diferentes vias na região CA1 de uma mesma fatia do Hipocampo Dorsal.

4.2. Objetivo Específico

Avaliar a LTP evocada por TBS em uma posição fixa de estimulação, e diferentes posições de registro.

Avaliar a LTP evocada por TBS em uma posição fixa de registro e diferentes posições de estimulação.

5. Materiais e Métodos

5.1. Animais

Nesse trabalho foram usados 10 camundongos machos C57-BL6 com idade de 6 a 10 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB - UFMG. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Protocolo: 254/2017.

Os animais foram sacrificados por decaptação com anestesia previa imediata à 0,3mL de Isoflurano 100% (1mL/mL) – CRISTÁLIA. A anestesia foi aplicada por inalação. Os animais foram contidos em uma caixa fechada (10x10x10cm) onde o isoflurano foi gotejado. Foi esperado o tempo necessário para que o animal desacordasse para a decaptação. Após decaptação todo o encéfalo foi retirado imerso na Solução Artificial Cerebral Espinhal (aCSF), **Tabela 1**, em torno de 0°C e levado ao fatiador.

5.2. Fatias do Hipocampo

Foram usadas fatias de 0,4mm do Hipocampo dorsal, Bregma~-2mm, ilustradas na **Figura 6**. A obtenção das fatias se deu a partir do vibrátomo Leica VT1000. Durante todo o processo o tecido foi mantido em aCSF à 0°C e constantemente tamponado por borbulhação de carbogênio (95% CO₂, 5% O₂). Após o fatiamento foram separados os hemisférios e retirado a porção do Córtex cerebral. As fatias foram então transferidas à câmaras com aCSF à 35°C por 45 minutos e em seguida à temperatura ambiente (~25°C) por mais 45 minutos, e então levadas ao set-up de eletrofisiologia.

Esse procedimento é descrito rotineiramente na literatura como a melhor maneira de se obter fatias provenientes do encéfalo para fins de estudos eletrofisiológicos (Bortolotto, 2001).

Solução artificial cerebral-espinhal – aCSF	
Reagente	Concentração (mM)
NaCl	125
KCl	2,5
NaHCO ₃	25
NaH ₂ PO ₄	1,25
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
Glicose	25
Myo-Inositol	3
Ácido-ascórbico	0,4
Piruvato	2
pH = 7,4 tamponado com 5% CO ₂	

Tabela 1: Solução artificial cerebral-espinhal (aCSF)

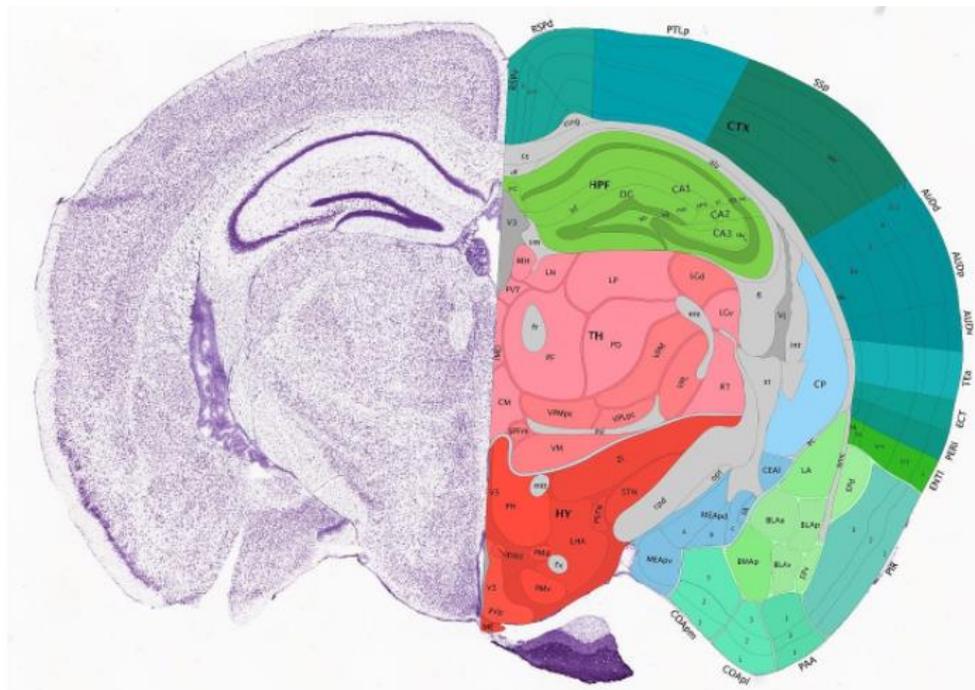


Figura 6 - Fatia ilustrativa do encéfalo de camundongo em Bregma -2mm. Corte histológico à esquerda e esquema representativo à direita de uma fatia coronal do encéfalo de camundongo em Bregma: -2mm. Em verde claro, a região do hipocampo utilizada em nosso trabalho. HPF: Hippocampal formation; DG: Dentate gyrus; CA1, 2, 3: Cornus ammons 1, 2, 3. Imagem obtida de Allen Brain Maps.

5.3. Eletrofisiologia

5.3.1. Set-up

A aquisição dos dados se deu a partir de um set-up de eletrofisiologia convencional, isolado eletricamente do exterior por uma gaiola de Faraday e mecanicamente por uma mesa suspensa por nitrogênio. As fatias do Hipocampo foram colocadas na câmara de experimentação com um fluxo constante de 3mL/min de aCSF, à 25°C, mantido por um sistema de bombeamento Pump P-1 (Pharmacia Biotech) e de temperatura TC-324C (Warner Instruments).

Para registro foram utilizados eletrodos de prata dentro de capilares de vidro boro-silicato (World Precision Instruments), com resistência de 3M Ω , manipulada por um estirador PP-830 (Narishige).

Para estimulação elétrica foi utilizado um eletrodo bipolar concêntrico (FHC-neuralMicrotargeting), a partir de um amplificador Axopatch 200 (Axon Instruments), ligado à um estimulador Grass SD9 (Grass Instruments). Utilizamos os softwares WCPv4.9.5 (Gentilmente cedido por John Dempster, University of Strathclyde) e Clampfitv10.3 (Molecular Devices) para aquisição e análise dos dados, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em *current-clamp*. Foi utilizada uma câmera DAGE-MTI para aquisição de imagens digitais. Para análise os registros eletrofisiológicos foram filtrados à 500 Hz, em uma frequência de amostragem de 41666,7 Hz.

5.4. Estratégia experimental

5.4.1 Protocolos de estimulação

5.4.1.1 Linha de base

Para analisar os efeitos da potencialização sináptica comparamos os *slopes* (dV/dt) obtidos dos fEPSP antes e após a estimulação tetânica fazendo uma linha de base de 30 sweeps obtidos por estimulação frequente a cada 30 segundos. Como a estimulação tetânica induz uma alta variabilidade imediata nos sinal pós-sináptico, geralmente nos primeiros 5 minutos, nós consideramos apenas os *slopes* após estabilização do sinal, após 10 minutos.

A estipulação da voltagem de estimulação foi determinada a partir de uma curva de crescimento do sinal em função do crescimento do estímulo aplicado, chamada aqui de curva de entrada e saída (*Inward/Outward - I/O*).

A fim de minimizar a quantidade de vias ativas para estudarmos o fenômeno em vias paralelas em uma mesma fatia, estipulamos um valor ideal percentual em relação ao sinal máximo obtido na curva de entrada e saída, em torno de 30%. Esse valor correspondeu, em nosso sistema à uma estimulação em torno de 20V, gerando um slope de -0,2mV/ms à 450 μm do eletrodo de estimulação, e -0,5mV/ms à 150 μm .

5.4.1.2. Curva de entrada e saída – *Inward/Outward - I/O*

A curva de entrada e saída foi realizada antes de cada experimento, a fim de se determinar a resposta máxima obtida no *slope* em relação ao estímulo aplicado. O protocolo de estimulação corresponde ao aumento gradual da estimulação em 5V a cada 30 segundos a partir de 10V até 40V.

5.4.1.3. Facilitação por pulso pareado – PPF

A facilitação por pulso pareado é considerada um fenômeno de plasticidade sináptica de curta duração, dependente da porção pré-sináptica. Conforme usualmente descrito na literatura utilizamos pulsos pareados à 50ms (Ito, 2012).

5.4.1.4. Estimulação tetânica, *Theta Burst Stimulation* - TBS

Nesse trabalho utilizamos 3 grupos de 4 pulsos, como mostrado na **Figura 7**. A voltagem utilizada para a estimulação foi a mesma utilizada para se medir o sinal basal antes e depois do TBS, determinada previamente ao experimento à partir da curva de entrada e saída, como descrito anteriormente.

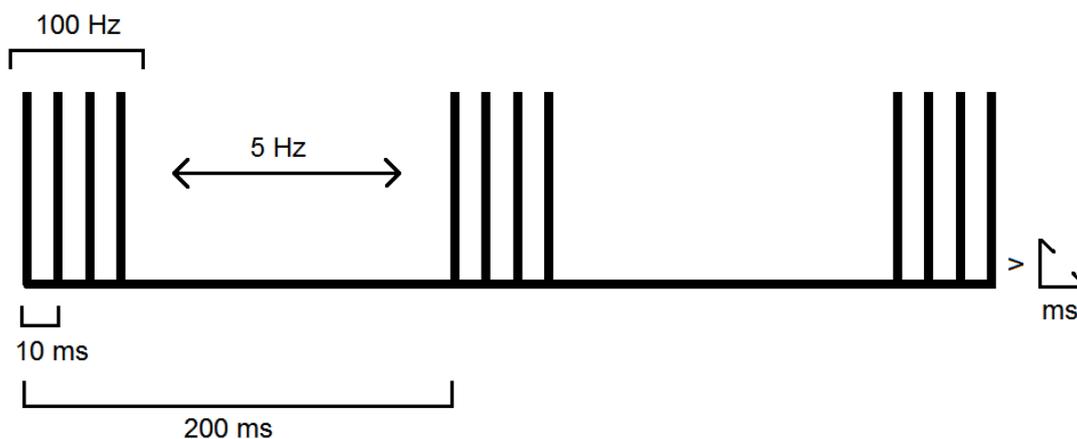


Figura 7 - *Theta Burst Stimulation* – TBS. 4 pulsos agrupados em *bursts* de estimulação com frequência *intra-burst* de 100 Hz e *inter-burst* de 5 Hz. *Bursts* foram repetidos 3 vezes.

5.4.2. Análise do Potencial Pós-sináptico Excitatório em Campo – fEPSP

Todos os resultados analisados nesse trabalho são baseados na velocidade de decaimento referente a tensão pós-sináptica da curva de fEPSP. Essa análise é feita a partir da derivada (mV/ms) da fase de ascensão em sentido negativo da curva. Por convenção as rotinas de análise referente exclusivamente a tensão pós-sináptica não compreendem amplitude do pico e integral da curva, pois usualmente esta apresenta fase de ascensão positiva, referente ao potencial de ação dendrítico, independente da velocidade de decaimento inicial ou da constante de decaimento da fase capacitiva final.

Um traço típico de fEPSP como é observado no osciloscópio está representado na **Figura 8**. Esse padrão de variação no potencial de campo apresenta diversas fases, referentes aos diversos eventos biofísicos de membrana pós-sináptica descritos à seguir.

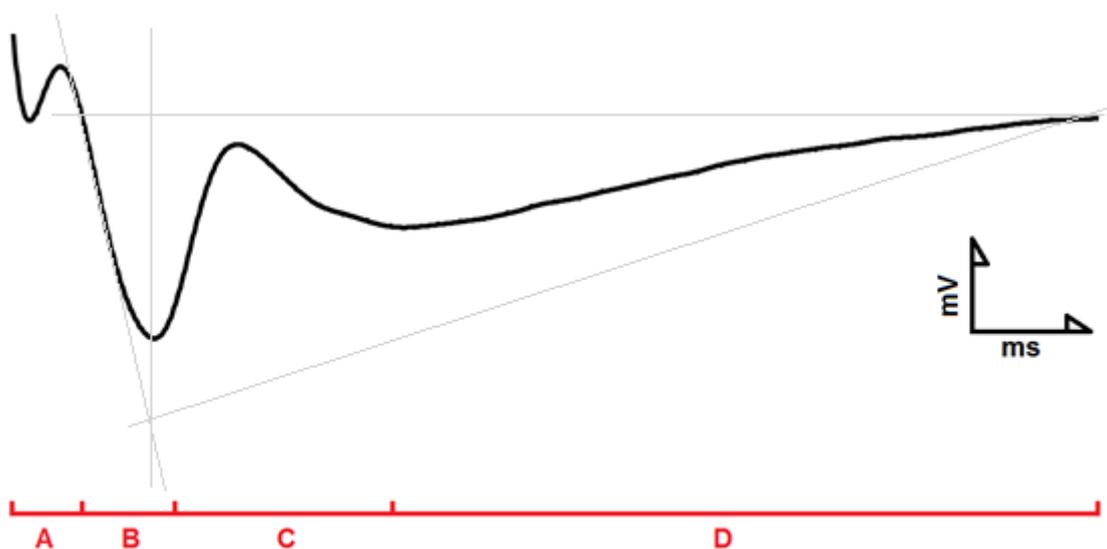


Figura 8 - Traço típico de um fEPSP. A: *Fiber volley*; B: *Slope*; C: *Population spikes*; D: Decaimento capacitivo.

A - *Fiber volley*: Essa primeira fase de hiperpolarização em campo observada é referente à potenciais de ação pré-sinápticos. Devido à sua pequena amplitude e baixa razão sinal x ruído, não é usualmente considerada em análises de fEPSP. Entretanto esse sinal é útil como parâmetro de qualidade da fatia. Geralmente quanto maior for a razão do fEPSP/*Fiber volley* mais saudável está o tecido. (Abrahamsson, 2016).

B – *Slope*: Essa fase de hiperpolarização negativa em campo é referente ao balanço de influxo de carga positiva para dentro dos neurônios pós-sinápticos. Principalmente Na⁺ e Ca²⁺ via AMPAR e NMDAR. Análise dessa fase é feita a partir da derivada da curva (Velocidade de decaimento – mV/ms) (Bortolotto, 2001).

C – *Population Spike*: Do inglês “População de potenciais de ação”. Essa mudança de fase na curva do fEPSP usualmente aparece em grandes sinais de Hiperpolarização em campo pós-sináptico, mas não está diretamente relacionado à este. É referente aos potenciais de ação dendríticos pós-sinápticos, e pode ser facilmente distinguido dos potenciais de ação pré-sinápticos pela latência e pela modulação por facilitação sináptica via pareamento de estimulação (PPF) (Bortolotto, 2001).

D – Decaimento: Essa despolarização final em campo corresponde à corrente capacitiva na membrana plasmática, diretamente proporcional à hiperpolarização pós-sináptica observada no *Slope* da fase B (Bortolotto, 2001).

5.4.3. Experimentos

5.4.3.1. Protocolo para avaliar dispersão da LTP com posição fixa de estimulação

Nesta primeira série de experimentos estipulamos uma posição fixa de estimulação em uma fatia do hipocampo dorsal Bregma:~-2mm, Interaural:~-1,7mm, e 4 posições de registro equidistantes em relação ao eletrodo de estímulo (+150µm; +300µm; +450µm; +600µm). Como não contamos com mais de um amplificador, o registro nas 4 posições diferentes não pode ser concomitante. Assim, revezamos o eletrodo de registro em cada uma das posições sequencialmente antes e depois da estimulação pelo TBS. A fim de minimizar o erro que a retirada e reinserção do eletrodo na fatia pudessem apresentar, e o dano tecidual causado, minimizamos o nível de inserção vertical do capilar no tecido e medimos 3 linhas de base de pelo menos 5 minutos para cada posição intercalada, **Figura 9**. Desta forma esperamos medir como a estimulação por TBS poderia funcionar em regiões diferentes pós-sinápticas na mesma fatia do hipocampo. A fim de evitar metaplasticidade, os protocolos de PPF e I/O foram minimizados e restringidos apenas às posições 1 e 3 de registro.

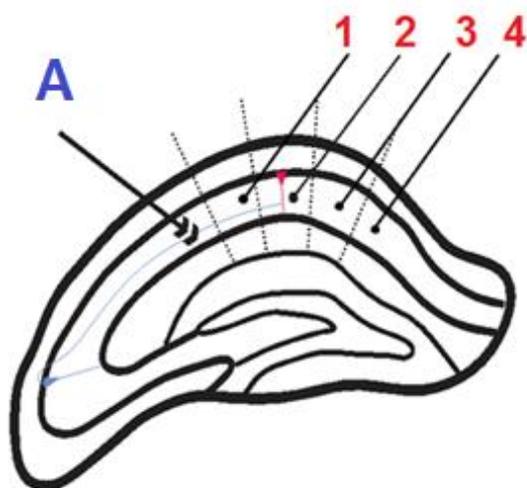


Figura 9 - Algoritmo para experimento de estimulação fixa: I/O + PPF para as posições 1 e 3; Linha de Base para as posições 1,2,3 e 4; TBS; Linha de Base para as posições 1,2,3 e 4;

I/O + PPF para as posições 1,2,3 e 4. (Posição 1: 150 μ m de distância do estimulador; 2: 300 μ m; 3: 450 μ m; 4: 600 μ m).

5.4.3.2. Protocolo para avaliar dispersão da LTP com posição fixa de registro

Para avaliar o nível de potencialização sináptica no que corresponderiam à vias diferentes pré-sinápticas definimos uma posição fixa de registro, inicialmente à 450 μ m do estimulador, e em seguida reduzimos essa distância para 150 μ m, movendo o estimulador no sentido do eletrodo de registro. E em um 3º passo movemos novamente o estimulador, agora à posição inicial.

Nesse experimento foram aplicados então 3 TBS sequenciais em duas posições diferentes de estímulo e uma posição fixa de registro. O primeiro TBS à 450 μ m, o segundo à 150 μ m, e o terceiro novamente à 450 μ m. Comparamos então o nível de potencialização gerado em cada posição, por cada TBS. Para o controle desse experimento aplicamos 3 TBS em posição fixa de estímulo e registro em uma janela de tempo correspondente ao experimento de troca de posição de estímulo. Dessa forma procuramos avaliar se vias pré-sinápticas paralelas poderiam estar segregadas por uma susceptibilidade à potencialização induzida por estímulo de alta frequência.

Figura 10.

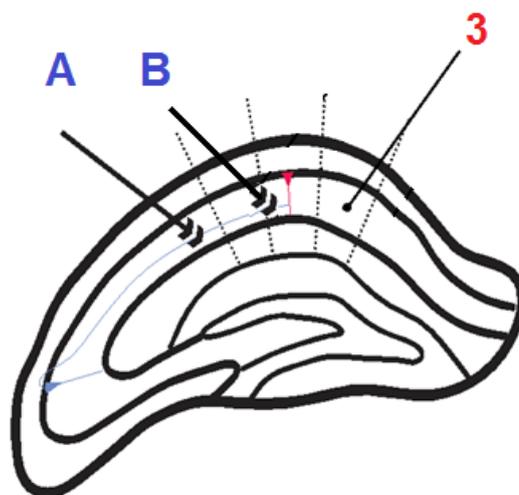


Figura 10 - Algoritmo para experimento de registro fixo: I/O + PPF + Linha de Base na posição de estímulo A (+450 μ m); TBS; PPF + Linha de Base + PPF + I/O. Avanço do eletrodo

de estimulação para posição B (+150 μ m); I/O + PPF + Linha de Base; TBS; PPF + Linha de Base + PPF + I/O. Volta do eletrodo de estimulação para posição A; I/O + PPF + Linha de Base; TBS; PPF + Linha de Base + PPF + I/O.

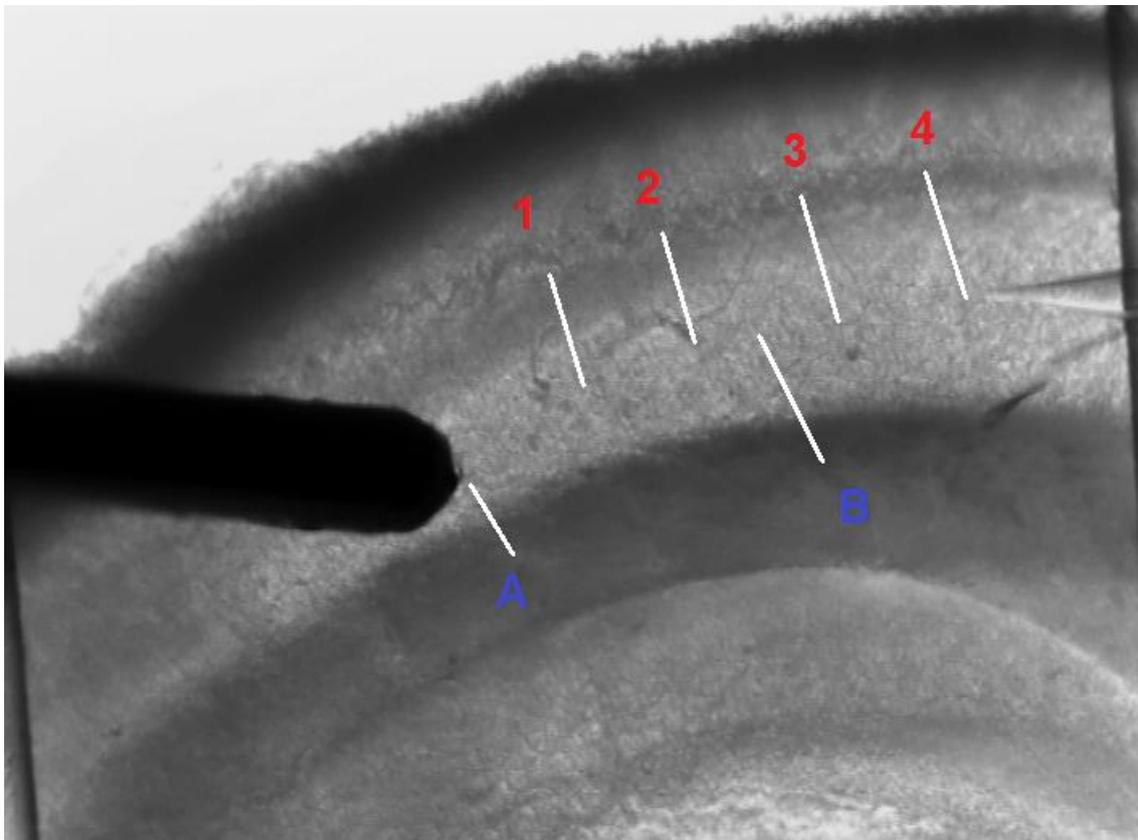


Figura 11 - Região representativa do Hipocampo dorsal. Imagem microscópica, aumento 4x, de uma fatia típica utilizada em nossos experimentos, da região de CA1 do hipocampo, Bregma: -2mm. À esquerda eletrodo de estímulo na posição A. Na extrema direita capilar com eletrodo de registro na posição 4. A e B correspondem as duas posições de estimulação determinadas, e 1, 2, 3 e 4 correspondem às quatro posições de registro (+0,15mm; +0,30mm; +0,45mm; +0,60mm).

5.4.4. Estatística

Para análise estatística e construção dos gráficos foram utilizados os softwares GraphPad Prism 5 e SciDAVis. A comparação entre duas populações, quando necessária, foi realizada pelo teste-t *student*, pareado e não pareado.

Para determinação dos intervalos de confiança de 95% a partir do Coeficiente de Pearson (r^2) das regressões lineares foi utilizado a sequência de equações à seguir (Loftus, 1988):

Primeiramente o Coeficiente de Pearson é transformado no Coeficiente de Fisher (z):

$$z = 0,5 \ln \left(\frac{1+r}{1-r} \right) \quad (Eq. 1)$$

O erro padrão (SE) de z é dado por:

$$SE = \sqrt{\frac{1}{(n-3)}} \quad (Eq. 2)$$

Os intervalos de confiança de 95% para z são obtidos por:

$$IC(95\%) = z \pm (1,96)(SD) \quad (Eq. 3)$$

Então esses valores são transformados novamente no Coeficiente de Pearson (r) pelo inverso da Eq.1:

$$r = \frac{e^{2z} - 1}{e^{2z} + 1} \quad (Eq. 4)$$

Para facilitar a visualização dos resultados e evitar interpretações errôneas, os dados obtidos nesse trabalho não foram normalizados, e os valores de *Slope*

(dV/dt) estão relatados em função modular e referenciados apenas por fEPSP. Entretanto os valores reais da derivada dessa fase do fEPSP foram negativos.

6. Resultados

6.1. Potencialização com posição fixa de estimulação

6.1.1. LTP

Inicialmente buscamos observar como a potencialização sináptica evocada por TBS acontece em quatro posições equidistantes da posição de estimulação (1= +150 μ m; 2= +300 μ m; 3= +450 μ m e 4 = +600 μ m), com posição fixa de estimulação. A análise do slope dos fEPSP nas quatro regiões diferentes de registro nos mostrou uma queda exponencial do sinal basal pós sináptico à medida que a posição de registro se afasta da posição de estímulo, (constante de decaimento $\lambda = 172 \pm 56\mu\text{m}$). Na **Figura 12 B** estão plotados traços representativos, como observado no osciloscópio para as quatro regiões, antes e depois da estimulação por TBS, em mV/ms.

Na **Figura 12 C** ilustramos o trecho de um *scatter plot*, do momento em que foi aplicado o estímulo TBS. Pode se observar o aumento dos valores dos pontos para cada região, após a estimulação pelo TBS, nesse caso aplicado quando o eletrodo de registro estava posicionado na posição 3. Esse gráfico também ilustra a janela temporal utilizada para estabilização do sinal imediato após o TBS, para que então pudéssemos trocar a posição de registro.

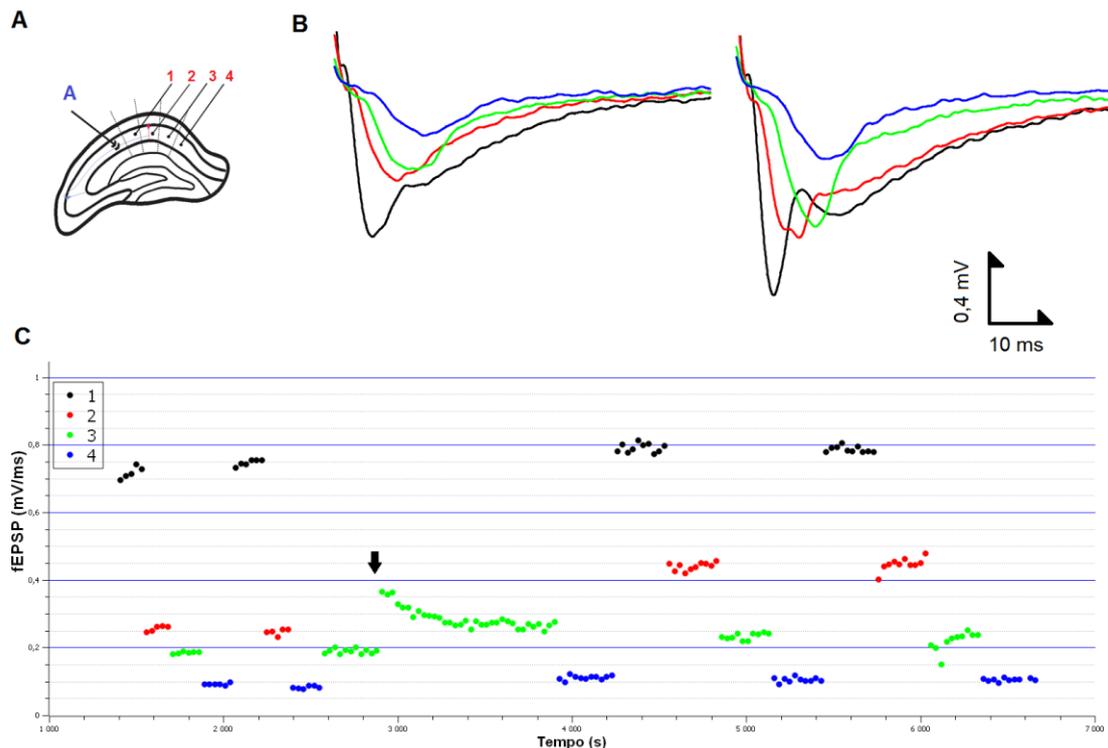


Figura 12 - Experimento com posição fixa de estimulação. A: Esquema ilustrativo do experimento com posição fixa de estimulação (A) e quatro posições equidistantes de registro (1, 2, 3 e 4). B: Traços ilustrativos dos formatos dos fEPSP registrados nas quatro posições, antes (à esquerda) e depois (à direita) da estimulação por TBS, dados são mostrados em mV/ms. Preto: Posição 1, Vermelho: 2, Verde: 3, Azul: 4. C: *Scatter plot* ilustrativo do valor dos fEPSP, ao longo de um experimento ilustrativo com o momento em que foi aplicado o TBS (seta preta), para as quatro posições de registro. Os fEPSP são representados aqui em valores absolutos de sua inclinação (mV/ms) em função do tempo (s).

A análise do fEPSP após a estimulação por TBS nos mostrou que a taxa de potencialização com posição fixa de estímulo foi equivalente nas quatro regiões. Isso significa, o nível de potencialização observado na posição mais próxima da estimulação é o mesmo, percentualmente, àquele nas demais regiões, independente dos valores de fEPSP basais de cada região, **Figura 13**.

O estímulo por TBS não alterou significativamente a constante de decaimento espacial do sinal para o afastamento do registro em relação ao estímulo, como é mostrado na **Figura 13 B**.

Não observamos diferença estatística na taxa de potencialização nas quatro regiões diferentes, **Figura 13 C**, ao realizarmos teste-t comparando a taxa de potencialização na região 1 com cada uma das outras regiões.

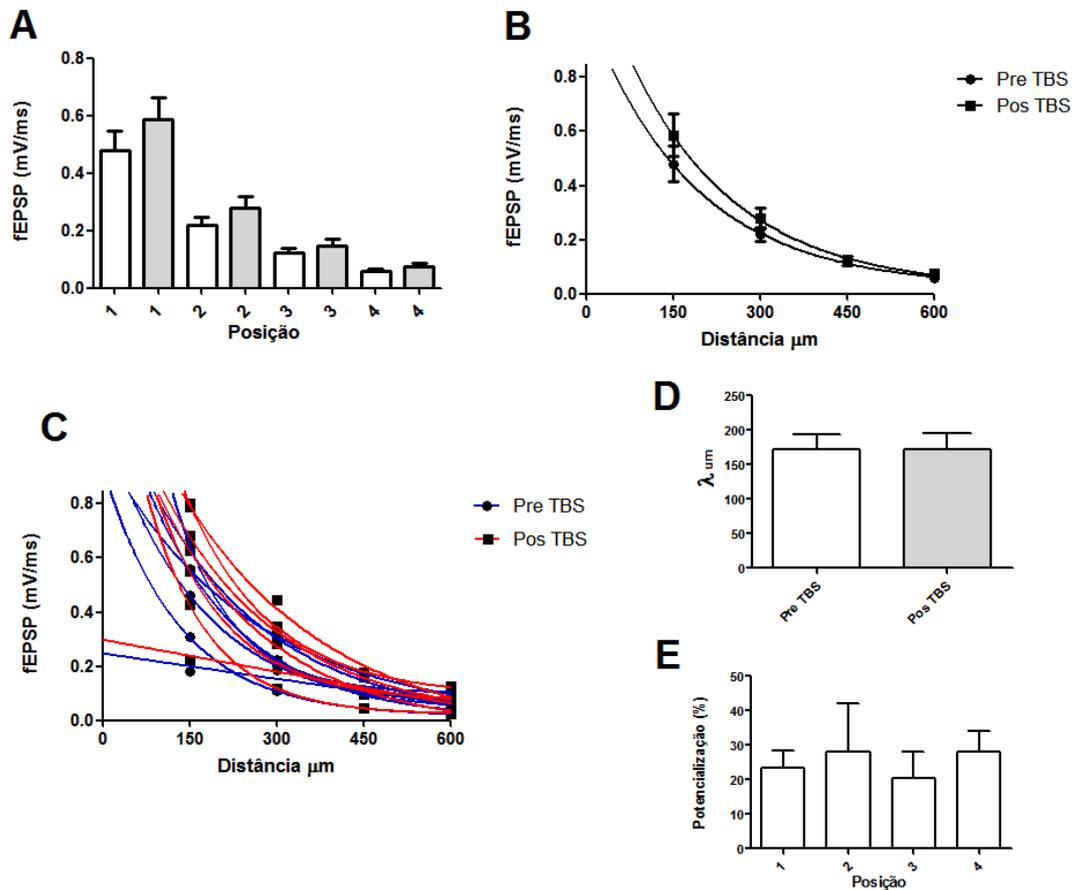


Figura 13 - Decaimento do fEPSP pré e pós TBS em função do espaço. A: Valores (Média \pm erro padrão) do fEPSP registrado nas quatro posições de registro, antes (branco; 1: $0,48 \pm 0,18$ mV/ms; 2: $0,22 \pm 0,07$ mV/ms; 3: $0,12 \pm 0,05$ mV/ms; 4: $0,06 \pm 0,02$ mV/ms) e depois (cinza; 1: $0,59 \pm 0,20$ mV/ms; 2: $0,28 \pm 0,11$ mV/ms; 3: $0,15 \pm 0,06$ mV/ms; 4: $0,08 \pm 0,04$ mV/ms) da estimulação por TBS. B: Decaimento mono-exponencial dos valores de fEPSP para as quatro posições de registro antes ($\lambda = 183,6$ μ m) e depois ($\lambda = 186,4$ μ m) da estimulação por TBS. C: Ajuste de decaimento mono-exponencial do fEPSP individual para cada experimento em função do espaço (λ), antes (azul) e depois (vermelho) da estimulação por TBS. D: Análise estatística das médias \pm desvio padrão de λ , antes ($172,1 \pm 55,58$ μ m; branco) e depois ($172,4 \pm 56,41$ μ m; cinza). Não foi observada diferença estatística no teste-t ($p > 0,05$). E: Média \pm desvio padrão do nível de potencialização dada em percentual para cada posição de registro (1: $23,48 \pm 13,14$ %; 2: $28,05 \pm 37,15$ %; 3: $20,38 \pm 20,68$ %; 4: $28,14 \pm 15,87$ %), $n=7$. Não foi observada diferença estatística no teste-t ($p > 0,05$ entre todos os grupos).

Analizamos também a taxa de decaimento do sinal entre as posições 1 e 2, e 3 e 4, o que corresponde a distâncias equivalentes entre si, 150 μ m, mas diferentes em relação ao estimulador, Figura 14. Os valores médios de fEPSP comparados entre 1 e 2; e 3 e 4, antes e depois do TBS estão mostrados em A e C respectivamente.

A análise da taxa de decaimento do sinal pelo espaço de 150 μ m, obtida pela médias das regressões lineares entre os dois grupos de posição não mostrou diferença estatística no teste-t, frente à estimulação pelo TBS, **Figura 14 B e D**. Essas análises ilustram as evidências anteriores de que a potencialização por TBS não altera a taxa de decaimento de sinal em função do espaço, e é proporcional para as quatro diferentes posições de registro estudadas.

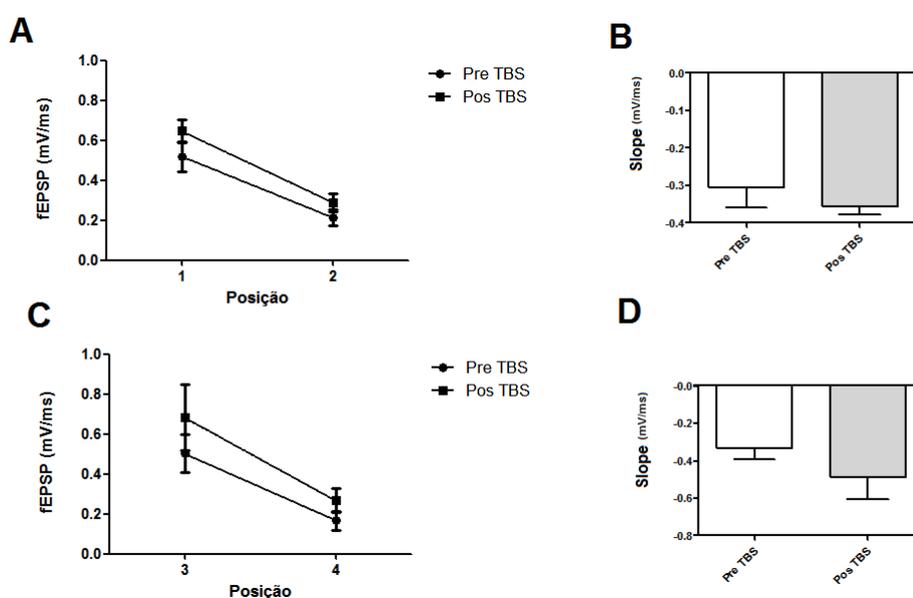


Figura 14 - Taxa de decaimento do sinal de fEPSP em 150 μ m. A: Média \pm desvio padrão dos valores de fEPSP obtidos antes e depois do TBS para as posições 1 e 2, ajustados em regressão linear. B: Análise estatística da média \pm desvio padrão da taxa de decaimento do sinal entre 1 e 2 antes (branco; -0,31 \pm 0,11) e depois (cinza; -0,36 \pm 0,05) da estimulação pelo TBS. Não há diferença estatística obtida pelo teste-t ($p > 0,05$). C: Média \pm desvio padrão dos valores de fEPSP obtidos antes e depois do TBS para as posições 3 e 4, ajustados em regressão linear. D: Análise estatística da média \pm desvio padrão da taxa de decaimento do sinal entre 3 e 4 antes (branco; -0,33 \pm 0,15) e depois (cinza; -0,49 \pm 0,26) da estimulação pelo TBS. Não há diferença estatística obtida pelo teste-t, $n=5$ ($p > 0,05$).

6.1.2. Entrada e saída - I/O

Os resultados da seção anterior nos mostraram que a taxa de potencialização não varia de acordo a distância em relação à posição fixa de estimulação. Como essa distância implica em diferentes valores basais de fEPSP registrado, inferimos também que essa taxa de potencialização é independente deste.

Para estudar os diferentes níveis possíveis de potencialização causados por diferentes valores de fEPSP basais em uma posição fixa de registro, estudamos alterações provocadas pelo TBS nas curvas de entrada e saída antes e depois da estimulação.

Para construir a curva de entrada e saída (*Inward/Outward* – I/O) aplicamos 7 estímulos separados por intervalos de 30 segundos com crescimento gradual de 5V, a partir de 10V até 40V, como descrito anteriormente na metodologia. Como foi feito nos experimentos para PPR, restringimos essa análise às posições 1 e 3, e a estimulação máxima utilizada à 40V, a fim de evitar metaplasticidade (Bortolotto, 2001). Essa curva foi construída antes e depois da estimulação por TBS e está comparada na **Figura 15**.

Na **Figura 15 A** é mostrada a regressão não linear da média \pm desvio padrão dos valores de fEPSP registrados na posição 1 (Ver **Figura 1 A**) em relação à intensidade de estimulação antes e depois da aplicação do TBS. Em **B** está mostrada a regressão linear para os fEPSP registrados na posição 3.

Observamos que o crescimento do *slope* do fEPSP em função do estímulo segue uma função exponencial na posição 1, que saturam com alta intensidade de estimulação, enquanto que na posição 3 a função de crescimento é linear. Essa diferença se deve provavelmente a dependência de *inputs* mais altos na posição 3 (+450 μ m), os quais não foram utilizados aqui para que pudéssemos observar a mesma função de crescimento de sinal em 1 (+150 μ m).

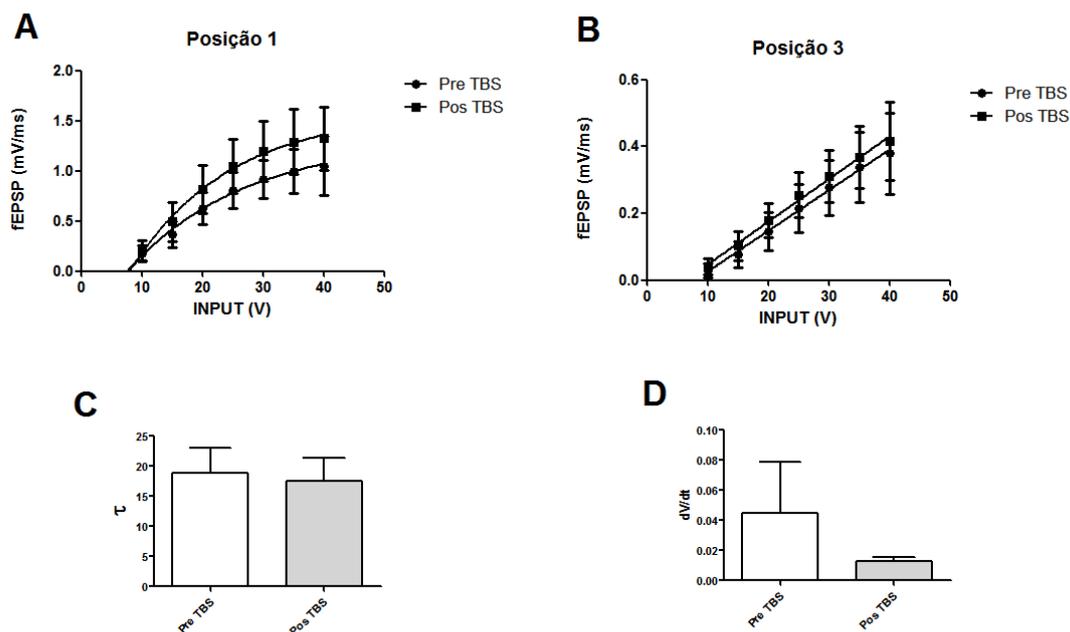


Figura 15 - Curva de entrada e saída – I/O. A: Relação do fEPSP vs. voltagem de estimulação para a posição 1 em média \pm desvio padrão. Ajuste mono-exponencial representado pela linha sólida (Pre TBS, $r^2= 0,36$; Pos TBS, $r^2= 0,44$). B: Valores absolutos de slope plotados contra de voltagem e estimulação para a posição 3. Fit para regressão linear (Pre TBS, $r^2= 0,38$; Pos TBS, $r^2= 0,43$). C: Análise estatística entre as médias \pm desvio padrão das constantes de decaimento exponencial das curvas de I/O antes (branco; $18,90 \pm 9,41$ V) e depois (cinza; $17,64 \pm 7,41$ V) do TBS para a posição 1. Não há diferença estatística no teste-t ($p>0,005$). D: Análise estatística entre as médias \pm desvio padrão da inclinação dada em dV/dt obtida através da regressão linear das curvas de I/O para a posição 3, antes (branco; $0,05 \pm 0,08$ mV/V) e depois (cinza; $0,01 \pm 0,01$ mV/V) da estimulação por TBS. Não há diferença estatística no teste-t, $n=5$ ($P>0,05$).

A análise entre as médias \pm desvio padrão das constantes de decaimento das curvas de I/O antes e depois da estimulação por TBS, registrados na posição 1, não mostrou diferença estatística significativa no teste-t, **Figura 15 C**. Assim como também não observamos diferença estatística entre as médias \pm desvio padrão da inclinação das retas de crescimento das curvas de I/O registradas na posição 3, antes e depois do TBS, **Figura 15 D**. Podemos concluir, a partir desses dados, que o percentual de potencialização por TBS causado nas curvas de I/O foi igual para as diferentes tensões de estimulações, corroborando o resultado anterior de que a taxa de potencialização em uma posição fixa de estimulação independe do valor basal de seu fEPSP.

6.1.3. Facilitação por pulso pareado - PPF

A facilitação por pulso pareado foi obtida como descreve a literatura para este tipo de experimentação no hipocampo, a partir de dois pulsos pareados com mesma tensão de estimulação, separados por um intervalo de 50ms (Ito, 2012). A facilitação por pulso pareado (PPF) estudada aqui foi obtida pela razão entre os valores do fEPSP do segundo (fEPSP2) e primeiro (fEPSP1) pulso (PPR), a partir da equação:

$$PPF = \frac{fEPSP2}{fEPSP1} - 1$$

Traços típicos de facilitação de fEPSP registrados nas posições 1 e 3 estão ilustrados na Figura 16 A e B.

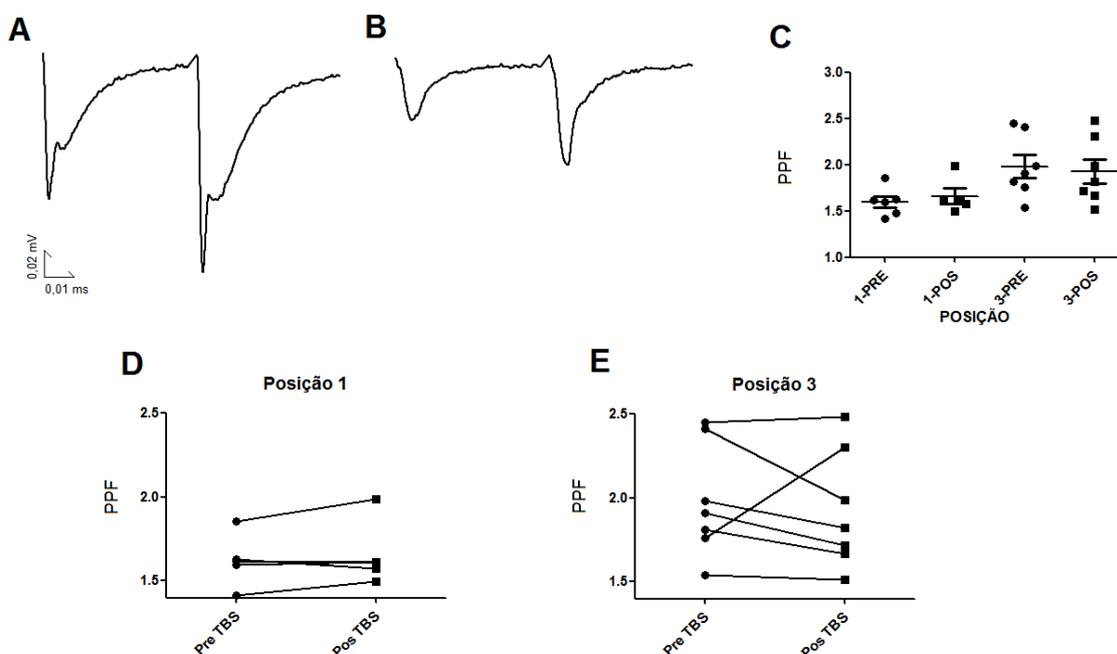


Figura 16 - Facilitação por pulso pareado – PPF. A e B: Traços ilustrativos da facilitação observada antes de estimulação por TBS na posição 1 e 3, respectivamente. C: Média ± desvio padrão da razão de facilitação (PPF) por pareamento de pulso nas posições 1 e 3, antes (Pré) e depois (Pós) do TBS (1-Pré: 1,60 ± 0,15; 1-Pos: 1,66 ± 0,19; 3-Pre: 1,99 ± 0,34; 3 –Pós: 1,93 ± 0,35), posição 1, n= 5, posição 3 n= 7. Foi observada diferença estatística no teste-t apenas entre as posições 1 e 3 antes do TBS, ($p=0,0266$). D: Análise individual de PPF para a posição 1, antes (Pré) e depois (Pós) do TBS. E: Análise individual de PPR para a posição 3, antes e depois do TBS.

A análise estatística através do teste-t mostrou não haver diferença na média de facilitação por pulso pareado tanto na posição 1, quanto na posição 3, antes e depois do TBS. Entretanto observamos uma diferença de facilitação entre essas duas posições antes da aplicação do estímulo.

A análise individual da facilitação antes e depois da estimulação por TBS nos mostra uma heterogeneidade para os experimentos, **Figura 16 D e E**. Encontramos razões de facilitação por pareamento de pulso que foram amplificadas ou reduzidas pelo estímulo TBS, nas duas posições de registro.

6.2. Potencialização com posição fixa de registro

6.2.1. LTP

Nesta série de experimentos estudamos como a potencialização poderia variar em posições diferentes de estimulação, o que representariam vias pré-sinápticas segregadas, e uma posição fixa de registro, a partir de um protocolo descrito previamente na seção de metodologia.

Para isso medimos a taxa de potencialização gerada através de 3 estimulações sequenciais por TBS em intervalos de 15 minutos (1ª estimulação à 450 μm do eletrodo de registro, posição de estímulo A₁; 2ª estimulação à 150 μm , posição B; 3ª estimulação à 450 μm , posição A₂), **Figura 17**.

A **Figura 17** mostra em **A** o esquema ilustrativo desse experimento, traços ilustrativos de fEPSP observados antes e depois do TBS para estas duas posições de estímulo, **B**, e em **C** um exemplo de *scatter plot* desse experimento de intercalação de posições de estímulo.

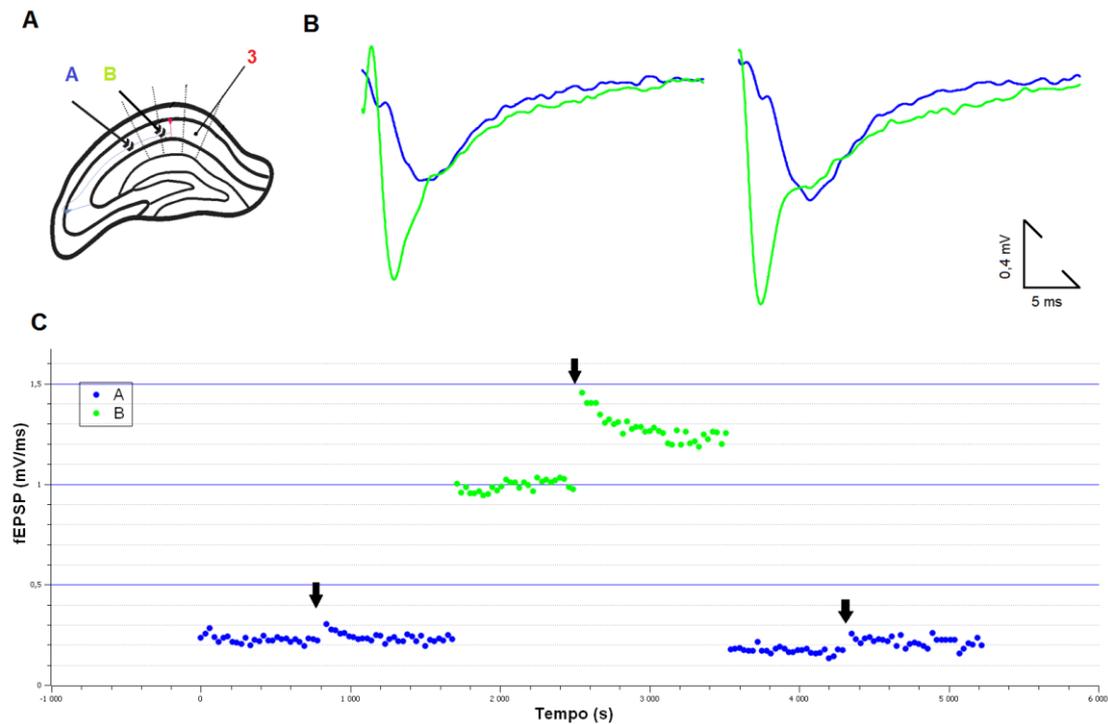


Figure 17 - Experimento de potencialização com registro fixo. A: Esquema ilustrativo da abordagem experimental, A (azul) representa a estimulação à 450 μm do eletrodo de registro e B (verde) à 150 μm . B: Traços típicos de fEPSP para essas duas posições (azul= +450 μm , verde= +150 μm) antes e depois da estimulação por TBS. C: *Scatter plot* individual de um experimento ilustrativo, mostrando as três estimulações sequencias por TBS (setas pretas) nas duas regiões diferentes de estimulação.

Para controle desse experimento realizamos o mesmo protocolo sequencial de estimulação por TBS com posição fixa de estímulo e registro (A₁, A₂, A₃), no mesmo intervalo específico de tempo, 15 minutos.

Não observamos um padrão de correlação entre a taxa de potencialização induzida por TBS sequencial, tanto em posição fixa de estímulo e registro, quanto em posição alternada de estímulo, o que tornou, nesse momento, impossível analisar como a potencialização em duas regiões diferentes de estimulação (+450 μm e +150 μm) está relacionada.

Uma possível explicação para esse fenômeno está evidenciada na **Figura 18**, onde plotamos as taxas de LTP dos experimentos individuais para os 3 TBS sequenciais.

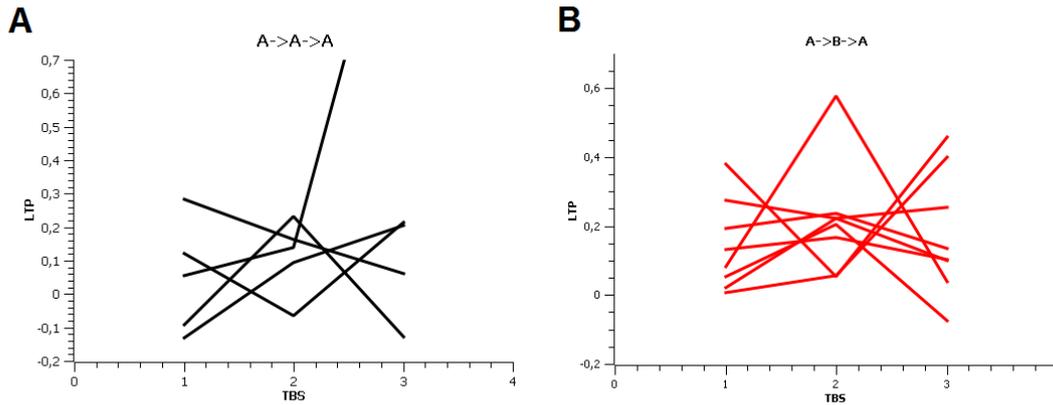


Figura 18 - Análise individual da potencialização gerada por TBS sequencial. A: Posição fixa de estímulo B: Posição intercalada de estímulo.

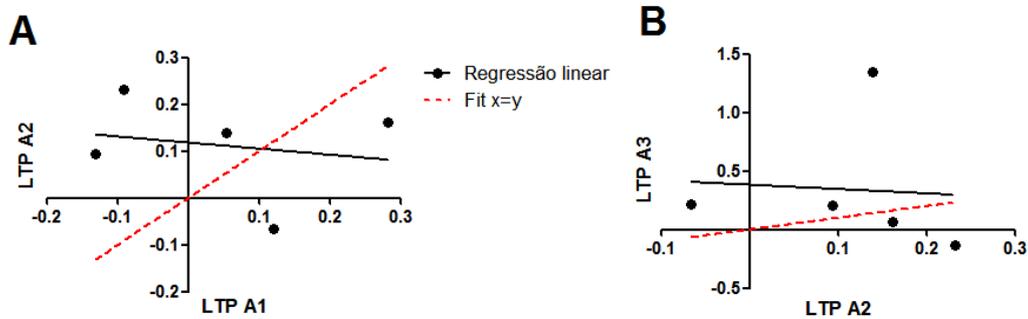
A análise dos experimentos de estimulação sequencial por TBS nos mostra que há uma diferença na susceptibilidade temporal à potencialização, que compromete o estudo da susceptibilidade espacial.

Observamos padrões variáveis na susceptibilidade de potencialização, mesmo quando esta foi evocada pelo mesmo estímulo de alta frequência e na mesma posição de registro e estímulo. Observamos, em diferentes experimentos, taxas crescentes, decrescentes e segregação na potencialização evocada por TBS em janelas de 15 minutos nos experimentos com estimulação e registro fixos, e nos experimentos de intercalação de posição de estimulação, **Figura 18**.

Na **Figura 19** mostramos a falta de correlação, para experimentos individuais, entre as taxas de potencialização no experimento controle, com estimulação fixa (A->A->A), entre o 1º (LTP A1) e 2º (LTP A2) TBS, **Figura 19 A**, e 2º (LTP A2) e 3º (LTP A3) TBS, **Figura 19 B**. A baixo está plotada a correlação para o experimento de posições intercaladas de estimulação (A->B->A), entre o 1º (LTP A1) e 2º (LTP B) TBS, **Figura 19 C**, e entre o 1º (LTP A1) e 3º (LTP A2) TBS, que nesse caso correspondem a estimulações na mesma posição de estímulo, separados apenas pela janela de tempo, **Figura 19 D**.

Para cada gráfico traçamos uma linha imaginária que corresponderia à uma taxa de potencialização igual para cada TBS, 1:1, o que corresponderia à hipótese nula, de não haver diferença no nível de LTP obtido frente ao mesmo estímulo de alta frequência (linha vermelha tracejada). Em nenhum dos casos foi possível construir uma regressão linear com valores significantes de r^2 . Em nenhum dos casos os intervalos de confiança (ci) para os valores de r^2 obtidos compreendem o valor da hipótese nula ($r^2=1$). Dessa forma rejeitamos a hipótese nula.

A -> A -> A



A -> B -> A

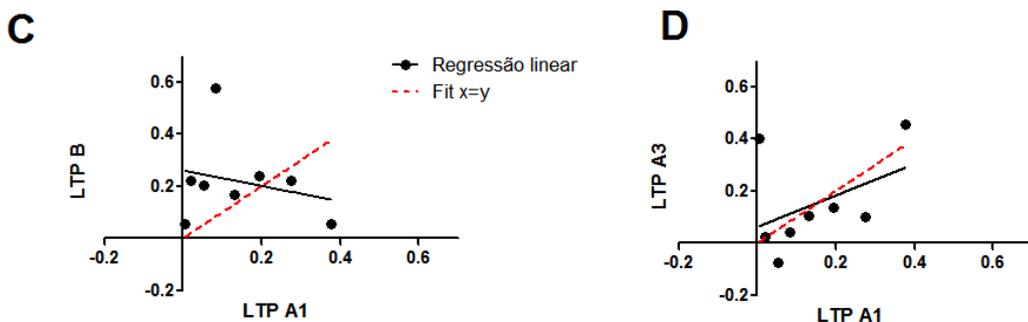


Figura 19 - Relação entre as taxas de potencialização: Para posição fixa de estimulação, A e B, e posição variada de estimulação C e D. A: Comparação entre a taxa de potencialização obtida no 1º e 2º TBS em posição fixa de estímulo. Linha vermelha: Hipótese nula, LTP homogênea, fit artificial ($r^2=1$). Linha preta: Regressão linear ($r^2= 0,04$) (ci: $-0,61 \leq \rho \leq 0,97$). B: Comparação entre a taxa de potencialização para o 2º e 3º TBS composição fixa de estímulo, ($r^2= 0,005$) (ci: $-0,90 \leq \rho \leq 0,87$) . C: Comparação entre potencialização obtida pelo 1º e 2º TBS, distância de 450 μm e 150 μm do estimulador, respectivamente ($r^2= 0,057$) (ci: $-0,25 \leq \rho \leq 0,90$). D: Comparação entre potencialização obtida pelo 1º e 3º TBS, ambos à 450 μm do estimulador, ($r^2= 0,184$) (ci: $-0,40 \leq \rho \leq 0,87$).

6.2.2. fEPSP basal e LTP

A fim de analisar a taxa de potencialização em função do sinal basal do fEPSP plotamos os valores absolutos dos *slopes* individuais contra a taxa de LTP observada nos experimentos de intercalação de posição de estimulação, **Figura 20**.

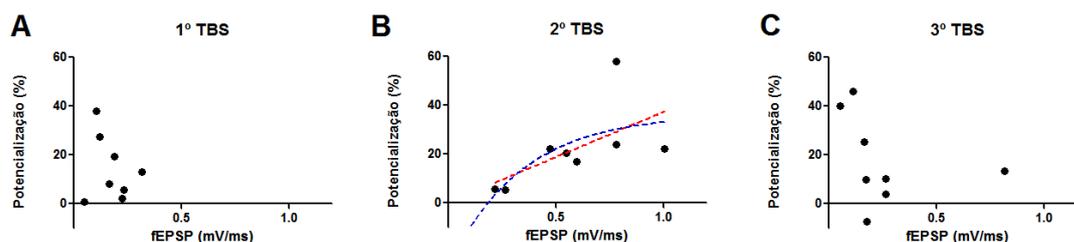


Figura 20 - Taxa de potencialização em relação ao fEPSP pré TBS. A: 1° TBS, na posição A, 450 μm entre os eletrodos de estímulo e registro. B: 2° TBS, posição B, 150 μm. Fit para regressão linear (vermelho, $r^2= 0,37$), Fit para decaimento mono-exponencial (azul, $r^2= 0,444$; platô: 36,1). C: 3° TBS, posição A, 450 μm

Assim como observado na taxa de potencialização intrínseca correlacionada às diferentes posições de estimulação, não observamos correlação entre os valores de fEPSP obtidos antes do TBS para a posição A, e a susceptibilidade de potencialização subsequente. Analisando os três gráficos da **Figura 20** entre si, é possível observar um menor valor de fEPSP quando o eletrodo de estímulo está à 0,45mm do eletrodo de registro (1° e 3° TBS), em relação à distância de 0,15mm, 2° TBS. Entretanto valores médios de -0,2mV/ms para a posição A de estimulação apresentaram diferentes graus de potencialização evocada pelo TBS, variando de -7% (*slope* basal de -0,18mV/ms) a 46% (*slope* basal de -0,11mV/ms).

Para a potencialização obtida na posição de estímulo B, quando o estimulador e o registro estão mais próximos, podemos observar uma tendência de maior necessidade de um fEPSP basal para geração de maior taxa de potencialização ilustrado no fit para regressão linear na **Figura 20 B**. Entretanto esse ajuste não apresenta um valor de r^2 confiável que indique a necessidade real. O ajuste com função exponencial apresenta um valor mais confiável de r^2 , com um platô no nível de potencialização à cerca de 36%.

6.2.3. PPF

O mesmo tipo de análise descrita anteriormente foi feita para a taxa de facilitação por pulso pareado, antes e depois dos 3 TBS sequenciais, nas duas posições intercaladas de estímulo, **Figura 21**.

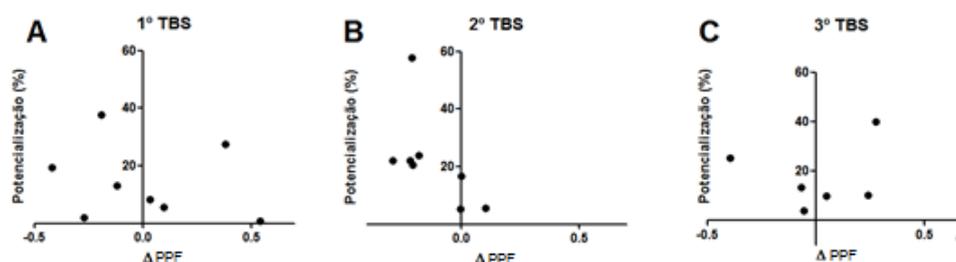


Figura 21 - Taxa de potencialização em relação ao PPF. A: Plots individuais da diferença de PPR gerada pelo TBS em relação a taxa de potencialização observada para o 1º estímulo, posição A, 450 μm . B: 2º TBS, posição B, 150 μm . C: 3º TBS, posição A, 450 μm .

Nesse caso calculamos a variação da facilitação pelo pulso pareado antes e depois da estimulação por TBS. A análise do que chamamos de ΔPPF se deu pela subtração do valor de PPF após TBS pelo valor do PPF previamente ao TBS. Os valores de PPF por si foram calculados da mesma forma como descrita anteriormente, nos experimentos com estimulação fixa. Para garantir valores fidedignos, esperamos a estabilização do sinal para a aplicação do pulso pareado após o TBS, como está descrito na metodologia. Não encontramos um padrão de correlação que pudesse explicar a susceptibilidade à potencialização em relação a variação da facilitação por pulso pareado induzida pelo TBS.

7. Discussão

7.1. LTP com posição fixa de estimulação

Todas as análises desse trabalho foram baseadas em Potencial pós-sináptico excitatório em campo (fEPSP). Esse tipo de registro eletrofisiológico é relativamente simples e fácil, especificamente na região do *Stratum radiatum* de CA1 do Hipocampo, principalmente pela geometria espacial da disponibilidade das fibras de *schaffer collaterals* em relação à árvore dendrítica apical das células piramidais de CA1, onde se forma a vasta maioria das sinapses excitatórias dessa região. Por essa facilidade, se tornou nas últimas décadas a forma de experimentação eletrofisiológica mais popular para estudos de Potencialização e Depressão sináptica na Formação Hipocampal (Shepherd, 1990).

A análise da potencialização com posição fixa de estimulação nos mostrou uma queda exponencial do fEPSP basal em relação ao afastamento da posição de registro com o estimulador. Esses dados se enquadram na hipótese lamelar no que diz respeito a razão angulação das projeções axonais em *schaffer colateral* e a angulação do corte das fatias utilizadas em nosso trabalho. Em nosso protocolo de fatiamento os cortes foram feitos à 90° em relação à extremidade rostral e caudal do encéfalo dos camundongos.

Segundo a hipótese lamelar, nessa altura do Hipocampo dorsal as projeções de *schaffer colateral* não estão em um plano totalmente paralelo com o eixo coronal do encéfalo (Yang, 2014). Desse modo a proximidade em relação ao eletrodo de estimulação representa maior quantidade de fibras ativas.

A taxa percentual de potencialização nesses experimentos mostrou ser independente da distância de registro e do sinal basal do fEPSP. Esses dados sugerem uma susceptibilidade intrínseca da via pré-sináptica em se potencializar frente à estimulação por TBS, que determina o nível de potencialização dessa via.

Apesar de registrarmos em 4 posições diferentes, hipoteticamente referentes à inúmeros microcircuitos independentes, a posição fixa de estimulação determina uma única via ativa, que mesmo aferente à diversos microcircuitos, pode ter uma taxa de potencialização ditada pelo balanço entre as diferentes possíveis taxas de potencializações individuais dos microcircuitos. Desse modo, mesmo que haja uma segregação no nível de LTP inerente à cada microcircuito, não é possível enxergar essa diferença, pois o que vemos é o saldo total de potencialização dos diversos microcircuitos.

De fato, experimentos de plasticidade que mostram a dependência de ativação concomitante de interneurônios, como ITDP e STDP utilizam estimulação pareada entre vias provenientes de CA3 (*schaffer colateral*) e do Córtex Entorrinal, que abastecem estes interneurônios (Leroy, 2017). Apesar de nem todos os interneurônios receberem *inputs* exclusivos do Córtex Entorrinal, recebem também das demais sub-regiões da formação hipocampal, a combinação temporal fina entre correlação de *inputs* que modula os níveis de plasticidade é diferente para cada via de abastecimento e dependente por sua vez das propriedades biofísicas e bioquímicas de membrana intrínsecas à cada interneurônio. Por exemplo para a clássica *Basket cell*, que recebe *inputs* do Córtex Entorrinal, da região septal, de CA3 e feedback dos axônios de CA1. Cada tipo de *input* provenientes dessas diversas regiões refletirá em uma taxa diferente de depressão sináptica exercida sobre o corpo celular de uma célula piramidal em CA1 (Klausberger, 2008)

A análise da facilitação por pulso pareado nos mostra o envolvimento da porção pré-sináptica na geração da LTP. A carência de diferença estatística antes e depois do TBS condiz com relatos clássicos da literatura e suporta uma evidência negativa dessa relação. Entretanto, a análise de experimentos individuais mostra um padrão heterogêneo na razão de facilitação por pulso pareado em relação à LTP, que também é relatado na literatura em evidências positivas desse tipo de plasticidade de curta duração e a potencialização de longa duração. Nesse tipo de evidências, valores relativamente baixos de PPF antes do TBS tendem a ser amplificados após essa estimulação, enquanto valores relativamente altos tendem a ser reduzidos (Schulz, 1994).

Aplicar dois pulsos em curto intervalo de tempo permite que a célula pré-sináptica dispare dois potenciais de ação concomitantes. Isso leva à maior quantidade de liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, devido à entrada de mais Ca^{2+} na célula no segundo pulso e ao Ca^{2+} residual do primeiro pulso. Consequentemente o segundo pulso pareado gera um slope maior no fEPSP em relação ao primeiro. O estudo da razão dessa facilitação antes e depois da geração da LTP nos permite estudar a quantidade de vias ativas que contribuem para essa potencialização sináptica (Zucker, 2002).

Não encontramos diferença estatística para razão de pulso pareado antes e depois da geração de LTP. A análise de experimentos individuais nos mostra que alguns casos se comportam como descrito classicamente, acima, porém outros casos apresentam aspecto contrário. Essa diferença sugere uma heterogeneidade dos sistemas experimentados, que são explicados para uma única célula pela combinação do aumento do número de sinapses ativas e aumento da probabilidade de liberação de neurotransmissores (Schulz, 1994). Porém são contrários à idéia de que LTP é uma forma de plasticidade homossináptica, ou seja, que seria capaz apenas de potencializar sinapses ativas (McMahon, 1997).

Infelizmente essa heterogeneidade particular à cada célula impede a análise de heterogeneidade de microcircuitos que hipoteticamente são compostos por diversas células piramidais com variada proporção entre sinapses ativas e silenciosas.

Outro aspecto à ser considerado é o protocolo utilizado para a geração de LTP. TBS é uma estimulação otimizada para potencialização de células piramidais, e não para os interneurônios. Apesar da estimulação por alta frequência ser capaz de gerar também LTD em células piramidais, indiretamente via potencialização por interneurônios, não necessariamente esse fenômeno acontecerá através do TBS, e quando acontecer, estará englobado no saldo final referente a via potencializada.

Existem diversos protocolos de estimulação de alta frequência utilizados para geração de LTP, por exemplo; 100Hz x1, x2, x3, 200Hz, etc. O protocolo de estimulação TBS se tornou popular para estudos de LTP no hipocampo por se aproximar mais do que é considerado fisiológico para o ritmo de disparo das células piramidais e por gerar níveis superiores de potencialização ao protocolo usual de estimulação à 100Hz. TBS mimetiza a oscilação theta observada no hipocampo, a partir da aplicação de 4 pulsos pareados à uma frequência de 100Hz, separados de outros 4 pulsos à 5Hz (Larson, 2015). O número de repetições de estimulação varia no que é descrito pela literatura, usualmente de 3 a 12 vezes.

A estimulação fixa se refere a via pré-sináptica fixa. A maioria dos interneurônios nessa região do Hipocampo exerce sua atividade inibitória na porção pós-sináptica dessas vias; nos dendritos, corpos celulares e axônios das células piramidais CA1. O que pode também explicar porque não é observado um padrão de segregação de potencialização sináptica referente à estimulação em posição fixa pré-sináptica, mesmo quando variada a posição de registro.

Para buscarmos padrões de segregação referentes a diferentes vias pré-sinápticas, elaboramos o segundo grupo de experimentos, com posição variada de estimulação.

7.2. LTP com posição fixa de registro

Buscamos padrões de segregação de microcircuitos referentes à diferentes vias pré-sinápticas a partir da intercalação de posição de estimulação e aplicação do TBS, e posição fixa de registro. Os experimentos conduzidos dessa maneira nos mostraram indícios de haver uma segregação, não exclusivamente espacial como esperávamos, mas também temporal na susceptibilidade à potencialização. Testemunhamos casos em que o mesmo estímulo de alta frequência, aplicado em voltagem fixa, na mesma região de estimulação e registro foi capaz de gerar diferentes níveis de potencialização independente do momento sequencial da estimulação.

Essa diferença pode estar relacionada à diferente probabilidade de uma célula piramidal se potencializar ou não frente ao estímulo tetânico. Entretanto, tratando-se de uma população homogênea de células, com propriedades biofísicas de membrana similares, esperava-se que as taxas de potencialização frente ao mesmo estímulo fossem também similares.

Haveria a possibilidade de crescimento gradual da eficácia do TBS tendendo a se atingir um platô no nível de potencialização que poderia ser explicado pela saturação da capacidade de potencialização daquele via, referente à quantidade de receptores capazes de ser trafegados à membrana plasmática e à quantidade de ativação de sinapses silenciosas. Dessa forma o nível de potencialização cresceria exponencialmente, onde maior LTP indicaria maior capacidade de geração de LTP, até que o limite de LTP da via fosse atingido.

O decaimento exponencial também poderia ser plausivelmente explicado pela existência de uma capacidade máxima de potencialização da via, onde os estímulos subsequentes ao primeiro seriam capazes de potencializar as sinapses remanescentes, que não haviam sido ativas pelo primeiro TBS, então teriam conseqüentemente menor eficácia.

Porém uma melhor explicação para ambos os fenômenos se basearia na correlação do nível de potencialização e o fEPSP basal, que cresceria junto à potencialização e geraria maior nível de LTP subsequente. Para explicar o decaimento, provavelmente o fEPSP basal não seria grande o suficiente para gerar altos níveis de potencialização, visto que a potencialização de sinapses e ativação de sinapse silenciosas são processos diferentes, e que o segundo demandaria maior nível de estimulação (Isaac, 1994; Kullmann, 2003). Inferiríamos então que o primeiro TBS geraria maior taxa de LTP a partir da tendência de saturação da potencialização de sinapses ativas na estimulação primária, e que os consequentes estímulos não seriam tão eficazes.

Entretanto, quando comparamos os valores de fEPSP basais e os níveis de potencialização, não encontramos relação linear, ou não-linear, plausível, que explicasse a diferença nas taxas de potencialização observada. Altos valores de fEPSP não necessariamente estão associados a altos valores de LTP, assim como baixos valores de fEPSP não restringem os níveis de LTP. Esses dados sugerem que a capacidade intrínseca de potencialização da via é independente do número de sinapses ativas, o que nos faz desacreditar na homogeneidade desse sistema, e em uma possível segregação das vias.

Não consideramos nessa fase da LTP outros eventos envolvidos que também podem afetar as taxas de potencialização observadas, como principalmente a dendritogênese e formação de novos botões sinápticos. Estes eventos por si demandam mais tempo do que o analisado em nossas janelas experimentais, e estão atribuídos à fase tardia da LTP (Late-LTP) (Redondo, 2011).

Padrões de segregação intercalada de potencialização observados, como altos níveis de LTP no 1º ou 3º TBS, ou apenas no 2º, separados por baixos níveis de LTP não podem ser explicados da mesma forma como os fenômenos acima. Para isso precisamos incluir nesse sistema a atividade inibitória de interneurônios, e tratar os microcircuitos de forma heterogênea.

A segregação temporal pode agora ser explicada pela probabilidade de potencialização também desses interneurônios, e a capacidade dessa potencialização em diminuir ou bloquear os eventos de LTP nas células piramidais a partir da atividade inibitória do interneurônio.

A pesar de não estarmos ativando vias provenientes do Córtex Entorrinal, de onde os interneurônios recebem grande parte de *inputs* excitatórios que sinalizam *inputs* inibitórios sobre os neurônios piramidais, a estimulação em *schaffer colateral* pode também estimular vias de abastecimento de interneurônios provenientes de CA3, tanto quanto estimulá-los diretamente pelo *feedback* de suas sinapses com os neurônios piramidais.

A partir daí estamos lidando com diversas subpopulações de interneurônios, que possuem ajuste fino para níveis de potencialização. Ou seja, a susceptibilidade de inibição exercida por um interneurônio sobre uma célula piramidal é altamente variada frente à um estímulo TBS em *schaffer colateral*. O que altera os padrões de potencialização gerados por este estímulo em células piramidais e compromete a análise dos níveis de LTP gerados por TBS sucessíveis em uma posição fixa de registro e estímulo.

A análise da potencialização em regiões variadas de estimulação também mostrou a falta de padrão que se enquadre em um sistema homogêneo quanto a susceptibilidade de LTP em neurônios piramidais. Novamente acreditamos que essa segregação seja exercida por interneurônios, que podem conferir uma segregação espaço-temporal para a susceptibilidade à potencialização sináptica evocada por TBS.

Infelizmente não é possível ainda analisar mais à fundo a susceptibilidade de potencialização em relação à estimulação em diferentes vias, pois encontramos segregação também temporal nessa relação, que pode se combinar com os padrões de segregação espacial. Assim como observados nos experimentos com estimulação fixa, não observamos uma relação direta entre a facilitação por pulso pareado e os níveis de LTP gerados por TBS sequencial.

Apesar de não encontrarmos ainda relação entre as taxas de potencialização geradas por TBS sequencial, que expliquem o modo de funcionamento de uma possível segregação de susceptibilidade de microcircuitos à LTP, nestes primeiros experimentos encontramos evidências que sugerem a existência dessa segregação, e de que ela opere espaço-temporalmente.

7.3. Próximos passos

A potencialização de longa duração induzida por estimulação de alta frequência é uma forma grosseira de indução de plasticidade sináptica. Registrá-la por fEPSP não nos dá informação do número de células ativas, e da quantidade de sinapses e receptores envolvidos. Se por um lado estudos de plasticidade restritos à avaliação neuronal individual evidenciam susceptibilidades intrínsecas à potencialização celular, é evidente a modulação dessa plasticidade exercida por padrões de conectividade. Quanto à região CA1 do Hipocampo, grandes evidências sugerem a existência de microcircuitos segregados formando engramas neurais capazes de codificar espaço-temporalmente o fluxo de informação através do circuito hipocampal e ditar padrões de formação e resgate de memória. Não é claro ainda como informações ambientais são armazenadas nessas vias. Uma forma de se compreender a diferença de funcionamento de microcircuitos está na análise paralela da superatividade relativa de uma via em detrimento à outra. Sem luz quanto ao tamanho de um microcircuito, a distância temporal e espacial de sua atividade e o número de células e sinapses envolvidos, consideramos nesse trabalho um sistema binário, onde vias paralelas apresentariam diferentes padrões de LTP. Nosso esforço agora se baseia em quantificar a contribuição individual de uma via na geração de um fEPSP para que os padrões possam ser analisados fidedignamente.

Em nossos experimentos buscamos utilizar tensões mínimas de estimulação para que pudéssemos registrar o menor número possível de vias ativas. Esses valores foram determinados empiricamente a partir do fEPSP basal observado na posição mais longe de registro (+600 μ m) e mantidos para os experimentos com posição de estimulação variada.

Pequenos valores de fEPSP impedem a análise de *population spikes* referentes à via ativa. Experimentos com tensão de estimulação relativamente alta torna possível a análise *population spikes* em cada posição. Esses parâmetros podem entrar nos grupos de análise, além de ser possível também analisar como se comporta a potencialização por TBS frente à valores mínimos e máximos de fEPSP.

A principal hipótese que rege a segregação de microcircuitos é pela atividade inibitória de interneurônios. Esse fenômeno pode ser estudado bloqueando farmacologicamente, primeiramente inespecificamente, a inibição exercida por interneurônios, através de Picrotoxina por exemplo.

A combinação desses dados com os já apresentados pode ser aplicada a modelos matemáticos que permitam corroborar ou negar a hipótese da existência de uma segregação espaço-temporal quanto à susceptibilidade de potencialização por TBS de microcircuitos no Hipocampo CA1.

8. Conclusão

Neste trabalho utilizamos a potencialização de longa duração induzida por TBS para buscar padrões de segregação baseados em novas hipóteses de segregação de microcircuitos. Observamos taxas proporcionais de potencialização ao estimular fixamente uma posição fixa pré-sináptica que independem da região registrada e de valores basais de fEPSP. Encontramos segregação na taxa de LTP evocada por TBS repetido 3 vezes à cada 15 minutos que sugerem um segregação espaço-temporal na susceptibilidade de potencialização de microcircuitos.

9. Referências

Allen, T. A., Salz, D. M., McKenzie, S., & Fortin, N. J. (2016). Nonspatial Sequence Coding in CA1 Neurons. *Journal of Neuroscience*, 36(5), 1547–1563.

Ahmed, O. J., & Mehta, M. R. (2009). The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends in Neurosciences*, 32(6), 329–338.

Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., O'Keefe J. (2007). *Oxford University Press*, 1st edition.

Baudry, M., Zhu, G., Liu, Y., Wang, Y., Briz, V., & Bi, X. (2015). Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning. *Brain Research*, 1621, 73–81.

Blaustein, M. P., Kao, J. P. Y., Matterson, D. R. (2012) Cellular Physiology and Neurophysiology. 2nd Edition. Elsevier Mosby.

Bliss, T. V, & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356.

Bliss, T. V. P., & Cooke, S. F. (2011). Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics*, 66 Suppl 1, 3–17.

Bono, J., & Clopath, C. (2017). Modeling somatic and dendritic spike mediated plasticity at the single neuron and network level. *Nature Communications*, 8(1).

Bortolotto, Z. A., Amici, M., Anderson, W. W., Isaac, J. T. R., & Collingridge, G. L. (2001). Synaptic Plasticity in the Hippocampal Slice. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.]*, Chapter 6, 1–23.

Bragin ,A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K., Buzsaki, G. (1995) Gamma (4-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci* 15:47-60.

Briz, V., & Baudry, M. (2016). Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. *The Neuroscientist*.

Brown, T. (1990). Hebbian Synapses: Biophysical Mechanisms And Algorithms. *Annual Review of Neuroscience*, 13(1), 475–511.

Brown, T. e Zador, A., Shepherd, G. (1990) The Synaptic Organization of the Brain. *Oxford University Press, New York*, 3rd edition.

Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33(3), 325–340.

Cai, D. J., Aharoni, D., Shuman, T., Shobe, J., Biane, J., Song, W., ... Silva, A. J. (2016). A shared neural ensemble links distinct contextual memories encoded close in time. *Nature*, 534(7605), 115–118.

Cajal, S. R. (1911). *Histologie du Système Nerveux*. Paris: A. Maloine

Canto, C. B., Wouterlood, F. G., & Witter, M. P. (2008). What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plasticity*, 2008.

Claiborne, B. J., Amaral, D. G., and Cowan, W. M. (1986). A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 246, 435–458

Cutsuridis, V., & Wennekers, T. (2009). Hippocampus, microcircuits and associative memory. *Neural Networks*, 22(8), 1120–1128.

Dougherty, K. A., Islam, T., & Johnston, D. (2012). Intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurones from the rat dorsal and ventral hippocampus. *Journal of Physiology*, 590(22), 5707–5722.

Ferguson, K. A., Chatzikalymniou, A. P., & Skinner, F. K. (2017). Combining Theory, Model and Experiment to Explain How Intrinsic Theta Rhythms Are Generated in an *in Vitro* Whole Hippocampus Preparation without Oscillatory Inputs. *Eneuro*, 4(August), ENEURO.0131-17.2017.

Hardingham, N., Dachtler, J., Fox, K., & Moreno-lópez, B. (2013). The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis, 7(October), 1–19.

Hartley, T., Lever, C., Burgess, N., & O'Keefe, J. (2013). Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1635)

Hebb, D. O. 1949. *The Organization of Behavior*. New York: Wiley

Isaac, J. T. R., Nicoll, R. A., Malenka, R. C. (1995). Evidence for Silent Synapses: Implications for the Expression of LTP, *Neuron* 15(Cv), 427-434.

James, W. 1890. *Psychology: Briefer Course*. Cambridge: Harvard Univ. Press

Jarsky, T., Roxin, A., Kath, W. L., & Spruston, N. (2005). Conditional dendritic spike propagation following distal synaptic activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 8(12), 1667–1676

Klausberger, T., & Somogyi, P. (2008). Neuronal Diversity and The Unity Dynamics : Temporal Circuit Operations of Hippocampal. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5885), 53–57.

Kohler C. 1986 Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J. Comp. Neurol.* 246, 149–169.

Kullmann, D. M. (2003) Silent synapses: what are they telling us about long-term potentiation? *Phil. Trans. R. Soc.Lond.*, 727-733

Larson, J., & Munkácsy, E. (2015). Theta-burst LTP. *Brain Research*, 1621, 38–50

Leroy, F., Brann, D. H., Meira, T., & Siegelbaum, S. A. (2017). Input-Timing-Dependent Plasticity in the Hippocampal CA2 Region and Its Potential Role in Social Memory. *Neuron*, 95(5), 1089–1102.e5.

Loftus, G.R. & Loftus, E.F. (1988). *Essence of Statistics (2nd Edition)*. New York: McGraw Hill.

[Madison, D.V.](#), [Schuman, E.M.](#) (1991) LTP, post or pre? A look at the evidence for the locus of long-term potentiation. [New Biol.](#) 3(6):549-57.

McMahon, L. L., & Kauer, J. A. (1997). Hippocampal interneurons express a novel form of synaptic plasticity. *Neuron*, 18(2), 295–305.

Mizuseki, K., Diba, K., Pastalkova, E., & Buzsáki, G. (2011). Hippocampal CA1 pyramidal cells form functionally distinct sublayers. *Nature Neuroscience*, *14*(9), 1174-.

Moser, E. I., & Gaute T. Einevoll. (2007). From Grid Cells to Place Cells: A Mathematical Model. *Hippocampus*, *17*(9), 801–812.

Moosmang, S. (2005). Role of Hippocampal Cav1.2 Ca²⁺ Channels in NMDA Receptor-Independent Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *Journal of Neuroscience*, *25*(43), 9883–9892.

Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, *93*(2), 281–290.

Poo, M. ming, Pignatelli, M., Ryan, T. J., Tonegawa, S., Bonhoeffer, T., Martin, K. C., ... Stevens, C. (2016). What is memory? The present state of the engram. *BMC Biology*, *14*(1), 1–18.

Redondo, R. L., & Morris, R. G. M. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nature Reviews. Neuroscience*, *12*(1), 17–30.

Schulz, P. E., Cook, P., Johnston, D. (1994). Changes in Paired-Pulse Facilitation Suggest Presynaptic Involvement in Long-Term Potentiation, *The Journal of Neuroscience*. *14*(9): 5325 - 5337

Shepherd, G. M. (1990) *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press, New York, 3rd edition.

[Siegelbaum](#), S. A., Kandel, E. R. (2014) *Princípios de Neurociências*. 5^a Edição. McGraw-Hill Education.

Sik, A., Penttonen, M., Ylinen, A., & Buzsáki, G. (1995). Hippocampal CA1 interneurons: an in vivo intracellular labeling study. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(10), 6651–6665.

Squire, L. R. (2009). The Legacy of Patient H.M. for Neuroscience. *Neuron* *18*(9), 1199–1216.

- Somogyi, P., and Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J. Physiol.* 562, 9–26.
- Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* 1976; 167:285–314
- Swanson, L. W., Wyss, J. M., Cowan, W. M. (1978) An autoradiography study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol.* 181: 681-716
- Taube, J. S., Muller, R. U., & Ranck, J. B. (1990). Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(2), 420–435.
- Tanzi, E. 1893. I fatti e la induzioni nell 'odie rna istologia del sistema nervoso. Riv. Spero Freniatr. Med. Leg. Alienazioni Ment.
- Thompson, L. T., & Best, P. J. (1989). Place cells and silent cells in the hippocampus of freely-behaving rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(7), 2382–2390.
- Walther, C. (2002) Hippocampal terminology: concepts, misconceptions, origins. *Endeavour* 26, 41-44.
- Westenbroek, R. E., Ahlijanian, M. K., & Catterall, W. A. (1990). Clustering of L-type Ca²⁺ channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, 347(6290), 281–284.
- Wilent, W. B., & Nitz, D. A. (2007). Discrete Place Fields of Hippocampal Formation Interneurons. *Journal of Neurophysiology*, 97(6), 4152–4161.
- Wood-Jones, F., Portens, S. D. 1928. The Matrix of the Mind. Honolulu: Mercantile
- Yang, S., Yang, S., Moreira, T., Hoffman, G., Carlson, G. C., Bender, K. J., Tang, C.-M. (2014). Interlamellar CA1 network in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12919–12924.