

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

NÚCLEO DE NEUROCIÊNCIAS

JULIÁN TADEO FELIPE VEGA

**CIRCUITO BULBO OLFATÓRIO-HIPOCAMPO DORSAL E SEUS IMPACTOS NA
MEMÓRIA SOCIAL DE LONGA DURAÇÃO**

BELO HORIZONTE

2018

JULIÁN TADEO FELIPE VEGA

**CIRCUITO BULBO OLFATÓRIO-HIPOCAMPO DORSAL E SEUS IMPACTOS NA
MEMÓRIA SOCIAL DE LONGA DURAÇÃO**

Projeto de pesquisa apresentado ao programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Especialista

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes

BELO HORIZONTE

2018

043 Vega, Julián Tadeo Felipe.
Círculo bulbo olfatório-hipocampo dorsal e seus impactos na memória social de longa duração [manuscrito] / Julián Tadeo Felipe Vega. - 2018.

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

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes. Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes.

Projeto de pesquisa apresentado ao programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Especialista.

1. Neurociências. 2. Memória. 3. Ondas Encefálicas. 4. Neurogênese. I. Moraes, Grace Schenatto Pereira. II. Moraes, Márcio Flávio Dutra. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

“Mede o que é mensurável e torna mensurável o que não o é.”

Galileo Galilei

À minha grande amiga e esposa amada que acreditou e apoiou esse meu insólito sonho

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre haver me guiado e protegido pelos tortuosos e floridos caminhos da vida. Por sempre ter me oferecido as melhores oportunidades de crescimento e luta para o meu aperfeiçoamento. Por haver me presenteado com uma família com inesquecíveis e sublimes valores de bem. Por haver me confiado uma esposa e um filho que são as luzes celestes de minha existência. Por sempre haver colocado, desde minha infância, pessoas especiais em minha marcha pessoal e profissional. Por haver despertado em mim, desde menino, uma vontade imensa de alcançar as mais altas estrelas. Por ter colocado no meu coração a certeza que a fé me levaria a qualquer lugar.

Agradeço a minha esposa e amiga amada Flávia que viabilizou a realização desse insólito sonho. Sem ela nada disso estaria acontecendo. Apesar de saber que eu precisaria me ausentar parcialmente do meu trabalho remunerado e que lhe seriam sacrificadas muitas horas de convívio e atenção, apoiou meus estudos e acreditou que eu seria capaz de trilhar um novo caminho. Foram contínuas, intermináveis e para sempre inesquecíveis suas frases de motivação ao longo do ano de 2017. Foram muitas horas de sobrecarga nos trabalhos do nosso lar. Foram muitas horas em que você teve que se dedicar sozinha ao nosso amado filho Lucas. Mas sempre, no final de um dia exaustivo de estudos, você olhava para mim e dizia: “ Você vai passar na prova meu amor. Você vai conseguir realizar seu sonho. Fique tranquilo. Vai dar tudo certo.” E deu... A você, minha amada, meu eterno agradecimento à sua amizade e companheirismo incondicionais.

Agradeço ao meu amado filho Lucas por haver-me inspirado todos os dias a buscar esse sonho. Por ser a luz da minha vida e por todos os dias me presentear com seus sorrisos e beijos iniciados às 5:30 da manhã. Por ter aberto mão de muitas horas de convívio sem nada me cobrar e apenas sorrir. Obrigado filho por ser meu maior amigo.

Agradeço aos meus amados e gigantes pais Marcelo e Rizete que até hoje me carregam no colo com seus braços fortes e amorosos, buscando oferecer-me as melhores flores dos seus jardins. Obrigado meus amigos queridos por sempre estarem ao meu lado e me fortalecerem na fé e nos valores morais que edificam um homem. Obrigado por estarem comigo nos momentos de dificuldade reduzindo o peso dos meus ombros. Obrigado por caminharem ao lado de minha família e nos trazerem tantas alegrias e tanto conforto de alma. Obrigado pelas horas de sono não dormidas para vigiar por mim. Obrigado por abrirem mão do próprio conforto para arrancarem um sorriso de meu rosto. Obrigado por me amarem muito mais do que mereci. Obrigado por serem meus pais.

Agradeço a minha amada irmã Camila que sempre esteve ao meu lado: desde nossa infância inesquecível aos dias atuais em que juntos confidenciamos nossos planos de vida e rimos de forma irreverente. Obrigado por sempre ovacionar minhas conquistas e por me incentivar. Seu apoio foi sempre muito importante para mim; mais do que você imagina. Obrigado por ser essa grande amiga em minha vida, a quem posso recorrer a qualquer momento.

Agradeço aos meus amados sogros, Jussara e Denilton, que sempre me guardaram como um filho, cuidando de mim e da minha família, me oferecendo constantemente momentos de alegria e grandes ensinamentos de simplicidade e carinho.

Agradeço de forma especial a minha Orientadora e Professora Dra. Grace que, contrariando toda lógica acadêmica, viu em mim um futuro membro de sua renomada e prestigiada equipe. Jamais me esquecerei do dia em que você, no corredor do NNC, indo fazer a primeira reunião de equipe após sua volta dos EUA, me disse: “ Entra! Vem fazer parte da reunião conosco!” Fiquei sem entender, mas algo me dizia que naquela hora meu sonho estava se iniciando. Ainda na incerteza de que teria o privilégio de ser orientado por você percebi que eu de fato tinha conseguido entrar pro seu laboratório! Quanta alegria. Seria um membro do Núcleo de Neurociências da UFMG. Confesso que me senti um tanto vaidoso! Obrigado professora! Obrigado por acreditar em meus estudos. Por confiar no meu futuro trabalho. Por apostar que eu serei um aluno que somará com suas pesquisas. Por haver me incentivado desde o primeiro email. Obrigado por haver aberto, de forma tão acolhedora e descontraída, essa imensa porta para uma nova trajetória em minha carreira. Obrigado por sua dedicação e consideração constantes. Como te respondi no primeiro email, traduzirei toda essa minha gratidão com meu compromisso em ser um aluno estudioso, responsável e dedicado. Sinto-me honrado em ser seu aluno.

Agradeço ao meu co-Orientador Professor Dr. Márcio Moraes, que pelas irônicas curvas do destino, aceitou ser meu professor. Obrigado pela confiança em meus estudos, pela simplicidade no trato e pela oportunidade de aprender ao seu lado. Sinto-me honrado em ser seu aluno.

Agradeço a Professora Dra. Paula Scalzo pela gentileza, consideração e confiança em viabilizar meu contato com a Professora Grace. Obrigado por todo o apoio durante a especialização e por ter marcado meu currículo e minhas decisões com suas aulas de neuroanatomia.

Agradeço a minha amada amiga Beré que há longos anos vem, incansavelmente, ajudando-me a crescer na estrada da vida. Obrigado, amiga querida, por caminhar ao meu lado e auxiliar-me no aprimoramento como pai, filho, marido, trabalhador e amigo.

Agradeço ao meu amigo Lucas Bernardes que durante 2 intensos anos participou da minha vida de forma decisiva. Obrigado por ter me ensinado tanto em tão pouco tempo e por ter me ajudado nessa nova etapa da vida.

Agradeço aos meus amigos e tios Amim e Dudu por haverem participado dessa minha transição de forma tão carinhosa e objetiva. Obrigado por sempre estarem ao meu lado, desde criança, nos momentos marcantes de minha vida.

Agradeço às integrantes da banca, Ana Flávia e Luciana Melo, pelo aceite e pela gentileza em somar com o início dos meus trabalhos acadêmicos.

Finalmente, agradeço aos professores e colegas de trabalho do Núcleo de Neurociências da UFMG por me acolherem como novo membro da equipe.

RESUMO

O isolamento social (IS) em roedores prejudica o armazenamento da memória social de longa-duração (MSLD) e o acoplamento entre o bulbo olfatório (BO) e o hipocampo-dorsal (HD). Em contrapartida, o ambiente enriquecido (AE) recupera o déficit desse tipo de memória, via mecanismos dependentes de neurogênese. O presente projeto testará a hipótese de que o acoplamento entre BO e HD, comprometido pelo IS, pode ser recuperado pelo AE e que a neurogênese é condição necessária para que o AE possa prevenir os efeitos do IS sobre a MSLD. Assim, será avaliado o acoplamento BO-HD por meio da análise do potencial de campo (LFP), em animais isolados em AE, durante a evocação da MSLD. Além disso, ao inibir a neurogênese, verificaremos o papel da mesma no provável efeito do AE sobre o acoplamento BO-HD. Os camundongos C57/BL6 serão distribuídos em 4 grupos que ficarão alojados em dois tipos de ambiente (AE e/ou IS) e terão suas MSLD avaliadas a partir do paradigma residente-intruso. Para a análise do efeito neurogênico sobre as áreas estudadas será utilizada a irradiação intracraniana com raios gamma para induzir a apoptose das células nervosas. Através de eletrodos bipolares, o sinal LFP será captado simultaneamente nas regiões do BO e do HD para que dessa forma, durante a tarefa, possa ser analisado o acoplamento entre os padrões oscilatórios theta e gamma gerados, respectivamente, por essas regiões.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 Memória.....	5
1.1.1 Formação e armazenamento de memórias: os engramas	6
1.1.2 Tipos de memórias.....	12
1.1.3 Memória Social.....	14
1.1.3.1 Fatores ambientais : isolamento social x ambiente enriquecido.....	16
1.2 Neurogênese	17
1.3 Circuito bulbo olfatório - hipocampo dorsal na memória social.....	23
1.4 Oscilações neurais.....	28
1.4.1 Um breve conceito de circuitos neurais.....	28
1.4.2 Neurônios oscilam?.....	29
1.4.3 Oscilações e funções cognitivas	30
1.4.4 Populações neurais (<i>cell assemblies</i>) e sincronismo	32
1.4.5 <i>Local Field Potential</i> (LFP)	33
1.4.6 <i>Cross-frequency coupling</i>	34
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37

4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Animais experimentais	37
4.2 Grupos e condições de alojamento	38
4.3 Ambiente da tarefa de comportamento	39
4.4 Tarefa de comportamento: Paradigma Intruso-Residente.....	39
4.5 Procedimentos cirúrgicos	41
4.5.1 Cirurgia estereotáxica: inserção de eletrodos	42
4.6 Histologia	43
4.7 Irradiação intracraniana	44
4.8 Desenho Experimental.....	45
5. PLANO DE DESENVOLVIMENTO	48
6. RECURSOS FINANCEIROS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

*“ A característica mais saliente da memória é
justamente o esquecimento ”*

James McGaugh

Apesar de nas últimas décadas o campo das neurociências ter sido potencialmente revolucionado por crescentes descobertas, a compreensão das bases neurobiológicas da memória ainda é um desafio para os neurocientistas modernos.

Semanticamente, memória pode expressar desde as mais emotivas e subjetivas percepções espaço-temporais da vida de um indivíduo, quanto um complexo mecanismo neurofisiológico ocorrido no sistema nervoso central desse mesmo indivíduo. Analisada em nível cognitivo e num cenário evolucionista darwiniano, o médico e psicólogo William James (1890) define a memória como um processo de armazenamento, dentro do cérebro, das informações aprendidas, compondo item fundamental para o comportamento adaptativo dos animais. Sob uma perspectiva neuroanatômica, Kandel (2000) afirma que trazer à tona uma memória, nada mais seria que o resultado de uma interação complexa entre as diversas regiões encefálicas envolvidas, enfatizando que elas podem ser modificadas ao longo do tempo por um mecanismo de influências múltiplas, também conhecido como neuroplasticidade. Já, em nível fisiológico, a memória (explícita de longa duração) pode ser definida como um processo que envolve 4 etapas fundamentais: aprendizado (aquisição da informação), codificação (mudanças promovidas pelo aprendizado), armazenamento (dependente do tipo de codificação) e, finalmente, evocação da informação (Izquierdo, 2002). Os mecanismos subjacentes a cada etapa podem envolver alterações em canais iônicos, receptores de membrana e até mesmo em fatores de transcrição, capazes de sinalizar uma nova síntese de proteínas que estarão envolvidas na formação de uma nova memória. Assim, evidencia-se que o processo de formação de uma memória não é simplesmente

o produto de um fator externo, mas também de eventos (químicos, elétricos, magnéticos, mecânicos e biológicos) em níveis celular e molecular.

Independente de qual interpretação e significado sejam conferidos à palavra memória, uma vez consolidadas em nosso sistema nervoso, as memórias passam a compor o repertório cognitivo, sensorial, motor e comportamental de cada um de nós, caracterizando-nos de forma singular e pitoresca dentro do cenário biológico e social que nos encontramos inseridos.

1.1.1 Formação e armazenamento de memórias: os engramas

A ideia de que a memória fosse algo que pudesse estar fisicamente armazenado no cérebro remonta, até onde se conhece, às ideias de Platão, na Grécia Antiga, quando afirmou “(...) bloco de cera em nossas almas - de diferentes qualidades, de acordo com os indivíduos - e isso é “o dom da Memória, a mãe das Musas”. Quando vemos, ouvimos ou pensamos em algo, submetemos essa cera às percepções e aos pensamentos, e os imprimimos nela, assim como imprimimos com sinetes.” (Yates, 2007). No entanto foi apenas no século XX, a partir das teorias de Richard Semon e Donald Hebb, que se iniciou uma nova era de mais ampla compreensão dos supostos mecanismos envolvidos nesse singular evento. Para a maioria dos cientistas estava óbvio que a memória ficaria representada no cérebro de forma física, no entanto para muitos outros ela estaria armazenada na mente (Bergson, 1911; McDougall, 1911). Com a divulgação da teoria do engrama de Richard Semon (1904, 1909) e da teoria da plasticidade sináptica de Donald Hebb (1949) novas portas de entendimento neurofisiológico foram se abrindo. Ao longo das décadas seguintes essas ideias foram servindo de substrato teórico para viabilizar pesquisas sobre os mecanismos envolvidos nas etapas que iam desde a aquisição de uma memória até o valioso processo final de sua evocação. Nos últimos anos, com o auxílio de animais transgênicos, de técnicas de alta resolução espaço-temporal, como a optogenética, e de outras tantas tecnologias eletrofisiológicas, tem-se verificado, com um alto grau de detalhamento, que de fato existem células nervosas responsáveis por abrigar as informações captadas e que esses neurônios trabalham em conjunto em um mecanismo maior de armazenamento numa escala temporal diversificada.

O revolucionador conceito do engrama, como sendo a representação neural do armazenamento das memórias no cérebro, foi introduzido por Richard Semon no início do século XX, quando publicou seus trabalhos sobre a teoria dos engramas, também referenciada como a teoria dos traços de memória (Semon, 1904,1909). De acordo com essa teoria, a informação aprendida ativaria uma definida população de neurônios, induzindo permanentes transformações, físicas e/ou químicas, nessas células, que agora ao serem acionadas em conjunto (engrama), passariam a carregar uma informação (Poo et al, 2016). A ideia de Semon foi desprezada e refutada pela comunidade científica e somente após a tradução do seu livro para o inglês, em 1921, que o psicólogo americano Karl Lashley inicia, de forma pioneira, uma sistemática e veemente busca pelas células que compunham os supostos engramas. Infelizmente Lashley não tinha disponíveis as técnicas dos tempos atuais e usou uma abordagem errônea de lesão induzida em roedores para tentar descobrir onde residiam esses neurônios. Apesar de haver chegado a conclusões equivocadas, seus estudos foram importantes para trabalhos seguintes. Ao longo das décadas foram-se somando esforços e surgindo novas descobertas envolvendo os mecanismos dessas supostas células de memória, no entanto foi apenas em 2012, após mais de um século da teoria inicial dos engramas, que Xu Liu e colaboradores, do renomado Instituto de Tecnologia de Massachusetts em Cambridge (MIT), trazem à tona um trabalho de altíssimo impacto. Neste estudo, os autores conseguiram manipular com a maior precisão temporal e espacial até então vista, uma específica e escolhida população de neurônios e dessa forma associá-la com uma memória. Com o uso da optogenética eles conseguiram “marcar” o engrama que se “acendia” durante a codificação de uma memória de medo. Uma vez marcada, essa população neural podia ser reativada, por meio da incidência de luz azul canalizada por fibra óptica no cérebro do roedor. Essa ativação ocorria em qualquer momento e em qualquer outro contexto espacial, evidenciando que aquela memória de medo estaria “abrigada” naquele conjunto de neurônios (engrama) e que podia ser “ligada” e “desligada” a qualquer instante.

De fato, não é simples demonstrar que uma específica população de neurônios se comporta como células de um engrama. Para isso é preciso que se atenda a três condições: (i) precisa-se demonstrar que essas células são ativadas no instante exato do aprendizado, (ii) precisa-se verificar alterações físicas e químicas nessas células e

finalmente (iii) no momento da evocação da memória, essas mesmas células precisam ser acionadas e formar a mesma memória original (Tonegawa et al., 2015a). Os estudos envolvendo a busca pelos engramas podem ser catalogados em 3 diferentes tipos: (1) observacional, (2) perda-de-função e (3) ganho-de-função (Gerber et al., 2004; Martin and Morris, 2002). Os experimentos observacionais são os de menor força, uma vez que apenas demonstram a correlação entre a atividade de uma população neural e a expressão no comportamento do animal para um certo tipo de memória. Os estudos de perda-de-função são os seguintes em força, já que agora, através da inibição induzida de uma população neuronal, fica evidenciado a correlação dessa população com a ausência da expressão de um comportamento para um certo tipo de memória. Finalmente os estudos de maior força são os de ganho-de-função, já que eles apontam que a ativação de uma dada população neural é suficiente para a expressão de uma memória. O renomado trabalho supracitado de Xiu Liu e colaboradores em 2012 foi do tipo ganho-de-função. A figura abaixo é um resumo (até o ano de 2015) de todos os trabalhos relevantes que envolveram os estudos dos engramas em memórias de roedores. Note que esses estudos foram realizados em diversas áreas encefálicas e são distintos nos 3 tipos previamente citados.

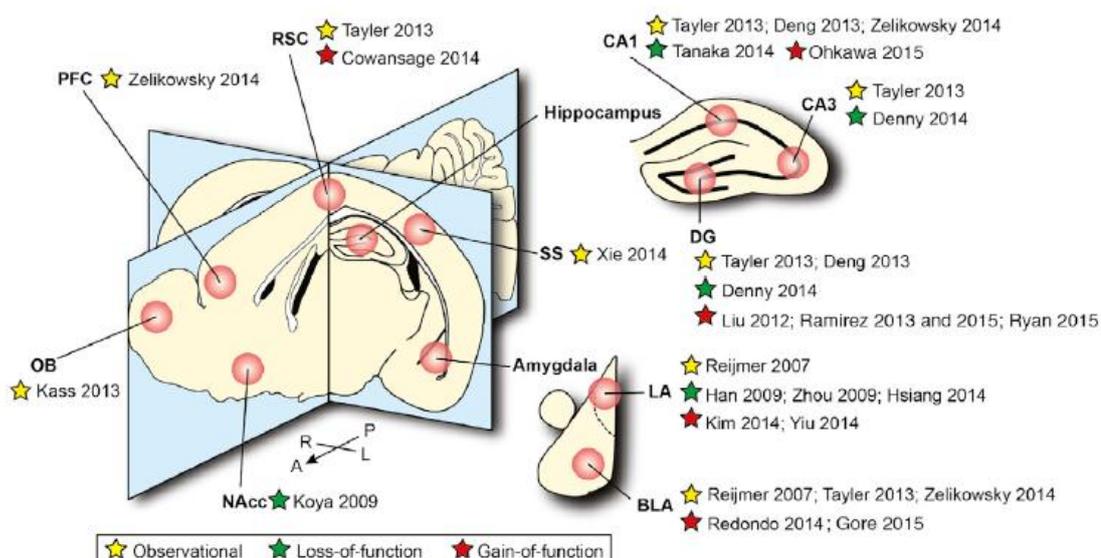


Figura 1: (PFC) córtex pré-frontal; (RSC) córtex retro-esplênico; (CA1); (CA3); (DG) giro denteado; (LA) amígdala lateral; (BLA) amígdala baso-lateral; (SS) córtex sensorial; (OB) bulbo olfatório; (NAcc) núcleo acumbente. (Figura extraída de Tonegawa et al., 2015b)

Sabe-se que para um engrama ser consolidado no sistema nervoso, isto é, para uma nova memória ser formada, ele precisa primeiramente ser codificado (etapa subsequente ao aprendizado na qual novos neurônios são recrutados) e depois fortalecido (etapa que confere “força” ao traço de memória a partir da potenciação das interações sinápticas) (Poo et al, 2016). Na consolidação do engrama inicia-se o processo de estabilização dessas novas conexões criadas pelo aprendizado, assinalando a transição de um estado inicial de fragilidade de uma nova memória para um segundo estado de estabilidade e de longa duração (Ryan et al., 2015). A principal característica dessa etapa é que ela representa uma janela temporal finita que se inicia imediatamente após o aprendizado, período no qual a memória se encontra num alto grau de instabilidade e labilidade, podendo ser perturbada ou até mesmo rompida (Flexner et al., 1963; Flexner et al., 1967; Davis and Squire, 1984). A etapa termina quando ocorre a estabilização das sinapses na rede de neurônios envolvida nesse aprendizado. Quando essa nova informação ficou armazenada no cérebro e está disponível para ser evocada, obedecendo às três condições elementares (Tonegawa et al., 2015a) supracitadas, diz-se que essa população de neurônios, capaz de ser reativada, formou um engrama.

Quando Semon elaborou a teoria dos engramas e afirmou sobre “...a persistente embora, principalmente, latente modificação na substância irritável produzida por um estímulo...” ele não discorreu nada a respeito da natureza dessa modificação. Foi apenas em 1949, que Donald Hebb, o mais famoso discípulo de Lashley, em seu notável livro *The Organization of Behavior: a neuropsychological theory*, propôs um modelo teórico baseado na plasticidade sináptica neuronal, como substrato para a formação dessas memórias, afirmando que os neurônios que codificavam uma memória sofriam permanentes fortalecimentos entre suas sinapses em função da co-ativação entre o neurônio pré e pós-sináptico. Nesse livro, Hebb nominou esse grupo de neurônios co-ativados como *cell assembly* (assembléia celular) e postulou que quando essas células estivessem interconectadas elas formariam um padrão de conexões que equivaleria à representação de uma informação externa. Essa representação seria mantida no repertório de memórias do indivíduo enquanto houvesse reverberação dessas conexões nessa assembléia. Anos mais tarde ele estendeu seu postulado elaborando a hipótese de que caso essa rede neuronal permanecesse ativa, as conexões

poderiam ser fortalecidas e um subsequente processo de crescimento dessa rede aconteceria. Isso representava a ideia de que as conexões se tornariam mais eficientes e duradouras caso os neurônios, de um dado circuito preferencial, disparassem juntos. Daí surge a famosa máxima neurocientífica: “neurônios que disparam juntos permanecem juntos”. A medida que foi-se concebendo a ideia de que a memória estaria então distribuída ao longo de um conjunto de neurônios, Hebb afirmou que apenas um pequeno subgrupo dessa assembleia maior de neurônios precisaria ser acionado para a reativação total da memória. Em outras palavras, a informação contida na circuitaria total poderia ser evocada através do acionamento de uma simples “pista” capaz de “reacender” o engrama e por sua vez fortalecer esse traço mnemônico, tornando-o mais duradouro e vivo no repertório de memórias do indivíduo. Essa teoria representava a resposta para um bom mecanismo evolutivo adaptativo, no qual a destruição de uma pequena parcela de neurônios de um dado engrama não representaria a destruição de uma memória (Bear, 2017). A Figura 2 (Bear, 2017) é um resumo didático dessa teoria de Hebb.

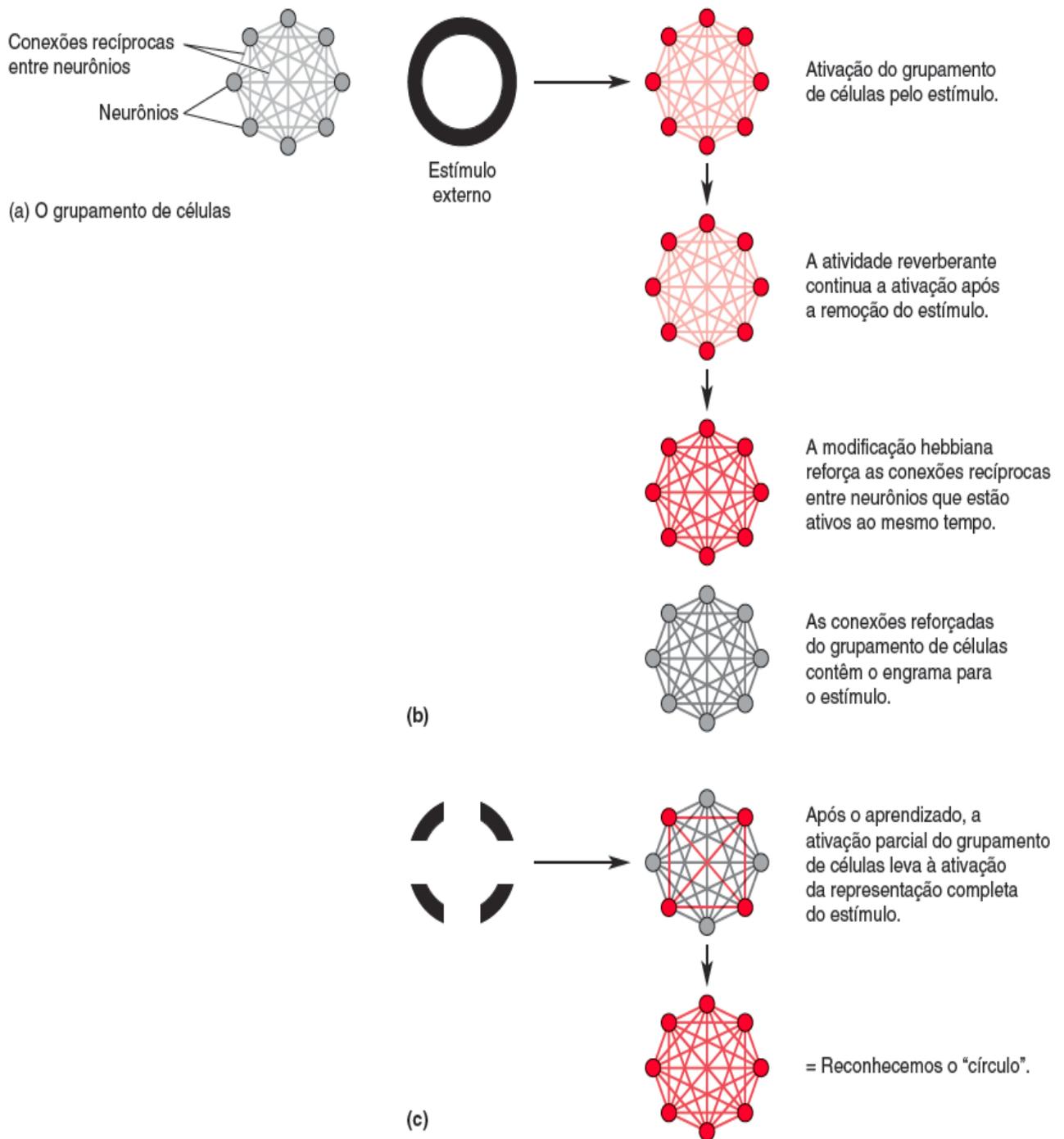


Figura 2

Dessa forma, ficavam então unidas as teorias dos engramas e da plasticidade sináptica como mecanismos formadores e hospedeiros das memórias.

1.1.2 Tipos de memórias

As memórias podem ser classificadas obedecendo uma análise bidimensional que considera dois aspectos: (1) curso temporal na etapa de armazenamento e (2) natureza da informação lembrada (Purves et al., 2010).

Considerando a dimensão temporal, as memórias podem ser divididas em memórias de curta duração (variando de segundos até poucas horas) ou de longa duração (variando de horas até anos). Em 1890 William James convencionou que as memórias que duravam entre 1 e 6 horas, após a aquisição, seriam chamadas de memórias de curta duração. Essa janela temporal refere-se justamente ao tempo necessário para que as memórias de longa duração sejam consolidadas (Izquierdo, 2002), sendo que nessas primeiras horas, elas são lábeis e passíveis de interferências, podendo ser moduladas e até mesmo canceladas de forma definitiva (Izquierdo et al., 1999). A consolidação é considerada um mecanismo de fixação definitiva de uma memória e envolve principalmente o hipocampo e suas conexões (Izquierdo, 2002). Essa etapa pode ser afetada por diversos fatores como: traumatismo craniano, álcool, fármacos, eletrochoques e até mesmo a exposição do indivíduo a novos ambientes (McGaugh, 1966 e 2000, Izquierdo, 1989). Isso mostra sua sensibilidade a fatores externos e internos e o quão difícil é formar uma memória de longa duração em nosso repertório cognitivo. As memórias de curta duração têm suas bases bioquímicas diferentes das bases das memórias de longa duração e não requerem mecanismos de síntese proteica, não sendo, portanto, reconhecidas como uma fase da memória de longa duração, mas sim como um mecanismo fisiológico paralelo e diferente (Izquierdo, 2002). A evidência dessa interpretação se deu a partir de experimentos (Izquierdo et al., 1998) que demonstraram que era possível suprimir uma memória de curta duração sem causar a perda da memória de longa duração para um aprendizado específico em um mesmo indivíduo. A título de ilustração didática, vale citar Iván Izquierdo (2002) : “O papel da memória de curta duração é, basicamente, o de manter o indivíduo em condições de responder através de uma “cópia” efêmera da memória principal, enquanto esta ainda não tenha sido formada (...), essa propriedade faz com que ela possa efetivamente cumprir seu papel de “alojamento temporário” da memória, enquanto “sua casa” definitiva está sendo construída.”

As memórias de longa duração (também conhecidas como memórias primárias ou principais) (McGaugh, 2000) envolvem processos metabólicos no hipocampo e suas conexões. Requerem entre 3 e 8 horas para serem consolidadas (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006) e duram mais de 6 horas (McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006). A sua formação envolve mecanismos fisiológicos de síntese proteica através de ativação gênica ou do sistema mTOR extra-ribossomal (fora do núcleo neuronal) (Izquierdo, 2002) e tem como fator influenciador no tempo de persistência o nível de “alerta emocional” presente durante sua consolidação inicial (Cahill e McGaugh, 1998). O aprofundamento do conhecimento dos mecanismos de consolidação desse tipo de memória foi consequência da descoberta da LTP (*long term potentiation*) feita por Terje Lomo e Timothy Bliss. A LTP é um processo eletrofisiológico representando um aumento da força sináptica entre dois neurônios estimulados de forma síncrona, a partir de uma estimulação de alta frequência dessa sinapse química. Clarke e colaboradores (2010) verificaram que a sequência dos processos bioquímicos que participam da LTP são os mesmos que participam da formação de uma memória de longa duração. Curiosamente, ao contrário do que muitas pessoas pensam, a diferença entre a formação de uma memória de curta ou de longa duração não depende do conteúdo cognitivo do *input* da informação, mas sim dos mecanismos bioquímicos subjacentes a essas memórias (Izquierdo, 2002).

Uma categorização ainda controversa é sobre a memória de trabalho ou memória operacional. Alguns psicólogos norte-americanos a consideram como um sub-tipo de memória de curta duração. No entanto, para a grande maioria dos neurocientistas, em função da sua farmacologia molecular totalmente diferente, ela é considerada como sendo um outro tipo de memória. Um tipo muito breve e fugaz de memória (variando de segundos até no máximo 3 minutos) que funciona como um gerenciador central da realidade do indivíduo, não ocupando o papel de formar arquivos, mas sim de analisar e comparar as recorrentes informações que chegam (Izquierdo, 2002). Ao manter a informação “acesa” durante uma breve janela temporal ela viabiliza uma rápida integração e comparação atemporal de algumas memórias preexistentes, dando assim continuidade a ações e viabilizando o gerenciamento de algumas funções executivas como a tomada de decisão. É uma memória processada fundamentalmente no córtex pré-frontal e dado seu súbito e fugaz processamento indica depender de um

processamento fruto de atividades elétricas dos neurônios não sendo acompanhadas de alterações bioquímicas consideráveis nas sinapses (Izquierdo, 2002).

Considerando a dimensão natureza da informação, a memória de longo prazo pode ser classificada como implícita (também nominada memória procedural) ou explícita (também nominada memória declarativa) (Kandel, 2000). A primeira é tida como um tipo inconsciente de memória, envolvendo o aprendizado motor, hábitos e condicionamentos. Em função desse tipo de memória é que sabemos caminhar ou andar de bicicleta. Vale notar que estruturas como o cerebelo e o núcleo caudado abrigam os principais circuitos desse tipo de memória (Izquierdo, 2002). Já, as memórias explícitas, são aquelas que envolvem uma evocação deliberada, consciente, a partir de vivências e informações prévias na vida do indivíduo (Kandel, 2000), sendo governadas fundamentalmente pelo hipocampo e suas conexões e por isso mais suscetíveis à modulação pelas emoções (Izquierdo, 2002). Elas ainda podem ser divididas mediante o conteúdo da informação explícita: ou são memórias de uma experiência pessoal, auto-biográfica, envolvendo episódios ou eventos que marcaram de uma certa forma a vida do indivíduo (memória episódica) ou são memórias vinculadas a fatos ou conceitos (memória semântica), compondo um conhecimento global e impessoal (Kandel, 2014).

Alguns autores são resistentes em reconhecer que animais privados de verbalização possam declarar seu conhecimento e por isso dizem que eles não têm memórias declarativas, mas sim explícitas (Bear, 2017). Em nosso trabalho, reconhecemos a memória declarativa de camundongos e faremos sua análise e mensuração a partir de uma tarefa que envolve a capacidade de reconhecimento entre co-específicos, corroborando com a ideia do padrão de consciência na “declaração” da memória no momento em que ocorre o camundongo acusa o reconhecimento mediante um novo estado de desinteresse exploratório.

1.1.3 Memória Social

Toda relação social está vinculada com a habilidade de um indivíduo reconhecer seus co-específicos (Thor, Wainwright & Holloway, 1982). A partir dessa interação,

a memória social retrata a capacidade que membros de uma espécie têm de estabelecer comportamentos básicos de sobrevivência como reprodução, defesa territorial e estabelecimento de hierarquia (Ferguson *et al.*, 2002). Essa capacidade de reconhecimento social é viabilizada por distintos mecanismos sensoriais, dependendo da espécie dos animais. Nos primatas, ela se dá primordialmente através dos sistemas auditivo e visual (Ferguson *et al.*, 2002; Tsao & Livingstone, 2008). Já, em grande parte dos outros mamíferos, por exemplo nos roedores, ela acontece através do sistema olfatório, uma vez que é um sistema mais desenvolvido, conferindo uma alta capacidade de processamento de odores.

Dentro da estrutura social em que vive, cada roedor tem associado à sua identidade uma “assinatura olfativa”, isto é, um conjunto de odores voláteis e não-voláteis (predominantemente os feromônios) que funcionam como pistas quimiossensoriais específicas, presentes na sua área anogenital, tornando-o único dentro deste cenário e possibilitando que seja reconhecido por seus co-específicos (Karlson & Luscher, 1959; Carr *et al.*, 1976; Ferguson *et al.*, 2002; Markham & Juraska, 2007). A sinalização dessas informações sociais é importante para evidenciar estados como saúde do animal, dominância, territorialidade, período de fertilidade e até mesmo a existência de cópula prévia (Kogan *et al.*, 2000; Arakawa *et al.*, 2008).

Sabe-se que as bases neuroanatômicas e biológicas da memória social estão associadas diretamente às estruturas do hipocampo e do bulbo olfatório (Schinder, 2007). Dessa forma, a memória social é classificada como uma memória hipocampo-dependente (Kogan *et al.*, 2000) com modulação realizada pelo sistema olfatório (Sanchez *et al.* 2005). Tem como porta de entrada principal estruturas do sistema olfatório que captam as informações olfativas do meio externo e posteriormente as encaminham, de forma direta ou indireta, para o hipocampo e outras estruturas. Essas projeções e detalhamentos do sistema olfatório serão expostos no item 1.3.

A verificação de que o hipocampo não era apenas uma estrutura limitada ao processamento da memória espacial (Eichenbaum, 1996), mas que também era responsável pela formação da memória social, foi se confirmando a partir de estudos que apontavam sua participação em tarefas de aprendizado olfativo-dependente (Kogan *et al.*, 2000) e em tarefas de reconhecimento social (van Wimersma Greidanus and

Maigret, 1996; Maaswinkel et al., 1996; Pena et al., 2014). Muitos pesquisadores acreditam que sua participação na formação desse tipo de memória se deva ao fato dele ser uma estrutura capaz de fazer a integração dos complexos estímulos necessários para o processo de reconhecimento social (Sutherland and Rudy, 1989; Eichenbaum, 1996). Nessa etapa de integração, ele recebe convergentemente diversas aferências sensoriais e as codifica numa única informação que então é posteriormente convertida em uma representação polimodal para o roedor (Kogan et al., 2010).

1.1.3.1 Fatores ambientais : isolamento social x ambiente enriquecido

Já se é conhecido que alguns tipos de ambiente são capazes de promover a plasticidade neural e a modulação do comportamento de diversas espécies (Thor et al., 1982). O isolamento social (IS) e o ambiente enriquecido (AE) são dois tipos de ambientes capazes de promover essas alterações. Kogan e colaboradores (2000) demonstraram que a memória social de longa duração de camundongos tem sensibilidade à essas variações. Nesse estudo foi verificado que um camundongo isolado socialmente, isto é, privado de qualquer convívio com seus co-específicos, durante curtas 24h já se mostrava incapaz de reconhecer um juvenil, numa tarefa de reconhecimento, que lhe foi apresentado logo após o isolamento e que, num cenário no qual os camundongos ficavam agrupados, além de terem a memória social de longa duração preservada nas primeiras 24h ela ficou estendida para 7 dias após o treino.

Caracterizado por privar o roedor de qualquer convívio com seus co-específicos e de alojá-los em caixas pequenas e sem estímulos, contendo apenas ração e água, o isolamento social é um paradigma consolidado e bastante utilizado. Os protocolos de isolamento social variam em relação ao tempo do isolamento. Grande parte dos estudos utiliza um padrão de isolamento de 3 semanas em roedores adultos, no qual se verificam alterações em níveis comportamental (Gentsch et al., 1988; Wilkinson et al., 1994; Domeney & Feldon, 1998), motor (Wongwitdecha & Marsden, 1996) e vinculadas a memórias aversiva (Rudy, 1996; Coudereau et al., 1997) e espacial (Pacteau et al., 1989). Em nosso laboratório usamos o protocolo de isolamento social com duração de 7 dias em camundongos adultos e já verificamos seu efeito prejudicial na memória social de longa duração (Gusmão et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

Opostamente aos efeitos deletérios na memória social que o IS provoca, nosso grupo também tem estudado os efeitos positivos do AE, mostrando que animais nele mantidos, tem sua memória social de longa duração preservada. Foi verificado (Pereira-Caixeta et al., 2017) que o AE, para animais agrupados, foi capaz de promover um fortalecimento da MSLD, estendendo-a para até 10 dias e tornando-a menos susceptível às perturbações de agentes externos. Nossos estudos envolvendo os efeitos do AE sobre a memória social de longa duração (Monteiro et al., 2014; Pereira-Caixeta et al., 2017), apontaram a neurogênese, desencadeada pela exposição do roedor ao AE, como o mecanismo responsável pelos efeitos promnésicos nesses animais, uma vez que nesses trabalhos a inibição da neurogênese eliminou os efeitos positivos do AE. Portanto, por ser um ambiente correlacionado com a neurogênese, será melhor detalhado no item seguinte.

1.2 NEUROGÊNESE

“Todo puede morir, nada renacer...corresponde a la ciencia del futuro cambiar, si es posible, este cruel decreto”

Ramon y Cajal, 1928

Até meados do século XX não se acreditava que depois do nascimento do indivíduo, o cérebro pudesse dar origem a novas células nervosas. Apesar de já haverem alguns estudos que falassem do processo de divisão celular em regiões cerebrais em ratos adultos (Allen, 1912; Smart e Leblon, 1961), foi Joseph Altman, com seu famoso trabalho: *Are new neurons formed in the brains of adult mammals?* (Altman, 1962), foi o primeiro cientista a reconhecer a neurogênese em animais adultos. Apesar de sua publicação ter resultado em uma forte polêmica e ter sido criticada e refutada pela comunidade científica, abria-se oficialmente uma nova e inesquecível porta no campo da neurociência. Nos anos seguintes, despontaram fortes evidências que o fenômeno neurogênico ocorria no hipocampo de roedores adultos (Altman et al., 1963; Altman & Das, 1965). Em 1969, Altman consegue demonstrar que a prolife-

ração celular acontecia de forma contínua numa região adjacente aos ventrículos laterais de mamíferos, a zona subventricular (ZSV) e que o nascimento dessas novas células era acompanhado de uma migração rumo ao bulbo olfatório através de uma via de migração rostral (RMS). Outro grande colaborador nessa veemente busca pela confirmação da neurogênese foi Kaplan que numa série de trabalhos (Kaplan & Hinds, 1977; Kaplan, 1983; Kaplan, 1985) confirmou as evidências de neurogênese no hipocampo e no bulbo olfatório. No entanto, seus estudos foram também criticados e apenas na década de 90, já com melhores recursos experimentais, é que a neurogênese e seus mecanismos subjacentes foram de fato confirmados e reconhecidos pela comunidade. A RMS foi verificada (Corotto et al., 1993), comprovou-se o potencial neurogênico das células precursoras da SVZ (Lois and Alvarez-Buylla, 1994) e demonstrou-se que existem células-tronco no giro denteado e que elas são de fato capazes de gerar células granulares funcionais (Van Praag et al., 2002). Dessa forma já não restava mais dúvidas sobre os nichos neurogênicos em cérebros de roedores adultos. Recentemente, estudos de impacto sinalizaram com riqueza de detalhes que o bulbo olfatório (Frankland & Miller, 2008; Sakamoto et al., 2011) e o giro denteado no hipocampo dorsal (Frankland & Miller, 2008) são as mais expressivas áreas que abrigam o nascimento de novas células nervosas. A Figura 3 abaixo tem o intuito de ilustrar neuroanatômicamente as regiões neurogênicas supracitadas.

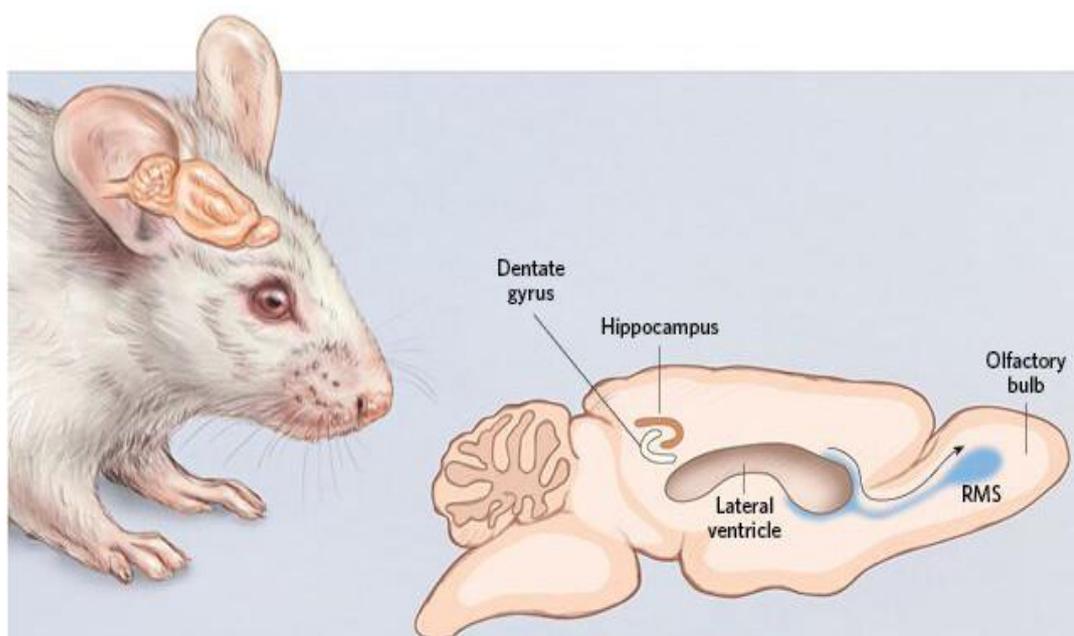


Figura 3. © Laurie O'keefe. The Scientist Magazine. October 1, 2015

Estudos mostraram que o nascimento dessas novas células nervosas é sempre acompanhado de um complexo mecanismo de migração e diferenciação celular, para que haja finalmente a integração do novo neurônio nas redes corticais preexistentes. Os neuroblastos (células originadas de células neurais precursoras) que nascem na SVZ migram uma longa distância, pela RMS, até chegarem, em estado maturado, no bulbo olfatório, para então se integrarem na camada granular e nos glomérulos (Ming; Song, 2011). A Figura 4 mostra de forma sucinta a maturação neuronal da SVZ ao BO.

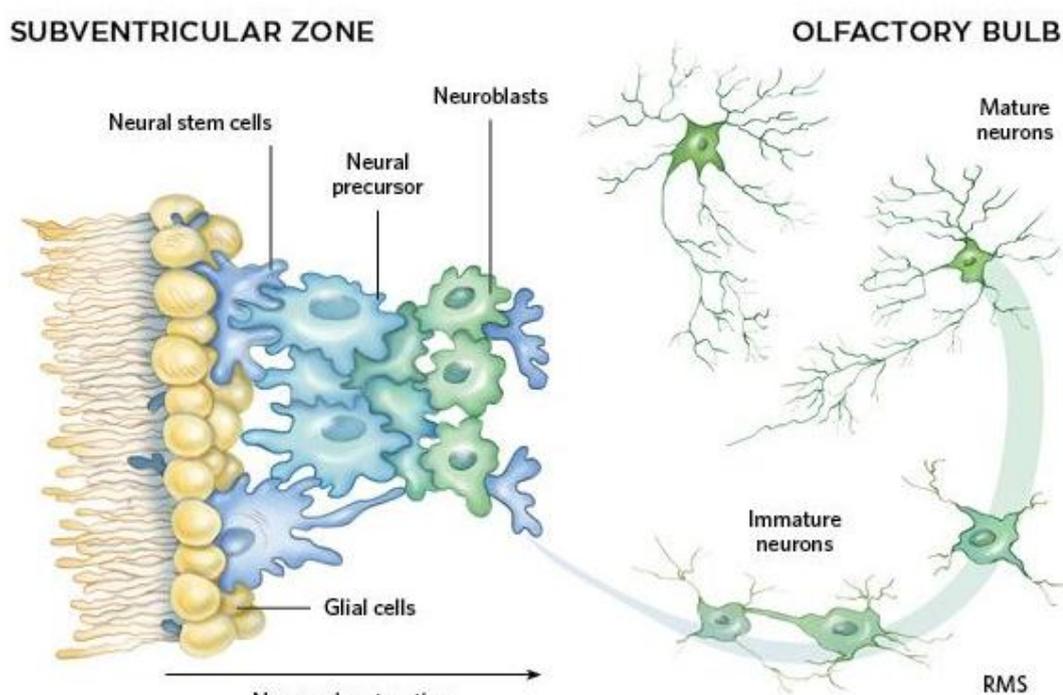


Figura 4. © Laurie O'keefe; Illustrations based on I. Varela-Nallar, N.C. Inestrosa, (2013) Front Cell Neurosci, 7:100, 2013

Os neuroblastos que nascem na zona subgranular (SGZ) do hipocampo iniciam seu processo de maturação e simultânea migração interna para a camada granular do giro denteado (Ming; Song, 2011) aonde, já completamente maduros, se integram. O período que vai desde a ativação da célula-tronco quiescente até seu estado final de diferenciação e inicial integração na camada granular dura aproximadamente 30 dias (Seri et al., 2004). Essa primeira integração sináptica na rede hipocampal ocorre quando o neurônio tem integralmente concluído seus processos de diferenciação e

maturação (Tozuka et al, 2005). No entanto, apenas após sete semanas do seu nascimento é que esse neurônio finaliza sua integração na rede, período que lhe conferirá as propriedades eletrofisiológicas plenas de um neurônio maduro (e.g, disparos de potenciais de ação) (Marín-Burgin & Schinder, 2012). Sabe-se que há uma certa dificuldade de integração sináptica na rede, já que esses novos neurônios tem uma alta resistência de entrada, isto é, apresentam poucos canais iônicos dependentes de voltagem, que por sua vez são as estruturas que viabilizam os disparos de potencial de ação. A Figura 5 mostra de forma sucinta a maturação neuronal ocorrida ao longo do giro denteado do hipocampo.

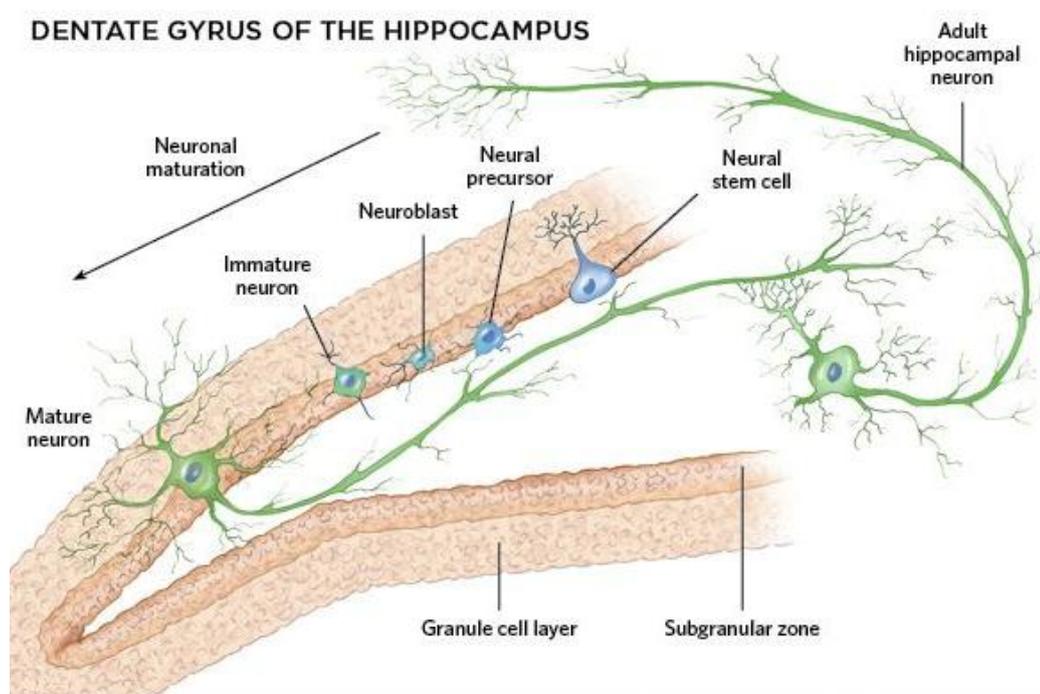


Figura 5. © Laurie O'keefe; Illustrations based on I. Varela-Nallar, N.C. Inestrosa, (2013) Front Cell Neurosci, 7:100, 2013

Quando se fala em neurogênese imediatamente existe uma associação intuitiva de benefícios gerados, uma vez que estamos falando de um aumento das mais valiosas células do corpo humano: os neurônios. No entanto, o assunto não é tão simples de ser interpretado apesar de já existirem evidências de que os impactos positivos de fato existem. Como exemplo de diferença de impacto funcional nas regiões neurogênicas sabe-se que as células que se integraram no BO assumem um papel

de substituição dos neurônios que morreram, participando assim de um mecanismo natural e contínuo de *turnover*. Já as células que se integraram no tecido hipocampal tem uma função de promover o crescimento do tecido (Frankland & Miller, 2008; Sakamoto et al., 2011). Estudos recentes (Gage, 2000; Lledo et al., 2006; Sahay et al., 2011; Aimone et al., 2011) tem mostrado que esses novos neurônios têm gerado consideráveis impactos positivos em mecanismos de aprendizado e formação de memórias espacial, episódica e contextual além de estarem vinculados com os mecanismos de processamento olfativo em roedores. A questão é que existem muitas variáveis subjacentes ao fenômeno neurogênico. Por exemplo: as dinâmicas cinética, morfológica e funcional envolvidas desde a proliferação até a integração são espécie-dependente (Snyder et al., 2009). Além disso, essa integração envolve um mecanismo com alta sensibilidade a fatores externos (e.g, o ambiente no qual o indivíduo se encontra) e apresenta taxas com alta variação dependentes da natureza do estímulo (Cameron et al., 1994; Kempermann et al., 1997; Kunh et al., 1997; Van Praag et al., 1999; Alberg et al., 2000; Lu et al., 2003; Pham et al., 2003; Uda et al., 2006).

A correlação entre neurogênese e memória tem atraído a atenção de muitos pesquisadores da neurociência cognitiva nas últimas décadas. A princípio acreditava-se que os benefícios gerados pelos novos neurônios incluídos numa rede neural e todos os impactos fisiológicos (plasticidade, proliferação de neuróglia, aumento de vascularização local, dentre outros) subjacentes a essa chegada, seriam incontestáveis. No entanto, os estudos nessa área têm apontado resultados controversos. Estimulando a neurogênese no giro denteado, Kempermann (1997) e van Praag (1999) verificaram seus efeitos positivos no desempenho comportamental em animais. Inibindo a neurogênese em camundongos, Saxe (2006), Imayoshi (2008) e Ko e (2009) verificaram déficit na memória de medo condicionado. Porém, Shors (2002) e Zhang (2008), após ablação neurogênica, não encontraram prejuízo nesse tipo de memória. Esses são apenas alguns estudos que mostram a real dúvida e controvérsia que circundam esse tema.

Sabe-se que a memória, através de mecanismos de plasticidade, é sensível ao ambiente no qual o indivíduo se encontra. No cenário neurogênico, o ambiente enriquecido é fator de alto impacto em alguns mecanismos de memória. Um dos primeiros

cientistas a utilizar a denominação ambiente enriquecido (*enriched environment*), foi Donal Hebb. Esse tipo de ambiente, construído intencionalmente para estimular o indivíduo a aumentar sua interação física e/ou social (Van Praag, Kempermann & Gage, 2000), vem sendo associado a trabalhos que buscam compreender melhor os mecanismos de neuroplasticidade e seus efeitos. Pode-se enriquecer um ambiente inserindo objetos (van Praag et al., 1999), introduzindo novos co-específicos (Koogan et al., 2000) ou também com diferentes odores de origem social ou não-social (Gusmão et al., 2012). Independentemente da forma utilizada para o enriquecimento ambiental, estabeleceu-se um consenso de que existe uma proporcionalidade direta entre a complexidade do ambiente e o desempenho do roedor em tarefas de memória (Bengotxea et al., 2012). Ainda que pouco se saiba sobre os mecanismos envolvidos nos impactos do AE sobre as redes neurais. Estudos mostram que ele está envolvido na facilitação de produção de fatores tróficos como, por exemplo, o BDNF, em regiões hipocampais e do bulbo olfatório (Pereira-Caixeta et al., 2016) e na produção de novos neurônios nessas duas áreas, aumentando também a sobrevivência desses neo-formados (Gould et al., 1999, van Praag et al., 2000). Okuda et al. (2009) verificaram que além dos efeitos neurogênicos o AE é capaz de potencializar a proliferação de células granulares na amígdala de camundongos, aumentando dessa forma o número de astrócitos; células de fundamental importância para qualificar as transmissões sinápticas das redes neurais, uma vez que são responsáveis pela regulação sinaptogênica, pela manutenção bioquímica do meio extracelular e pela secreção de fatores neurotróficos (Lent, 2008).

Dessa forma vemos que a memória social para ser formada e evocada está diretamente ligada à neurogênese nas estruturas do bulbo olfatório e do hipocampo.

1.3 CIRCUITO BULBO OLFATÓRIO - HIPOCAMPO DORSAL NA MEMÓRIA SOCIAL

“Eis porque a maior parte de nossa memória está fora de nós, numa pancada de chuva, num cheiro de quarto fechado...”

Marcel Proust - Em busca do tempo perdido

Até aqui, verificamos a intrínseca relação existente entre o bulbo olfatório e o hipocampo de roedores. Vimos que ambas estruturas participam do mecanismo de formação de memórias (Kogan et al., 2000) e que são os dois expressivos nichos neurogênicos no cérebro de adultos (Frankland & Miller, 2008). Neste item discorreremos um pouco sobre a neuroanatomia das vias que integram essas estruturas distantes anatomicamente, porém próximas sinapticamente, uma vez que é sabido que apenas duas sinapses separam o sistema olfatório principal do giro denteado no hipocampo (Vanderwolf, 1992).

Os sinais olfativos captados do ambiente externo são compostos químicos fruto de uma mistura de odores voláteis e não-voláteis e para serem processados pelo sistema nervoso central precisam ser primeiramente captados pelo sistema olfatório, dividido didaticamente em principal e acessório. O primeiro é constituído pelo epitélio olfatório principal e pelo bulbo olfatório principal e é responsável por detectar os odores voláteis. Já o último é constituído pelo órgão vomeronasal e pelo bulbo olfatório acessório e é o responsável por detectar os odores não voláteis (Sawyer et al., 1984; Matochik, 1988; Bluthé and Dantzer, 1993; Tirindelli et al., 1998). Esses dois sistemas trabalham de forma paralela e integrada uma vez que as vias que os compõem são em grande parte sobrepostas e com funções complementares (Licht & Meredith, 1987; Sanchez-Andrade, 2005, 2009; Spehr *et al.*, 2006). Os odores voláteis são conduzidos para áreas superiores encefálicas como hipocampo e córtex primário olfatório (Li et al., 2010; Yanget al., 2009; Moy, 2008). Já os odores não-voláteis são processados no próprio sistema olfatório acessório (Dulac, 2003). A Figura 6 abaixo ilustra de forma didática as estruturas principais desses dois sistemas e a localização do giro denteado do hipocampo em relação à elas.

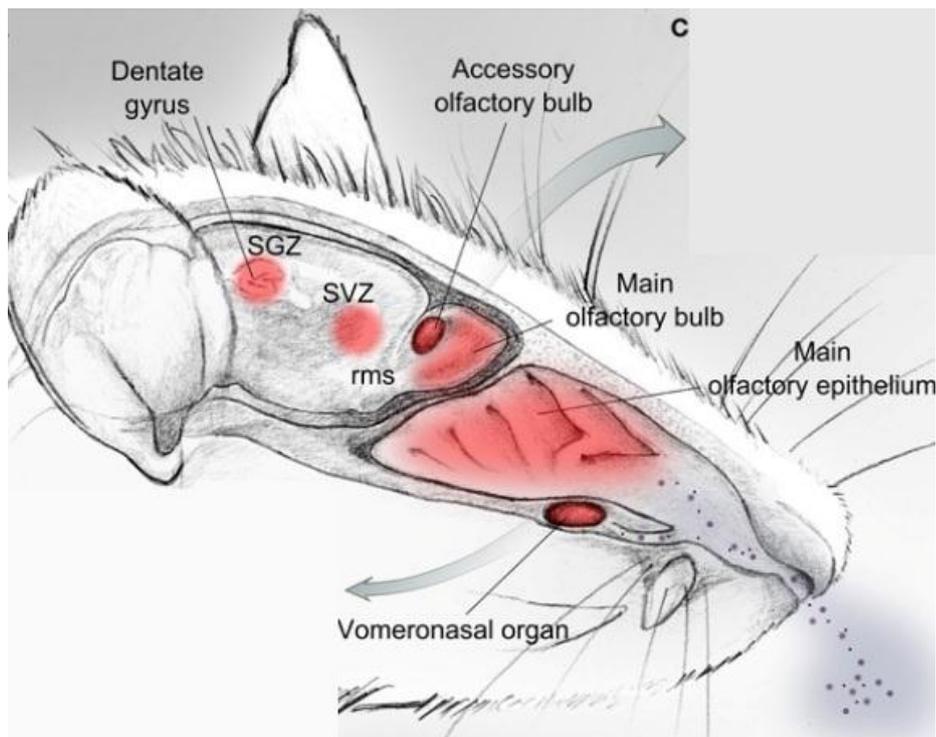


Figura 6. Figura adaptada retirada de Oboti, 2014

No epitélio olfatório principal existem terminações nervosas ciliares dendríticas de neurônios primários responsáveis pela captação dos odores. Projeções axonais desses neurônios se dirigem para os glomérulos do bulbo olfatório principal, aonde os sinais são primariamente processados. No bulbo olfatório encontram-se os neurônios de segunda ordem (células mitrais e células tufozas) que após captarem os sinais nos glomérulos, projetam seus axônios, pelo trato olfatório lateral, até as áreas secundárias e terciárias integrantes do tálamo, sistema límbico e córtex (Kandel, 2000; Sanchez-Andrade, 2005, 2009). Existe uma ramificação do trato olfatório lateral que se projeta para o córtex entorrinal e depois imediatamente para o giro denteado no hipocampo através da via perfurante. Vale ressaltar que o córtex piriforme, região envolvida no armazenamento e recuperação de traços de memória (Barkai & Saar, 2001; Haberly, 2001), tem projeções diretas para estruturas de controle endócrino e autonômico como o hipotálamo e a amígdala (porção lateral), abrigando assim um mecanismo de relação direta de mudanças nos eixos de regulação de funções vegetativas e emocionais mediante estímulos olfativos (Sanchez-Andrade, 2005, 2009). O bulbo

olfatório principal, por ser a entrada primária da informação olfatória, tem função elementar no processo de reconhecimento de co-específicos. Roedores que sofreram lesões induzidas nessa área evidenciaram prejuízos nas tarefas de reconhecimento social (Bluthé & Dantzer, 1992; Matochick, 1998; Popik *et al.*, 1991). Além disso, vemos que por envolver estruturas corticais associativas, está envolvido na percepção consciente dos odores e assim é capaz de desencadear respostas de cunho motivacional e emocional. A Figura 7 abaixo é uma ilustração da projeção dos neurônios de primeira ordem do epitélio olfatório para os glomérulos do bulbo olfatório. Vale notar que a divisão didática entre cores dos neurônios equivale a uma relação entre o único tipo de receptor olfatório que se manifesta em cada neurônio, sendo que cada glomérulo reunirá apenas neurônios que expressarem o mesmo tipo de receptor. Essa divisão faz parte do complexo mecanismo de processamento de odores.

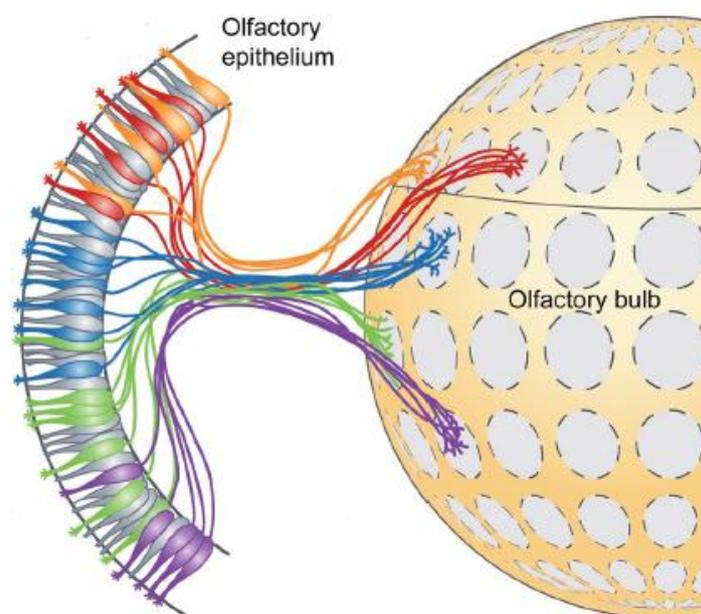


Figura 7. Figura retirada de DeMaria and Ngai (2010)

Por outro lado, temos o órgão vomeronasal comunicando-se com o bulbo olfatório acessório, que por sua vez, através do trato olfatório acessório projeta-se para diversas regiões, incluindo a amígdala medial e o núcleo basal da estria terminal (Scalia and Winans, 1975; Tirindelli *et al.*, 1998). O órgão vomeronasal por processar prin-

principalmente feromônios está envolvido no processamento de informações mais vinculadas a mecanismos vegetativos da vida do roedor. As moléculas são captadas pelo epitélio olfatório principal e através de um mecanismo de transporte são encaminhadas para o órgão vomeronasal (Meredith, 1998; Tirindelli et al., 1998; Sanchez-Andrade, 2005). Deste ponto, axônios se projetam para o bulbo olfatório acessório que por sua vez encaminha projeções para a amígdala (porção medial) e para a estria terminal. Finalmente ocorre uma última projeção para o hipotálamo e para algumas áreas corticais (Li et al., 1990; Simerly, 1990; Swanson & Petrovich, 1998). A Figura 8 abaixo traz uma visão anatômica panorâmica dos dois sistemas.

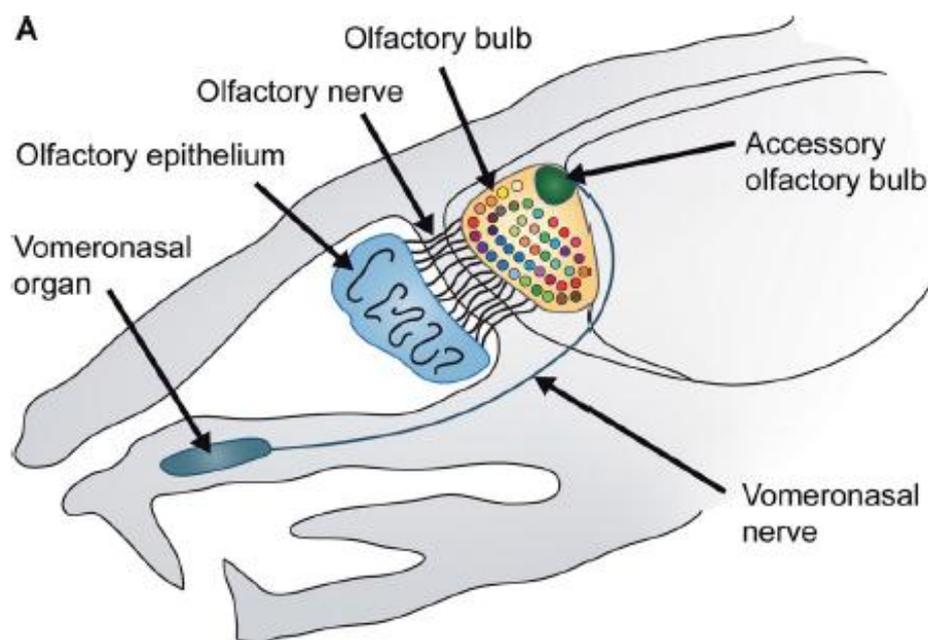


Figura 8. Figura retirada de DeMaria and Ngai (2010)

É fundamental dizer que ambos sistemas contêm projeções de volta aos bulbos principal e acessório, remetendo-nos ao conceito de um circuito fechado. A Figura 9 abaixo ilustrará de forma detalhada as vias dos dois sistemas olfatórios.

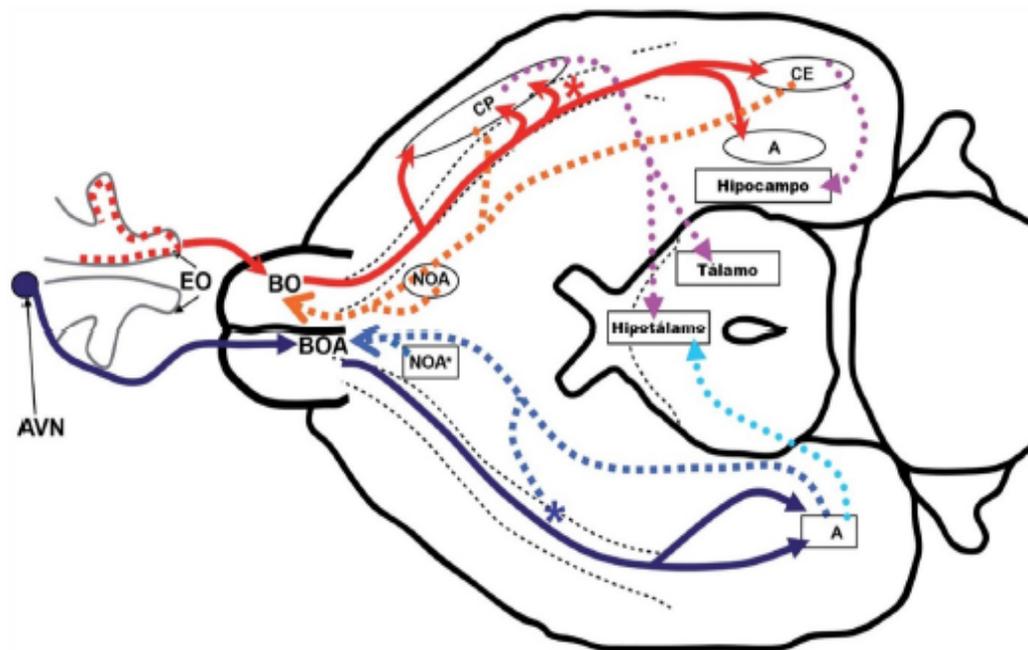


Figura 1. Esquema representativo das vias olfatórias. Os axônios dos neurônios olfatórios presentes no epitélio olfatório (EO) projetam para o bulbo olfatório principal (BO), formando o nervo olfatório. Os neurônios do BO mandam projeções para diferentes estruturas, dentre as quais pode-se citar o núcleo olfatório anterior (NOA), a taenia tecta, o tubérculo olfatório, o córtex piriforme (CP), o complexo amigdalóide (A), o córtex entorrinal (CE) e o núcleo do trato olfatório lateral (nLOT; asterisco vermelho). Neurônios do córtex olfatório e do nLOT projetam de volta para o BO. Conexões intracortical principais estão presentes entre partes do neocórtex, hipocampo, tálamo e hipotálamo, assim como para o neocórtex e as estruturas contralaterais. Os axônios provenientes do aparelho vomeronasal (AVN) formam o nervo vomeronasal e projetam para o bulbo olfatório acessório (BOA). Os neurônios, então, projetam axônios (e recebem projeções) para o NOA e nLOT (asterisco azul) e para A. Principalmente CP e A mandam projeções para os núcleos do tálamo e hipotálamo (Adaptado de Paxinos *et al.*, 2004 e de Castro *et al.*, 2009).

Figura 9. Figura retirada da dissertação de Mestrado de Roberta Ribas Pena (2014)

Quando se faz alusão ao conceito de circuito neural, pensa-se em redes de neurônios interconectadas através de sinapses, diretas ou indiretas, intra ou inter regionais. Esses neurônios podem estar ligados mono ou polissinápticamente, através de interações seletivas, interagindo simultânea e preferencialmente com áreas específicas (Varela *et al.*, 2001).

1.4 OSCILAÇÕES NEURAIS

“Without periodicity, there is no time; without time, there is no past, present, or future.”

György Buzsáki

1.4.1 Um breve conceito de circuitos neurais

Kandel (2000) afirmou que um único neurônio, por si só, não é inteligente, mas quando integrado em uma rede de outros neurônios ele seria capaz de sentir, pensar, lembrar e perceber. A ideia conexionista de redes de neurônios remonta a três grandes nomes, os quais, ao longo das décadas, tiveram seus trabalhos aperfeiçoados por outros neurocientistas, para que então pudéssemos chegar a um grande, porém ainda incompleto, conhecimento sobre o funcionamento de populações neuronais. Seimon (1904) com a teoria dos engramas, Sherrington (1906) com seu trabalho sobre o arco-reflexo (*The Integrative Action of the Nervous System*) e Donald Hebb (1949) com a teoria das assembleias celulares (*cell assemblies*) davam início a um novo ciclo de estudos sobre o comportamento conjunto dos neurônios e seus impactos no comportamento humano. Avanços nas técnicas de eletrofisiologia foram permitindo progressos dentro da difícil tarefa de mapear e compreender o encéfalo mediante uma perspectiva conexionista de circuitos integrados em multi-níveis. O renomado neurocientista Gyorgy Buzsáki afirma que “ a tarefa de cabear o cérebro humano é semelhante à tarefa de conectar todas as estrelas”. Hoje sabemos que o cérebro está organizado em uma hierarquia de múltiplos circuitos paralelos que se interconectam de curtas a longas distâncias ao longo do córtex cerebral (Buzsáki, 2006). Durante o curso evolutivo das espécies, os circuitos neurais básicos, que assinalavam boa resposta adaptativa, foram se mantendo e outros novos circuitos paralelos de média e longa extensão foram sendo sobrepostos. Dessa forma a natureza foi aproveitando aquilo que estava gerando bons resultados e os “novos” cérebros nada mais seriam do que versões modificadas de cérebros anteriores. Assim como num sítio arqueológico, novas camadas celulares foram surgindo e formando camadas superiores, abri-

gando então novos circuitos de maior complexidade. Esses circuitos foram se conectando com os antigos e formando hierarquias de controle (Buzsáki, 2006). Ainda se sabe muito pouco sobre essa hierarquia funcional das diferentes redes de neurônios espalhadas pelas estruturas encefálicas e por isso são muito contestadas.

1.4.2 Neurônios oscilam ?

A natureza é palco de diversos exemplos que retratam a periodicidade. Diariamente, o Sol nasce e se põe e as marés sobem e descem. A cada trimestre as estações se revezam e dessa mesma forma, no cérebro de cada indivíduo, em curtos intervalos de tempo, os neurônios vibram de forma ritmada e em diferentes padrões oscilatórios.

Um sistema é considerado um oscilador quando, independentemente de sua natureza, ele possui ritmo, periodicidade, amplitude e um ciclo definido de funcionamento; todos eles gerados pela combinação intercalada de forças positivas e negativas, que respectivamente conduzem o sistema para longe de seu estado inicial e depois trazendo-o de volta ao estado inicial (Buzsáki, 2006). Como boa ilustração de um oscilador pensemos num pêndulo daqueles relógios antigos. Muitos físicos alegam que a mais valiosa característica de um sistema oscilatório é a sua previsibilidade. No entanto, quando o assunto se trata das oscilações neurais as análises e previsões não são consideradas tão simples e diretas, fazendo com que para a maioria dos neurocientistas a principal característica de um oscilador seja o ritmo com que oscilam. Se pensarmos no ritmo como a frequência de vibração e analisarmos o universo das ondas, de fato, a frequência de uma onda é a grandeza física que a caracteriza de forma única no espaço. Por exemplo: se uma onda eletromagnética acusar uma frequência entre 606 e 668 THz ela definitivamente se apresentará na cor azulada no espectro de visão de um humano; nenhuma outra assim o fará. No contexto neurocientífico não tem sido diferente. Desde os estudos de Hans Berger, em 1929, começou-se a associar os padrões de oscilação de uma dada área cerebral com padrões comportamentais e cognitivos. Para compreender esse cenário macroscópico comportamental, precisamos entender como essas oscilações são originadas por nosso cérebro.

De forma resumida, dizemos que um único neurônio oscila, principalmente, devido às constantes flutuações de potencial de membrana causadas pela ação de canais iônicos dependentes de voltagem que, ao permitir o influxo e o efluxo de íons, geram efeitos alternados e ritmados de despolarização e hiperpolarização na membrana (Buzsáki, 2006). Esse neurônio, agindo dentro de uma rede, terá seus disparos sincronizados com os dos outros neurônios e dessa forma verificaremos agora uma população inteira realizando disparos sincronizados. Sabe-se que as oscilações dependem da ação de populações de neurônios inibitórios (Traub et al. 1989, 1997; Golomb & Rinzel 1993; Wang & Buzsaki 1996; White et al. 1998; Brunel & Hakim 1999; Whittington et al. 2000), mais especificamente interneurônios GABAérgicos. É através deles que se define uma cadência de “disparos” e “silêncios” sucessivos. Se pensarmos num conjunto de redes neurais dispersas ao longo de uma região cortical e considerarmos essa constante e dinâmica interação entre populações de neurônios excitatórios e inibitórios, verificamos a origem das oscilações cerebrais (Wilson & Cowan 1972). A oscilação é uma capacidade intrínseca dos neurônios e ela é gerada em múltiplos padrões de frequência em curtos e transientes intervalos, onde a frequência dessas oscilações é dependente do tempo médio de duração da inibição provocada nas redes (Buzsáki, 2006).

1.4.3 Oscilações e funções cognitivas

O médico neurologista Hans Berger, em 1929, ao conectar eletrodos no couro cabeludo de um de seus pacientes verificou, pela primeira vez, que uma corrente elétrica advinda do cérebro estava associada a um padrão oscilatório entre 8 e 12 Hz. Essas ondas receberam o nome de ondas alfa (uma relação entre a primeira letra do alfabeto grego e a primeira onda encontrada em cérebros de humanos). Nesse momento abriam-se as portas para a busca de atividade neural em forma de ondas e desde então tem-se encontrado fortes relações entre as oscilações neurais e as diversas funções cognitivas como atenção (Klimesch, 2012), memória de trabalho (Gulbinaite et al., 2014a; Haegens et al., 2014) e controle cognitivo (Cavanagh et al., 2009; Gulbinaite et al., 2014b). Tem-se verificado também relações com o controle do *timing* dos disparos neurais (Lisman and Buzsáki, 2008), com a facilitação de mecanismos

de plasticidade sináptica envolvendo a consolidação de memórias de longa duração (Buzsaki and Dragun, 2004) e com o controle motor e de percepção (Fries P (2005) ; Fell J, Axmacher N; Axmacher (2011); Schnitzler A, Gross J; Gross (2005)).

Essas oscilações são classificadas em faixas de frequência e na maior parte das vezes em bandas de frequência (conjunto de frequências analisadas em grupo). A literatura reconhece distintas formas de se fazer a divisão dessas bandas (Buzsáki, 2006), e portanto será apontada na Figura 10 abaixo as bandas que serão usadas em nosso trabalho, baseadas nos trabalhos de Kepecs et al., 2005; Kay & Beshel, 2010, Gourévitch et al., 2010.

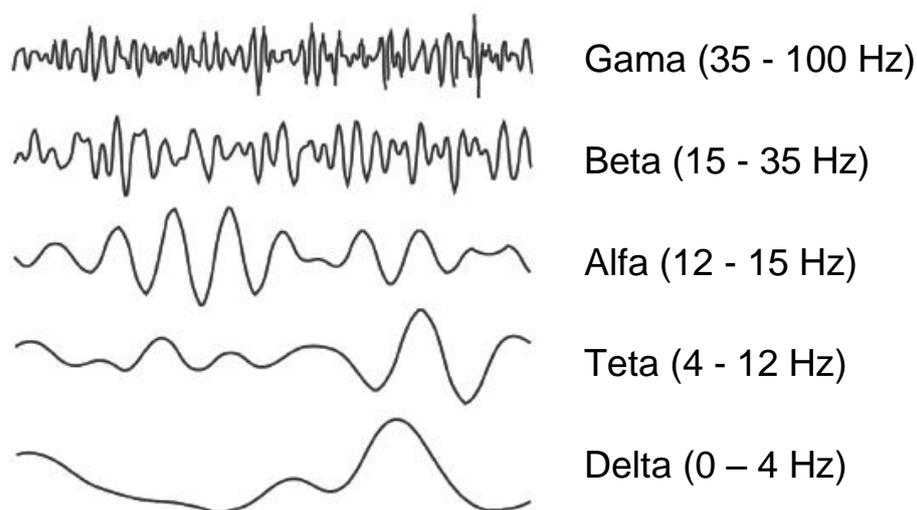


Figura 10

Os distintos valores de faixas de frequências têm sido usados como indicadores de funções cerebrais. Oscilações delta estão presentes em momentos de percepção sensorial e tomadas de decisão (Başar et al., 1980, 1998a,1998b, 1999, 2000, 2001; Başar-Eroğlu et al.,1992; Näätänen et al.,1992; Shürmann et al., 1997). Oscilações teta estão ligadas à processos de plasticidade durante o aprendizado e funções de memória, envolvendo principalmente o hipocampo e o lobo temporal (Klimesch, 1999; Nokia et al., 2009; Rutishauser et al., 2010). Oscilações alfa se acentuam em estados tônicos de atenção (Klimesch, 1999; Nerad & Bilkey, 2005; Sadaghiani et al., 2010). Já no extremo das maiores frequências, as oscilações beta e gama são vistas durante processamento sensorial, coordenação sensório-motora e alguns tipos de memória

(Gray et al., 1989; Laurent & Davidowitz, 1994; Stopfer et al., 1997; Fries et al., 2001; Friedrich & Laurent, 2001, Laurent, 2002).

Apesar de se terem evidências das correlações das faixas de frequência e padrões cognitivos, ainda permanece a dúvida de como essas oscilações impactam esses complexos processos.

1.4.4 Populações neurais (*cell assemblies*) e sincronismo

A idéia de uma rede integrada de neurônios com a capacidade de dispararem seus potenciais de ação de forma sincrônica veio como uma solução apresentada por Hebb para os problemas da permanência do aprendizado e do armazenamento temporário de memórias (Cooper, 2005). Ele afirmou que a habilidade que o cérebro teria de gerar pensamentos coerentes provinha de uma orquestração espaço-temporal de populações de neurônios, também referidas como *cell assemblies*. Esse termo referia-se a uma dada população de neurônios excitatórios cujas sinapses teriam sido fortalecidas pela co-ativação dos mesmos, conferindo-lhes então uma força sináptica maior quando comparada com qualquer outra que não pertencesse a essa população. O limite anatômico dessas assembleias seriam todos aqueles neurônios que disparavam juntos mediante um estímulo (Buzsáki, 2006). No decorrer dos anos tal hipótese foi sendo refinada, notoriamente por Brainterberg (1978) e Abeles (1982). Porém, a ideia central que a compunha manteve-se intocada e com a evolução das pesquisas percebeu-se que o sincronismo era um elemento intrínseco a essas redes e às oscilações por elas geradas. Tem-se demonstrado que o sincronismo por oscilação é um mecanismo metabólico de baixo custo (Salek-Haddadi et al., 2002). Buzsáki afirma ser o de menor investimento energético (2006). O mecanismo de sincronia entre dois distintos osciladores neurais também tem sido correlacionado com o aumento da eficiência sináptica e conseqüentemente da plasticidade neural funcional (Schaefer et al., 2006; Singer, 1993); processos fisiológicos elementares para o aprendizado (Roelfsema et al., 1997; Engel et al., 2001; Fries et al., 2001).

Nossa pesquisa se deterá ao estudo do sincronismo entre os padrões de oscilação teta e gama gerados nas regiões do hipocampo dorsal e do bulbo olfatório.

1.4.5 *Local Field Potential (LFP)*

O *local field potential* (LFP) é um sinal eletrofisiológico que mede o campo elétrico gerado pela diferença de potencial elétrico entre dois pontos de um dado volume de tecido cerebral (Mitzdorf, 1985). Qualquer porção de membrana de célula nervosa que seja excitável (seja de um dendrito, de uma espinha, do soma neuronal, de um axônio, de uma neuroglia ou de um terminal axonal) é palco de correntes iônicas geradoras de um potencial elétrico no meio extracelular. Dentre as principais atividades que participam da criação desse sinal estão as correntes oriundas das transmissões sinápticas, o fluxo iônico ocorrido nos canais dependentes de ligantes e de voltagem, potenciais gerados pelo fluxo de Na⁺ e Ca²⁺ e a própria oscilação intrínseca no potencial da membrana neuronal (Buzsáki, Anastassiou and Koch, 2012). Dessa forma podemos afirmar que o LFP é resultado tanto do somatório dos campos gerados pelas correntes do meio intracelular para o meio extracelular (também nominadas *sources*) quanto pelas correntes do meio extracelular para o meio intracelular (também nominadas *sinks*) (Buzsáki, 2006). O LFP é um sinal que mede a sincronização dos *inputs* de informação de longa duração de uma região (e.g, PEPS, PIPS) e não os *outputs* de curta duração (e.g, potenciais de ação) (Quiroga, 2013). Para isso, em sua análise aplica-se um filtro passa-baixo que elimina a leitura dos sinais de alta frequência de flutuação do potencial elétrico gerado pelas correntes vinculadas aos potenciais de ação. Muitos autores se referem ao LFP como “micro-EEG” (micro-eletroencefalograma). É uma alusão perfeitamente coerente pois em ambos os casos o método consiste na captação da atividade elétrica de uma área encefálica expressa por ritmos cerebrais de distintas frequências. A diferença entre eles se dá na dimensão do volume de tecido cerebral que o sinal está sendo captado. Enquanto a resolução espacial do EEG é da ordem de cm, a do LFP é da ordem de mm. A captação do LFP se dá pela inserção profunda de finos micro-eletrodos que podem ser de vidro ou de metal. O raio de alcance volumétrico da medição permite a captação dos campos elétricos gerados por um número de células nervosas que pode variar de dezenas a milhares delas (Buzsáki, 2006).

A captação do LFP permite medir variações do campo elétrico ao longo de uma janela temporal móvel. Esse sinal pode então ser decomposto em componentes

espectrais a partir de análises matemáticas. Uma das análises de uso recorrente é a análise tempo-frequência. Nela faz-se a decomposição espectral do sinal através da Transformada de Fourier de Curta Duração (STFT – *short-term Fourier transform*) que converte o sinal no domínio do tempo em uma função bidimensional no domínio tempo-frequência. Com isso, obtém-se um espectrograma que nada mais é do que um retrato da densidade espectral numa escala temporal, apontando a magnitude de energia envolvida para cada valor de frequência. Dessa forma, pode-se fazer uma análise numa escala temporal da variação de amplitude e a fase do sinal colhido. Isso, por sua vez pode ser usado como informação de algum processo neural em uma dada região encefálica. Em função dessas valiosas informações que podem ser colhidas a partir das oscilações neurais, surgem cada vez mais estudos usando a análise do LFP para buscar compreender melhor os mecanismos de processamento cortical, planejamento das atividades motoras e de funções cognitivas de alto nível como memória, tomada de decisão e atenção (Henrie and Shapley, 2005; Kreiman et al., 2006; Liu and Newsome, 2006; Pesaran et al., 2002; Scherberger et al., 2005; Womelsdorf et al., 2006).

1.4.6 Cross-frequency coupling

As oscilações geradas pelas redes neuronais ao longo do encéfalo são conhecidas por serem interdependentes em suas distintas bandas de frequência (Buzsaki and Draguhn, 2004). Essa forma de interação é conhecida como *cross-frequency coupling* (CFC) e pode ser analisada em diversas escalas espaciais e temporais (Buzsáki, 2006). Estudos tem sugerido um papel funcional para o CFC em tarefas de aprendizado e tem-se verificado uma variação na intensidade desse acoplamento mediante estímulos sensoriais, motores e cognitivos. Também tem sido reconhecido como um mecanismo de transferência de informações a longa distância, assumindo papel importante na integração de áreas distantes (Canolty and Knight, 2010).

O sub-tipo mais conhecido de CFC é o *phase-amplitude coupling* (PAC), relacionando uma dependência entre a fase de uma oscilação de baixa frequência com a amplitude de uma oscilação de alta frequência (Canolty and Knight, 2010). Esse mecanismo retrata um acoplamento entre os *bursts* (i.e. disparos súbitos, rajadas) de

osciladores de alta frequência e a fase de osciladores de baixa frequência (Samie , 2017). Uma outra forma de se definir PAC é como sendo a modulação da amplitude de um oscilador A de alta frequência sobre a fase de um oscilador B de menor frequência ($f_A > f_B$). Recentemente o PAC tem recebido considerável atenção dos neurocientistas pois tem-se verificado que a modulação nesse tipo de acoplamento ocorre durante tarefas sensoriais, motoras e cognitivas (Tort et al., 2008, 2009; Axmacher et al., 2010; Fell and Axmacher, 2011; Schutter and Knyazev, 2012; Florin and Baillet, 2015; De Hemptinne et al., 2015). Nossa pesquisa será baseada no aprofundamento da análise do PAC ocorrente no circuito BO-HD. Análises do LFP durante tarefa envolvendo processos cognitivos (reconhecimento de odores) revelaram uma grande atividade gama (35-100 Hz) no bulbo olfatório principal de camundongos e um significativo acoplamento theta phase/gamma amplitude (PAC para oscilações teta e gama) entre o BOP e o hipocampo dorsal (Pena et al., 2017). Já existem evidências que o acoplamento entre essas regiões é funcional, isto é, está correlacionado com o processamento de memórias de longo prazo em roedores (Martin et al., 2007; Tort et al., 2009). De forma geral, ondas teta estão ligadas a processos de aprendizado e memória, principalmente em hipocampo e lobo temporal (Klimesch, 1999; Nokia *et al.*, 2009; Rutishauser *et al.*, 2010), enquanto ondas gama associam-se a processos importantes de processamento sensorial local, coordenação sensorio motora e memória (Gray et al., 1989; Laurent & Davidowitz, 1994; Stopfer et al., 1997; Fries et al., 2001; Friedrich & Laurent, 2001, Laurent, 2002).

Existe uma relação muito interessante entre a faixa de frequência de oscilação e o tamanho da população neural envolvida. Majoritariamente, amplas populações oscilam e sincronizam em baixas frequências enquanto pequenos grupos neurais são mais ativos em altas frequências (Buzsáki, 2006). Isso mostra o que ocorre num processo de recrutamento de redes: majoritariamente, extensas redes são recrutadas durante eventos de baixa frequência enquanto as pequenas redes são recrutadas durante baixas oscilações (Buzsaki and Dragun, 2004). Estudos tem verificado a manifestação das oscilações de baixa frequência em eventos sensoriais, motores e cognitivos (e.g tomada de decisão e memória) (Schroeder and Lakatos, 2009). É valido notar que diferentes frequências podem, num mesmo intervalo de tempo, coexistir dentro de uma mesma área ou em distintas regiões encefálicas, interagindo entre si

(Buzsaki and Dragun, 2004), dando ideia de uma dinâmica espacial, e atuando como sincronizadoras de disparos neurais (Lisman and Buzsáki, 2008), dando ideia de uma dinâmica temporal.

Compreender e prever o funcionamento do sistema nervoso humano através do prisma das oscilações neurais tem sido um recente e grande desafio para a neurociência. No entanto, para mais além dessa misteriosa neblina de informações, existem promissoras respostas que talvez um dia nos permitirão desvendar os mistérios da mente a partir dos simples e monótonos disparos neuronais.

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, muitas tem sido as descobertas sobre os impactos da neurogênese sobre a memória. No entanto, os avanços progressivos tem sido dados de forma anatomicamente isolada. Em outras palavras, estuda-se o papel destes novos neurônios isoladamente no hipocampo ou no bulbo olfatório. Entretanto, como a produção e amadurecimento desses novos neurônios interferem nas redes neurais formadas no hipocampo e no bulbo olfatório, ainda permanece desconhecido.

O presente projeto unir-se-á ao grande desafio atual de compreender com maiores detalhes como esses novos neurônios se comportam dentro das redes de memória já existentes e até mesmo naqueles engramas em processo de formação.

Uma das linhas de pesquisa do Núcleo de Neurociências (NNC) da Universidade Federal de Minas Gerais, coordenada pela Dra. Grace Schenatto, tem contribuído para demonstrar a correlação da neurogênese com a memória social de longa duração em camundongos. Resumidamente, detectamos dois pontos importantes: (1) a sensibilidade da persistência da memória social à neurogênese e (2) a estreita relação entre alterações no acoplamento BO-HD e a persistência da memória social.

Embasados em nossos estudos prévios e nas evidências da literatura que confirmam que as principais, se não únicas, regiões neurogênicas no cérebro maduro são o BO e o HD, o objetivo deste projeto é verificar os efeitos promnésicos do AE, via aumento da neurogênese nessa circuitaria, sobre a MSLD, a partir de uma melhora do acoplamento dessas duas regiões.

Analisaremos, por eletrofisiologia, o acoplamento (cross-frequency coupling) do circuito bulbo olfatório - hipocampo dorsal durante a evocação da memória, verificando os efeitos positivos da neurogênese sobre a memória de longa duração nos camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar se o AE, via aumento da neurogênese nas regiões do BO e HD, melhora a memória social de camundongos isolados via reestabelecimento do acoplamento BO-HD causado pelo isolamento social.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do IS sobre a MS em camundongos;
- Avaliar o efeito preventivo do AE sobre o déficit de memória dos camundongos isolados socialmente;
- Avaliar o acoplamento do BO-HD durante a tarefa de MS, em diferentes condições ambientais;
- Investigar o efeito da inibição da neurogênese sobre o acoplamento BO-HD durante a tarefa e MS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Os protocolos experimentais a serem utilizados deverão ser aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (nº177/2014).

Serão utilizados camundongos machos da linhagem C57/BL6 com 7 semanas de idade, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais. Deverão ser mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e

Biofísica, em estantes ventiladas (Alesco, Brasil) sob condições controladas de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), umidade (40-70%) e ciclo claro-escuro (12-12h – 7h-19h), com alimentação e água ad libitum. Caso a restrição de ingesta hídrica e sólida se fizer necessária ao protocolo experimental, assim será feito e por sua vez será especificado.

A fim de cumprir, em todos os quesitos, as orientações preconizadas pelas diretrizes do CEUA-UFMG. Os protocolos a serem utilizados, estão embasados na premissa de se utilizar o menor número possível de camundongos. Para tal, o tamanho amostral foi calculado com base no livro Estatística Aplicada à Experimentação Animal (2002, segunda edição) do autor Ivan Barbosa Machado Sampaio, sendo também considerados os dados obtidos em estudos anteriores para o cálculo da amostragem necessária.

Os pesquisadores envolvidos deverão estar enquadrados nos moldes e parâmetros elaborados pela Sociedade Brasileira de Neurociências (SBNeC) e, por sua vez, contidos na “Behavior Guidelines for Animal Experimentation”, respeitando a vida dos animais utilizados e evitando o sofrimento dos mesmos.

4.2 Grupos e condições de alojamento

O trabalho será conduzido utilizando 5 grupos ($n=10$) de camundongos adultos. Estes camundongos, inicialmente agrupados, serão conduzidos para as seguintes condições alojamento:

- Grupo 1 (Isolado Padrão): 1 animal em gaiola padrão (28x17x12cm) com forragem;
- Grupos 2, 3 e 4 (Isolado Enriquecido): 1 animal em gaiola grande (40x33x16cm) com forragem e rolos de papelão, fitas de papel celofane, peças cúbicas de plástico de diversas cores e uma toca, confeccionada com o fundo de uma garrafa pet;
- Grupo controle positivo: animais permanecendo na gaiola inicial de agrupamento

Os animais serão mantidos em suas respectivas condições de alojamento por pelo menos 7 dias (Monteiro et al., 2014; Caixeta et al., 2017). Durante esse período,

as gaiolas serão limpas a cada 3 dias e no caso do ambiente enriquecido os objetos serão trocados juntamente com a forragem.

4.3 Ambiente da tarefa de comportamento

As tarefas comportamentais ocorrerão em uma sala climatizada privada de ruídos, situada no Núcleo de Neurociências (NNC).

Todos os experimentos acontecerão no período da manhã entre 9:00 e 12:00h.

Caso se façam necessárias condições de luminosidade diferenciadas, as mesmas serão descritas detalhadamente nos respectivos protocolos.

Todos os aparatos deverão ser devidamente higienizados, antes e entre os testes com os animais, utilizando solução de ácido acético 0.003%.

4.4 Tarefa de comportamento: Paradigma Intruso-Residente

Em nosso estudo, para acessar a memória social dos camundongos, usaremos uma tarefa de reconhecimento social baseada numa variação do modelo de Thor e Holloway (1982), intitulada Paradigma residente-intruso. Será utilizado como intruso, um camundongo juvenil, que nesta faixa etária ainda não apresenta produção expressiva de feromônios, evitando assim um possível comportamento agressivo e sexual (Thor & Holloway, 1982) do residente durante a tarefa.

A tarefa consiste na mensuração do tempo de investigação que um camundongo adulto dispenderá ao ser apresentado a um co-específico, partindo do princípio que quanto maior o interesse e o tempo dispendido no processo de interação, menor a evidência de memória retida. Em contrapartida, caso o camundongo em tarefa perca rapidamente o interesse pelo intruso, deixando-o de investigar, quer dizer que ele já o identificou em seu repertório de memórias sociais.

O protocolo do paradigma consiste na exposição do camundongo adulto a 3 sessões de 5 minutos cada; habituação, treino e teste, intervaladas em 24h consecutivas.



Figura 11. Representação esquemática do paradigma a ser utilizado

Basicamente, a tarefa consiste em permitir que o camundongo faça a exploração social do outro indivíduo a partir da intromissão das vibrissas do focinho dele em micro-furos presentes num cilindro que isola o intruso, dentro da própria caixa.

O cilindro de isolamento é de acrílicotransparente, tem 10cm de diâmetro e contém 60 furos uniformemente espaçados (Gusmão et al., 2012). A foto abaixo representa um modelo real desse cilindro e do momento da tarefa em um experimento de um dos integrantes da nossa equipe.

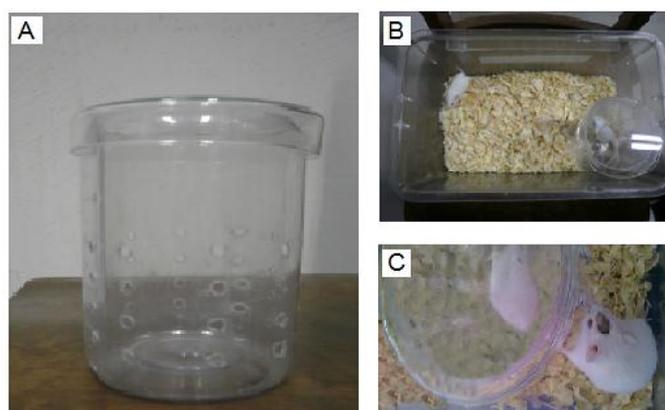


Figura 12. Foto representativa do aparato utilizado na tarefa de reconhecimento social. (A) Cilindro onde o animal juvenil foi alojado durante o treino e o teste da tarefa de reconhecimento social (B) Momento em que o juvenil foi colocado na gaiola em que o adulto estava após o período de habituação. (C) Detalhe da exploração social.. Figura extraída da tese de Doutorado de Ana Raquel Pereira Caixeta, 2016

A fase de habituação consiste na introdução do animal adulto em uma caixa limpa contendo um cilindro vazio por um período de 30 minutos. Durante os 5 minutos finais, um camundongo juvenil é introduzido no cilindro, com o objetivo da habituação.

A fase de treino consiste em colocar o juvenil no cilindro vazio e permitir a investigação social durante 5 minutos. A quantificação da investigação é medida pela introdução das vibrissas do adulto no cilindro. O cilindro é posicionado no mesmo lugar da fase de habituação e é limpo com álcool 70% entre cada etapa.

Na fase de teste ocorre a avaliação da memória social de longa duração. Após 24h o juvenil é inserido dentro do cilindro obedecendo ao mesmo protocolo da fase de treino e o adulto realiza a tarefa de reconhecimento durante 5 minutos.

4.5 Procedimentos cirúrgicos

A cirurgia envolverá o procedimento de inserção dos eletrodos e será realizada num aparelho estereotáxico. A cirurgia estereotáxica é uma forma de intervenção cirúrgica, recorrentemente utilizada em laboratórios que trabalham com modelos animais de roedores, que usa um sistema tridimensional de coordenadas para atingir pequenos alvos cerebrais.

Nosso laboratório utiliza o Atlas de Neuroanatomia de Camundongos (Paxinos *et al.*, 2010) para mapeamento das coordenadas almejadas.

A Figura 13, abaixo, retrata de forma simplificada as 3 etapas básicas (anestesia, posicionamento e cirurgia) que envolvem a cirurgia.



Figura 13. Ilustração das etapas cirúrgicas para inserção de eletrodos (adaptada da dissertação de Mestrado de Laura Jaimes Alvarado, 2016)

4.5.1 Cirurgia estereotáxica: inserção de eletrodos

Cada animal será anestesiado com isoflurano 3%, na indução, e 1%, na manutenção, por via intraperitoneal e posicionado em aparelho estereotáxico, após testes de estimulação sensorial que garantem a verificação do efeito anestésico sobre o animal.

A região da cabeça será tricotomizada e degermada com Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI), para então o animal receber a anestesia local com lidocaína por via subcutânea, diluída a 0,5% com soro fisiológico em uma concentração de 5mg/Kg (CEUA/UFMG).

O crânio ficará exposto após incisão com bisturi e o periósteo removido, permitindo a visualização dos bregma e lambda.

O animal permanecerá alinhado no aparato estereotáxico, para que seja feita a marcação precisa dos locais que receberão os implantes dos eletrodos e parafusos a partir do bregma em dimensões ântero-posterior e látero-lateral, e com relação à dura-máter em dimensão dorso-ventral.

Será utilizado um atlas de neuroanatomia de camundongos, Paxinos 2001, além de artigos científicos, para obtermos as coordenadas. Estas são: (i) Bulbo olfatório, em mm: AP +4.0; LL +1.0; DV -3.0; (ii) Hipocampo dorsal – CA1, em mm: AP -1.9; LL +/- 1.6; DV -1.0. Precisarão ser implantados dois parafusos: (i) Parafuso de referência: região occipital contralateral, profundidade até a dura-máter; (ii) Parafuso terra: região parietal contralateral, profundidade até a dura-máter.

Com as regiões mapeadas e marcadas, segue-se a furação da calota craniana, para inserção e posicionamento dos eletrodos e parafusos em profundidade específica. Estes serão fixados ao crânio com cimento de zinco e então, soldados a um conector de pinos, o qual permitirá o acoplamento ao sistema de registro eletrofisiológico

A região do crânio que ficará exposta será coberta por acrílico dentário (o mesmo material utilizado para confecção de aparelhos ortodônticos) formando um capote (Messier et al., 1999).

As respostas sensoriais precisarão ser testadas ao longo de todos os procedimentos, garantindo que o animal não passe por nenhum sofrimento de dor durante essa etapa. Na eventual sinalização de respostas sensoriais mediante estimulação, haverá uma suplementação com $\frac{1}{4}$ da dose de cetamina (20mg/kg).

Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais receberão uma dose de banana (analgésico e anti-inflamatório), em concentração de 0,3mg/kg e de pentabiótico (antibiótico) a 160mg/kg.

4.6 HISTOLOGIA

Com o intuito de verificar se a inserção dos eletrodos e das cânulas atingiu as regiões desejadas do hipocampo dorsal e do bulbo olfatório, após o fim da tarefa de comportamento, os animais serão eutanasiados e para que possamos remover o cérebro para futuros fatiamento e análise.

Os cérebros serão armazenados em paraformaldeído (4%) por um dia e em sacarose (30%) por dois dias.

Com auxílio de um micrótomo criostato (-20°C) os cérebros serão fatiados no plano coronal, obtendo fatias de 100µm próximo ao orifício da cânula. Numa segunda etapa, essas fatias serão coradas com vermelho neutro e o local da inserção será verificado com auxílio de um microscópio óptico.

4.7 IRRADIAÇÃO INTRACRANIANA

O procedimento de irradiação craniana para inibição de neurogênese acontecerá no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN).

Camundongos com idades entre 7 e 8 semanas de idade receberão uma dose de 7 (Grays) Gys de irradiação, para o cérebro inteiro, usando uma fonte de Cobalto-60 metálico.

Serão inicialmente anestesiados com cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e imobilizados dentro de um tubo falcon (50 ml) devidamente perfurado para permitir a ventilação dos mesmos.

Posteriormente, o tubo falcon será posicionado verticalmente no interior de um tijolo de chumbo para que os corpos dos camundongos sejam protegidos da irradiação. O tijolo de chumbo é um modelo já validado em nosso laboratório e foi confeccionado exclusivamente para nossos experimentos. Tem, em um dos lados, um orifício de 0,9 cm o qual é cuidadosamente posicionado em direção ao crânio do animal para que apenas este local possa ser irradiado.

Os camundongos do grupo controle passarão pelo mesmo procedimento de anestesia e posicionamento dentro do tubo falcon, porém não serão irradiados.

Como elegemos a dose de 7 Gys, de acordo com Tada e colaboradores (1999), esperamos que 30 dias após a sessão de irradiação seja um ponto de redução expressiva da proliferação celular. Por esse motivo iniciaremos os testes comportamentais após esse período.

Na semana que anteceder o início dos testes comportamentais, administraremos Brdu, uma vez ao dia, durante 7 dias, na dosagem de 75mg/Kg.

4.8 DESENHO EXPERIMENTAL

Nosso estudo envolverá dois experimentos.

O primeiro experimento será realizado com o grupo controle positivo e com os grupos 1 (grupo controle negativo) e 2 (grupo experimental). O grupo controle positivo representará os animais sem prejuízo de memória e sem problemas de acoplamento. O grupo controle negativo representará os animais que tiveram sua memória e seu acoplamento prejudicados devido ao IS. Já o grupo experimental será o grupo que ainda não sabemos os resultados. Esse experimento terá o intuito de validar a hipótese de que o ambiente enriquecido restabeleceu o acoplamento das regiões BO-HD. Para isso, o sinal eletrofisiológico (LFP) será coletado durante a evocação da memória social de longa duração, enquanto o camundongo realiza a tarefa residente-intruso. Esperamos que haja um maior acoplamento das bandas de frequência (teta e gama) no Grupo 2, uma vez que estes são os camundongos que, hipoteticamente, deveriam sofrer os efeitos positivos do ambiente enriquecido.

No segundo experimento, usaremos os Grupos 3 e 4, com intuito de verificar que a neurogênese, induzida pelo AE, é a responsável por aumentar o acoplamento entre as duas áreas. Para isso, inibiremos a neurogênese por irradiação transcraniana, método já demonstrado eficiente nos trabalhos de Tada et al., 2000 e Madsen et al., 2003 e nos últimos trabalhos de nosso laboratório. O sinal eletrofisiológico (LFP) também será coletado durante a evocação da memória social de longa duração, enquanto o camundongo realiza a tarefa residente-intruso.

A irradiação craniana será feita conforme detalhado no item acima e a Figura 14 abaixo ilustra o modelo de tubo falcon a ser usado.

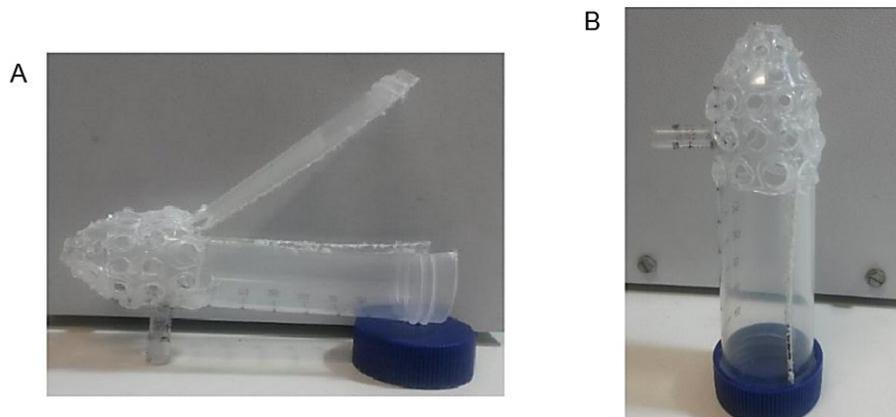


Figura 14. Imagem representativa de tubo falcon usado para posicionamento dos camundongos durante o processo de irradiação. (A) O tubo falcon foi aberto para facilitar o posicionamento do camundongo anestesiado. (B) O falcon ficava na posição vertical e fechado durante a sessão de irradiação. (retirada da dissertação de Mestrado de Ana Raquel Pereira Caixeta, 2014)

Como nossa hipótese é que a neurogênese é a responsável pela melhoria do acoplamento, esperamos que o Grupo 4 tenha seu acoplamento prejudicado.

A Figura 15 abaixo é um resumo esquemático do desenho experimental:

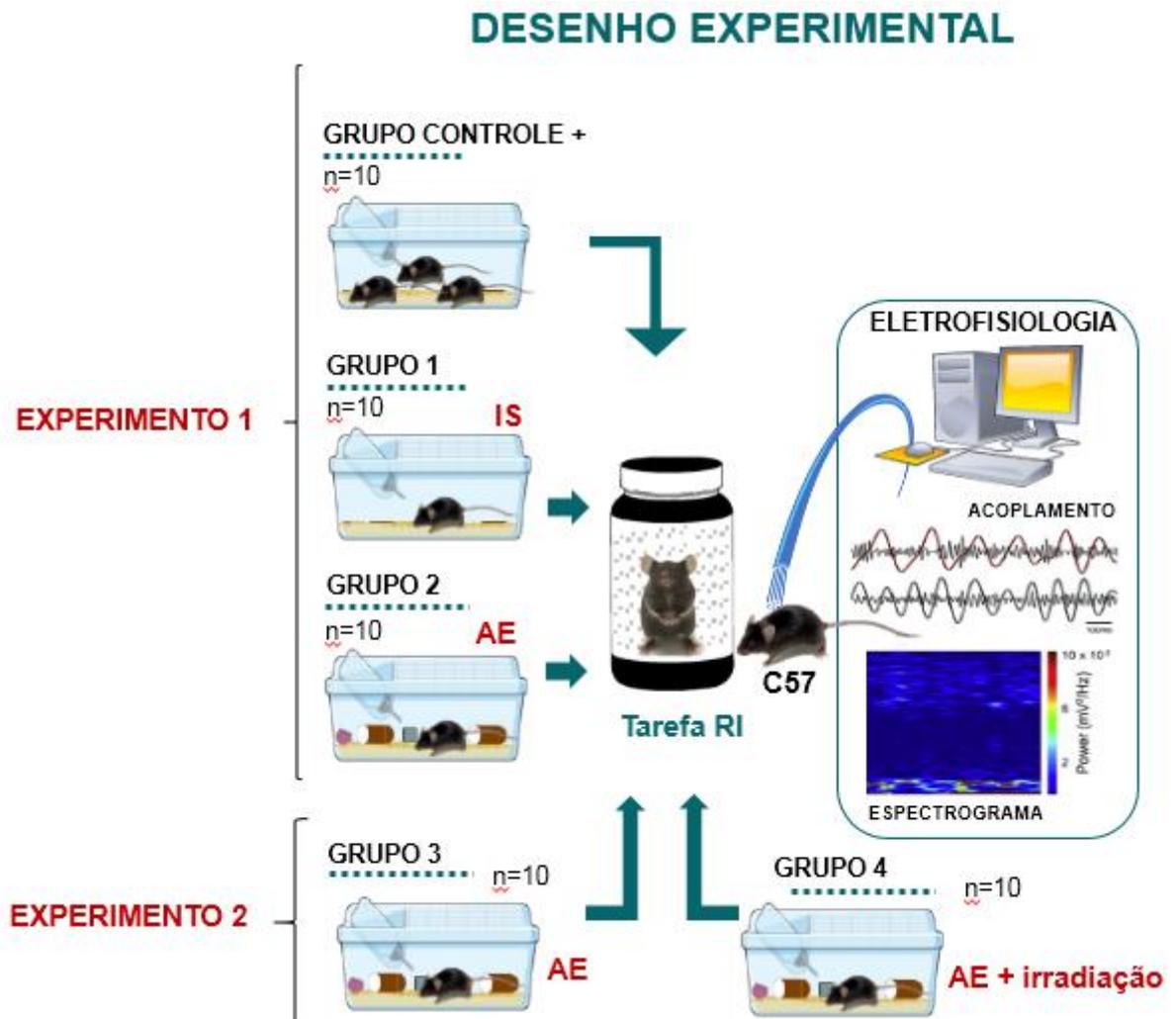


Figura 15

5. PLANO DE DESENVOLVIMENTO

O cronograma inicial, mostrado no Quadro 1 abaixo, visa nortear o ritmo cronológico das etapas que compõem a realização do trabalho e estará sujeito a alterações, em função de ajustes estabelecidos pela Orientadora Profa. Dra. Grace Schenatto e de possíveis imprevistos acadêmicos, que porventura poderão se expressar ao longo do prazo inicialmente delineado.

Quadro 1 - Cronograma de desenvolvimento de Pesquisa de Mestrado a ser realizada na Universidade Federal de Minas Gerais

ANOMÊS	2018												2019											
ETAPAS	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
Revisão de Literatura	■																							
Levantamento Bibliográfico	■	■																						
Treinamento em Eletrofisiologia		■	■	■	■																			
Aprendizado de técnicas cirúrgicas		■	■	■	■																			
Experimentos				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Coleta de Dados								■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Tratamento dos Dados												■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Interpretação dos Resultados															■	■	■	■	■	■	■	■	■	
Redação da Dissertação																	■	■	■	■	■	■	■	
Revisão																					■	■	■	
Entrega da Dissertação																						■	■	
Defesa da Dissertação																							■	

6. RECURSOS FINANCEIROS

Os gastos envolvidos na pesquisa serão integralmente cobertos pelas entidades financiadoras do programa de pesquisas do NNC.

As etapas da pesquisa acontecerão dentro dos laboratórios do NNC, no Instituto de Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Minas Gerais, e no CPMAG, o que não implicará em qualquer despesa externa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed, G. et al. Communications Olfactory bulb axonal outgrowth is inhibited by draxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 398, n. 4, p. 730–734, 2010.

Aimone JB, Deng W, Gage FH. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):589–96.

Alberg et al., (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 20, 2896-2903.

Altman, J. & Das, G. D. Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature*. 1964, 204: 1161–1163.

Altman, J. & Das, G. D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature* 207, 953–956 (1965).

Arakawa et al. A new test paradigm for social recognition evidenced by urinary scent marking behavior in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*. 2008, 97–104.

Axmacher, N. et al. Cross-frequency coupling supports multi-item working memory in the human hippocampus. 2010.

Barkai E, Saar D. Cellular correlates of olfactory learning in the rat piriform cortex. *Rev Neurosci* 2001;12:111–20.

Başar, E. et al. Brain oscillations in perception and memory. *International Journal of Psychophysiology*. Volume 35, Issues 2–3, 1 March 2000, Pages 95-124

Başar, E. et al. Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes. *International Journal of Psychophysiology*, v. 39, n. 2–3, p. 241–248, 2001.

Bear, M.F.; Connors, W.; Paradiso, A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre, 2017. 4ª edição.

Berger, H. (1929) Uber das Electrenkephalogramm des Menschen. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 87, 527–570

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 1973;232:331–56.

Bluthé RM, Dantzer R. Role of the vomeronasal system in vasopressinergic modulation of social recognition in rats. Brain Res. 1993 Feb 26;604(1-2):205-10.

Bluthé RM, Dantzer, R. Chronic intracerebral infusions of vasopressin and vasopressin antagonist modulate behavioral effects of interleukin-1 in rat. Brain Res Bull. 1992;29(6):897-900.

Brunel N., Hakim V..Neural Computation Volume 11 | Issue 7 | October 1, 1999 p.1621-1671

Buzsáki G, Draguhn A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. Science 304:1926–1929.

Buzsáki G., Anastassiou C.A., Koch C.(2012).The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. Nature Reviews

Buzsáki, G. Rhythms of the brain. New York: Oxford University Press, 2006.

Cahill, L & McGaugh, J.L.(1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. Trends in Neurosciences, 11,294-299.

Cameron HA, Gould, E. (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neurosc 61:203-209.

Canolty R.T., Knight R.T.The functional role of cross-frequency Coupling. Trends in Cognitive Sciences, November 2010, Vol. 14, No. 11

Carr WJ, Yee L, Gable D, Marasco E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1976 Sep;90(9):821-8.

Coudereau JP, Debray M, Monier C, Bourre JM, Frances H. Isolation impairs place preference conditioning to morphine but not aversive learning in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Mar;130(2):117-23.

Cavanagh, J.F., Cohen, M.X., and Allen, J.J. (2009). Prelude to and resolution of an error: EEG phase synchrony reveals cognitive control dynamics during action monitoring. *J. Neurosci.* 29, 98–105.

Corotto, F. S.; Henegar, J. A.; Maruniak, J. A. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neuroscience Letters*, v. 149, n. 2, p. 111–114, 1993.

Davis H. P., L. R. Squire, *Psychol. Bull.* 96, 518–559 (1984)

DeMaria and Ngai (2010). The cell biology of smell. *Journal of cell Biology.* vol. 191 no. 3 443-452.

Domeney A, Feldon J. The disruption of prepulse inhibition by social isolation in the Wistar rat: how robust is the effect? *Pharmacol Biochem Behav.* 1998 Apr;59(4):883-90.

Dulac C, Torello AT. Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:551–62.

Eichenbaum H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.* 2000;1(1):41-50.

Eichenbaum H. Hippocampus: mapping or memory? *Curr Biol.* 2000 Nov 2;10(21):R785-7. Review.

Eichenbaum H. Learning from LTP: A comment on recent attempts to identify cellular and molecular mechanisms of memory. *Learning & Memory*, 1996 Sep-Oct, Vol.3(2-3), pp.61-73

Engel AK, Fries P, Singer W. Dynamic predictions: oscillations and synchrony in topdown processing. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(10):704-16.

Fell, J.; Axmacher, N. The role of phase synchronization in memory processes. v. 12, n. February, 2011.

Ferguson JN, Young LJ, Insel TR. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol*. 2002;23(2):200-24.

Flexner J. B., Flexner L. B, E. Stellar. Memory in Mice as Affected by Intracerebral Puromycin. *Science* 141, 57–59(1963)

Flexner, J. B. Flexner, R. B. Roberts. Memory in Mice Analyzed with Antibiotics. *Science* 155,1377–1383 (1967)

Florin, E.; Baillet, S. NeuroImage The brain`s resting-state activity is shaped by synchronized cross-frequency coupling of neural oscillations. *NeuroImage*, v. 111, p. 26–35, 2015.

Frankland & Miller. Regenerating your senses: multiple roles for neurogenesis in the adult brain. *Nature Neuroscience*. 2008, Vol. 11, No. 10.

Friedrich RW, Laurent G. Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. *Science*. 2001;291:889-94.

Fries P. (2005). A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn Sci* 9:474–480.

Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science*. 2001;291(5508):1560-3.

Gage FH. Structural plasticity: cause, result, or correlate of depression. *Biol Psychiatry*. 2000 Oct 15;48(8):713-4.

Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer H. Genetic and environmental influences on behavioral and neurochemical aspects of emotionality in rats. *Experientia*. 1988 Jun 15;44(6):482-90. Review.

Gerber, B., Tanimoto, H., and Heisenberg, M. (2004). An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 737–744.

Golomb, D.; Rinzel, J. Dynamics of globally coupled inhibitory neurons with heterogeneity. *Physical Review E*, v. 48, n. 6, p. 4810–4814, 1993.

Gould et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neurosci.* 1999, 2: 260–265.

Gourévitch B, Kay LM, Martin C. Directional coupling from the olfactory bulb to the hippocampus during a go/no-go odor discrimination task. *J Neurophysiol.* 2010;103(5):2633-41.

Gray CM, König P, Engel AK, Singer W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature*. 1989;338(6213):334-7.

Gulbinaite, R., Johnson, A., de Jong, R., Morey, C. C., and van Rijn, H. (2014a). Dissociable mechanisms underlying individual differences in visual working memory capacity. *Neuroimage* 99, 197–206.

Gulbinaite, R., van Rijn, H., and Cohen, M. X. (2014b). Frontoparietal network oscillations reveal relationship between working memory capacity and cognitive control. *Front. Hum. Neurosci.* 8:761.

Gusmão, I. D., Monteiro, B. M., Cornélio, G. O., Fonseca, C. S., Moraes, M. F., Pereira, G. S. Odor-enriched environment rescues long-term social memory, but does not improve olfaction in social isolated adult mice. *Behav Brain Res.* 2012, 228(2), 440-6.

Haberly LB. Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem Senses.* 2001;26:551–76.

Haegens, S., Cousijn, H., Wallis, G., Harrison, P. J., and Nobre, A. C. (2014). Inter- and intra-individual variability in alpha peak frequency. *Neuroimage* 92, 46–55. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.01.049

Hebb DO. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. Michigan: Wiley, 1949.

Hemptinne, C. DE et al. Therapeutic deep brain stimulation reduces cortical phase-amplitude coupling in Parkinson ' s disease. v. 18, n. 5, 2015.

Henrie, J. A.; Shapley, R. LFP Power Spectra in V1 Cortex : The Graded Effect of Stimulus Contrast. p. 479–490, 2018.

Imayoshi, I. et al. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neurosci.* 11, 1153–1161 (2008).

Izquierdo I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed, 2002.

Izquierdo, I, Medina, J.H., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 1-11.

Izquierdo, I.(1989). Different forms of posttraining memory processing. *Behavioural and Neural Biology*, 51,171-202.

Izquierdo, I., Barros, D.M, Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *NATURE*, 393:635-636.

Izquierdo, I., Medina, J.H.(1997). Memory formation, the sequece of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68,285-316.

Izquierdo, I., Bevilaqua, L. Rossato, J.I., Bonini, J.S., Medina, J.H., Cammarota, M.(2006) Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29,496-505.

James, W. (1890). *The principles of psychology*. New York, NY: Henry Holt & Co.

Joseph Altman. Are New Neurons Formed in the Brains of Adult Mammals? *Science* 30 Mar 1962: Vol. 135, Issue 3509, pp. 1127-1128.

Julia Rosauero Clarke, Martín Cammarota, Agnès Gruart, Iván Izquierdo and José María Delgado-García. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 09 February 2010, Vol.107(6), pp.2652-7

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill, 2000.

Kaplan MS, JW Hinds. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 09 Sep 1977: Vol. 197, Issue 4308, pp. 1092-1094

Kaplan M. S., D. H. Bell. Neuronal proliferation in the 9-month-old rodent — Radioautographic study of granule cells in the hippocampus. *Experimental Brain Research*. September 1983, Volume 52, Issue 1, pp 1–5.

Karlson P, Luscher M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 1959 Jan 3;183(4653):55-6.

Kay LM, Beshel J. A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. *J Neurophysiol*. 2010;104(2):829-39.

Kempermann G., et al. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997, 386: 493–495.

Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF. The sniff as a unit of olfactory processing. *Chem. Senses*. 2006;31:167–79.

Klimesch, W. (2012). Alpha-band oscillations, attention, and controlled access to stored information. *Trends Cogn. Sci.* 16, 606–617. doi:10.1016/j.tics.2012.10.007

- Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis. *Brain Research Reviews*. 1999;29:169–95
- Ko, H.-G., Jang, D.-J., Son, J., Kwak, C., Choi, J.-H., Ji, Y.-H., ... Kaang, B.-K. (2009). Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Molecular Brain*, 2, 1.
- Kogan, J.H. et al. Long-Term Memory Underlying Hippocampus-Dependent Social Recognition in Mice. *Hippocampus*. 2000, 10:47–56.
- Kreiman, G. et al. Object Selectivity of Local Field Potentials and Spikes in the Macaque Inferior Temporal Cortex. p. 433–445, 2006.
- Kunh HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Cage, FH (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neuronal progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820-5829.
- Lashley, K. (1950). In search of the engram. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 4, 454–482.
- Laurent G, Davidowitz H. Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Science*. 1994;265(5180):1872-5.
- Laurent G. Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3:884-95.
- Lent R. *Neurociência da mente e do comportamento*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2008.
- Li CS, Kaba H, Saito H, Seto K. Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. *Neuroscience*. 1990;36(3):773-8.
- Li L, Mauric V, Zheng JF, Kang SU, Patil S, Hoyer H, et al. Olfactory bulb proteins linked to olfactory memory in C57BL/6J mice. *Amino Acids* 2010;39: 871–86.
- Licht G, Meredith M. Convergence of main and accessory olfactory pathways onto single neurons in the hamster amygdala. *Exp Brain Res*. 1987;69(1):7-18.

- Lisman, J., Buzsaki, G., 2008. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr. Bull.* 34 (5), 974–980.
- Liu, J.; Newsome, W. T. Local Field Potential in Cortical Area MT : Stimulus Tuning and Behavioral Correlations. v. 26, n. 30, p. 7779–7790, 2006.
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, P.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K., and Tonegawa, S. (2012). Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature* 484, 381–385.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Mar;7(3):179-93. Review.
- Lois ; Alvarez-Buylla . Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, NY)*, v. 264, n. 5162, p. 1145–1148, 1994.
- Lu et al. Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Experimental Neurology.* 2003, 183: 600–609.
- Maaswinkel H, Baars AM, Gispen WH, Spruijt BM. 1996. Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav* 60:55–63.
- Marín-Burgin, A.; Schinder, A. F. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. v. 227, p. 391–399, 2012.
- Markham JA, Juraska JM. Social recognition memory: influence of age, sex, and ovarian hormonal status. *Physiol Behav.* 2007 Dec 5;92(5):881-8.
- Martin C, Beshel J, Kay LM. An Olfacto-Hippocampal Network Is Dynamically Involved in Odor-Discrimination Learning. *J Neurophysiol.* 2007;98(4):2196-205.
- Martin, S.J., and Morris, R.G.M. (2002). New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus* 12, 609–636.
- Matochik JA. Role of the main olfactory system in recognition between individual spiny mice. *Physiol Behav.* 1988;42:217–22.

McGaugh, J.L.(1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153:1351-1358.

McGaugh, J.L: Memory – A century of consolidation. *Science* 2000, 287:248-251.

Ming, G.; Song, H. Review Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain : Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, v. 70, n. 4, p. 687–702, 2011.

Mitzdorf, U. (1985) Current source–density method and application in cat cerebral cortex: investigation of evoked potentials and EEG phenomena. *Physiol. Rev.* 65, 37–100

Monteiro BM, Moreira FA, Massensini AR, Moraes MF, Pereira GS. Enriched environment increases neurogenesis and improves social memory persistence in socially isolated adult mice. *Hippocampus*. 2014 Feb;24(2):239-48.

Moy SS, Nadler JJ, Poe MD, Nonneman RJ, Young NB, Koller BH, et al. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: relevance to autism. *Behav Brain Res* 2008;188(March (1)):178–94.

Nerad L, Bilkey DK. Ten- to 12-Hz EEG oscillation in the rat hippocampus and rhinal cortex that is modulated by environmental familiarity. *J Neurophysiol.* 2005;93(3):1246-54.

Nokia, M. S. et al. Hippocampal Theta-Band Activity and Trace Eyeblick Conditioning in Rabbits. v. 123, n. 3, p. 631–640, 2009.

Oboti, L.; Peretto, P. How neurogenesis finds its place in a hardwired sensory system. *Frontiers in Neuroscience*, v. 8, n. 8 MAY, p. 1–14, 2014.

Okuda et al. Environmental Enrichment Stimulates Progenitor Cell Proliferation in the Amygdala. *Journal of Neuroscience Research.* 2009, 87:3546–3553.

Pacteau C, Einon D, Sinden J. Early rearing environment and dorsal hippocampal ibotenic acid lesions: long-term influences on spatial learning and alternation in the rat. *Behav Brain Res.* 1989 Aug 1;34(1-2):79-96.

Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 2^o edition. (2004), Academic Press Limited, London, UK.

Pena RR, Pereira-Caixeta AR, Moraes MF, Pereira GS. Anisomycin administered in the olfactory bulb and dorsal hippocampus impaired social recognition memory consolidation in different time-points. *Brain Res Bull.* 2014 Oct;109:151-7.

Pena R.R, Medeiros D.C, Guarnieri L.O., Guerra J.B., Carvalho V.R., Mazoni, Schenatto G.P, Moraes M. Home-cage odors spatial cues elicit theta phase/gamma amplitude coupling between olfactory bulb and dorsal hippocampus. *Neuroscience* 363 (2017) 97–106

Pereira-Caixeta AR, Guarnieri LO, Pena RR, Dias TL, Pereira GS. Neurogenesis Inhibition Prevents Enriched Environment to Prolong and Strengthen Social Recognition Memory, But Not to Increase BDNF Expression. *Mol Neurobiol.* 2017 Jul;54(5):3309-3316.

Pham K, Nacher J, Hof PR, McEwen BS. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression. In the adult dentate gyrus. *Eur Neurosci* 17:879.

Poo M.M. et al. What is memory? The present state of the engram *BMC Biology*, May 19, 2016, Vol.14(40)

Popik P, Vetulani J, Bisage A, Van Ree JM. Recognition cue in the rat's social memory paradigm. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1991;2:315–27.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, White LE. *Neurociências*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

Quiroga R.Q., Panzeri S. *Principles of Neural Coding*. CRC Press, 2013.

Roelfsema PR, Engel AK, Konig P, Singer W. Visuomotor integration is associated with zero time-lag synchronization among cortical areas. *Nature.* 1997;385:157–61.

Rudy JW. Postconditioning isolation disrupts contextual conditioning: an experimental analysis. *Behav Neurosci.* 1996 Apr;110(2):238-46.

Rutishauser, U. et al. Human memory strength is predicted by theta-frequency phase-locking of single neurons. *Nature*, v. 464, n. 7290, p. 903–907, 2010.

Sadaghiani S1, Scheeringa R, Lehongre K, Morillon B, Giraud AL, Kleinschmidt A. Intrinsic connectivity networks, alpha oscillations, and tonic alertness: a simultaneous electroencephalography/functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci.* 2010;30(30):10243-50.

Sahay A, Wilson DA, Hen R. Pattern separation: a common function for new neurons in hippocampus and olfactory bulb. *Neuron.* 2011 May 26;70(4):582-8.

Sakamoto et al. Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *PNAS.* 2011, Vol. 108, No. 20.

Salek-Haddadi, A. et al. Simultaneous EEG-Correlated Ictal fMRI. v. 40, p. 32–40, 2002.

Samiee S., Baillet S. Time-resolved phase-amplitude coupling in neural oscillations. *NeuroImage* 159 (2017) 270–279

Sanchez-Andrade G, James BM, Kendrick KM. Neural encoding of olfactory recognition memory. *J Reprod Dev.* 2005;51(5):547-58.

Sanchez-Andrade G, Kendrick KM. The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav Brain Res.* 2009;200(2):323-35.

Sawyer TF, Hengehold AK, Perez WA. Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behav Neurosci.* 1984;98(5):908-13.

Saxe, M. D. et al. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. v. 103, n. 46, p. 17501–17506, 2006.

Scalia F., Winans S.S. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *Journal of Comparative Neurology*. Volume 161, Issue 1, pages 31–55, 1 May 1975

Schaefer AT, Angelo K, Spors H, Margrie TW. Neuronal oscillations enhance stimulus discrimination by ensuring action potential precision. *PLoS Biol*. 2006;4:e163.

Schnitzler A, Gross J; Gross (2005). "Normal and pathological oscillatory communication in the brain". *Nature Reviews Neuroscience*. 6 (4): 285–296.

Schroeder, C. and Lakatos, P. (2009) Low-frequency neuronal oscillations as instruments of sensory selection. *Trends Neurosci*. 32,9–18

Schutter, D. J. L. G.; Knyazev, G. G. Cross-frequency coupling of brain oscillations in studying motivation and emotion. p. 46–54, 2012.

Semon R: Die mneme. [The mneme]. Leipzig: Wilhelm Engelmann; 1904.

Semon R: Die mnemischen empfindungen. [Mnemic psychology]. Leipzig: Wilhelm Engelmann; 1909.

Seri, B. et al. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, v. 478, n. 4, p. 359–378, 2004.

Sherrington C.S.,(1906).Observations on the scratch-reflex in the spinal dog *The Journal of physiology* 34 (1-2), 1-50

Shors, T. J. et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372–376 (2001). The first study to show the functional importance of adult neurogenesis.

Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. & Gould, E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12, 578–584 (2002).

Simerly RB. Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci.* 1990;13(3):104-10.

Singer W. Synchronization of cortical activity and its putative role in information processing and learning. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:349–74.

Snyder, J. S. et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J. Neurosci.* 29, 14484–14495 (2009).

Spehr M, Spehr J, Ukhanov K, Kelliher KR, Leinders-Zufall T, Zufall F. Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(13):1476-84.

Steven J. Cooper. Donald O. Hebb's synapse and learning rule: a history and commentary. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28 (2005) 851–874.

Stopfer M, Bhagavan S, Smith BH, Laurent G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature.* 1997;390:70–4

Sutherland RJ, Rudy JW. 1989. Configural association theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. *Psychobiology* 17:129–144.

Swanson LW, Petrovich GD. What is the amygdala? *Trends Neurosci.* 1998;21(8):323-31.

Thor DH, Holloway WR. Social memory of the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psych* 1982;96:1000–6.

Tirindelli R, Mucignat-Caretta C, Ryba NJ. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 1998;21(11):482-6.

Tomás J. Ryan, Dheeraj S. Roy, Michele Pignatelli, Autumn Arons, Susumu Tonegawa. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science.* 2015 May; 348(6238):1007-1013 doi: 10.1126/science.aaa5542

Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D., and Ryan, T. (2015a). Memory engram storage and retrieval. *Current Opinion in Neuroscience* 35, 101–109.

Tonegawa, S. et al. Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron*, v. 87, n. 5, p. 918–931, (2015b).

Tort, A.B., Komorowski, R.W., Manns, J.R., Kopell, N.J., and Eichenbaum, H. (2009). Theta-gamma coupling increases during the learning of item-context associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 20942–20947.

Tort, A. B. L. et al. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. v. 105, n. 51, p. 20517–20522, 2008.

Tozuka et al. GABAergic Excitation Promotes Neuronal Differentiation in Adult Hippocampal Progenitor Cells. *Neuron*. 2005, 47: 803–815.

Traub RD, Miles R. *Neuronal Networks of the Hippocampus*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1991.

Traub, R. D.; Whittington, M. A. Simulation of Gamma Rhythms in Networks of Interneurons and Pyramidal Cells. v. 150, p. 141–150, 1997.

Traub RD, Miles R, Wong RKS. Model of the origin of rhythmic population oscillations in the hippocampal slice. *Science* 1989;243:1319–25.

Tsao DY, Livingstone MS. Mechanisms of face perception. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:411-37.

Uda M, Ishido M, Kami K, Masuhara M. (2006). Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res*. 1104:64-72.

van Wimersma Greidanus TB, Maigret C. 1996. The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. *Brain Res* 713:153– 159.

Vanderwolf CH. Hippocampal activity, olfaction, and sniffing: an olfactory input to the dentate gyrus. *Brain res.* 1992;593:197–208.

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., & Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), 1030–4.

van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J. & Gage, F. H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 13427–13431 (1999).

Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J. The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. *Nature reviews. Neuroscience.* 2001;2(4):229-39.

Wang X.J., Buzsaki G. (1996) Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J. Neurosci* 16:6402-6413

White J.A., Chow C.C., Ritt J., Soto-Treviño C., Kopell N.(1998) Synchronization and oscillatory dynamics in heterogeneous, mutually inhibited neurons. *J Comput Neurosci* 5:5-16

Whittington, M. A. et al. Inhibition-based rhythms : experimental and mathematical observations on network dynamics. 2000.

Wilkinson LS, Killcross SS, Humby T, Hall FS, Geyer MA, Robbins TW. Social isolation in the rat produces developmentally specific deficits in prepulse inhibition of the acoustic startle response without disrupting latent inhibition. *Neuropsychopharmacology.* 1994 Feb;10(1):61-72.

Wilson, H.R.; Cowan, J.D. Excitatory and inhibitory interactions in localized populations of model neurons. *Biophysical Journal*, v. 12, n. 1, p. 1–24, 1972.

Wongwitdecha N, Marsden CA. Social isolation increases aggressive behaviour and alters the effects of diazepam in the rat social interaction test. *Behav Brain Res.* 1996 Feb;75(1-2):27-32.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current Protocols in Neuroscience* 2009; Chapter 8: Unit 8-24.

Yates FA, *A arte da memória*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007

Zhang R.L.; Gang, Z.; Chopp, M. Neuropharmacology Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. v. 55, p. 345–352, 2008.