

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ALTERAÇÕES DURADOURAS NO COMPORTAMENTO E NA
NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DE RATOS PELA
EXPOSIÇÃO A UMA DOSE SUBCONVULSIVANTE DE
PILOCARPINA**

Ana Paula Ramos Costa

Florianópolis

2017

Ana Paula Ramos Costa

**ALTERAÇÕES DURADOURAS NO COMPORTAMENTO E NA
NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL DE RATOS PELA
EXPOSIÇÃO A UMA DOSE SUBCONVULSIVANTE DE
PILOCARPINA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima

Co-orientadora: Cilene Lino de Oliveira

Orientador no período de doutorado sanduíche: John F. Cryan

Florianópolis, 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Ana Paula Ramos
ALTERAÇÕES DURADOURAS NO COMPORTAMENTO E NA NEUROGÊNESE
HIPOCAMPAL DE RATOS PELA EXPOSIÇÃO A UMA DOSE
SUBCONVULSIVANTE DE PILOCARPINA / Ana Paula Ramos Costa ;
orientador, Thereza Christina Monteiro de Lima ;
coorientador, Cilene Lino de Oliveira. - Florianópolis, SC,
2017.

122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

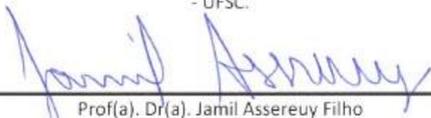
1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Pilocarpina. 4.
Neurogênese. 5. MicroRNAs. I. Lima, Thereza Christina
Monteiro de . II. Oliveira, Cilene Lino de. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. IV. Título.

"Alterações duradouras no Comportamento e na neurogênese hipocampal de ratos pela exposição a uma dose subconvulsivante de pilocarpina"

Por

Ana Paula Ramos Costa

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (01/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



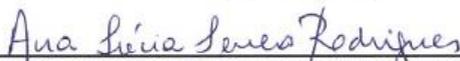
Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



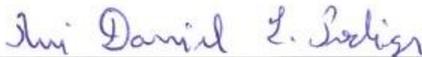
Dr(a) Raquel Vecchio Fornari (Universidade Federal do ABC)
(videoconferência)



Dr(a) Rubia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (Universidade Estadual de Maringá)
(videoconferência)



Dr(a) Ana Lucia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Rui Daniel Schroder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Marcelo Giachero (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 19 de janeiro de 2017.

‘..De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.’ Fernando Sabino

Agradecimentos

À Deus, por ter me dado força e saúde durante a caminhada.

Aos meus pais, Lydia Maria Ramos Costa e Luiz Otávio Borrajo Costa, por terem me apoiado quando decidi tentar de novo, mesmo sabendo que a caminhada seria difícil. Por estarem do meu lado sempre, secando minhas lágrimas e curando minhas feridas.

Ao meu namorado, Kevin Donnelly, por não me deixar cair nos últimos meses, por me incentivar e apoiar sempre.

À minha orientadora, Thereza, por ter confiado em mim, por me defender quando precisei e por ter permitido que um sonho se realizasse.

À minha coorientadora, Cilene, por ter sentado do meu lado por muitas vezes para procurar artigos e fazer correções, ponto a ponto.

Ao meu supervisor, John Cryan, por ter me dado oportunidade de viver a experiência de um doutorado sanduíche no exterior e ter me oferecido um emprego mesmo antes deste doutorado acabar.

À minha tia e doutora, Ana Teresa Ramos Cerqueira, por ter sempre acreditado no meu potencial e ter me incentivado desde o começo de tudo.

À minha vizinha, Mariinha, por sempre ter estado presente, mesmo de longe.

Às minhas companheiras de luta, Claudini e Julia, por terem sido minhas melhores companhias no laboratório e por abraçarem as causas mais justas dessa sociedade.

Ao professor Rui Prediger, pelos convites para dar aula, pelo apoio nas atividades de extensão e por ter manifestado seu apoio num momento muito especial.

Aos meus amigos do departamento, Maíra, Cristiane, Raquel e Filipe, por compartilharem das mesmas angústias e alegrias de um doutorado.

Ao meu parceiro de pilocarpina, Alexandre, por ter sido meu guia, meu amigo e meu incentivador.

Ao governo brasileiro, por ter custeado os quase 12 anos de formação na Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos funcionários do departamento, Scheila, Andreia e Pedro, por sempre serem atenciosos e esforçados para atender as necessidades dos estudantes.

Aos funcionários do LAMEB, em especial à Chirle e à Vanessa, por não medirem forças para nos ajudar com as diferentes técnicas utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Neurogastroenterologia na University College Cork, Pat, Gerry, Collete, Rachel e Kieran, por fazerem possível a realização dos meus experimentos na Irlanda.

Aos meus colaboradores do Brasil e da Irlanda, Brunno Levone, Anand Gururajan, Felipe Vanz, Filipe Matheus, Gerry Moloney e Alexandre Hoeller.

Às minhas amigas, Elise, Alice, Mariana, Lígia, Flavinha, Natália, Aninha, Lívia, Clara, Paula, Nina, Camila, Naline, Karina, Michelle, Danka, Loli, Letícia e Bruna, por me darem apoio, por me fazerem rir, por me aceitarem como sou.

Aos meus *doguitos*, por todo amor incondicional, em especial a Tigresa, que nos deixou ao final desse processo – voce foi a mais graciosa e amorosa amiga.

Resumo

O sistema colinérgico é um dos principais sistemas neurotransmissores no sistema nervoso com influência em funções como controle autonômico, aprendizagem, memória, respostas emocionais, bem como no processo de neurogênese. A neurogênese do hipocampo adulto tem sido relacionada à aprendizagem, memória espacial, medo e transtornos do humor. Vários estudos sugerem que estresse crônico pode reduzir a neurogênese do hipocampo adulto, enquanto que o tratamento crônico com antidepressivos, exercícios físicos e o enriquecimento ambiental podem aumentar a proliferação de novos neurônios no hipocampo. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que ratos tratados com uma dose única subconvulsivante de pilocarpina - um agonista não seletivo de receptores muscarínicos - apresentam um perfil tipo-ansioso (observado nos testes do labirinto em cruz elevado e do campo aberto) e aumento dos níveis de corticosterone plasmática, que persistiu de 24 h até 30 dias após o tratamento. Nossa hipótese é de que o tratamento com pilocarpina perturba o mecanismo de neurogênese, impedindo o correto funcionamento do hipocampo na modulação de estados emocionais, o que resulta nas alterações endócrinas e comportamentais observadas neste modelo. Para testar esta hipótese, avaliamos a influência do tratamento com pilocarpina na neurogênese hipocampal e no comportamento dependente deste fenômeno de ratos adultos. Além disso, avaliamos a expressão de diferentes microRNAs envolvidos no controle deste processo. Nossos resultados sugerem que o tratamento com pilocarpina aumenta a neurogênese do hipocampo e provoca neurogênese ectópica, o que pode contribuir para as mudanças comportamentais de longo prazo observadas neste modelo. Além disso, este tratamento diminui a expressão de 6 microRNAs envolvidos no controle da proliferação, migração e desenvolvimento de novos neurônios no hipocampo de ratos adultos, sugerindo um possível mecanismo pós-transcricional decorrente deste tratamento. Portanto, pode-se sugerir que a exposição a uma dose única e subconvulsivante de pilocarpina é suficiente para alterar a estrutura encefálica de ratos através de mecanismos pós-transcricionais, o que altera o comportamento de forma duradoura, sustentando a alteração fenotípica observada em nosso modelo.

Palavras-chave: Pilocarpina, Neurogênese, Neurogênese ectópica, MicroRNAs.

Abstract

The cholinergic system is one of the main neurotransmitter systems in the nervous system with role in autonomic control as well as in learning, memory, emotional responses and neurogenesis. Adult hippocampal neurogenesis has been related to learning, spatial memory, fear, antidepressant treatment and anxiety disorders. Several studies suggest that chronic stress can reduce adult hippocampal neurogenesis, whereas chronic antidepressant treatment, physical exercises and environmental enrichment can increase the neurogenesis process. Recently, our research group showed that rats treated with a single injection of a non-convulsant dose of pilocarpine - a non-selective muscarinic receptor agonist – present an anxiogenic-like profile (in the elevated plus maze and open field tests) and increased serum corticosterone levels that persisted from 24 h up to 30 days. Our hypothesis is that the pilocarpine treatment can disturb the mechanism of neurogenesis, preventing its proper functioning in the modulation of emotional states, which results in the changes observed in this model. To test this hypothesis, we evaluated the influence of pilocarpine treatment on hippocampal neurogenesis and on the dependent behavior of this phenomenon. Furthermore, we evaluated the expression of different microRNAs that are involved in the control of this process. Our results suggest that pilocarpine treatment increases hippocampal neurogenesis besides provoking ectopic neurogenesis, which may contribute to the long-term behavioral changes observed in this model. In addition, pilocarpine treatment downregulated the expression of 6 microRNAs involved in the control of proliferation, migration and development of new neurons in the hippocampus of adult rats, suggesting a possible post-transcriptional mechanism as a consequence of this treatment. Therefore, we can suggest that the single exposure pilocarpine is enough to alter the brain structure of rats through post-transcriptional mechanisms sufficiently to alter their behavior in a long-lasting way, sustaining the phenotypic alteration observed in our model.

Keywords: Pilocarpine; Neurogenesis; Ectopic neurogenesis; MicroRNAs.

Lista de Figuras

Figura 1 – Projeções colinérgicas no sistema nervoso central.....	28
Figura 2 – Distribuição de receptores colinérgicos no sistema nervoso central.....	29
Figura 3 – Áreas encefálicas onde ocorre neurogênese no encéfalo adulto de roedor	36
Figura 4 – Vias encefálicas que compõe a formação hipocampal.....	38
Figura 5 – Ilustração do processo de neurogênese no giro denteado do hipocampo	43
Figura 6 – Esquema do experimento 1 da etapa 1	59
Figura 7 – Esquema do experimento 2 da etapa 1	60
Figura 8 – Esquema do experimento 3 da etapa 1	60
Figura 9 – Esquema do experimento 4 da etapa 1	61
Figura 10 – Esquema do experimento 1 da etapa 2	62
Figura 11 – Esquema do experimento 2 da etapa 2	62
Figura 12 – Esquema do experimento 3 da etapa 2	63
Figura 13 – Esquema do experimento 4 da etapa 2	63
Figura 14 – Esquema do experimento 1 da etapa 3	64
Figura 15 – Desenho esquemático destacando proteínas da via de sinalização das neurotrofinas avaliadas neste estudo	64
Figura 16 – Efeito do tratamento com pilocarpina no teste do nado forçado repetido	66
Figura 17 – Efeito do tratamento com pilocarpina no teste da preferência à sacarose	67
Figura 18 – Efeito do tratamento com pilocarpina na proliferação e sobrevivência de células no giro denteado do hipocampo	69

Figura 19 – Fotografias representativas do giro denteado de hipocampos marcados com NeuN e BrdU	70
Figura 20 – Efeito do tratamento com pilocarpina no comportamento de ratos submetidos à exposição aos braços abertos	71
Figura 21 – Efeito do tratamento com pilocarpina na ativação neuronal no hipocampo de ratos submetidos à exposição aos braços abertos	72
Figura 22 – Fotografias representativas do giro denteado de hipocampos marcados com FOS	73
Figura 23 – Efeito do tratamento com pilocarpina no teste do medo condicionado	74
Figura 24 – Efeito do tratamento com pilocarpina no teste da alimentação suprimida pela novidade	75
Figura 25 – Efeito do tratamento com pilocarpina na expressão de microRNAs no hipocampo de ratos	78
Figura 26 – Efeito do tratamento com pilocarpina na expressão de proteínas no hipocampo de ratos	80
Figura 27 – Efeito do tratamento com pilocarpina na composição da microbiota intestinal de ratos	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 – MicroRNAs selecionados para avaliação	77
Tabela 2 – MicroRNAs alterados pelo tratamento com pilocarpina	79
Tabela 3 – Análise de KEGG de vias de sinalização	79

Lista de Abreviaturas

ACTH – Hormônio adrenocorticotrófico (*adreno-corticotrophic hormone*)

ANOVA – Análise de variância

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*)

CA1 – Corno de Ámon 1

CA2 – Corno de Ámon 2

CA3 – Corno de Ámon 3

CE – Córtex entorrinal

EEG - Eletroencefalograma

CEUA – Comitê de Ética sobre o Uso de Animais

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DCX – Doublecortina

DAB – Diaminobenzidina

FF – Fímbria-Fórnix

GD – Giro Denteado

HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HPRA – *Health Products Regulatory Agency*

HAB – *High anxiety behavior*

ISRS – Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LAB – *Low anxiety behavior*

LTP – *Long-term potentiation*

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

MiRNA - MicroRNA

NF- κ B – Fator nuclear *kappa* B

NGF – Fator de crescimento neuronal

PFA – Paraformaldeído

PCR – Reação em cadeia da polimerase

P75NTR – Receptor de neurotrofina p75

PI3 – fosfatidil inositol-3

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência Animal

SDS – Dodecil sulfato sódico

SNC – Sistema Nervoso Central

TBS-T –Tampão de Tris (*Tris buffered saline*)

TNF – Teste do Nado Forçado

TNF-r – Teste do Nado Forçado repetido

ZSG – Zona subgranular

ZSV – Zona subventricular

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	27
1.1	O sistema colinérgico e as emoções	27
1.2	Neurogênese adulta – um histórico	33
1.3	Circuitaria hipocampal	36
1.4	Neurogênese hipocampal	40
1.5	Como avaliar a neurogênese hipocampal?.....	42
1.6	Regulação da neurogênese hipocampal adulta	44
1.6.1	MicroRNAs e neurogênese.....	45
1.6.2	Composição da microbiota intestinal e neurogênese.....	46
1.6.3	Controle colinérgico da neurogênese	47
1.7	O modelo da indução de comportamentos de esQUIVA induzido pela pilocarpina	48
2	Justificativa	49
3	Hipótese	49
4	Objetivos	50
4.1	Gerais.....	50
4.2	Específicos	50
5	Material e Métodos.....	51
5.1	Animais.....	51
5.2	Fármacos e tratamento	51
5.3	Testes comportamentais.....	52
5.3.1	Teste do Nado Forçado Repetido (TNF – r).....	52

5.3.2	Teste da Preferência à Sacarose	53
5.3.3	Teste da Exposição aos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado	54
5.3.4	Teste do Medo Condicionado	54
5.3.5	Teste da Alimentação Suprimida pela Novidade	55
5.4	Imunohistoquímica e Imunofluorescência	55
5.4.1	Marcação para C-fos	56
5.4.2	Marcação para NeuN/BrdU	56
5.5	Extração de microRNA	56
5.6	Reação em cadeia da polimerase	57
5.7	Extração de DNA das amostras de ceco	57
5.8	<i>Western blotting</i>	57
5.9	Desenho Experimental	58
5.10	Estatística	65
6	Resultados.....	65
6.1	Etapa 1 – Tempo de imobilidade no teste do nado forçado repetido e preferência por sacarose após tratamento com pilocarpina.....	65
6.2	Etapa 2 - Neurogênese e ativação neuronal no hipocampo dorsal e ventral e testes do medo condicionado e da alimentação suprimida pela novidade após o tratamento com pilocarpina.....	68
6.3	Etapa 3 - Expressão de microRNAs no hipocampo 30 dias após o tratamento com pilocarpina.....	76
7	Discussão.....	83
8	Conclusão	95

9	Referências	97
	Apêndice A	121

1. Introdução

1.1 O sistema colinérgico e as emoções

O sistema colinérgico de mamíferos é formado basicamente por dois tipos de neurônios, os interneurônios com função modulatória e os neurônios de projeção. Os neurônios apresentam alta distribuição no sistema nervoso: desde a medula espinhal e a cadeia de gânglios do sistema nervoso autônomo, até boa parte do encéfalo como córtex, hipocampo, estriado, núcleo magnocefalular basal, tegumento mesencefálico e núcleos de nervos cranianos, sendo que os neurônios da região diencefálica são interneurônios modulatórios e das regiões mais inferiores são neurônios de projeção (ASRICAN *et al.*, 2016).

Os principais núcleos de neurônios colinérgicos de projeção estão destacados na figura 1. Eles estão presentes no prosencéfalo basal, formados pela área septal medial, banda diagonal de Broca, núcleo basal de Meynert e substância inominada que enviam suas projeções para o hipocampo, tálamo, bulbo olfatório e córtex. Já na região pontomesencefálica temos os núcleos formados pelo tegumento dorsolateral e o núcleo tegumentar pedúnculo-pontino que projetam para o rombencéfalo, tálamo, hipotálamo e prosencéfalo basal (MYHRER; ENGER; AAS, 2008; PAUL *et al.*, 2015)

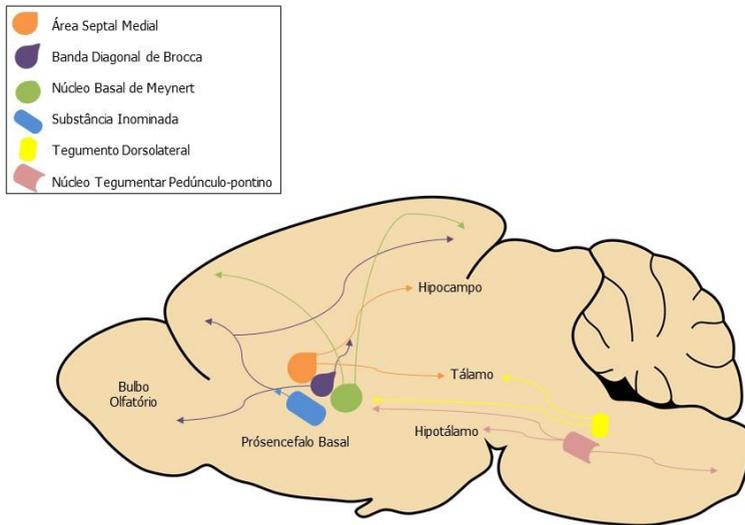


Figura 1 – Ilustração representando o corte sagital de encéfalo de rato, evidenciando os núcleos de neurônios colinérgicos e suas respectivas projeções no sistema nervoso central. A cor laranja representa a área septal medial e suas respectivas projeções para diferentes áreas do encéfalo, a cor roxa representa a banda diagonal de Broca e suas projeções, a cor verde representa o núcleo basal de Meynert e suas respectivas projeções, a cor azul representa a substância inominada e sua projeção, a cor amarela representa o tegumento dorsolateral e suas projeções e, por fim, a cor rosa representa o núcleo tegumentar pedúnculo-pontino e suas projeções para diferentes áreas encefálicas. Adaptado de (ASRICAN *et al.*, 2016) e (MYHRER; ENGER; AAS, 2008).

Como principais componentes da via colinérgica no sistema nervoso central (SNC) temos os neurônios colinérgicos, as enzimas que participam da síntese e degradação da acetilcolina (colina-O-acetiltransferase e acetilcolinesterase, respectivamente) e os receptores específicos para acetilcolina (PAUL *et al.*, 2015). A acetilcolina produzida pelos neurônios colinérgicos é liberada e pode interagir com dois principais tipos de receptores: nicotínicos e muscarínicos. A figura 2 mostra a distribuição destes receptores no sistema nervoso central.

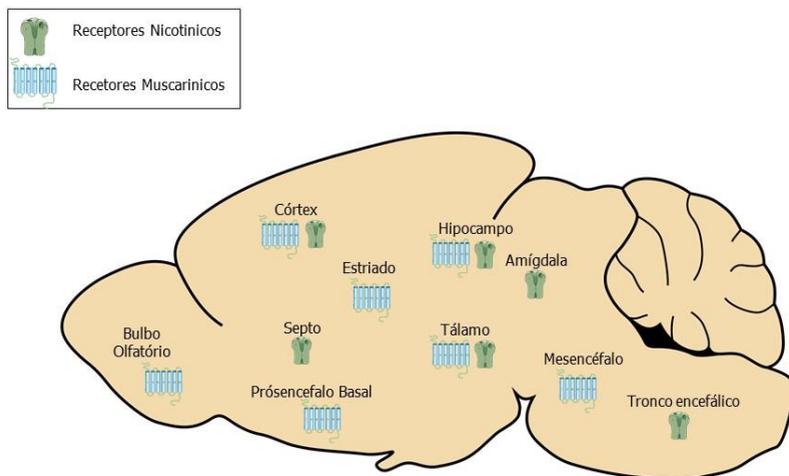


Figura 2 – Ilustração representando um corte sagital de encéfalo de rato, evidenciando a distribuição dos receptores nicotínicos e muscarínicos no sistema nervoso central. Os receptores ionotrópicos em cor verde representam os receptores nicotínicos e os receptores metabotrópicos em cor azul representam os receptores muscarínicos. Baseado em (PICCIOTTO *et al.*, 2000).

Os receptores nicotínicos são receptores ionotrópicos permeáveis aos íons sódio e potássio quando ativados, gerando uma transmissão excitatória rápida por despolarização da membrana. Foram descritos 4 subtipos desse receptor, distribuídos ao longo do corpo de mamíferos desde de junções neuromusculares, sistema nervoso autônomo e medula espinhal, até diferentes áreas encefálicas como o hipocampo, córtex, amígdala, tronco encefálico, tálamo, hipófise e septo (PICCIOTTO *et al.*, 2000). Por sua alta distribuição no encéfalo, os receptores nicotínicos possuem papel modulatório de diversas atividades encefálicas como a nocicepção, reforço positivo, memória de trabalho, respostas de medo condicionado, neurodegeneração, locomoção, ansiedade e depressão (PICCIOTTO *et al.*, 2000).

Já os receptores muscarínicos são receptores metabotrópicos acoplados à proteína G, podendo ser inibitórios ou excitatórios, de acordo com a cascata intracelular gerada após sua ativação. Existem 5 diferentes tipos de receptores muscarínicos descritos na literatura: M1,

M2, M3, M4 e M5 (WESS; EGLIN; GAUTAM, 2007). A ativação dos receptores M2 e M4 desencadeia a cascata de transdução de sinal da família Gi/Go (inibitórias) e a ativação dos receptores M1, M3 e M5 desencadeia a cascata mediada pelas proteínas da família Gq/G11(excitatórias) (AMAR *et al.*, 2010) . Os receptores do tipo M1, M4 e M5 são expressos predominantemente no SNC, enquanto que os receptores M2 e M3 são encontrados tanto na periferia quanto no SNC (WESS, 2007). Os receptores do tipo M1 são mais abundantes no neocórtex, no hipocampo e no estriado; os do tipo M2 estão presentes no hipocampo, córtex, bulbo olfatório, prosencéfalo basal e tálamo; receptores M3 são menos abundantes, e estão no tálamo, no hipocampo e no estriado; já os receptores M4 são abundantes no estriado, córtex e hipocampo; e os receptores do tipo M5 estão presentes no mesencéfalo e no hipocampo (ABRAMS *et al.*, 2006).

Através da utilização de ferramentas farmacológicas e de lesão de diferentes estruturas encefálicas, a literatura tem mostrado diversas evidências sobre os efeitos do sistema colinérgico no sistema nervoso central, sendo seu papel importante em diferentes aspectos da cognição e de respostas emocionais (DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010, 2014; GRAY; MCNAUGHTON, 1983; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013). Apesar disso, ainda não está claro qual a participação específica de cada subtipo de receptor em diferentes modulações muscarínicas no SNC (WESS, 2007). Foi demonstrado que roedores submetidos a tarefas de aprendizado apresentaram níveis de acetilcolina elevados logo após a execução da tarefa (CHANG; GOLD, 2003; MCINTYRE *et al.*, 2002). Reforçando esta relação, outros estudos demonstraram que ratos idosos que apresentam déficits cognitivos apresentam redução dos níveis de acetilcolina no hipocampo (AUBERT *et al.*, 1995; BAXTER *et al.*, 1999). Além disso, manipulações farmacológicas que aumentam acetilcolina no SNC melhoram o desempenho de animais em testes cognitivos e o bloqueio de receptores colinérgicos provoca amnésia (HASSELMO; SARTER, 2011; HASSELMO, 2006)

Em humanos, a degeneração de neurônios colinérgicos está associada à perda de memória na doença de Alzheimer (SCHLIEBS; ARENDT, 2006) e uma das intervenções farmacológicas tem como alvo a inibição da enzima acetilcolinesterase, aumentando a disponibilidade de acetilcolina nas fendas sinápticas – estratégia adotada após os clássicos estudos de Davis e colaboradores no final da década de 70,

tratando pacientes com fisostigmina (um inibidor da colinesterase) e tratando voluntários saudáveis com atropina e escopolamina (bloqueadores não seletivos de receptores muscarínicos), mimetizando alguns dos sintomas cognitivos da doença (BARTUS, 2000).

A literatura vem acumulando diversas evidências de que o sistema colinérgico está intimamente relacionado com a modulação de estados afetivos. Estudos em humanos e roedores mostram que o bloqueio tanto de receptores nicotínicos (MINEUR; PICCIOTTO, 2010) como de receptores muscarínicos (DREVETS; ZARATE; FUREY, 2013), diminuindo a transmissão colinérgica, possui efeitos antidepressivos – confirmando, pelo menos em parte, a teoria colinérgica para a depressão proposta por Janowsky e colaboradores na década de 70 em relatos de aumento de sintomas depressivos após tratamento com fisostigmina em pacientes com o transtorno de Alzheimer e em voluntários saudáveis. (MINEUR; PICCIOTTO, 2010). Além disso, o aumento da transmissão colinérgica também está relacionado ao aumento de comportamentos relacionados à ansiedade (DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010; MINEUR *et al.*, 2013) e em respostas ao estresse (MARK; RADA; SHORS, 1996; MIZOGUCHI *et al.*, 2001). Evidências mais antigas, das décadas de 50 e 60, mostraram que a exposição a inseticidas organofosforados - que têm como principal mecanismo de ação a inibição da acetilcolinesterase – provoca sintomas depressivos em pessoas saudáveis e diminui os sintomas de mania no transtorno bipolar (JEON *et al.*, 2015). Em um estudo mais recente e mais amplo, (HARRISON; MACKENZIE ROSS, 2016) encontraram níveis de ansiedade e depressão autodeclarados maiores em trabalhadores rurais expostos a pesticidas, mesmo quando fatores como saúde física, dados demográficos e eventos estressantes foram levados em consideração (HARRISON; MACKENZIE ROSS, 2016).

Como se pode constatar até agora, é inegável o envolvimento do sistema colinérgico modulando processos de memória e emoção, associando-se o aumento da transmissão colinérgica com um melhor desempenho em tarefas cognitivas, mas uma piora em respostas relacionadas ao estado de humor. Entretanto, foi demonstrado que o aumento sustentado de acetilcolina nas fendas sinápticas pela inibição da acetilcolinesterase pode causar ativação de receptores M2 pré-sinápticos que, por consequência, diminuem a liberação de acetilcolina pelo neurônio pré-sináptico (SARTER; PARIKH; HOWE, 2009). Além disso, este aumento de acetilcolina na fenda sináptica pode causar

ativação de receptores colinérgicos extrasinápticos, alterando a transmissão colinérgica em outras regiões (YAMASAKI; MATSUI; WATANABE, 2010). No mesmo sentido, o uso de antagonistas muscarínicos não-seletivos, como a atropina e a escopolamina, causa também o bloqueio dos mesmos receptores M2 pré-sinápticos - aumentando a liberação de acetilcolina e permitindo que a mesma ative receptores nicotínicos que não estão bloqueados (HERZOG *et al.*, 2003). Em estudos clínicos, foi demonstrado que o uso de adesivos de nicotina reduz os sintomas da depressão. Entretanto, este efeito se dá porque a exposição crônica a baixas doses de nicotina causa uma dessensibilização dos receptores de nicotina, resultando em uma redução da transmissão colinérgica (MINEUR; PICCIOTTO, 2010). Estes fatores levam à conclusão de que os efeitos que o sistema colinérgico tem sobre estes aspectos cognitivos e emocionais não são somente mediados pela neurotransmissão em si, mas são consequência de toda uma adaptação que ocorre em resposta à manipulação do próprio sistema.

Outra abordagem experimental utiliza a manipulação do sistema colinérgico, através do tratamento com agonistas muscarínicos, para induzir o modelo animal de epilepsia do lobo temporal. Neste modelo, proposto por Turski e colaboradores (1983), a injeção intraperitoneal de altas doses de pilocarpina (300-400 mg/kg), um agonista não-seletivo de receptores muscarínicos (preferencial de receptores M1 e M3 – FIGUEROA *et al.*, 2009), promove um estado epileptogênico caracterizado por episódios de descargas elétricas identificadas pelo eletroencefalograma (EEG), que são crescentes em complexidade, duração e propagação (SCORZA *et al.*, 2009). Como resultado do tratamento, uma crise motora generalizada é deflagrada (podendo durar até 48 h após o tratamento), um período livre de crises (cerca de 15 dias após a administração), seguido de estado crônico caracterizado por crises espontâneas e recorrentes que podem persistir por meses (CAVALHEIRO *et al.*, 1991), de maneira homóloga ao que ocorre em humanos diagnosticados com epilepsia do lobo temporal.

Dados publicados previamente na literatura revelam que a pilocarpina induz um aumento dos níveis de glutamato no hipocampo pela ativação de receptores M1, seguido pelo aparecimento de convulsões que podem ser desencadeadas e mantidas pela ativação dos receptores NMDA (para glutamato) e M1 (para acetilcolina) (NAGAO; ALONSO; AVOLI, 1996; SMOLDERS *et al.*, 1997).

Em adição a essas alterações, os animais tratados com altas doses de pilocarpina também apresentam déficits cognitivos (KUBOVÁ; MAREŠ, 2013; LOPES *et al.*, 2016), e alterações em comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão (DUARTE, FILIPE S *et al.*, 2013; DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013; LOPES *et al.*, 2016). Por outro lado, o tratamento com uma dose convulsivante de pilocarpina previne a perda cognitiva relacionada ao envelhecimento em ratos submetidos a diferentes avaliações de cognição e função olfatoria (DE-MELLO, N; SOUZA-JUNIOR; CAROBREZ, 2005; PREDIGER; DE-MELLO; TAKAHASHI, 2006). Comum a ambas as manipulações do sistema colinérgico - seja para atenuar a sua transmissão ou aumentá-la - o que parece explicar em parte a melhora cognitiva trazida pelos inibidores da acetilcolinesterase e, ao mesmo tempo, explicar os prejuízos estruturais seguidos do aparecimento das crises epiléticas está o fenômeno da neurogênese. Diversos estudos apontam o envolvimento do sistema colinérgico na modulação de processos plásticos, possuindo importante papel regulador da neurogênese (FONTANA *et al.*, 2006; KANEKO; OKANO; SAWAMOTO, 2006; KOTANI *et al.*, 2006). Para se entender melhor esta relação, faz-se necessária uma revisão sobre o fenômeno da neurogênese.

1.2 Neurogênese adulta – um histórico

O pesquisador italiano Giulio Bizzozero (1846-1901) foi um dos pioneiros no estudo da biologia celular, com contribuições inestimáveis como a descoberta das plaquetas, da fagocitose e da medula óssea. Inspirado pelos estudos de Wather Flemming (1843-1905) sobre a divisão celular, Bizzozero desenvolveu um extenso estudo de análise da capacidade de reprodução e regeneração de diversos tecidos, categorizando as células em células lábeis, estáveis e permanentes, um grande dogma da biologia celular, publicado em 1894. Segundo ele, células lábeis são aquelas que possuem capacidade mitótica constante - células do baço, de glândulas e da medula óssea; células estáveis são aquelas que possuem capacidade mitótica durante um período limitado de sua vida, se restringindo a situações patológicas que requerem regeneração - células do fígado, dos ossos e da musculatura lisa; já células permanentes são aquelas que formam tecido após a exaustão mitótica, ou seja, células que perderam a sua capacidade de divisão por terem sofrido muitas divisões durante o desenvolvimento embrionário -

células nervosas e de musculatura estriada esquelética (MAZZARELLO; CALLIGARO; CALLIGARO, 2001).

O dogma proposto por Bizzozero foi reforçado pelo seu pupilo Camilo Golgi (1843-1926) e seu colaborador Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) - com quem dividiu o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1906 - e foi um dos mais duradouros da biologia, sendo desfeito quase 100 anos depois com as evidências de formação de novos neurônios - neurogênese - em encéfalo de roedores adultos, publicada por Joseph Altman e Gopal Das na década de 60 (ALTMAN; DAS, 1965, 1966, 1967). Mais tarde, nos anos 80, foi demonstrado que o fenômeno de formação de novos neurônios acontecia em pássaros com canto, e que o mesmo sofria influências de fatores hormonais, de atividade física, do comportamento social e de neurotrofinas (COLUCCI-D'AMATO; DI PORZIO, 2008; GOLDMAN; NOTTEBOHM, 1983). Apesar disso, as evidências foram ignoradas pela comunidade científica até os anos 90, quando os trabalhos de Elizabeth Gould, Fred Gage, e Peter Eriksson iniciaram uma série de estudos que confirmaram as evidências levantadas por Altman e Das (ERIKSSON *et al.*, 1998; GAGE, 2002; GOULD *et al.*, 1997).

De fato, a maior parte das regiões encefálicas no indivíduo adulto é formada por células que perderam sua capacidade mitótica. Entretanto, exceções a essa regra foram encontradas em diversas classes do filo Cordado, como em peixes, aves, répteis, anfíbios e mamíferos - incluindo seres humanos. Contudo, o valor evolutivo do fenômeno de proliferação celular no tecido nervoso de indivíduos adultos (independente da espécie) ainda parece contraditório: por um lado, foi demonstrada essa capacidade em várias espécies e diversas regiões encefálicas; por outro lado, em vertebrados de menor complexidade como lagartixas, essa capacidade de regeneração do tecido nervoso é imensa e diminui com o aumento da complexidade do tecido nervoso (KEMPERMANN; WISKOTT; GAGE, 2004; KEMPERMANN, 2016). Em resposta às sugestões de Kempermann, Alice Power publicou um manuscrito que sugere que este fenômeno possui o mesmo valor adaptativo para as diferentes espécies e que a única diferença é que o fenômeno, que em aves, peixes e répteis ocorre de maneira difusa nos telencéfalos, convergiu para áreas específicas do encéfalo de mamíferos (POWERS, 2013).

Em mamíferos este fenômeno ocorre em duas regiões bem definidas conhecidas até o momento: o giro denteado no hipocampo e a região subventricular nos ventrículos laterais (ERIKSSON *et al.*, 1998). A camada subgranular do giro denteado do hipocampo possui células progenitoras que se dividem e formam novos neurônios que migram para a camada granular onde podem ser integrados à circuitaria hipocampal (Figura 3). Já a região subventricular possui células progenitoras que migram para o bulbo olfatório integrando a circuitaria local (Figura 3) (ALTMAN; DAS, 1965, 1966; CARLETON *et al.*, 2003; ERIKSSON *et al.*, 1998; GAGE, 2002; GOULD *et al.*, 1997).

Novos neurônios do bulbo olfatório contribuem para aspectos especiais do processamento de informação olfatória, como a discriminação olfativa (GHEUSI *et al.*, 2000). (CARLETON *et al.*, 2003) mostraram evidências de que os novos neurônios desta região são corretamente integrados à circuitaria local, possuindo as mesmas propriedades eletrofisiológicas de neurônios pré-existent e, possivelmente, as mesmas funções no processamento desta informação sensorial .

Já às novas células geradas no giro denteado do hipocampo é creditada a função de modulação e refinamento dos circuitos já existentes na região, contribuindo para a expressão de comportamentos normais envolvidos em tarefas de memória dependentes da circuitaria hipocampal (IMAYOSHI *et al.*, 2008).

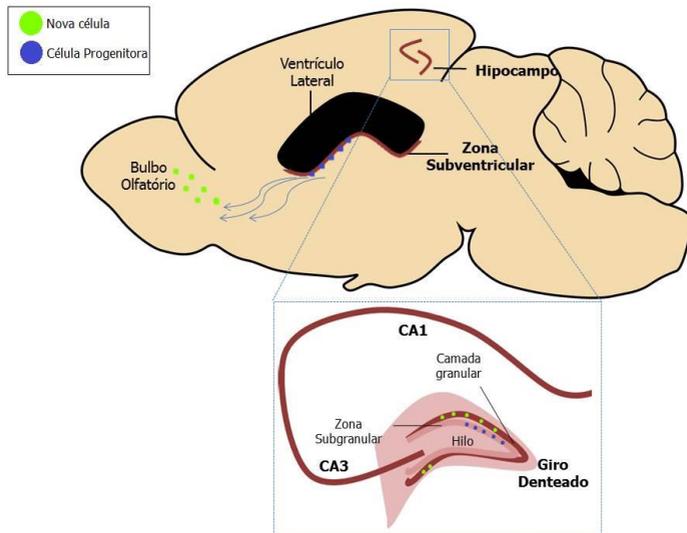


Figura 3 – Ilustração representando um corte sagital de encéfalo de rato, evidenciando as áreas onde ocorrem neurogênese no encéfalo adulto. Em destaque e maior aumento está representada a formação hipocampal. As áreas que possuem células progenitoras que continuam a se dividir no encéfalo adulto são a zona subventricular (ZSV) e o giro denteado. (GD) As esferas verdes representam uma nova célula proveniente da proliferação de células progenitoras – representadas pelas esferas azuis. As células novas formadas no GD surgem na zona subgranular e, à medida que vão se diferenciando, migram para a camada granular. Já as novas células geradas na ZS se diferenciam e migram para a região do bulbo olfatório. Adaptado de (DENG; AIMONE; GAGE, 2010).

1.3 Circuitaria hipocampal

Para melhor entender a função das novas células formadas no hipocampo faz-se necessária uma revisão da organização anatômica e funcional desta estrutura. A formação hipocampal é composta majoritariamente pelas regiões de substância cinzenta, destacadas na figura 4: a região do corno de Ámmon 1 (CA1), corno de Ámmon 2 (CA2), corno de Ámmon 3 (CA3), giro denteado (GD), subículo e córtex entorrinal (CE). Já a substância branca é formada principalmente pelas fibras da via perforante e pelas fibras da via fímbria-fórnix, sendo que a primeira é responsável pela comunicação bilateral do hipocampo com o córtex entorrinal e a segunda responsável pela conexão bilateral do

hipocampo com o tálamo, hipotálamo, *núcleo accumbens* e septo (AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007).

A formação hipocampal é conhecida por ter uma circuitaria bastante particular quando comparada a outras regiões corticais, o conhecido *loop* hipocampal que segue um sentido unidirecional através da via perforante: CE → giro denteado → CA3 → CA1 → subículo → CE (sendo que o subículo pode enviar projeções diretamente para o CE, bem como o CE pode enviar projeções diretas para CA1 e CA3, respeitando-se o sentido) (AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007). Através dessa via, o hipocampo recebe informações sensoriais corticais mediadas principalmente pelo glutamato, sendo a transmissão excitatória rápida mediada principalmente pela ativação de receptores AMPA e a transmissão excitatória lenta mediada pela ativação de receptores NMDA (OSTEN; WISDEN; SPRENGEL, 2007).

Já através da via fímbria-fórnix, o hipocampo recebe informações da área septal medial, principal responsável pelo controle da atividade teta hipocampal. Esta atividade está relacionada a um padrão de disparos neuronais sincronizados associados ao aprendizado, memória e modulação de estados emocionais, mediados pelo neurotransmissor acetilcolina, através da ligação com receptores muscarínicos e nicotínicos, mediando tanto sinapses excitatórias quanto sinapses inibitórias (OSTEN; WISDEN; SPRENGEL, 2007).

As eferências hipocampais, por sua vez, são para o córtex entorrinal e deste para outras áreas corticais, ou da região CA3 (principalmente) de volta para a área septal, tálamo, hipotálamo e amígdala via fórnix, podendo estas serem moduladas pelo neurotransmissor GABA, via ativação de receptores GABA_A para correntes inibitórias rápidas ou GABA_B para correntes inibitórias lentas; ou ainda pelo glutamato pelos mesmos receptores supracitados (OSTEN; WISDEN; SPRENGEL, 2007).

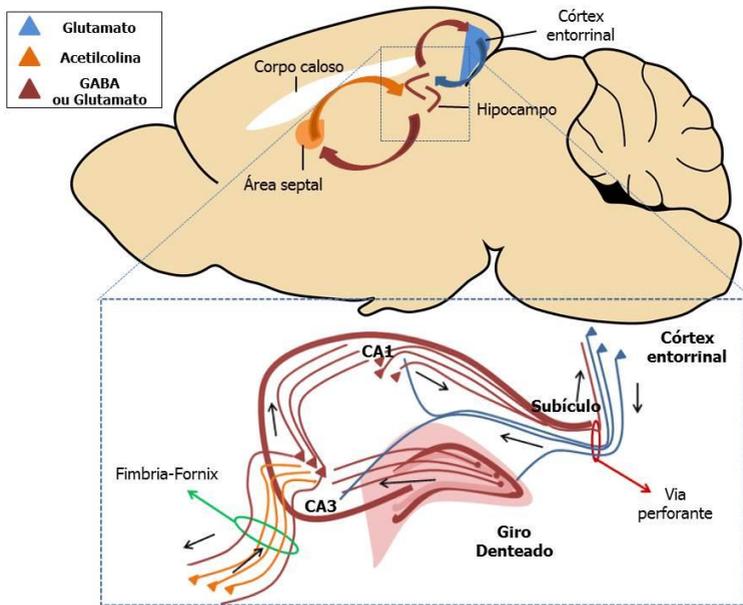


Figura 4 – Ilustração representando um corte sagital de encéfalo de rato, evidenciando as vias que compõe a formação hipocampal, bem como os neurotransmissores que compõem esta via. A via fimbria-fornix é a principal via de aferências que o hipocampo recebe da área septal bem como tálamo e hipotálamo. O principal neurotransmissor desta via é a acetilcolina e os neurônios colinérgicos estão representados pelos triângulos laranja. Já a via perforante é a principal via de conexão entre o córtex entorrinal e o hipocampo e o principal neurotransmissor desta via é o glutamato e os neurônios glutamatérgicos estão representados pelos triângulos azuis. Adaptado de (AMARAL; SCHARFMAN; LAVENEX, 2007)

Assim como outras regiões encefálicas, o funcionamento do hipocampo não é isolado e independente, o que pode ser evidenciado na revisão de sua organização anatômica e seus intrincados circuitos. Apesar disso, sua função é bastante individualizada e pode ser melhor elucidada através de estudos em pacientes humanos e animais que tiveram esta estrutura retirada ou lesionada. Sendo assim, as funções atribuídas a esta região encefálica são majoritariamente a de formação de alguns tipos específicos de memória (SCOVILLE; MILNER, 1957; SQUIRE, 1992) e a função de modulação de estados afetivos como na ansiedade e no estresse (DE KLOET, 1999; MCEWEN, B S; SAPOLSKY, 1995).

De acordo com a teoria da memória declarativa (COHEN; SQUIRE, 1980), o hipocampo faz parte de um conjunto de estruturas que compõem o **sistema de memória do lobo temporal medial**, tendo como função principal o processo de consolidação de uma nova memória e, uma vez que este processo é completado, a memória passa a ser armazenada no neocórtex. Neste contexto, a função hipocampal é tempo-dependente, sendo importante para a aquisição e a consolidação da memória.

Já a teoria do **mapa cognitivo**, proposta por O'keefe e Nadel (1978), versa sobre a função de localização espacial do hipocampo. De acordo com essa teoria, as diferentes partes do hipocampo são responsáveis por diferentes aspectos da navegação espacial, como a posição da cabeça, o campo visual e a movimentação feita no ambiente, e a memória deste local está armazenada no próprio hipocampo. Ainda, em humanos, a função do hipocampo se estende à linguagem, sendo o hipocampo direito associado à localização espacial enquanto o hipocampo esquerdo incorpora a noção de tempo e as entidades de linguagem envolvidas na memória episódica (O'KEEFE; NADEL, 1979).

Gray e McNaughton (1982), por sua vez, propuseram a **teoria septo-hipocampal**, a qual propõe que o hipocampo possui função de modulação de estados de ansiedade e medo, compondo um sistema de inibição comportamental relacionado a respostas de punição e recompensa. Neste contexto, o hipocampo medeia situações de conflito através da manutenção do ritmo teta hipocampal, regulado pelas aferências colinérgicas vindas da região septal e serotoninérgicas vindas do tronco encefálico. Fármacos ansiolíticos são capazes de diminuir a atividade deste ritmo (GRAY; MCNAUGHTON, 1983), enquanto que o aumento do mesmo é observado em pacientes com epilepsia do lobo temporal (BABILONI *et al.*, 2009) e em respostas de medo (LESTING *et al.*, 2011) e ansiedade (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2010).

Outra função associada ao hipocampo é a de modulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), possuindo, portanto, importante função na modulação de **respostas ao estresse**. A hiperatividade do eixo HPA é evidenciada pelas concentrações aumentadas de cortisol no plasma de humanos (corticosterona em roedores), urina, líquido cefalorraquidiano; uma resposta exagerada do cortisol ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH); e um aumento das glândulas pituitária e

adrenal (MELLO, ANDREA FEIJO *et al.*, 2007) O hipocampo possui uma grande densidade de receptores para glicocorticoides (tanto do tipo mineralocorticoide – MR - quanto do tipo glicocorticoide – GR) que, quando ativados, inibem a atividade do eixo HPA via núcleo paraventricular do hipotálamo, limitando as respostas ao estresse (MCEWEN, BRUCE S; GRAY; NASCA, 2015).

O que parece explicar em parte as diferentes teorias para a função hipocampal é a sua organização anatômica, pois ele apresenta-se de forma longa e curvada, posicionado de maneira longitudinal – da região dorsal para a região ventral do roedor (equivalente ao eixo pôstero-anterior em humanos) – o que confere às suas sub-regiões diferentes conectividades com outras estruturas encefálicas (STRANGE *et al.*, 2014). Foi proposto pelo casal Moser em 1993, e confirmado em 1995 (MOSER, E; MOSER; ANDERSEN, 1993; MOSER, M B *et al.*, 1995), que a região dorsal do hipocampo estaria mais relacionada com memória espacial, visto que a lesão nesta região provocou intenso déficit de localização espacial. Já à região ventral do hipocampo é creditada a função de modulação de emoções e respostas ao estresse, por sua intensa conectividade com a amígdala e o hipotálamo (CANTERAS; SWANSON, 1992; FANSELOW; DONG, 2010).

1.4 Neurogênese hipocampal

Como explicado, existem diversas funções creditadas ao hipocampo, e talvez por esta razão seja difícil definir a função das novas células geradas neste local. Aparentemente, o fenômeno da neurogênese possui especial importância por implementar novas células a circuitos relacionados ao aprendizado e memória espacial, medo associativo e respostas comportamentais à ansiedade (BOTTERILL *et al.*, 2015)

A abordagem mais estudada é a de que a função da neurogênese hipocampal estaria relacionada ao aprendizado e memória, como visto anteriormente, e esta é uma importante região encefálica envolvida no processamento de memória (SCOVILLE; MILNER, 1957; SQUIRE, 1992). Elizabeth (GOULD *et al.*, 1999) demonstraram que animais submetidos a tarefas hipocampo-dependentes, como o condicionamento clássico de traço e o labirinto aquático de Morris com a plataforma submersa, apresentaram maior taxa de neurogênese quando comparados

aos animais que foram submetidos a tarefas de aprendizado que não dependem diretamente do hipocampo (condicionamento clássico de atraso e labirinto aquático de Morris com plataforma visível).

Além disso, a literatura mostra que o tratamento crônico com antidepressivos é capaz de aumentar o número de células em divisão no hipocampo, um indicativo de aumento de neurogênese (MALBERG, J E *et al.*, 2000; POSSAMAI *et al.*, 2015). Acredita-se que este fenômeno possa ser a explicação para o fato de que o efeito terapêutico dos antidepressivos ocorre somente com o tratamento crônico, embora seus efeitos farmacológicos de aumento da transmissão monoaminérgica sejam alcançados de maneira aguda (MALBERG, JESSICA E, 2004)

Outros fatores como o enriquecimento ambiental (CLEMENSEN; DENG; GAGE, 2015; DENG; GAGE, 2015) e os exercícios físicos (NOKIA *et al.*, 2016) também são capazes de aumentar a neurogênese hipocampal, estando este fenômeno associado aos benefícios cognitivos (melhora de memória espacial, maior resiliência ao estresse) adquiridos através destes fatores.

Por outro lado, existem situações que podem influenciar a neurogênese de maneira negativa, diminuindo a taxa de proliferação e a sobrevivência de novas células ou influenciando na maturação e na integração destas novas células ao circuito hipocampal. Neste sentido, existem diversas evidências na literatura sugerindo que o estresse é capaz de diminuir a neurogênese no hipocampo de ratos adultos (DRANOVSKY; HEN, 2006; LEVONE; CRYAN; O'LEARY, 2015; O'LEARY; CRYAN, 2014; SIMON; CZÉH; FUCHS, 2005)

Estudos utilizando modelos animais de epilepsia do lobo temporal demonstram que há aumento da neurogênese hipocampal em animais com crises recorrentes (PARENT *et al.*, 1997). Entretanto, os novos neurônios formados são incorretamente incorporados à circuitaria hipocampal, fenômeno este conhecido como **neurogênese ectópica** ou **neurogênese aberrante**. Em um estudo recente, (CHO *et al.*, 2015) demonstraram que a neurogênese aberrante contribui para as crises epiléticas, aumentando a frequência das mesmas, embora não seja exclusivamente necessária para que elas ocorram.

Outros estudos mostram que traumatismos cranianos e acidentes vasculares cerebrais também podem gerar aumento de **neurogênese**

aberrante após o evento, e a ela são creditados muitos dos danos cognitivos e o aparecimento de epilepsia, consequentes a estes eventos (KERNIE; PARENT, 2010).

1.5 Como avaliar a neurogênese hipocampal?

Recentemente, Cameron e Glover (CAMERON, HEATHER A; GLOVER, 2015) publicaram uma extensa revisão sobre as formas de se avaliar a função da neurogênese hipocampal, seja através de manipulações que inibem este fenômeno – como a utilização de agentes antitumorais, radiação e manipulação genética; ou através de manipulações que estimulem o mesmo – como o tratamento com fármacos antidepressivos, exercícios físicos e ambientes enriquecidos.

Cada etapa deste processo pode ser acompanhada através da avaliação da expressão de marcadores moleculares que identificam o tipo celular em questão, e a figura 5 traz alguns exemplos de marcadores para cada etapa. A zona subgranular do giro denteado, que fica entre a camada granular e o hilo hipocampal, é a região onde as novas células são geradas e migram de lá para a camada granular onde se diferenciarão em neurônio ou astrócito (CAMERON, H A *et al.*, 1993). As células progenitoras localizadas nesta região são denominadas células progenitoras do tipo 1 e, de acordo com o micro-ambiente local, essas células podem sofrer mitose, gerando células progenitoras do tipo 2. Estas últimas, por sua vez, podem gerar neuroblastos que possuem o potencial de se diferenciar em células granulares glutamatérgicas (MU; LEE; GAGE, 2010).

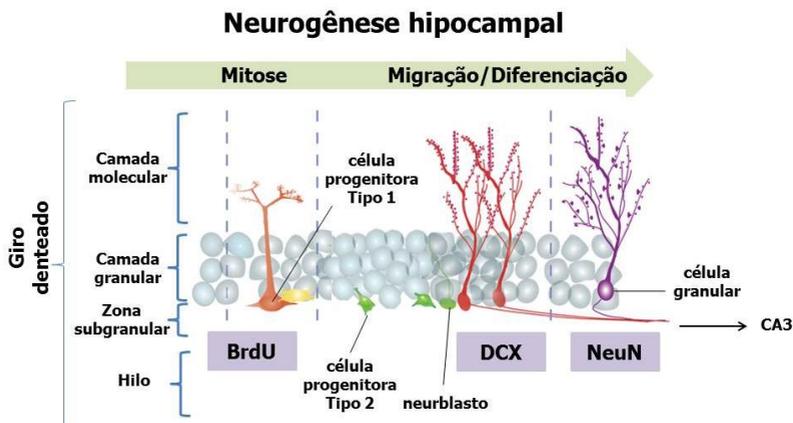


Figura 5 – Ilustração representando o processo de neurogênese no giro dentado do hipocampo e os possíveis marcadores moleculares para identificar cada etapa do processo – da proliferação através de mitose até migração e diferenciação. O principal marcador celular para células em proliferação é o BrdU, já células em processo de diferenciação e migração podem ser identificados pela expressão da proteína DCX e o neurônio maduro pode ser identificado pela expressão da proteína NeuN. Uma vez maduro, os dendritos do novo neurônio vão se integrar à circuitaria hipocampal, enviando suas projeções para a região CA3. Adaptado de(KHEIRBEK *et al.*, 2012)

O 5-bromodesoxiuridina (BrdU) é um nucleotídeo análogo da uridina que se incorpora ao DNA de células em divisão, ele é amplamente utilizado em estudos que visam avaliar a proliferação de células e, portanto, pode ser utilizado como um indicador de proliferação de células progenitoras do tipo 1 e do tipo 2 (GRATZNER, 1982). Já os neuroblastos são facilmente identificados através da expressão da proteína doublecortina (DCX), uma proteína de citoesqueleto que auxilia na formação de projeções dendríticas para a camada molecular, sendo importante para a diferenciação e migração do neuroblasto (GLEESON *et al.*, 1999). A célula granular madura, por sua vez, pode ser identificada através da expressão da proteína nuclear NeuN, um marcador de células pós-mitóticas neuronais que sinalizam a célula em atividade (MULLEN; BUCK; SMITH, 1992).

Existem diversos outros tipos de marcadores que são expressos por células em proliferação como o Ki67, MCM2 e PCNA, mas que apresentam a desvantagem de não permitirem a avaliação do destino

destas novas células, uma vez que, à medida que as mesmas amadurecem, elas deixam de expressar esses marcadores (SIERRA; ENCINAS; MALETIC-SAVATIC, 2011). Já para avaliar a identidade das novas células marcadores, como Nestina, GFAP, Vimentina, EGFR, Musashi, PSA-NCAM, NeuroD, NSE e β III tubulina, são utilizados para saber se a nova célula se diferenciou em neurônio ou em células da glia (SIERRA; ENCINAS; MALETIC-SAVATIC, 2011).

Estes marcadores moleculares são amplamente utilizados em estudos que avaliam os potenciais efeitos de fatores intrínsecos (genética, por exemplo) e extrínsecos (manipulações ambientais, farmacológicas, por exemplo) na taxa e na qualidade de neurogênese adulta, bem como para ajudar a elucidar suas funções no encéfalo adulto, conhecimento este ainda em construção que apresentaremos a seguir.

1.6 Regulação da neurogênese hipocampal adulta

A literatura mostra que existem diferentes fatores que podem regular a proliferação e sobrevivência de novos neurônios hipocampais no encéfalo adulto, podendo estes fatores serem intrínsecos ou extrínsecos (GOULD *et al.*, 2000).

Como um exemplo de fator intrínseco está o hormônio estrogênio. Foi observado que ratas adultas possuem uma maior taxa de proliferação de neurônios hipocampais em comparação aos ratos machos, mas esta diferença se restringe ao período em que há maior produção de estrógeno e a sobrevivência destas novas células depende do ambiente em que o animal está inserido (TANAPAT *et al.*, 1999). Outro hormônio que possui importante papel regulador da neurogênese é a corticosterona. Estudos com roedores demonstraram que o aumento da corticosterona plasmática diminui tanto a proliferação quanto a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo (GOULD *et al.*, 2000).

Neste contexto, o ambiente aparece como um dos principais fatores extrínsecos que regulam a neurogênese, podendo até mesmo influenciar nos fatores intrínsecos que regulam este fenômeno. A complexidade do ambiente parece ser um fator importante na taxa de proliferação e de sobrevivência dos novos neurônios, tendo sido mostrado que animais que vivem em cativeiro apresentam menor taxa de neurogênese do que aqueles que vivem na natureza (BARNEA; NOTTEBOHM, 1994). De

maneira semelhante, roedores de laboratório mantidos em ambiente enriquecido apresentam maior taxa de neurogênese do que aqueles mantidos sem nenhum enriquecimento (KEMPERMANN; WISKOTT; GAGE, 2004).

Mais recentemente, a literatura tem evidenciado outros fatores intrínsecos que regulam a neurogênese, como sistemas específicos de neurotransmissão, microRNAs e a composição da microbiota intestinal (FONTANA *et al.*, 2006; OGBONNAYA *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2010).

1.6.1 MicroRNAs e neurogênese

Nos últimos anos, uma nova classe de RNAs reguladores, os microRNAs, tem despertado interesse na comunidade científica por estarem diretamente envolvidos na regulação e coordenação da expressão gênica (SCOTT *et al.*, 2015). Mais de 60% da tradução dos RNA mensageiros humanos estão sob controle dos microRNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2009). Assim como outros mecanismos pós-transcricionais e epigenéticos, os microRNAs podem agir como uma interface entre os genes e o ambiente (SCOTT *et al.*, 2015).

Os microRNAs são moléculas de RNA não-codificantes formadas de 20 a 22 nucleotídeos que regulam a expressão gênica através da ligação à extremidade 3' de RNA mensageiros não traduzidos (LANG; SHI, 2012). Como consequência desta ligação, o RNA mensageiro pode sofrer degradação ou inibição da sua tradução por ribossomos, impedindo a expressão da proteína codificada por tal RNA mensageiro (LANG; SHI, 2012).

Por se tratar de um processo celular, a neurogênese também sofre regulação de miRNAs e evidências da literatura confirmam essa relação. E a deleção dos genes *Dicer* ou *Argonaute*, peças chave na formação dos microRNAs, provoca perda de populações de células progenitoras (BERNSTEIN *et al.*, 2003).

Um dos mecanismos propostos para a atuação dos microRNAs é através da interação com os receptores nucleares TRX, importante família de receptores que regula a expressão de diversos genes envolvidos em processos biológicos, incluindo a diferenciação celular (EVANS, 2005). Esse receptor nuclear regula a expressão de genes que controlam a proliferação e a diferenciação celular (SHI *et al.*, 2004, 2010; ZHAO *et al.*, 2009). Sendo assim, um *loop* de regulação se forma

entre os microRNAs, os receptores nucleares e os genes que regulam o ciclo celular (SHI *et al.*, 2010).

1.6.2 Composição da microbiota intestinal e neurogênese

Recentemente, a literatura tem demonstrado que existe um eixo bidirecional de comunicação entre o intestino e o encéfalo e que essa interação, via rotas neuronais, hormonais e imunológicas, apresenta um importante papel na manutenção da homeostase (CRYAN; DINAN, 2012). Boa parte dos estudos sobre esta interação é focado na regulação central da saciedade e a sua relação com a obesidade e o diabetes (PATTERSON *et al.*, 2016). Outra parte importante aborda doenças do trato gastrointestinal, como a síndrome do cólon irritável e, comum a estes transtornos estão algumas alterações comportamentais, como a ansiedade e a depressão (MOLONEY *et al.*, 2016).

Sabe-se hoje, através destas evidências, que muitos transtornos do humor e outras psicopatologias também estão associados a esta comunicação entre o encéfalo e o intestino, principalmente através da modulação feita pela composição da microbiota intestinal no comportamento (ADDOLORATO *et al.*, 1997; CRYAN; DINAN, 2012). Neste sentido, a microbiota intestinal é composta por diferentes microorganismos, desde fungos, vírus e *Archea* até diferentes filós de bactérias, sendo estes últimos os mais abundantes na microbiota intestinal (CRUMEYROLLE-ARIAS *et al.*, 2014; DESBONNET *et al.*, 2015; DIAZ HEIJTZ *et al.*, 2011).

Os estudos mais recentes desta área têm demonstrado que o eixo encéfalo-intestino exerce importante influência no desenvolvimento do sistema nervoso central e na modulação de comportamentos complexos (O'MAHONY *et al.*, 2015). Foi demonstrado que a composição da microbiota parece ser um fator regulador importante na taxa de neurogênese, visto que animais *germ free*, que nasceram e se desenvolveram totalmente livres de qualquer microorganismo, apresentam uma maior taxa de neurogênese, principalmente no hipocampo dorsal. A recolonização do intestino destes animais com a microbiota de animais normais logo após o desmame não reverteu estes efeitos na neurogênese adulta, demonstrando que essa comunicação é importante logo no início da vida, durante o desenvolvimento pós-natal (OGBONNAYA *et al.*, 2015).

Em outra pesquisa constatou-se que o tratamento com probióticos contendo as bactérias *Lactobacillus helveticus* e *Bifidobacterium longum* preveniu o déficit de neurogênese causado pela exposição ao estresse (AIT-BELGNAOUI *et al.*, 2014). Em conjunto, estes trabalhos mostram evidências de que pode haver modulação do processo de neurogênese pela microbiota intestinal, embora os mecanismos pelos quais esta modulação ocorre ainda não tenham sido elucidados.

1.6.3 Controle colinérgico da neurogênese

Como visto anteriormente, a via fimbria-fórnix (FF) é a principal via de aferências que o hipocampo recebe da área septal, sendo modulada principalmente pela acetilcolina. O bloqueio dessas aferências colinérgicas pela transecção da FF (FONTANA *et al.*, 2006), pelo tratamento excitotóxico com NMDA na área septal medial (VAN DER BORGHT *et al.*, 2005) ou pela lesão do prosencéfalo basal (COOPER-KUHN; WINKLER; KUHN, 2004) diminui a neurogênese no giro denteado do hipocampo. Corroborando com essas evidências, estudos mais antigos demonstraram que a ruptura da FF (ALVAREZ-PELAEZ, 1973; OKAICHI; OKAICHI, 1994), bem como lesões na área septal medial (OLTON, 1977) provocam prejuízos em diferentes tipos de memória.

Além disso, a transecção da FF reduz a expressão do RNA mensageiro de dois fatores intrínsecos que regulam a neurogênese: o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento neuronal (NGF)(DA PENHA BERZAGHI *et al.*, 1993). Neste mesmo estudo, os autores indicaram que o tratamento com pilocarpina, um agonista muscarínico, aumentou a expressão de BDNF e NGF; e que o pré-tratamento com escopolamina, um antagonista muscarínico, ou com o MK-801, um antagonista glutamatérgico, bloquearam este efeito, sugerindo que o sistema colinérgico exerce esse efeito sobre a neurogênese de maneira dependente de glutamato. Estudos prévios mostram que receptores muscarínicos e receptores NMDA estão colocalizados no hipocampo e a ativação de receptores muscarínicos do tipo M1 em neurônios piramidais do hipocampo potencia a transmissão excitatória de receptores NMDA (GRISHIN; BENQUET; GERBER, 2005), fato este que reforça esta relação.

Ainda neste sentido, o tratamento com agonistas muscarínicos como betanecol, a oxotremorina e a pilocarpina aumenta a proliferação de

células hipocampais (MA *et al.*, 2000; VEENA *et al.*, 2011) e a ativação da subunidade $\alpha 7$ de receptores nicotínicos também aumenta a neurogênese na zona subgranular do hipocampo (NARLA *et al.*, 2013).

Entretanto, apesar de todas as evidências, os mecanismos pelos quais o sistema colinérgico exerce sua influência sobre a neurogênese ainda não está elucidado (ASRICAN *et al.*, 2016).

1.7 O modelo da indução de comportamentos de esquiva induzido pela pilocarpina

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com a proposta de um modelo animal caracterizado pela exacerbação do comportamento de esquiva em ratos Wistar induzida por uma única injeção do agonista muscarínico pilocarpina (DUARTE, FILIPE S *et al.*, 2013; DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010; HOELLER, ALEXANDRE A *et al.*, 2016; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013). As sequelas deste tratamento são duradouras e seus efeitos comportamentais são observáveis a partir de 24 h até 3 meses após o tratamento (DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a dose utilizada provoca alterações no ritmo teta hipocampal típicas de respostas de ansiedade e medo (ADHIKARI; TOPIWALA; GORDON, 2010; LESTING *et al.*, 2011), com aumento da frequência de disparo. Entretanto, este aumento não é suficiente para deflagar descargas de grande amplitude características de atividade epileptogênica, demonstrando que este efeito no ritmo teta hipocampal é independente de atividade epiléptica (HOELLER, A A *et al.*, 2013).

Além disso, esses animais apresentam um aumento das concentrações plasmáticas de corticosterona e de ACTH 24 h após o tratamento, e a alteração nos níveis de corticosterona perdura por até 1 mês. Estas alterações hormonais são acompanhadas da redução da expressão de receptores glicocorticoides (GR) e de receptores NMDA no hipocampo tanto 24 h quanto 30 dias após o tratamento, evidenciando a perturbação no eixo HPA e a relação destas alterações com o sistema glutamatérgico (HOELLER, ALEXANDRE A *et al.*, 2016). Corroborando com estes dados, no mesmo trabalho foi demonstrado que o pré-tratamento com memantina, um antagonista NMDA, preveniu os efeitos comportamentais causados pela pilocarpina.

Sobre os eventos que ocorrem após o tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina, baseados nos achados do nosso grupo (DUARTE, FILIPE S *et al.*, 2013; DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010, 2014; HOELLER, ALEXANDRE A *et al.*, 2016; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013) e da literatura, sugerimos que a ativação de receptores muscarínicos no hipocampo (principalmente do tipo M1, correspondente a 60% dos receptores muscarínicos locais - (DASARI; GULLEDGE, 2011) levaria à dessensibilização dos receptores NMDA co-localizados e, como consequência disto, haveria a diminuição do papel inibitório do hipocampo sobre o eixo HPA. A hiperatividade do eixo HPA, caracterizada pelo aumento da liberação de corticosterona e ACTH poderia, por sua vez, ser responsável pelo aumento dos comportamentos de esquiva apresentado pelos animais.

2 Justificativa

Apesar da complexidade do sistema colinérgico, tem sido possível associar sua participação na modulação de respostas relacionadas à memória, atenção, emoções e a alteração da sua transmissão pode estar associada a transtornos do sistema nervoso central como a epilepsia, a doença de Alzheimer, a ansiedade e a depressão. Diante dessas evidências, considerou-se importante ampliar o estudo das consequências do tratamento único com pilocarpina relacionando as mesmas entre si a fim de se obter a validação deste método como um modelo animal de estudo da relação entre o estresse, a depressão e a ansiedade e seus tratamentos.

3 Hipótese

Nossa hipótese é de que as consequências geradas pelo tratamento com pilocarpina no hipocampo levem a uma alteração da circuitaria local através da perturbação do mecanismo de neurogênese via mecanismos pós-transcricionais, impedindo o funcionamento adequado do hipocampo na modulação do eixo HPA trazendo como consequência as alterações comportamentais e neuroendócrinas observadas após o tratamento único com uma dose subconvulsivante e ansiogênica de pilocarpina.

4 Objetivos

4.1 Gerais

Investigar se a administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina, um agonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos, promove alterações comportamentais típicas da exposição ao estresse em ratos Wistar machos adultos e propor um mecanismo de ação pelo qual essas alterações acontecem.

4.2 Específicos

- 1- Investigar o efeito agudo e tardio da administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina no comportamento de ratos expostos ao estímulo de estresse incontrolável; Experimento realizado na Universidade Federal de Santa Catarina.
- 2- Estudar o efeito agudo e tardio da administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina no comportamento de ratos expostos ao estímulo apetitivo; Experimento realizado na Universidade Federal de Santa Catarina.
- 3- Avaliar se a administração de dose subconvulsivante de pilocarpina altera a neurogênese no hipocampo; Experimento realizado na University College Cork.
- 4- Verificar se a administração de dose subconvulsivante de pilocarpina altera o padrão de ativação neuronal no hipocampo dorsal e ventral; Experimento realizado na University College Cork.
- 5- Investigar o efeito do tratamento com pilocarpina em comportamentos dependentes de neurogênese hipocampal; Experimento realizado na Universidade Federal de Santa Catarina.
- 6- Avaliar se as consequências do tratamento com pilocarpina estão relacionadas a mecanismos pós-transcricionais através da modulação por microRNAs; Experimento realizado na University College Cork.
- 7- Verificar se a administração de doses subconvulsivantes de pilocarpina afeta a expressão de proteínas chave na via de regulação da neurogênese; Experimento realizado na Universidade Federal de Santa Catarina
- 8- Estudar se as consequências do tratamento com pilocarpina se estendem à alteração da composição da microbiota intestinal. Experimento realizado na University College Cork.

5 Material e Métodos

Os procedimentos experimentais realizados na Universidade Federal de Santa Catarina foram de acordo com normas internacionais de cuidado e bem-estar animal recomendadas pela Sociedade Brasileira de Ciência Animal (SBCAL) e aprovados pelo Comitê de Ética Sobre o Uso de Animais da mesma instituição (CEUA – Projeto PP00798). Já os experimentos realizados na University College Cork na Irlanda foram aprovados pelo *Health Products Regulatory Agency* (HPRA – AE19130/I220; 7024308). Nas duas instituições utilizamos o número mínimo e suficiente de animais para as análises estatísticas, de forma a permitir a extração do máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos.

5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com idade entre 2 e 3 meses oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina ou do Laboratório Harlan (Reino Unido). Todos os animais foram alojados em grupos de, no máximo, 5 congêneres por caixa plástica padrão (dimensões de 33 cm x 40 cm x 18 cm) e mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$); ciclo claro/escuro 12/12 h, com luzes se acendendo às 07:00 h) e acesso *ad libitum* à água e ração; já os animais utilizados na *University College Cork* foram alojados em caixa (38 cm x 25cm x 20 cm) com enriquecimento ambiental padrão europeu (um rolo de papelão e papel picados para ninho). Os experimentos foram executados sempre no período claro do dia, entre 11:00 e 18:00 h.

5.2 Fármacos e tratamento

Os animais avaliados nesse estudo receberam metil-escopolamina 30 min antes do tratamento com pilocarpina, ou solução salina no caso dos animais controle, salina para bloquear os efeitos colinomiméticos periféricos. As doses e as vias de administração utilizadas estão especificadas para cada fármaco e foram selecionadas de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa (HOELLER, 2016). Já a dose de BrDu foi escolhida de acordo com a literatura (SU *et al.*, 2009).

- Hidrocloro de pilocarpina (agonista muscarínico não-seletivo) – Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA; P6503. Injetada via intraperitoneal (i.p) na dose de 150 mg/kg.
- Brometo de metil-escopolamina (antagonista muscarínico que não cruza a barreira hemato-encefálica) – RBI, EUA; S8502. Injetada via subcutânea (s.c.) na dose de 1 mg/kg.
- 5-bromodesoxiuridina (BrdU, 150mg/kg, i.p.; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA; B5002).
- Pentobarbital sódico (barbitúrico anestésico) – Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA, P3761. Injetado via i.p. na dose de 40mg/kg para induzir anestesia.
- Solução salina (NaCl) 0,9%

5.3 Testes comportamentais

5.3.1 Teste do Nado Forçado Repetido (TNF – r)

O teste do nado forçado original (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; PORSOLT *et al.*, 1978) consiste em colocar o animal em um tanque cilíndrico (20 cm x 40 cm) contendo água limpa à 25°C com água suficiente para o animal nadar sem apoiar as patas no fundo, em duas ocasiões separadas por 24 h (pré-teste e teste). Durante o período de teste (5 min) foi medido o tempo que o animal gasta na postura de imobilidade, que é o indicador da aquisição do “desespero comportamental”, comportamento relacionado a estados depressivos (PORSOLT; LE PICHON; JALFRE, 1977; PORSOLT *et al.*, 1978). Fármacos antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais na sessão de teste (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; PORSOLT *et al.*, 1978). Entretanto, os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) não são efetivos neste protocolo (PORSOLT *et al.*, 1978), sendo considerados resultados “falso negativos”. Já com o TNF-r em ratos - uma adaptação ao protocolo original proposto por Porsolt – permite avaliar o comportamento dos ratos submetidos ao estresse inescapável em várias ocasiões ao longo do tempo. Utilizamos o protocolo semelhante ao de (MEZADRI *et al.*, 2011) que consiste de uma primeira sessão de nado forçado de 15 min, chamada de pré-teste, seguida da sessão teste 24 h após. A sessão teste foi repetida, nos mesmos animais, aos 7 e 14 dias após o pré-teste sendo chamadas de reteste 1 e reteste 2 (MEZADRI *et al.*, 2011). Este protocolo parece ser mais sensível para a análise de

comportamentos de “desespero comportamental”, utilizando um número menor de animais que os testes originais, visto que com o mesmo foi possível avaliar os efeitos do tratamento a curto, médio e longo prazo com doses baixas de fluoxetina (ISRS) em um mesmo grupo de animais experimentais e no seu respectivo grupo controle (MEZADRI *et al.*, 2011).

Após o término do teste, cada animal foi seco com uma toalha e mantido por, pelo menos, 15 min sob uma lâmpada de 40W para evitar hipotermia. A cada animal a água do cilindro foi substituída por água limpa. Todas as sessões do teste foram gravadas por uma câmera posicionada a 20 cm da borda do cilindro para que os registros fossem analisados posteriormente de maneira cega. Foram registrados os parâmetros latência, tempo e frequência dos seguintes comportamentos: 1- imobilidade: ausência de movimentos bruscos, onde o animal pode apresentar somente movimentos mínimos necessários para manter a cabeça acima da água, ou permanecer boiando sobre a água, 2- nado: movimentos horizontais do animal pelo tanque, normalmente fazendo uma trajetória circular, movimentando as 4 patas, 3- escalada: movimento vertical do animal, geralmente apoiando-se nas paredes do tanque, fazendo movimentos como se fosse escalar as mesmas.

5.3.2 Teste da Preferência à Sacarose

Esse teste consiste de um paradigma de escolha entre duas garrafas uma de água e uma de sacarose. Este paradigma tem sido usado extensivamente para avaliar os efeitos da anedonia induzida por estresse (MUSCAT; PAPP; WILLNER, 1992; PAPP; WILLNER; MUSCAT, 1991). Os ratos foram isolados e habituados (24 h de habituação) a beber água de duas garrafas. Após a fase de adaptação a água de uma das garrafas foi substituída por uma solução de sacarose a 0,8%, conforme descrito previamente (SLATTERY; MARKOU; CRYAN, 2007) e 24 h depois as garrafas foram invertidas de sua posição inicial de forma a evitar vieses relacionados à posição das garrafas. A preferência para a sacarose sobre a água (ou seja, a ingestão de sacarose dividida pela soma do total de água acrescida de consumo de sacarose: $[\text{sacarose}/(\text{sacarose}+\text{água})]$) foi utilizada como uma medida relacionada à anedonia.

5.3.3 Teste da Exposição aos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado

O teste da exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado foi sugerido por (SALOMÉ *et al.*, 2004) como uma forma de indução ao estresse para avaliar parâmetros relacionados a respostas biológicas como a expressão da proteína FOS. Neste teste os animais foram colocados em um dos braços abertos do labirinto e o acesso aos braços fechado foi bloqueado por uma barreira da mesma altura que os braços fechados, impedindo o acesso e a visualização dos mesmos. Cada animal permaneceu no braço aberto pelo período de 5 min e uma linha traçada no vídeo separou o braço aberto em duas metades: proximal (metade próxima à barreira que impede o acesso aos braços fechados) e distal (extremidade dos braços abertos, considerada mais aversiva). Durante esse período de tempo foram avaliados o tempo de permanência em cada uma das regiões, bem como a quantidade de mergulhos de cabeça e levantamentos na barreira.

5.3.4 Teste do Medo Condicionado

O paradigma do medo condicionado foi realizado de acordo com o protocolo utilizado por Gazarini e colaboradores (2013) e consistiu em uma sessão de familiarização na caixa utilizada para o teste (35 x 20 x 30 cm). Nesta sessão os animais foram colocados na caixa e lá permaneceram por 3 min para que a caixa se tornasse familiar aos animais. Vinte e quatro horas depois houve a sessão de treinamento na mesma caixa, a qual consistiu em submeter os animais a mesma caixa por 1 min e, após esse primeiro minuto, os animais receberam um choque nas patas durante 3s na intensidade de 0,7mA. Logo após o choque os animais permaneceram na caixa para que houvesse o pareamento do estímulo neutro (ambiente) com o estímulo aversivo (choque nas patas). No dia seguinte (terceiro dia do protocolo), os animais foram submetidos somente ao contexto (teste A) para avaliação da memória aversiva ao contexto após o pareamento. O quarto dia do protocolo consistiu na exposição dos animais a uma caixa (30 x 30 x 30 cm), diferente contexto em que eles levaram o choque nas patas, chamado teste B, e avalia se houve generalização do medo. Esse tipo de treinamento é considerado um treinamento fraco, que possibilita avaliar se a droga testada pode causar o aumento da valência negativa do estímulo aversivo por fortalecimento da memória aversiva (GAZARINI *et al.*, 2013).

5.3.5 Teste da Alimentação Suprimida pela Novidade

Utilizamos uma versão modificada do teste da alimentação induzida pela novidade apresentada por (MERALI; LEVAC; ANISMAN, 2003), a qual prevê que animais sejam apresentados a 10g de um alimento apetitoso (*Frootloops* da Kellogg's®) 48 ou 24 h antes do teste em suas caixas-moradia. No dia do teste os animais foram submetidos ao teste do campo aberto clássico, com iluminação de luz vermelha indireta (MERALI; LEVAC; ANISMAN, 2003). Os animais foram colocados em uma das esquinas da arena do campo aberto e no quadrante central deste aparato uma porção de 8 *pellets* de *Frootloops* foi apresentada aos animais. Durante um período de 5 min foi observado o tempo de latência de aproximação ao quadrante central, o tempo de alimentação neste quadrante e a quantidade de *pellets* consumidos. Esta versão do teste apresenta uma vantagem em relação às versões clássicas (para revisão, consultar (DULAWA; HEN, 2005) por não envolver privação de alimento nos animais. A literatura mostra que a aversividade do quadrante central não diminui com a presença do alimento, o que faz com que haja uma inibição da alimentação mesmo que o alimento possua valência positiva para os animais (DULAWA; HEN, 2005; SAMUELS *et al.*, 2011). Imediatamente após o teste, outra porção do alimento foi apresentada aos animais para verificar a motivação pelo alimento na ausência do estímulo aversivo.

5.4 Imunohistoquímica e Imunofluorescência

De acordo com a metodologia padronizada por (GIBNEY *et al.*, 2010), primeiramente os animais foram eutanasiados por dessangramento (perfusão intracardíaca com solução salina e fixação com solução de formaldeído 4%) sob anestesia (pentobarbital 40mg/kg i.p.). Após a perfusão, os cérebros dos animais foram retirados da calota craniana e imersos em paraformaldeído 4% por 24 h, em sacarose 30% por uma semana e, em seguida, os blocos de cérebro foram congelados rapidamente em gelo seco e fatiados no criostato modelo CM1850 (Leica Microsystems Inc., USA) em fatias de 40 micrômetros, colocadas em uma placa de cultura de células com solução anticongelante em séries de 8. As fatias foram ensaiadas pelo método de *free-floating* tanto para a imunohistoquímica colorimétrica quanto para a imunofluorescência. Todos os anticorpos primários são disponíveis comercialmente. A detecção colorimétrica foi feita pelo sistema ABC peroxidase (Vectastain® Elite). Para a imunofluorescência, os

anticorpos secundários foram conjugados com Alexa Flúor 488 ou Alexa Flúor 546 (MENEGHELLI *et al.*, 2009). O número total de células foi dado pelo corante fluorescente DAPI (marcador nuclear) ou pelo DAB (diaminobenzidina), como substrato da peroxidase. As secções foram analisadas por microscopia confocal (imunofluorescência) ou microscopia óptica (imunohistoquímica). Foram contadas as células marcadas no hipocampo dorsal e ventral de 3 fatias de cada região bilateralmente por animal.

5.4.1 Marcação para C-fos

Para a avaliação da expressão da proteína Fos, as secções foram incubadas com anticorpo primário policlonal coelho anti-*c-fos* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-253) na diluição de 1:5000. A seguir, foram incubadas com o anticorpo secundário presente no *kit* de revelação colorimétrica ABC (Vecstastain® Elite). As células positivas para FOS foram contadas no *software* ImageJ® por unidade de área na região do giro denteado.

5.4.2 Marcação para NeuN/BrdU

Para a avaliação da expressão de NeuN e BrdU, primeiramente as secções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal rato anti-BrdU (Abcam, Cambridge, MA, EUA, #ab6326) na diluição 1:100 e, então, incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 cabra anti-rato (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA, A-21209) na diluição de 1:500. Após lavagem, as mesmas secções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal camundongo anti-NeuN (Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha, MAB377) na diluição de 1:100 e, logo após, incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor® 594 cabra anti-camundongo (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, A11062) na diluição de 1:500. Neurônios BrdU positivos foram contados em todas as secções e o total foi multiplicado por 8 para obter uma estimativa do número total no hipocampo dorsal e ventral.

5.5 Extração de microRNA

O RNA total hipocampal foi isolado utilizando o *kit* de isolamento de miRvana, miRNA de acordo com as instruções do fabricante (Ambion, EUA). O tecido foi homogeneizado utilizando uma solução de lise desnaturante fornecida pelo *kit*. O lisado foi em seguida extraído utilizando fenol-clorofórmio; o próximo passo utilizou etanol

adicionado à solução e, logo a seguir, a solução foi filtrada sobre um filtro de fibra de vidro que reteve todo o RNA. O filtro foi então lavado e, finalmente, o RNA foi eluído usando uma solução de baixa força iônica também fornecida pelo *kit*. O RNA isolado foi armazenado a -80°C até processamento posterior. A concentração de RNA foi quantificada utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop®, Thermo Scientific, EUA).

5.6 Reação em cadeia da polimerase

Para a avaliação da expressão de microRNAs, 2 μL de RNA total foi submetido à reação em cadeia da polimerase dando um volume final de 10 μL utilizando o *kit* de síntese de cDNA miRCURY LNATM Universal microRNA RealTime PCR e o *kit* de síntese de cDNA (Exiqon, Dinamarca), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi diluído 100 vezes e submetido ao ensaio de PCR quantitativo em tempo real qRT-PCR em duplicatas em reações de 10 μL na placa especialmente desenhada para este ensaio contendo *primers* de 41 microRNAs selecionados de acordo com a literatura (miRCURY LNATM pick - & - painel microRNA mistura de PCR (Exiqon, Dinamarca). Os genes de referência utilizados foram RNU1A1, RNU5G, U6 snRNA. A amplificação foi feita usando o LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Suíça) em placa de 384 poços. A determinação dos limiares de ciclo foi feita usando o *software* Roche LC®.

5.7 Extração de DNA das amostras de ceco

O DNA foi extraído a partir de 0,25 g de conteúdo cecal utilizando uma combinação da técnica de *bead-beating* com o *kit* QIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®). O DNA foi preparado para sequenciamento utilizando o Nextera XT Index Kit (Illumina, San Diego, CA, EUA) e sequenciado pelo Illumina MiSeq v2 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

5.8 Western blotting

Foi feita a extração de proteínas totais de amostras de hipocampus após o tratamento com pilocarpina e seus respectivos controles. As amostras previamente preparadas, contendo a mesma concentração de proteína (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), foram misturadas ao tampão de amostra 5 vezes

concentrado (Tris-HCl 150 mM (pH 6,8), β -mercaptoetanol 15%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%, azul de bromofenol 0,3%, glicerol 25%) e fervidas por 5 min à 100 °C. Quantidades iguais de proteínas para cada amostra (15 μ g ou 30 μ g) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS (8-12%). Após a transferência, as membranas foram saturadas em solução de TBS-T contendo leite desnatado (5%) por, no mínimo, 1 h à temperatura ambiente. Após a lavagem em TBS-T (4 vezes), as membranas foram incubadas em tempo e condições apropriadas para o anticorpo primário de cada proteína avaliada: policlonal coelho anti-BDNF (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-546), policlonal camundongo anti-GSK3 β (1:1000, Bioss, Woburn, MA, EUA, bs-0028M), coelho anti-p38 MAPK (1:1000; Bioss, Woburn, MA, EUA, bs-50503R), coelho anti-ERK1/ERK2 (1:1000, Bioss, Woburn, MA, EUA, bs-0022R). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas em TBS-T (4 vezes) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase: cabra anti-camundongo-HRP (bs-0296G-HRP) e jumento anti-coelho-HRP (bs-0297D-HRP) ambos na concentração de 1:10.000 da empresa Bioss (Woburn, MA, EUA) durante 2 h à temperatura ambiente. Os imuno-complexos foram visualizados usando sistema de detecção de substrato quimioluminescente, *SuperSignal West Femto* (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, EUA) e revelados no sistema de fotodocumentação ChemiDocTMXRS (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA), segundo recomendações do fabricante. Os valores densitométricos foram normalizados utilizando como controle as bandas imunorreativas contra o anticorpo anti- β -actina. Os níveis de proteína foram quantificados por densidade óptica utilizando o programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os valores expressos como unidades arbitrárias em relação à β -actina.

5.9 Desenho Experimental

Primeira Etapa: Caracterização comportamental dos animais tratados com dose ansiogênica de pilocarpina submetidos ao teste do Nado Forçado Repetido e ao teste do Consumo de Sacarose.

Experimentos da Fase aguda: Os animais (n=10) foram primeiramente submetidos à sessão de pré-teste, 5 min após a sessão foram tratados

com metil-escopolamina e, 30 min após este tratamento, os animais foram tratados com 150 mg/kg de pilocarpina i.p. ou com solução salina (controle). Vinte e quatro horas após a preparação, os animais tratados e seus controles foram submetidos ao pré-teste do TNF-repetido (MEZADRI *et al.*, 2011). A primeira sessão de teste do TNF repetido foi realizada 24 h após o pré-teste. O reteste 1 e o reteste 2 ocorreram 7 e 14 dias após o pré-teste, respectivamente.

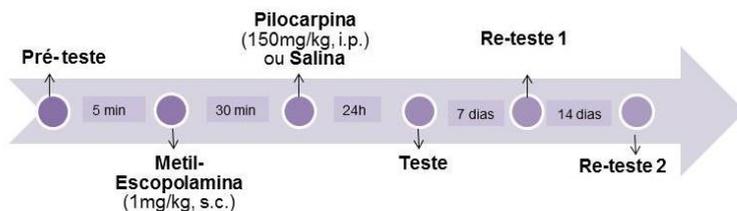


Figura 6: Esquema do experimento 1 da etapa 1, fase aguda.

Outro grupo de animais ($n=10$) foi submetido ao teste de Preferência à Sacarose (MERALI; LEVAC; ANISMAN, 2003) de maneira tal que, 1 h após o tratamento com pilocarpina, os animais foram isolados em caixas individuais e duas garrafas iguais contendo água foram oferecidas aos animais. No dia seguinte, uma das garrafas foi trocada por uma solução de sacarose 0,8% e 24 h após a ordem das garrafas foi trocada. Ao término deste protocolo, os animais foram reagrupados para futura análise da fase tardia pós-pilocarpina.

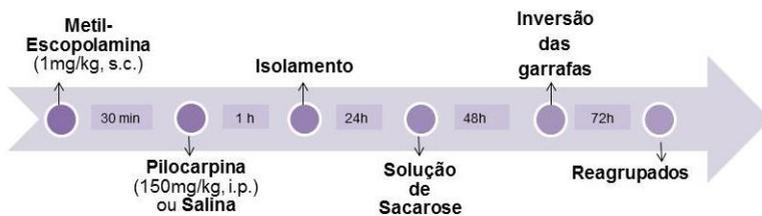


Figura 7: Esquema do experimento 2 da etapa 1, fase aguda.

Experimentos da Fase tardia: Trinta dias após a preparação, um grupo independente de animais ($n=10$) tratados com pilocarpina e seus controles foram submetidos ao pré-teste do TNF-repetido. A primeira sessão de teste do TNF repetido foi realizada 24 h após o pré-teste. O reteste 1 e o reteste 2 ocorreram 7 e 14 dias após o pré-teste, respectivamente.

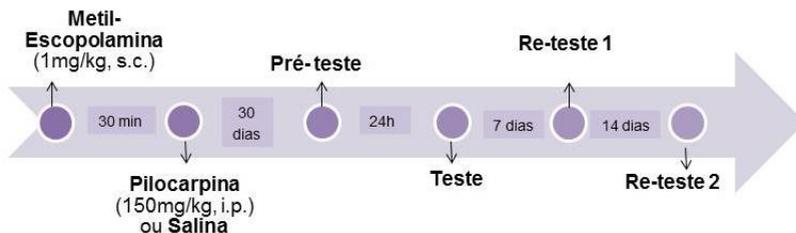


Figura 8: Esquema do experimento 3 da etapa 1, fase tardia.

O grupo de animais submetidos ao protocolo da preferência à sacarose foi novamente submetido ao mesmo protocolo 30 dias após o tratamento com pilocarpina.

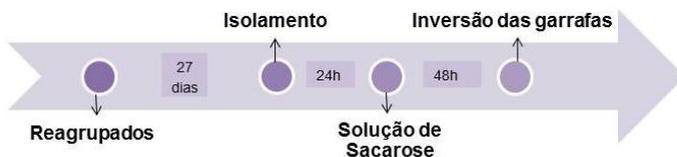


Figura 9: Esquema do experimento 4 da etapa 1, fase tardia.

Segunda etapa: Nesta segunda etapa foram investigadas as consequências de longo prazo do tratamento com pilocarpina, e, a partir deste momento, todos os experimentos e avaliações foram realizados na fase tardia após o tratamento para verificar as alterações bioquímicas e estruturais presentes nos animais 30 dias após o tratamento com pilocarpina.

Experimento 1: Para isso, um mesmo grupo de animais foi tratado dois dias consecutivos com uma injeção intraperitoneal de BrDU (150 mg/kg i.p.), no terceiro dia os animais receberam uma injeção de metil-escopolamina (1mg/kg s.c.), e 30 min após foram tratados com pilocarpina (150 mg/kg i.p.). Os grupos controle foram tratados com metil-escopolamina seguida de uma injeção de salina. Após 30 dias, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6): controle sem estresse e controle + estresse, pilocarpina sem estresse e pilocarpina + estresse. Os animais dos grupos sem estresse foram sacrificados aos 30 dias e utilizados para avaliação de neurogênese, assim como controle da expressão da proteína FOS, e os animais dos grupos com estresse foram submetidos ao protocolo de exposição forçada aos braços abertos do labirinto em cruz elevado (SALOMÉ *et al.*, 2004) como estímulo estressante para avaliação da expressão da proteína FOS.

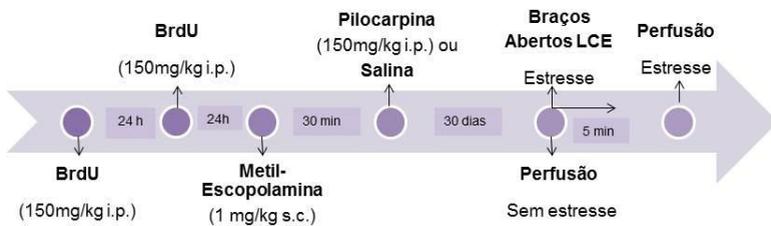


Figura 10: Esquema do experimento 1 da etapa 2, fase tardia.

Experimentos 3 e 4: Como foi identificado o aumento de neurogênese nos animais tratados com pilocarpina, decidiu-se submetê-los a diferentes testes comportamentais que envolvessem tarefas hipocampo-dependentes, ou seja, verificamos se esse aumento na neurogênese refletiria alteração comportamental em tarefas sensíveis a este fenômeno. Para isso, grupos independentes de animais foram tratados com metil-escopolamina (1mg/kg s.c.), 30 min após com pilocarpina (150 mg/kg i.p.) e, passados os 30 dias da fase tardia, os animais foram submetidos ao teste da Alimentação Suprimida pela Novidade (MERALI; LEVAC; ANISMAN, 2003) ou ao teste do Medo Condicionado (BALLESTEROS *et al.*, 2014).

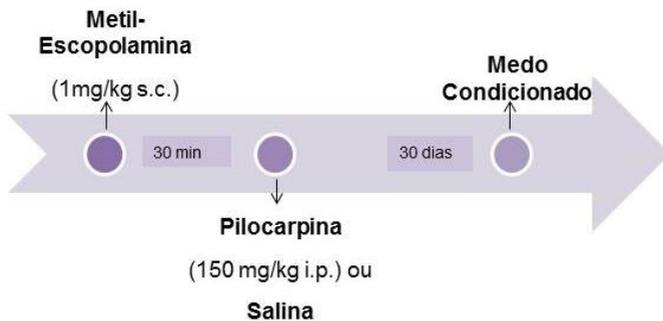


Figura 11: Esquema do experimento 3 da etapa 2, fase tardia.

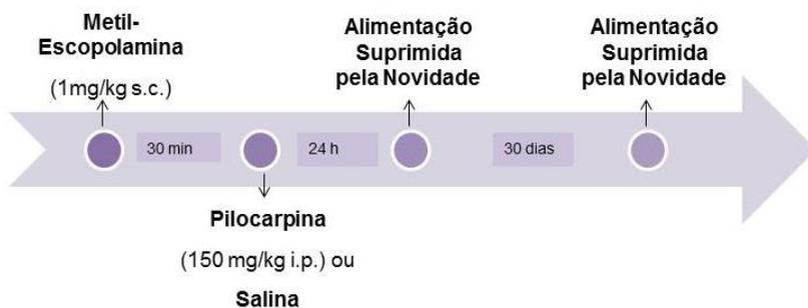


Figura 12: Esquema do experimento 4 da etapa 2, fase tardia.

Terceira Etapa: O fato do tratamento único com pilocarpina causar alteração estrutural no hipocampo destes animais de maneira duradoura levou à investigação do possível envolvimento de mecanismos pós-transcricionais mediando essa alteração fenotípica.

Experimento 1: Para avaliar este envolvimento, um grupo independente de animais foi tratado com metil-escopolamina (1mg/kg s.c.) e 30 min após com pilocarpina (150 mg/kg i.p.). Após 30 dias, os animais foram sacrificados e seus hipocampus foram retirados para posterior avaliação da expressão de microRNAs e os cecos dos mesmos foram retirados para avaliação da microbiota intestinal.

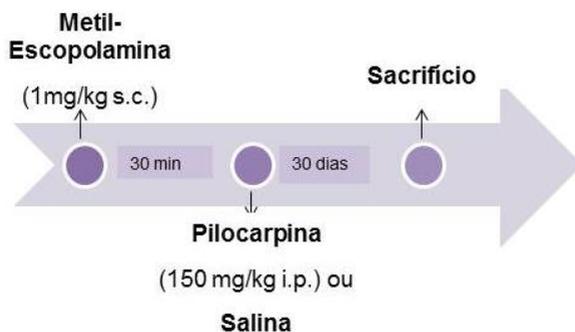


Figura 13: Esquema do experimento 1 da etapa 3, fase tardia.

Experimento 2: Para avaliar se as alterações de microRNA refletiam também uma alteração da expressão de proteínas da via das neurotrofinas (figura 15), um grupo independente de animais foi tratado com metil-escopolamina (1mg/kg s.c.) seguida de pilocarpina (30 min após, 150 mg/kg i.p.). Após 30 dias, os animais foram sacrificados e seus hipocampos foram retirados para análise da expressão de proteínas nesta estrutura.

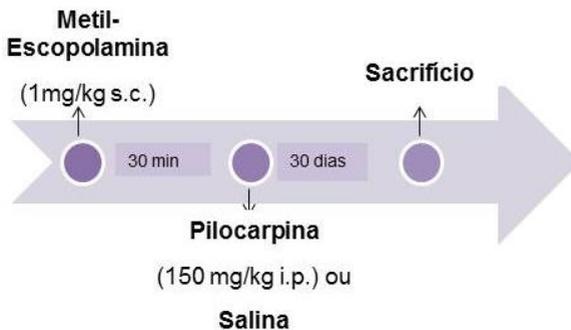


Figura 14: Esquema do experimento 2 da etapa 3, fase tardia.

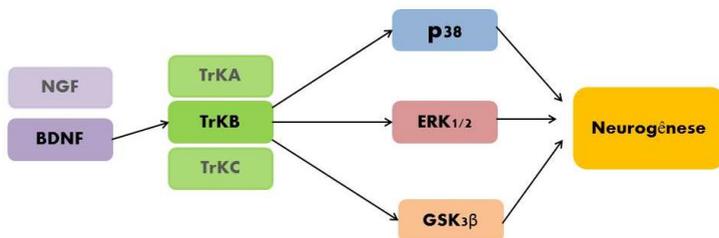


Figura 15 – Esquema simplificado destacando as proteínas da via de sinalização das neurotrofinas avaliadas neste estudo.

5.10 Estatística

Os dados dos testes comportamentais, os parâmetros bioquímicos de *Western blotting* e das reações de imunohistoquímica e imunofluorescência foram expressos como média \pm E.P.M. e avaliados pelo teste *t* de *Student* para os dados paramétricos e o teste *U* de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Para todas as avaliações foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se os dados tinham distribuição normal.

Os dados de PCR foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ e valores aberrantes foram definidos pelo método de Grubb (GURURAJAN *et al.*, 2016). Diferenças na expressão miRNA entre ratos tratados com pilocarpina e controle foram determinadas utilizando o teste *t* de Student para dados paramétricos e o teste *U* Mann-Whitney para dados não paramétricos.

Um valor de *p* menor que 0,05 foi selecionado como o limiar de significância e controlado para comparações múltiplas (Benjamini-Hochberg) a um nível de 5% (*p*-valor ajustado). A estatística dos dados de PCR foram calculadas usando o programa SPSS-18®, e as demais análises bem como todos os gráficos foram feitos utilizando o GraphPad Prism®, versão 5.0.

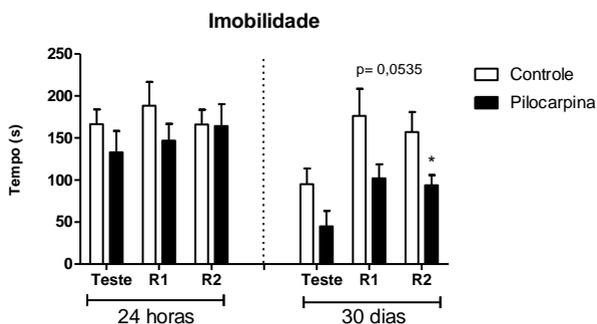
6 Resultados

6.1 Etapa 1 – Tempo de imobilidade no teste do nado forçado repetido e preferência por sacarose após tratamento com pilocarpina

A figura 16A ilustra o tempo de imobilidade de animais tratados com 150 mg/kg submetidos ao protocolo do TNF- α 24h ou 30 dias após o tratamento. Como podemos observar, a análise estatística não revelou nenhuma diferença entre os grupos experimentais de animais submetidos ao protocolo 24 h após o tratamento. Já para os animais submetidos ao protocolo 30 dias após o tratamento, como os dados do grupo controle não apresentaram distribuição normal no teste e no reteste 1, foi realizado o teste *U* de Mann Whitney e a análise revelou que para os dados do teste não houve diferença significativa quando comparamos o grupo controle e o grupo pilocarpina. Já para o reteste 1, apesar de não significativo, o valor de *p* foi muito próximo à 0,05 (*p*=

0,0535) e está expresso no gráfico. Os dados de reteste 2 obedeceram a distribuição normal e o teste t de Student revelou que os animais tratados com pilocarpina submetidos ao protocolo do TNF-r 30 dias após o tratamento apresentaram um menor tempo de imobilidade no reteste 2, quando comparados aos animais do grupo controle ($t(17)=2,292$; $p=0,0349$). Já no painel B da figura 16 podemos observar os dados de frequência do comportamento de imobilidade 30 dias após o tratamento com pilocarpina, e a análise estatística revelou não haver diferença entre os grupos em nenhuma sessão do teste.

A



B

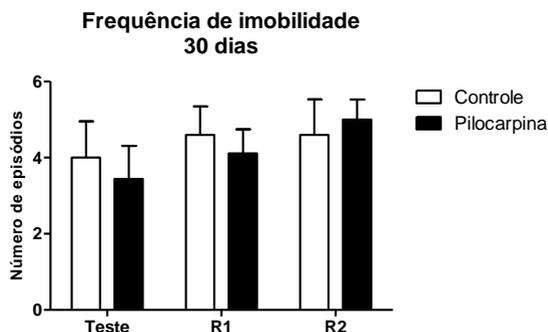


Figura 16 – A) Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) no tempo de imobilidade de ratos Wistar machos submetidos ao teste do nado

forçado repetido. B) Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) na frequência de imobilidade 30 dias após o tratamento. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, sendo um dos fatores a repetição e o outro fator o tratamento. O teste *t* de Student foi aplicado como teste *post hoc* para o fator tratamento. (t(17)= 2,292; p= 0,0349). *p<0,05 quando comparado ao grupo controle. Para os grupos que não apresentaram distribuição normal o teste *U* Mann Whitney foi aplicado e está representado no gráfico.

Na figura 17, os dados estão representados como índice de preferência à sacarose sobre a água [sacarose/(sacarose+água)}. Como se observa, o tratamento com pilocarpina não alterou a valência positiva da solução de sacarose 0,8% (p= 0,5612 – para 24 h; p= 0,4689 para 30 dias), uma vez que tanto animais controle quanto animais tratados exibiram uma média de preferência de, pelo menos, 60%.

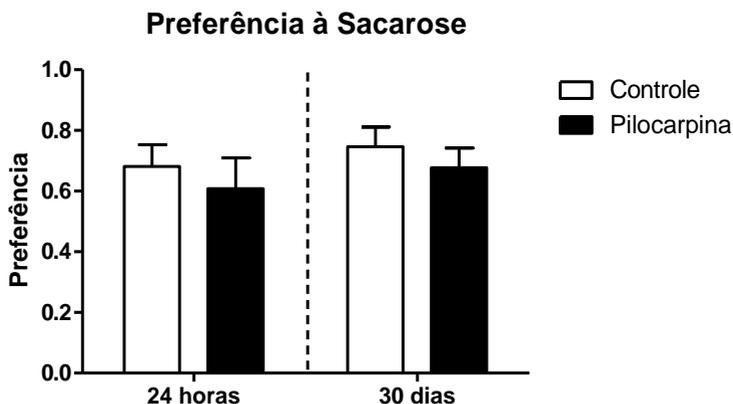


Figura 17 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) na preferência por sacarose (ingestão de sacarose dividido pela soma do total de água acrescido do consumo de sacarose: [sacarose/(sacarose+água)]) como uma medida relacionada à anedonia de ratos Wistar machos submetidos ao teste da preferência por sacarose. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 7 animais. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos.

6.2 Etapa 2 - Neurogênese e ativação neuronal no hipocampo dorsal e ventral e testes do medo condicionado e da alimentação suprimida pela novidade após o tratamento com pilocarpina

A figura 18 mostra o número de células duplamente marcadas para Brdu+/NeuN no giro denteado do hipocampo de ratos tratados com pilocarpina. Os dados obtidos sugerem que uma dose única de pilocarpina (150 mg / kg i.p.) aumentou significativamente o número total de células duplamente marcadas no giro dentado do hipocampo 30 dias após a injeção do agonista colinérgico ($t(10) = 2,644$, $p = 0,0246$), quando comparado com o grupo controle (solução salina). Quando a análise foi feita com sub-regiões do giro denteado observou-se que o número de neurônios BrdU + sobreviventes 30 dias após a injeção da pilocarpina foi maior na camada granular ($t(10) = 3,025$, $p = 0,0128$) e no hilo ($t(10) = 3,162$, $p = 0,0101$), mas não na zona subgranular ($t(10) = 1,728$, $p = 0,1146$).

Quando a contagem de células levou em consideração a diferenciação longitudinal do hipocampo, considerando o hipocampo dorsal de acordo com as coordenadas -1.8 a -5.2 mm do bregma e o ventral com as coordenadas -5.2 a -6.7 mm do bregma, a análise estatística mostrou que a injeção de pilocarpina aumentou a neurogênese no giro dentado dorsal ($t(10) = 2,357$, $p = 0,0402$) e houve uma tendência de aumento também no giro denteado ventral ($t(10) = 2,166$, $p = 0,0537$). Separando suas sub-regiões, é possível observar que a neurogênese está aumentada, tanto no hipocampo dorsal como no hipocampo ventral, na camada granular ($t(10) = 2,567$, $p = 0,028$; $t(10) = 2,373$, $p = 0,0391$, respectivamente) e no hilo ($t(10) = 2,786$, $p = 0,0192$; $t(10) = 2,912$, $p = 0,0155$, respectivamente). Novamente, nenhum resultado foi encontrado na zona subgranular, tanto no hipocampo dorsal quanto no hipocampo ventral ($t(10) = 1,447$, $p = 0,1786$; $t(10) = 1,524$, $p = 0,1584$, respectivamente). A figura 19 apresenta as fotos representativas da reação imunohistoquímica para BrdU e NeuN em animais controle e tratados com pilocarpina. Nos quadros superiores estão as figuras do hipocampo dorsal e nos quadros inferiores, do hipocampo ventral.

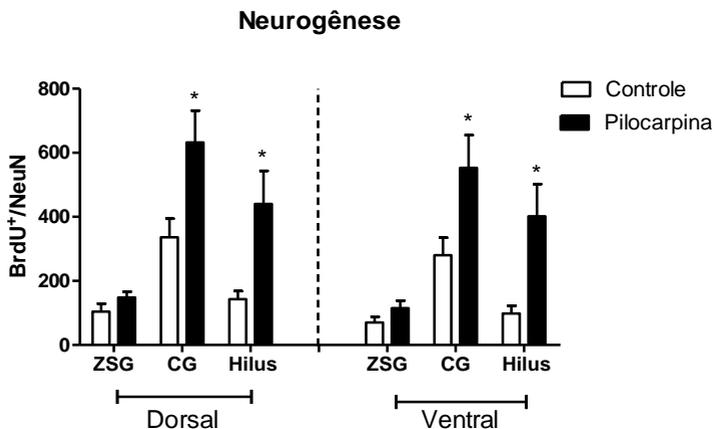


Figura 18 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) na proliferação e sobrevivência de neurônios de ratos Wistar machos. O número de células duplamente marcadas BrdU⁺/NeuN foi quantificado bilateralmente em 3 fatias de cada animal nas regiões da zona subgranular (ZSG), da camada granular (CG) e do hilo no hipocampo. O hipocampo foi dividido no eixo longitudinal em região dorsal (coordenadas -1.8 a -5.2 mm do bregma) e região ventral (-5.2 a -6.7 mm do bregma). Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student. * $p < 0.05$. CG Dorsal – $t(10) = 4,84$; Hilo Dorsal – $t(10) = 2,78$; CG Ventral – $t(10) = 2,37$; Hilo Ventral – $t(10) = 2,91$.

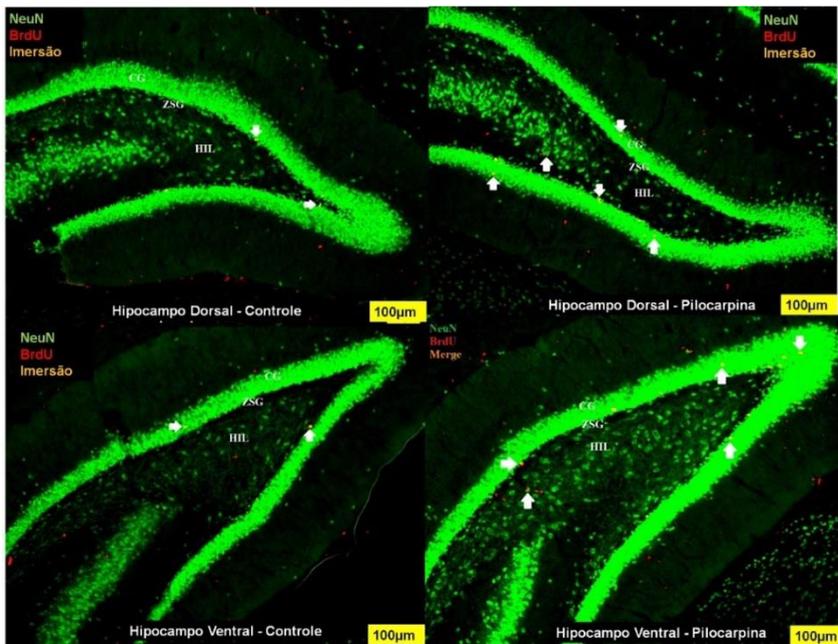


Figura 19 – Fotos representativas da reação de imunofluorescência em tecido de hipocampo de ratos Wistar machos 30 dias após o tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.). A cor verde representa a marcação para NeuN, a cor vermelha representa marcação para BrdU e a cor laranja representa a dupla marcação (imersão) para ambas as proteínas. As setas brancas inicam as duplas marcações nas regiões da zona subgranular (ZSG), camada granular (CG) e no hilo do hipocampo. O hipocampo foi dividido no eixo longitudinal em região dorsal (coordenadas -1.8 a -5.2 mm do bregma) e região ventral (-5.2 a -6.7 mm do bregma).

A figura 20 mostra o número de episódios do comportamento de mergulho de cabeça exibidos pelos animais durante o teste de exposição aos braços abertos do teste do labirinto em cruz elevado. A análise estatística revelou não haver diferença entre os grupos controle e pilocarpina.

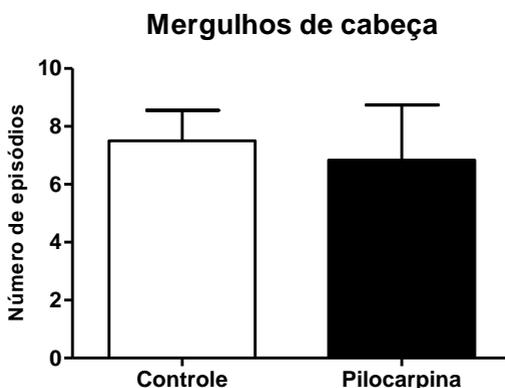


Figura 20 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) no comportamento de mergulhos de cabeça exibidos no teste da exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 10 animais. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student, $n=10$.

Na figura 21 pode-se ver o número de células do hipocampo dorsal e do ventral que foram marcadas pela reação de imunohistoquímica para a proteína FOS após o teste da exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado. A comparação foi feita entre os grupos submetidos ao estresse e não submetidos ao estresse, separadamente para o hipocampo dorsal e o ventral. Como se observa, a ANOVA de 2 vias, sendo um dos fatores o tratamento e o outro fator o estresse, revelou não haver diferença significativa entre os grupos analisados ($p= 0,3624$ para hipocampo dorsal e $p= 0,3337$ para hipocampo ventral). A figura 22 traz fotos representativas da reação para os animais do grupo estresse, ou seja, os que foram submetidos ao estresse da exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado.

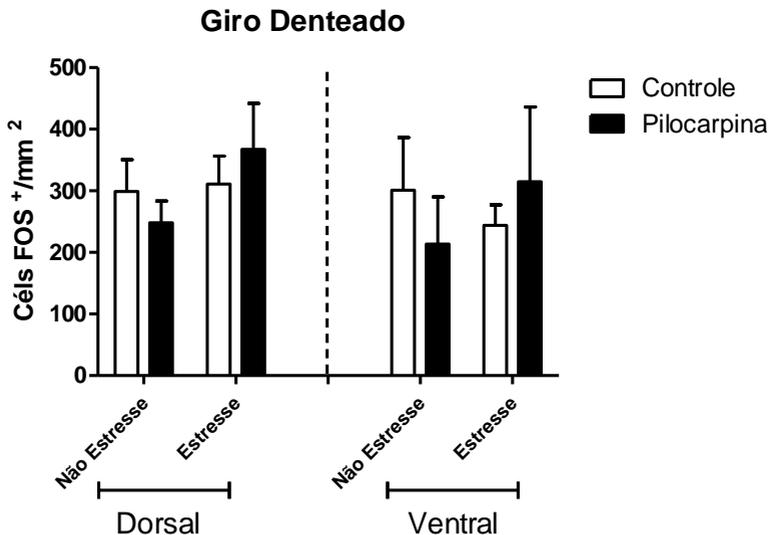


Figura 21 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) no padrão de ativação neuronal de ratos Wistar machos submetidos (estresse) ou não (não estresse) ao teste de exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado. O número de células Fos positivas foi quantificado bilateralmente em 3 fatias de cada animal e os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 6 animais. O hipocampo foi dividido no eixo longitudinal em região dorsal (coordenadas -1.8 a -5.2 mm do bregma) e região ventral (-5.2 a -6.7 mm do bregma). Os dados foram analisados pela ANOVA de duas vias, sendo um fator a presença ou não do estresse e o outro fator o tratamento. Não houve interação entre os fatores ($p= 0,3624$ – para hipocampo ventral; $p= 0,3337$ para hipocampo dorsal) ou qualquer diferença significativa entre os grupos.

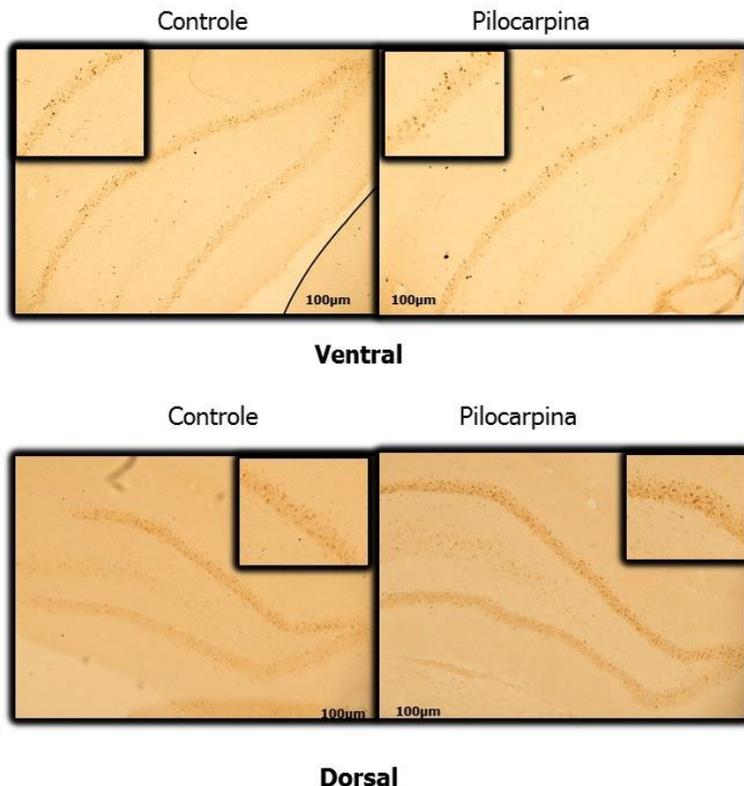


Figura 22 – Fotos representativas da reação de imunoprecipitacao em tecido de hipocampo de ratos Wistar machos 30 dias após o tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.). No painel superior estão representados os hipocampus ventrais de animais controle e animais pilocarpina que passaram pela exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado. No painel inferior estão representados os hipocampus dorsais de animais controle e animais pilocarpina que passaram pela exposição aos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Os pontos de cor marrom representam células que tiveram a reação de imunoprecipitação com DAB. O hipocampo foi dividido no eixo longitudinal em região dorsal (coordenadas -1.8 a -5.2 mm do bregma) e região ventral (-5.2 a -6.7 mm do bregma)

Já a figura 23 apresenta os gráficos do tempo em que os animais permaneceram exibindo o comportamento de congelamento no teste A

em A e no teste B em B. O teste *t* de *Student* revelou não haver diferença significativa entre os grupos controle e pilocarpina no teste A ($p=0,7254$) tampouco no teste B ($p=0,7952$).

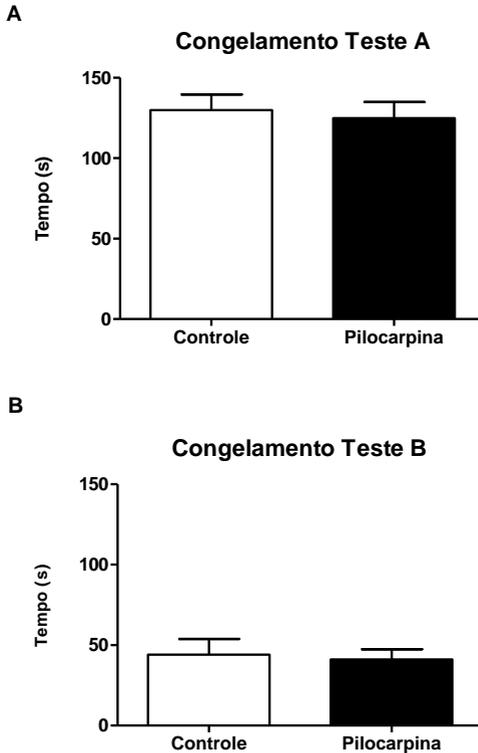


Figura 23 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) em: A) tempo de congelamento no teste A ($p=0,7254$) e no teste B ($p=0,7952$) (24h depois do condicionamento com choque nas patas de 0,7 mA por 3 s) do teste do medo condicionado. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 10 animais. Os testes foram realizados com grupos independentes de animais e os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student*, $n=10$.

Os resultados obtidos a partir da análise do teste da alimentação suprimida pela novidade estão expostos na figura 24, nos gráficos de latência para a entrada no quadrante onde a comida estava exposta (A) e de latência para a ingestão da comida após o teste na caixa moradia (B). Como se pode observar o tratamento com pilocarpina não alterou nenhum dos parâmetros analisados pelo teste *t* de *Student* (A – $p=0,9812$; B – $p=0,2403$).

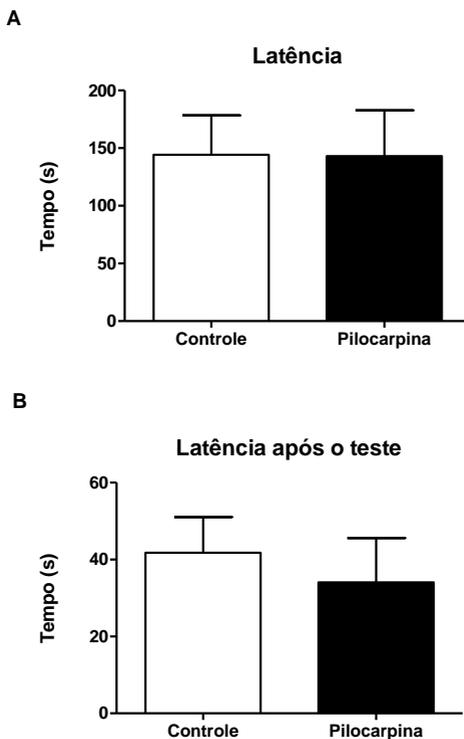


Figura 24 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) no A) tempo de latência para a entrada no quadrante central contendo o alimento palatável no teste da Alimentação Suprimida pela Novidade; $p=0,9812$. B) Tempo de latência para a alimentação com a comida palatável logo após o teste na casa moradia; $p=0,2403$. Os resultados estão representados como média \pm e.p.m. de 10 animais e os dados foram analisados pelo teste *t* de *Student*, $n=10$.

6.3 Etapa 3 - Expressão de microRNAs no hipocampo 30 dias após o tratamento com pilocarpina

A tabela 1 lista os 36 microRNAs escolhidos de acordo com a literatura, por terem sido alterados pelo tratamento com doses convulsivantes de pilocarpina, por serem alterados por protocolos de estresse ou estarem relacionados com o processo de neurogenese. A figura 25 expõe a expressão dos 36 microRNAs escolhidos no hipocampo dos animais 30 dias após o tratamento com 150 mg/kg de pilocarpina. Os resultados estão normalizados em relação ao grupo controle. O teste t de *Student* revelou que 26 dos 36 miRNAs analisados estão expressos em menor quantidade nos animais que receberam pilocarpina.

Tabela 1 – MicroRNAs selecionados para avaliação neste estudo com suas respectivas referências da literatura.

MicroRNA	Referência	MicroRNA	Referência
rno-let-7a-1-3p	(MEERSON <i>et al.</i> , 2010)	rno-miR-132-3p	(VO <i>et al.</i> , 2005)
rno-let-7b-3p	(KAWAHARA; IMAI; OKANO, 2012)	rno-miR-134-3p	(MEERSON <i>et al.</i> , 2010)
rno-let-7c-1-3p	(KAWAHARA; IMAI; OKANO, 2012)	rno-miR-135b-3p	(ISSLER; CHEN, 2015)
rno-let-7f-1-3p	(MEERSON <i>et al.</i> , 2010)	rno-miR-139-3p	(LIU; ZHAO, 2009)
rno-miR-1-3p	(MEERSON <i>et al.</i> , 2010)	rno-miR-142-3p	(LIU; ZHAO, 2009)
rno-miR-9a-3p	(UCHIDA <i>et al.</i> , 2008)	rno-miR-142-5p	(BALAKATHIRESAN <i>et al.</i> , 2014)
rno-miR-16-3p	(BAI <i>et al.</i> , 2012)	rno-miR-144-3p	(LIU; ZHAO, 2009)
rno-miR-17-5p	(MEERSON <i>et al.</i> , 2010)	rno-miR-146a-3p	(RISBUD; PORTER, 2013)
rno-miR-19b-3p	(BALAKATHIRESAN <i>et al.</i> , 2014)	rno-miR-183-3p	Meerson, 2010
rno-miR-24-3p	(LIU; ZHAO, 2009)	rno-miR-204-3p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)
rno-miR-30a-5p	(MELLIOS <i>et al.</i> , 2008)	rno-miR-211-3p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)
rno-miR-30c-1-3p	(LIU; ZHAO, 2009)	rno-miR-214-3p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)
rno-miR-34a-3p	(LIU; ZHAO, 2009)	rno-miR-184	(SHI <i>et al.</i> , 2010)
rno-miR-34b-3p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)	rno-miR-206-3p	(LIU; ZHAO, 2009)
rno-miR-34c-3p	(HARAMATI <i>et al.</i> , 2011)	rno-miR-212-3p	(RYAN; JOILIN; WILLIAMS, 2015)
rno-miR-124-3p	(UCHIDA <i>et al.</i> , 2008)	rno-miR-221-3p	(SHI <i>et al.</i> , 2010)
rno-miR-125a-3p	(EDBAUER <i>et al.</i> , 2010)	rno-miR-363-5p	(LIU; ZHAO, 2009)
rno-miR-128-3p	Zhou, 2009	rno-miR-375-5p	(LIU; ZHAO, 2009)
rno-miR-451-3p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)	rno-miR-448-3p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)
rno-miR-598-5p	(O'CONNOR <i>et al.</i> , 2013)	rno-miR-872-3p	(SMALHEISER <i>et al.</i> , 2011)
rno-miR-3544	(LIU; ZHAO, 2009)		

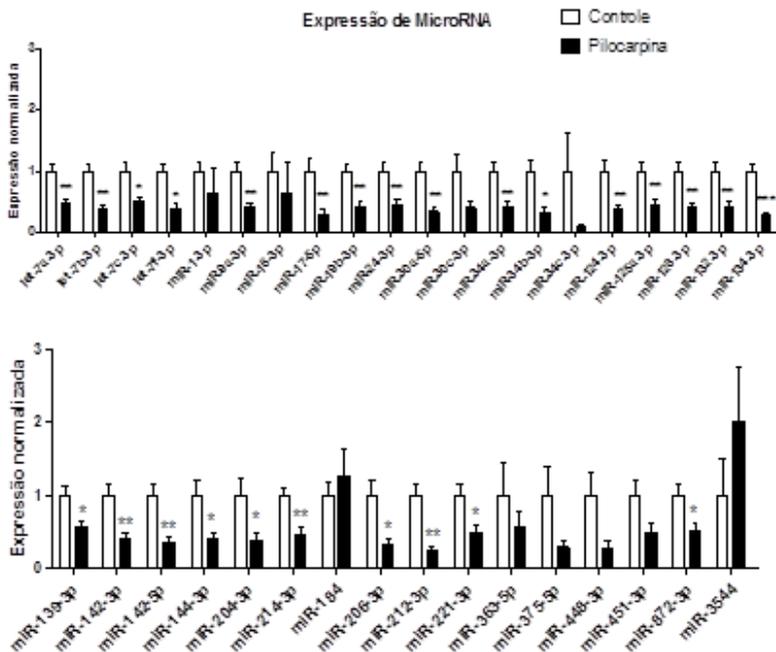


Figura 25 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) na expressão de microRNAs no hipocampo de ratos 30 dias após o tratamento. A expressão dos microRNAs está normalizada para o grupo controle, a expressão do grupo tratado é relativa ao grupo controle. Os dados foram analisados pelo teste t de *Student*. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0,001$.

Quando foi realizada a correção de Bonferroni, revelou-se que dos 26 microRNAs que apresentaram redução da expressão somente 6 representam uma real alteração causada pela pilocarpina, estes microRNAs estão representados na tabela 2.

Tabela 2 – MicroRNAs alterados pelo tratamento com pilocarpina após a correção de Bonferroni.

MicroRNA	Normalizacao	Valor de p
miR-134-3p	0,289454719	<0.001
miR-214-3p	0,450193916	0,001
miR-19b-3p	0,432026135	0,001
Let-7f-3p	0,398900867	0,001
miR-30a-5p	0,350281139	0,001
miR-212-3p	0,233104409	0,001

A análise de vias de Sinalização KEEG revelou que os microRNAs alterados possuem 19 genes-alvo que participam da via de sinalização das neurotrofinas (p= 0,007).

Tabela 3 – Análise KEEG® de vias de sinalização mostrando quais vias de sinalização são afetadas pelos 6 microRNAs alterados pelo tratamento com pilocarpina. Destacado em vermelho a via das neurotrofinas que regulam o processo de neurogênese.

Análise KEEG de vias de Sinalização

Via de Sinalização	valor de p	#genes	#miRNAs
Biossíntese de Glucanas	0,000000001	5	miR-30a, miR-214, miR-19b
Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito	0,000002432	11	miR-30a, miR-214, let-7f
Via Rap1	0,004401587	24	miR-19b, let-7f, miR-30a, miR-214, miR-212
Via das Neurotrofinas	0,007059253	19	miR-19b, let-7f, miR-30a, miR-214, miR-212
Proteoglicanas no câncer	0,008804035	22	miR-19b, let-7f, miR-30a, miR-214, miR-212
Via FoxO	0,009008283	18	miR-19b, let-7f, miR-30a, miR-214, miR-212

A figura 26 apresenta os resultados na análise da expressão de proteínas da via das neurotrofinas. Foram selecionadas as proteínas BDNF (quadro A), p38 (quadro B), GSK3 β (quadro C), e ERK1/2 (quadro D) por representarem diferentes estágios desta via de sinalização, conforme apresentado na Introdução deste trabalho. Os dados estão expressos por unidades arbitrárias e a expressão é relativa à expressão da proteína constitutiva β -actina. A análise estatística não revelou nenhuma diferença significativa na expressão das proteínas avaliadas.

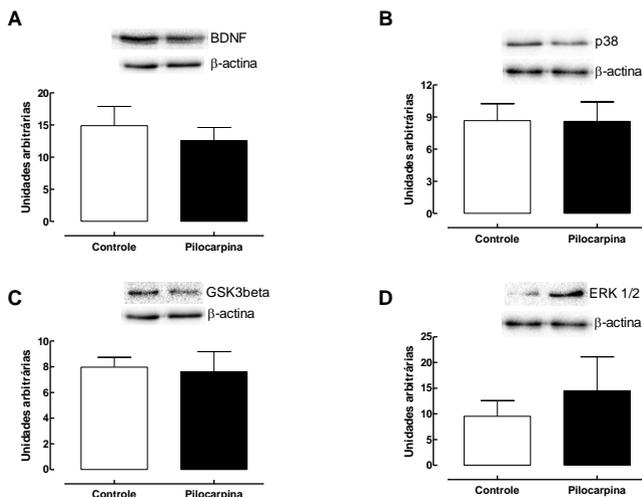


Figura 26 – Efeito do tratamento com 150mg/kg de pilocarpina na expressão de BDNF, p38, GSK3 β e ERK1/2 no hipocampo de ratos 30 dias após o tratamento. Os resultados estão mostrados como expressão relativa à proteína β -actina, representados por unidades arbitrárias.

Na figura 27 (quadro A) nota-se a abundância relativa da microbiota dos animais tratados com pilocarpina e seu grupo controle ao nível de filo microbiano. Neste nível, os *taxa* microbianos mais prevalentes em ambos os grupos foram *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, representando uma abundância média combinada de 98,3% e 98,6%, respectivamente, nos grupos tratados e controle. A única diferença estatisticamente significativa observada entre os grupos no nível de filo foi em *Tenericutes* que estava presente maior abundância no grupo pilocarpinae

($p = 0,007$), mas que representa menos de 1% na abundância total da microbiota.

No quadro B, observa-se a distribuição da abundância relativa no nível de família da composição da microbiota intestinal de animais tratados com pilocarpina e seus controles. A legenda mostra as diferentes famílias, e o gráfico ilustra suas abundâncias e distribuições em cada grupo (quadro B1). A análise estatística revelou que *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* foram os *taxa* microbianos mais prevalentes, representando uma abundância média combinada de 72% e 78% nos grupos tratados com pilocarpina e controle, respectivamente (quadro B2). A única diferença estatisticamente significativa observada entre os dois grupos, em nível familiar, foi para Bacteroidaceae ($p = 0,049$) e Rikenellaceae ($p = 0,041$), que estavam ambas com uma abundância muito baixa, <2%.

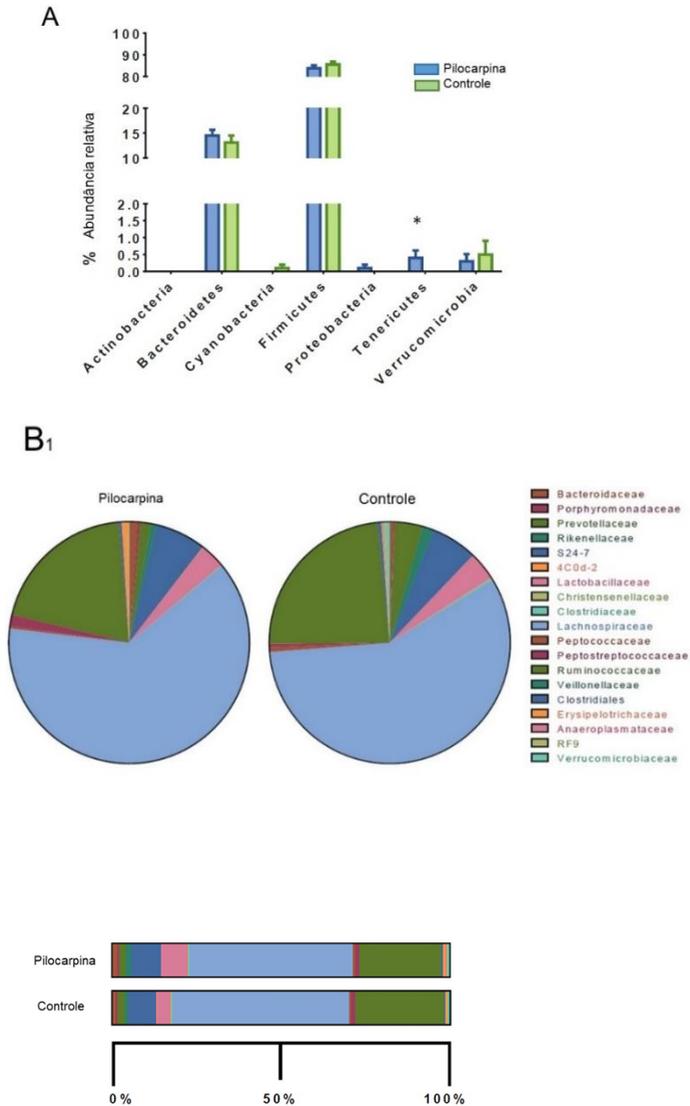


Figura 27 – Efeito do tratamento com pilocarpina (150 mg/kg, via i.p.) na composição da microbiota intestinal de ratos Wistar machos (n=10). A) abundância relativa ao nível de Filo microbiano em animais tratados com pilocarpina e seus controles. B1) distribuição da abundância relativa ao nível de família microbiana. B2) abundância relativa ao nível de família microbiana. Os dados foram analisados pelo teste t de *Student* não pareado. * $p < 0.05$.

7 Discussão

O conjunto de resultados obtidos durante a realização deste trabalho mostra que o tratamento com uma dose subconvulsivante de pilocarpina (150 mg/kg) reduz o tempo de imobilidade no teste do nado forçado repetido sem alterar o componente hedônico da solução de sacarose. Além disso, este tratamento promoveu o aumento da sobrevivência de células tanto no hipocampo dorsal quanto no hipocampo ventral 30 dias após a injeção de pilocarpina. Esta mudança no número de novos neurônios hipocampais foi acompanhada da diminuição da expressão de 6 microRNAs relacionados com a via das neurotrofinas. No entanto, o tratamento não alterou a composição da microbiota intestinal de maneira significante.

A redução da imobilidade no TNF pode ser decorrente do efeito ansiogênico da pilocarpina, uma vez que esta mesma dose causou efeitos ansiogênicos no teste do labirinto em cruz elevado (DUARTE, FILIPE S *et al.*, 2013; DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010, 2014; HOELLER, ALEXANDRE A *et al.*, 2016; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013) e que fármacos com propriedades ansiogênicas, tais como a cafeína e a anfetamina, também reduzem a imobilidade neste teste (PORSOLT *et al.*, 1978; VIEIRA *et al.*, 2008).

Além disso, um estudo mais recente observou uma correlação positiva entre o tempo de exploração dos braços abertos do teste do LCE e o tempo de imobilidade no TNF, ou seja, quanto maior o tempo de exploração dos braços abertos do LCE, maior o tempo de imobilidade no TNF (ESTANISLAU *et al.*, 2011). Assim, no presente estudo, os animais tratados com pilocarpina apresentaram redução de imobilidade no TNF além de apresentarem menor exploração dos braços abertos do LCE (DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2014; HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013). Em outro estudo, (LOPES *et al.*, 2016) encontraram resultados semelhantes de diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado utilizando uma dose convulsivante de pilocarpina.

A imobilidade no contexto do TNF foi originalmente interpretada como uma resposta de "desespero comportamental" (*behavioral despair*) por Porsolt (1978), em grande parte baseada no pressuposto de que os animais têm "a esperança de escapar" no início do teste e a "perdem" com poucos minutos após perceberem que não há saída

possível da situação (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Outro grupo de pesquisadores interpreta esta resposta como uma estratégia evolutiva preservada (THIERRY *et al.*, 1984) que pode ser semelhante ao estado psicológico de “encurralamento” descrito na depressão clínica (LUCKI, 1997). Além disso, a imobilidade pode ser devida à incapacidade ou relutância em manter o esforço em vez de uma hipoatividade generalizada ou mesmo uma estratégia de preservação de energia (CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). Mais recentemente, (CABIB; CAMPUS; COLELLI, 2012) propuseram que a imobilidade aparece com a inibição de estratégias de enfrentamento ativas pela experiência de repetidas tentativas de fuga da situação estressante, o que envolve aprendizado (MOLENDIJK; DE KLOET, 2015). Sendo assim, o comportamento de redução da imobilidade encontrado nos animais tratados com pilocarpina submetidos ao TNF-repetido parece estar mais relacionado à esquivas da situação de estresse inescapável por aprendizado. Por envolver aprendizado e repetição, não se pode excluir uma possível relação com memória nos efeitos encontrados no TNF-r. A literatura mostra que doses convulsivantes de pilocarpina podem causar déficit cognitivo em diferentes testes comportamentais, como nos testes de reconhecimento social, discriminação olfatória e reconhecimento de objetos (CHO *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2016). Entretanto, somente este resultado não permite que se exclua um possível efeito da pilocarpina no aprendizado da imobilidade neste teste, o que poderia ser uma explicação plausível para a diminuição do tempo de imobilidade ao invés do aumento esperado com as repetições do teste (VIEIRA *et al.*, 2008).

Clinicamente, fármacos antidepressivos são prescritos tanto para transtornos afetivos como para transtornos de ansiedade. Entretanto, de maneira contraditória, no início do tratamento (fase aguda) é muito comum o aumento da ansiedade em seres humanos (BRIDGE *et al.*, 2007). Em conjunto com os dados encontrados na literatura, dados do presente estudo sugerem que fármacos ansiogênicos podem apresentar um perfil semelhante ao dos antidepressivos no TNF. Estas evidências levantam ainda o questionamento sobre a preditividade do TNF – podendo o teste ser preditivo para os efeitos ansiogênicos agudos de antidepressivos, mas não necessariamente para os efeitos antidepressivos propriamente ditos.

Para avaliar outro aspecto relacionado às emoções, decidiu-se testar os animais no teste de preferência à sacarose, como uma medida de

avaliação do componente hedônico oferecido pela solução. Situações como estresse crônico e depressão reduzem a preferência por sacarose (SLATTERY; CRYAN, 2014). No presente trabalho, o tratamento com pilocarpina não diminuiu a preferência dos animais pela solução de sacarose. A este respeito, (SMALL *et al.*, 2016) demonstraram que o aumento da transmissão colinérgica na área tegmental ventral, pela infusão local do inibidor da acetilcolinesterase fisiostigmina (1 e 2µg/hemisfério) ou pelo agonista muscarínico pilocarpina (3 e 30µg/hemisfério), imediatamente antes do teste, diminuiu o consumo de sacarose no teste, bem como diminuiu o tempo de exploração dos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado – parâmetros relacionados a estados emocionais como depressão e ansiedade, respectivamente. Estudos utilizando a pilocarpina como modelo de epilepsia do lobo temporal demonstram que doses mais altas de pilocarpina diminuem a preferência pela solução de sacarose (KLEIN *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2016; MAZARATI *et al.*, 2009). Portanto, acreditamos que a dose utilizada não foi suficiente para diminuir o componente hedônico da solução de sacarose, embora tenha sido suficiente para reduzir a exploração dos braços abertos no LCE.

A segunda etapa deste trabalho visou verificar os possíveis efeitos da pilocarpina na neurogênese hipocampal, uma vez que dados da literatura sustentam a hipótese de que o sistema colinérgico exerce importante papel neste processo celular e que este papel poderia estar envolvido na gênese do efeito do tipo ansiogênico deste composto. Como observado no presente estudo, o tratamento com 150 mg/kg de pilocarpina aumentou a sobrevivência de neurônios nas diferentes camadas do giro dentado do hipocampo: camada granular, zona subgranular e hilo. Este aumento ocorreu tanto no hipocampo dorsal quanto no hipocampo ventral. Entretanto, o aumento na zona do hilo é considerado aberrante ou ectópico por alguns autores (CHO *et al.*, 2015; PARENT *et al.*, 1997); pois o processo de migração em condições normais leva as novas células à camada granular do giro dentado do hipocampo (DRANOVSKY; HEN, 2006).

A literatura mostra que há um aumento de neurogênese em situações de dano ao sistema nervoso central, como em modelos animais de derrame (THORED *et al.*, 2006) e trauma (DASH; MACH; MOORE, 2001) e a esse fenômeno é creditada a função de restaurar o dano ocorrido. No entanto, nem sempre as novas células se desenvolvem corretamente, migram corretamente ou mesmo são funcionalmente

integradas à circuitaria local, pois grande parte delas nem mesmo sobrevive após o período agudo ao dano (SCHARFMAN; HEN, 2007).

Modelos animais de epilepsia do lobo temporal que utilizam a pilocarpina como agente indutor das crises recorrentes também apresentam aumento de neurogênese e neurogênese ectópica (CHO *et al.*, 2015; PARENT *et al.*, 1997; SCHARFMAN, 2004). Em estudo recente, (CHO *et al.*, 2015) demonstraram que a neurogênese aberrante contribui para as crises epilépticas, aumentando a frequência das mesmas, embora não seja exclusivamente necessária para que elas ocorram. Entretanto, a maioria destes estudos relaciona o aumento da neurogênese como consequência das crises epilépticas, uma vez que essas crises são geradas por um aumento da excitabilidade neuronal (CAMERON, H A; MCEWEN; GOULD, 1995; MYERS; BERMUDEZ-HERNANDEZ; SCHARFMAN, 2013; SCHARFMAN; PIERCE, 2012; SCHARFMAN, 2004). Neste contexto, Cameron e colaboradores (2012) avaliaram a morfologia e a funcionalidade de novos neurônios ectópicos localizados no hilo hipocampal consequentes ao modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina. Foi demonstrado por este grupo que as células localizadas no hilo possuem maior propensão a desenvolver dendritos basais, emitem projeções para a região CA3 tanto quando células normotópicas, enviam fibras musgosas para a camada molecular e são mais facilmente excitáveis (CAMERON, MICHAEL C; ZHAN; NADLER, 2011; GAO *et al.*, 2015; ZHAN; TIMOFEEVA; NADLER, 2010). Acredita-se que essa maior excitabilidade contribui para as alterações comportamentais associadas a essa doença como déficits cognitivos e alterações no humor (CAMERON, MICHAEL C; ZHAN; NADLER, 2011; CHO *et al.*, 2015; MYERS; BERMUDEZ-HERNANDEZ; SCHARFMAN, 2013; SCHARFMAN; PIERCE, 2012; SCHARFMAN, 2004).

O presente estudo mostra, pela primeira vez, que pode haver aumento da neurogênese hipocampal sem necessariamente haver crises convulsivas, como foi evidenciado por (HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013) que a dose utilizada não provoca tais alterações mesmo em longo prazo (HOELLER, ALEXANDRE ADEMAR *et al.*, 2013). Além disso, (DA PENHA BERZAGHI *et al.*, 1993), utilizando a mesma dose de pilocarpina aqui empregada, demonstraram que o aumento da transmissão colinérgica incrementou a expressão de BDNF no hipocampo dos animais tratados. Pode-se, então, relacionar o aumento da neurogênese com um possível aumento de BDNF causado

pelo tratamento com pilocarpina, o que poderia estimular a proliferação de novas células hipocâmpais. Uma série de estudos (ZAFRA *et al.*, 1990, 1991, 1992) já havia mostrado que a expressão de BDNF é dependente do influxo de cálcio e da ativação do complexo cálcio/calmodulina com ativação de AMP cíclico, e um dos principais eventos que permite esse estímulo é a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que estão colocalizados com receptores muscarínicos no hipocampo. Sendo assim, a ativação de receptores muscarínicos pela pilocarpina pode conseqüentemente ativar receptores NMDA e estimular a produção de BDNF que, por sua vez, estimularia o processo de neurogênese.

Em 2007, dois dos maiores nomes da pesquisa em neurogênese – Helen E. Scharfman e Rene Hen – publicaram uma revisão intitulada “Is more neurogenesis always better?” na qual salientam a importância de se investigar a qualidade dos novos neurônios gerados no encéfalo adulto. Estas autoras (SCHARFMAN; HEN, 2007) recordam que grande parte dos novos neurônios formados não sobreviverá por muito tempo e que, uma vez que sobrevivam, sua função não trará efeitos necessariamente terapêuticos. A este respeito, animais *germ free*, que apresentam uma série de alterações comportamentais como aumento de comportamentos de esquiva e maior susceptibilidade ao estresse, apresentam maior taxa de neurogênese quando comparados aos animais controle (OGBONNAYA *et al.*, 2015). Em consonância, nosso trabalho mostra que animais tratados com pilocarpina possuem aumento de neurogênese, mesmo tendo um perfil de maior esquiva dos braços abertos no LCE e da região central do CA (DUARTE, FILIPE SILVEIRA *et al.*, 2010; HOELLER, ALEXANDRE A *et al.*, 2016).

Por outro lado, a detecção imunohistoquímica da proteína FOS, produto do gene de rápida expressão *c-fos*, é um método valioso para mapear neurônios em funcionamento em circuitos específicos no sistema nervoso central (DRAGUNOW; FAULL, 1989). Como os animais tratados com pilocarpina apresentam menor exploração nos braços abertos do LCE, considerou-se interessante submetê-los ao protocolo de exposição aos braços abertos do LCE proposto por (SALOMÉ *et al.*, 2004) como desafio estressante para avaliar se o tratamento com pilocarpina alteraria o padrão de ativação neuronal diante desse desafio. No trabalho de (SALOMÉ *et al.*, 2004) utilizando ratos selecionados para alta e baixa ansiedade (HAB e LAB, respectivamente) no LCE, foi observado que a exposição aos braços

abertos aumentou o número de células FOS positivas no núcleo paraventricular do hipotálamo e septo lateral e diminuiu o número de células ativadas no giro denteado e na região CA3 do hipocampo de ratos HAB. No presente trabalho, foi avaliado o número de células marcadas no giro denteado do hipocampo, sendo que a análise foi feita separadamente para a região ventral e dorsal, por estas exibirem diferentes funções, sendo a região ventral mais importante no processamento de emoções e a região dorsal mais requerida no processamento de memórias contextuais (FANSELOW; DONG, 2010). A análise estatística revelou que o tratamento com pilocarpina não alterou o padrão de ativação neuronal no giro denteado de animais submetidos ao teste da exposição aos braços abertos do LCE. Assim, o aumento da neurogênese aqui observado não se refletiu numa diferente ativação neuronal avaliada pela expressão da proteína FOS no hipocampo. É importante salientar que a falta de diferença na ativação neuronal no giro denteado do hipocampo não significa que não há diferença na interpretação do estímulo aversivo, uma vez que a contagem de células FOS+ não foi realizada em outras regiões encefálicas que juntamente com o hipocampo participam do processamento de emoções, como as próprias regiões CA1 e CA3, assim como a amígdala e o córtex pré-frontal. Portanto, uma avaliação mais ampla, incluindo as áreas com as quais o hipocampo se conecta via aferências ou eferências, responderia melhor sobre a influência do tratamento com pilocarpina na ativação neuronal após o estímulo aversivo da exposição forçada aos braços abertos do LCE.

Como no presente estudo foi encontrado aumento de neurogênese hipocampal nos animais tratados com pilocarpina, grupos independentes de animais foram submetidos a tarefas comportamentais hipocampo-dependentes a fim de verificar se esse aumento na neurogênese se refletiria em uma alteração comportamental em tarefas sensíveis a este fenômeno, como o teste do medo condicionado e o teste da alimentação suprimida pela novidade.

Como se observou, tanto os animais tratados com pilocarpina quanto os animais controle foram capazes de lembrar do estímulo aversivo mesmo na ausência do mesmo – o que foi evidenciado pela presença do comportamento de congelamento na média de 71,66% (controle) e 68,8% (pilocarpina) do tempo observado no teste A, que avalia a associação do estímulo neutro (ambiente) com o estímulo aversivo (choque nas patas), não havendo diferença significativa entre

os grupos avaliados. Estes resultados sugerem que o aumento da neurogênese causado pelo tratamento com pilocarpina não alterou a estratégia de enfrentamento dos animais submetidos a este protocolo de maneira detectável. Já no teste B, utilizado para avaliar se o estímulo aversivo foi forte o suficiente para causar generalização da resposta de medo em um contexto diferente, e observa-se que a mesma manipulação não causou generalização do medo, visto que o tempo de congelamento no contexto B, um contexto neutro, foi de 24,4 % para o grupo controle e 22,77% para o grupo tratado. Sendo assim, é possível sugerir que o tratamento com pilocarpina não causou prejuízo no aprendizado do medo, evidenciado pelo resultado no teste A, nem tampouco causou a generalização do medo, mostrado pelos resultados do teste B. Portanto, o tratamento com pilocarpina parece não participar da modulação da memória de medo avaliada neste protocolo.

Dados provenientes da literatura mostram que manipulações que impedem a formação de novos neurônios no hipocampo podem causar tanto a diminuição do tempo de congelamento no teste do medo condicionado, quanto um aumento na expressão do medo (SAXE *et al.*, 2006; SEO *et al.*, 2015). O trabalho de (SEO *et al.*, 2015), sugere que o fenômeno da neurogênese modula o aprendizado emocional de duas maneiras distintas, e aparentemente opostas, o que explicaria a falta de concordância na literatura a respeito da importância da neurogênese no aprendizado, pois a neurogênese melhora o aprendizado associativo (estímulo condicionado + estímulo incondicionado) e, ao mesmo tempo, contribui para a não generalização do medo. Em outras palavras, novos neurônios no hipocampo permitem que o aprendizado emocional seja mais coerente com o estímulo recebido e com o contexto em que o animal está. Neste sentido, a neurogênese causada pela pilocarpina parece seguir este padrão, uma vez que os animais tratados com pilocarpina, mesmo apresentando um fenótipo de maior expressão de comportamentos de esquiva, conseguiram associar o estímulo neutro ao aversivo sem generalizar o medo, exibindo respostas apropriadas para os contextos A e B.

Já para os resultados dos efeitos do tratamento com pilocarpina no teste da Alimentação Suprimida pela Novidade se observou que a neurogênese causada pelo tratamento com pilocarpina não pareceu melhorar o desempenho dos animais neste paradigma, uma vez que o tempo para aproximação ao quadrante que continha o alimento foi semelhante entre os grupos tratado e controle. Esta esquiva do alimento,

entretanto, não representa uma aversão ao alimento em si, uma vez que imediatamente após o teste a latência para a ingestão do alimento apetitoso foi bastante baixa para ambos os grupos. A literatura mostra que a aversividade do quadrante central neste teste não diminui com a presença do alimento, o que faz com que haja a inibição da alimentação mesmo que o alimento possua valência positiva para os animais (DULAWA; HEN, 2005; SAMUELS *et al.*, 2011). O aumento da neurogênese causado pelo tratamento com antidepressivos é capaz de diminuir a latência para a visita no quadrante central e aumentar o consumo do alimento neste local (DULAWA; HEN, 2005). Além disso, foi demonstrado que os efeitos dos antidepressivos sobre este comportamento é dependente da neurogênese hipocampal, uma vez que a ablação da neurogênese hipocampal por raio-X impediu os efeitos crônicos da fluoxetina neste teste (WANG *et al.*, 2008). Uma possível explicação para os resultados encontrados no presente estudo aponta para o fato de que alguns dos novos neurônios migraram de maneira ectópica, o que pode ter impedido os efeitos esperados da neurogênese hipocampal neste teste.

Quanto à investigação dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos nas consequências de longo prazo causadas pelo tratamento único com pilocarpina, constatou-se que os animais tratados com pilocarpina apresentaram menor expressão de 26 microRNAs previamente selecionados no estudo com base na literatura por sua relação com o fenômeno da neurogênese, estresse e tratamento com pilocarpina.

Uma das características mais importantes dos microRNAs é de que um único tipo de miRNA pode regular a expressão de mais de um gene, o que torna este tipo de estudo bastante complexo. Apesar disso, diversas evidências da literatura auxiliam no entendimento da dinâmica destas moléculas. A expressão dos miRNAs 30 dias após o tratamento com pilocarpina mostra que este tratamento diminuiu a expressão de diversos microRNAs e, por conta disso, foi necessário realizar a correção de Bonferroni para verificar quais diferenças seriam realmente relevantes. Os microRNAs que tiveram sua expressão reduzida após a correção de Bonferroni, e sobre os quais comentaremos com maior detalhe, são 6 (let-7f, miR-19b, miR-30a, miR-134, miR-214 e miR-212) que foram afetados pelo tratamento com pilocarpina.

A família de microRNA let-7 é a que se expressa em maior abundância no encéfalo, desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta. Mais especificamente, uma densa expressão de miRNAs desta família é encontrada nas zonas de neurogênese, em neurônios pós-mitóticos (REHFELD *et al.*, 2015). Foi demonstrado que o let-7b suprime a expressão de diferentes genes envolvidos no controle do ciclo celular, como o receptor TLX (ZHAO *et al.*, 2009). A inibição da expressão de let-7b favorece o potencial proliferativo de células precursoras de neurônios e bloqueia sua diferenciação. Entretanto, não foram encontradas evidências da participação do let-7f na proliferação de células encefálicas normais, somente em células tumorais de glioma, estando este microRNA reduzido em tecidos tumorais (YAN *et al.*, 2015). Esses dados da literatura nos fornecem evidências de que um dos mecanismos possíveis para o aumento da proliferação de células após o tratamento com pilocarpina possa ter se dado através da supressão da expressão de microRNAs da família let-7, visto que se encontrou a redução na expressão do microRNA let-7f 30 dias após o tratamento com pilocarpina no hipocampo de ratos Wistar. Para confirmar esta hipótese poderíamos propor um experimento que provocasse a superexpressão dos microRNAs desta família de maneira independente, como realizado no estudo de (LI *et al.*, 2015) enquanto investigavam o papel da família let-7 na regeneração de nervo periférico. Estes autores propuseram que os microRNAs da família let-7 reduzem a proliferação e migração de células nervosas periféricas através da supressão da expressão de e NGF (LI *et al.*, 2015).

Já a família de microRNAs miR-19 é formada pelo miR19a e miR19b, que diferem um do outro por apenas um nucleotídeo no meio da sequência e ambos estão altamente expressos em células progenitoras neurais e têm sua expressão diminuída durante a diferenciação celular (HAN *et al.*, 2016). Recentemente, um elegante estudo conduzido pelo grupo de Fred Gage demonstrou que ambos, miR-19a e miR-19b são peças fundamentais na correta migração de novas células no hipocampo. Eles demonstraram que o nível de expressão de miR-19 é maior na zona subgranular do giro denteado do hipocampo e que a superexpressão destes miRNAs aumentou a eficiência da migração celular e a redução dos mesmos resultou na piora da eficiência da migração de novos neurônios no hipocampo (HAN *et al.*, 2016). Os autores sugerem que a alteração da expressão de miR-19 pode estar associada à migração ectópica hipocampal que ocorre na esquizofrenia e que estudos mais detalhados devem ser realizados para compreender os mecanismos pelos

quais este microRNA interfere na migração de novas células, a fim de desenvolver novas ferramentas terapêuticas. Na presente investigação verificou-se redução da expressão de miR-19b 30 dias após o tratamento com pilocarpina e esta redução está acompanhada pelo aumento de neurogênese ectópica. Sendo assim, pode-se sugerir que esta migração aberrante pode ter sido devida à redução da expressão de miR-19b. Experimentos utilizando *antagomirs* (sequências de nucleotídeos que antagonizam os efeitos de microRNAs) auxiliariam na confirmação desta hipótese.

O miR-30a é um membro da família miR-30 composta de outras 5 sequências de pares de base (miR-30b, miR-30c1, miR-30c2, miR-30d e miR-30e) (ZHANG, QIAN *et al.*, 2015). A literatura traz evidências de sua influência principalmente no contexto de diferentes tipos de câncer, como o câncer de mama e câncer colorretal, sendo que a superexpressão deste microRNA reduz a proliferação de células cancerosas (ZHANG, N *et al.*, 2014; ZHANG, QIAN *et al.*, 2015). Já no sistema nervoso central, foi demonstrado que o miR-30a encontra-se expresso no córtex pré-frontal de humanos adultos e sua expressão está inversamente relacionada com a expressão de BDNF nesta região, sugerindo então um possível papel regulatório de processos plásticos no encéfalo adulto (MELLIOS *et al.*, 2008). Assim, apesar de termos avaliado a expressão deste microRNA no hipocampo de ratos, pode-se dizer que a redução da expressão do mesmo pelo tratamento com pilocarpina pode contribuir para o aumento da neurogênese encontrado em nossos animais. Mais uma vez, experimentos que validem essa suposição são necessários.

Outro microRNA que teve sua expressão reduzida pelo tratamento com pilocarpina foi o miR-134 que tem sua função associada à regulação do desenvolvimento de espinhas dendríticas no giro denteado do hipocampo. (SCHRATT *et al.*, 2006) demonstraram que o nível de expressão de miR-134 aumenta no hipocampo de ratos ao longo do desenvolvimento, atingindo seu máximo de expressão 13 dias após o nascimento. Mais especificamente, este miRNA encontra-se expresso em dendritos de pós-sinapses excitatórias e exerce papel regulatório no volume de espinhas dendríticas neste local, uma vez que neurônios de cultura hipocampais com superexpressão de miR-134 apresentaram menor volume e largura de espinhas dendríticas e a supressão do mesmo causou efeito contrário, maior volume e largura de espinhas dendríticas. Sendo assim, sugere-se que este microRNA possui importante papel

regulatório no desenvolvimento e função de sinapses excitatórias no hipocampo. Mais tarde, (JIMENEZ-MATEOS *et al.*, 2012) demonstraram que o silenciamento *in vivo* da expressão de mir-134 na região CA3 do hipocampo resultou em uma redução da densidade de espinhas dendríticas nesta região e diminuiu a recorrência de convulsões espontâneas em camundongos com *status epilepticus*. Desta maneira, pode-se inferir que a redução da expressão de miR-134 após o tratamento com pilocarpina pode afetar a densidade de espinhas dendríticas e trazer consequências comportamentais relacionadas a esta redução, associação esta já demonstrada na literatura (LEUNER; SHORS, 2013).

A respeito do miR-212, também reduzido após o tratamento com pilocarpina, foi demonstrado que ele está expresso em maior quantidade 2h após a indução de LTP (*long-term potentiation*) no hipocampo de ratos anestesiados (WIBRAND *et al.*, 2010), podendo então ser importante na sinaptogênese. Já o miR-214 foi encontrado em maior expressão no hipocampo de ratos submetidos ao protocolo de separação materna tratados com quetamina (O'CONNOR *et al.*, 2013), possivelmente colaborando para os efeitos antidepressivos deste fármaco. Logo, pode-se sugerir que ambos os microRNAs supracitados participam de processos neuronais importantes e também poderiam contrinuir no efeito causado pela pilocarpina.

A avaliação *in silico* através da análise KEGG mostrou que os 6 microRNAs que estão reduzidos após o tratamento com pilocarpina estão envolvidos na regulação da expressão de proteínas da via de sinalização das neurotrofinas. A este respeito, as neurotrofinas são uma família de proteínas identificadas inicialmente como fatores de sobrevivência de neurônios sensoriais e simpáticos e, desde então, tem sido mostrada a sua participação em muitos aspectos da sobrevivência, do desenvolvimento e na função dos neurônios nos sistemas nervoso periférico e central. As neurotrofinas atuam ativando um ou mais dos três membros da família de receptores de tirosina quinases (TrkA, TrkB e TrkC) e o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) é um membro da família do fator de necrose tumoral. Através dessa ativação, as neurotrofinas ativam *Ras*, fosfatidil inositol-3 (PI3), fosfolipase C-g1 e as vias de sinalização controladas por essas proteínas, tal como a das MAPquinases. A ativação do p75NTR resulta na ativação do fator nuclear *kappa* B (NF-kB) e *Jun* quinase assim como de outras vias de sinalização. A correta regulação das quantidades de neurotrofinas

durante o desenvolvimento controla o número de neurônios sobreviventes e garante uma correta destinação e densidade desses neurônios nas diferentes áreas encefálicas. Além disso, as neurotrofinas regulam a migração celular, o crescimento de axônios, a arborização dendrítica e a expressão de proteínas e neurotransmissores em novos neurônios no encéfalo adulto. Tem sido demonstrado que diversos distúrbios do SNC estão acompanhados de alterações na expressão destes fatores neurotróficos, como BDNF e o NGF e que mudanças estruturais no encéfalo acompanham este fenômeno (REICHARDT, 2006).

Por esta razão, investigou-se aqui a expressão de proteínas que fazem parte de diferentes níveis na via das neurotrofinas com o intuito de verificar se as alterações de microRNAs encontradas refletiriam uma alteração na expressão de proteínas que tem sua expressão regulada por estes microRNAs ou por etapas limitantes a estas proteínas.

O tratamento com pilocarpina não alterou a expressão das proteínas BDNF, ERK1/2, p38 e GSK3 β . Com este resultado sugere-se que a supressão dos microRNAs observada neste estudo parece não refletir na alteração da expressão das proteínas supracitadas, o que não exclui uma relação causal entre os microRNAs e as proteínas, uma vez que as proteínas foram avaliadas apenas em um espaço de tempo restrito de 30 dias após o tratamento com pilocarpina. A literatura mostra que, de maneira aguda, a dose de 150 mg/kg de pilocarpina aumenta a expressão de BDNF no hipocampo de ratos (DA PENHA BERZAGHI *et al.*, 1993), e esse aumento pode ser transitório, mas suficiente para estimular a divisão celular de células progenitoras e aumentar sua sobrevivência, o que observamos 30 dias após o tratamento. Além disso, a análise da expressão das proteínas e de miRNAs foi realizada em grupos independentes de animais e em condições laboratoriais diferentes, o que pode ter influenciado a expressão de ambos, dificultando esta comparação.

A última etapa do presente trabalho envolveu a investigação da composição da microbiota intestinal de ratos tratados com pilocarpina e seu grupo controle. Como foi visto anteriormente, o estudo do eixo encéfalo-intestino investiga a possível modulação que a composição da microbiota intestinal pode exercer sobre diferentes aspectos do comportamento. Resultados aqui obtidos sugerem que o grupo de animais tratados com pilocarpina apresentou uma composição de

microbiota intestinal muito semelhante ao grupo controle. As alterações encontradas em nível de filo e família aconteceram numa parcela muito pequena da total composição da microbiota, e, portanto, as mudanças comportamentais e de neurogênese encontradas com o tratamento com pilocarpina muito provavelmente não foram devidas a uma alteração na composição da microbiota intestinal destes ratos.

Em uma revisão publicada em 2011, Hasselmo e Sarter enfatizam que as ferramentas farmacológicas mais comumente utilizadas para estudar os efeitos centrais do sistema colinérgico se restringem aos fármacos que modulam o sistema colinérgico de maneira não seletiva como, por exemplo, os inibidores da acetilcolinesterase, os antagonistas não-seletivos de receptores muscarínicos e os agonistas não-seletivos de receptores nicotínicos. Além disso, eles pontuam que a maioria dos estudos falha em reconhecer a complexidade dos efeitos destes fármacos na transmissão colinérgica (HASSELMO; SARTER, 2011). A presente pesquisa ratifica esta preocupação, uma vez que mostra que uma intervenção farmacológica única pode trazer consequências biológicas importantes e duradouras, mesmo após a eliminação do fármaco do sistema. Isso ocorre devido à complexidade do sistema nervoso com seus diversos circuitos e respostas a estímulos ambientais.

8 Conclusão

Concluimos que o tratamento único com uma dose subconvulsivante e ansiogênica de pilocarpina aumenta o número de neurônios sobreviventes no giro denteado do hipocampo e provoca neurogênese ectópica. Sugerimos que este aumento traria como consequência uma má adaptação da circuitaria hipocampal, prejudicando seu funcionamento e trazendo as respostas comportamentais inadequadas observadas no modelo aqui desenvolvido, tais como o aumento da esquivas em testes de ansiedade e a diminuição do tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Em termos de mecanismos subjacentes, acredita-se que a ativação dos receptores muscarínicos presentes no hipocampo pode levar à ativação de receptores NMDA, que ativam o complexo cálcio/calmodulina estimulando a produção de neurotrofinas. As neurotrofinas por sua vez, estimulam a formação de novos neurônios e como os microRNAs que

regulam o desenvolvimento e a migração destes neurônios estão diminuídos pelo tratamento com pilocarpina, e a incorporação destes novos neurônios acaba ocorrendo de maneira aberrante.

Entretanto, com os dados aqui apresentados não se pode afirmar se há uma relação causal do aumento da neurogênese com as alterações comportamentais causadas pelo tratamento com pilocarpina. Estudos utilizando ferramentas que impeçam a formação destes novos neurônios, como o uso de raio-X, drogas antitumorais e/ou animais *knockdown* para proteínas limitantes deste fenômeno auxiliariam na busca de resposta a esta questão. Além disso, o aprofundamento nos mecanismos envolvidos na alteração dos microRNAs pode abrir uma nova perspectiva terapêutica para distúrbios do humor, uma vez que é crescente a evidência de que eles possuem importante papel regulatório no funcionamento do sistema nervoso central.

9 Referências

ABRAMS, Paul *et al.* Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. **British Journal of Pharmacology** v. 148, n. 5, p. 565-578 , jul. 2006.

ADDOLORATO, G *et al.* Inflammatory bowel disease: a study of the association between anxiety and depression, physical morbidity, and nutritional status. **Scandinavian Journal of Gastroenterology** v. 32, n. 10, p. 1013-1021 , out. 1997.

ADHIKARI, Avishek; TOPIWALA, Mihir A; GORDON, Joshua A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron** v. 65, n. 2, p. 257-269 , 28 jan. 2010.

AIT-BELGNAOUI, A *et al.* Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice. **Neurogastroenterology and Motility** v. 26, n. 4, p. 510-520 , abr. 2014.

ALTMAN, J; DAS, G D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **The Journal of Comparative Neurology** v. 124, n. 3, p. 319-335 , jun. 1965.

ALTMAN, J; DAS, G D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **The Journal of Comparative Neurology** v. 126, n. 3, p. 337-389 , mar. 1966.

ALTMAN, J; DAS, G D. Postnatal neurogenesis in the guinea-pig. **Nature** v. 214, n. 5093, p. 1098-1101 , 10 jun. 1967.

ALVAREZ-PELAEZ, R. Effects of fimbria-fornix lesion on avoidance conditioning in the rat. **Physiology & Behavior** v. 11, n. 5, p. 603-607 , nov. 1973.

AMAR, M *et al.* Blockade of different muscarinic receptor subtypes changes the equilibrium between excitation and inhibition in rat visual cortex. **Neuroscience** v. 169, n. 4, p. 1610-1620 , 15 set. 2010.

AMARAL, David G; SCHARFMAN, Helen E; LAVENEX, Pierre. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). **Progress in Brain Research** v. 163, p. 3-22 , 2007.

ASRICAN, Brent *et al.* Cholinergic Circuit Control of Postnatal Neurogenesis. **Neurogenesis (Austin, Tex.)** v. 3, n. 1 , 13 jan. 2016.

AUBERT, I *et al.* Cholinergic markers in aged cognitively impaired Long-Evans rats. **Neuroscience** v. 67, n. 2, p. 277-292 , jul. 1995.

BABILONI, Claudio *et al.* Hippocampal, amygdala, and neocortical synchronization of theta rhythms is related to an immediate recall during rey auditory verbal learning test. **Human Brain Mapping** v. 30, n. 7, p. 2077-2089 , jul. 2009.

BAI, Mei *et al.* Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. **Plos One** v. 7, n. 10, p. e46921 , 8 out. 2012.

BALAKATHIRESAN, Nagaraja S *et al.* Serum and amygdala microRNA signatures of posttraumatic stress: fear correlation and biomarker potential. **Journal of Psychiatric Research** v. 57, p. 65-73 , out. 2014.

BALLESTEROS, Carolina Irurita *et al.* Effect of dorsal and ventral hippocampal lesions on contextual fear conditioning and unconditioned defensive behavior induced by electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray. **Plos One** v. 9, n. 1, p. e83342 , 3 jan. 2014.

BARNEA, A; NOTTEBOHM, F. Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 91, n. 23, p. 11217-11221 , 8 nov. 1994.

BARTUS, R T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Experimental Neurology** v. 163, n. 2, p. 495-529 , jun. 2000.

BAXTER, M G *et al.* Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. **Neuroscience** v. 89, n. 3, p. 771-779 , mar. 1999.

BERNSTEIN, Emily *et al.* Dicer is essential for mouse development. **Nature Genetics** v. 35, n. 3, p. 215-217 , nov. 2003.

BOTTERILL, J J *et al.* Aberrant hippocampal neurogenesis after limbic kindling: Relationship to BDNF and hippocampal-dependent memory. **Epilepsy & Behavior** v. 47, p. 83-92 , jun. 2015.

BRIDGE, Jeffrey A *et al.* Clinical response and risk for reported suicidal ideation and suicide attempts in pediatric antidepressant treatment: a meta-analysis of randomized controlled trials. **The Journal of the American Medical Association** v. 297, n. 15, p. 1683-1696 , 18 abr. 2007.

CABIB, Simona; CAMPUS, Paolo; COLELLI, Valentina. Learning to cope with stress: psychobiological mechanisms of stress resilience. **Reviews in the neurosciences** v. 23, n. 5-6, p. 659-672 , 2012.

CAMERON, H A *et al.* Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. **Neuroscience** v. 56, n. 2, p. 337-344 , set. 1993.

CAMERON, H A; MCEWEN, B S; GOULD, E. Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the

dentate gyrus. **The Journal of Neuroscience** v. 15, n. 6, p. 4687-4692 , jun. 1995.

CAMERON, Heather A; GLOVER, Lucas R. Adult neurogenesis: beyond learning and memory. **Annual review of psychology** v. 66, p. 53-81 , 3 jan. 2015.

CAMERON, Michael C; ZHAN, Ren-Zhi; NADLER, J Victor. Morphologic integration of hilar ectopic granule cells into dentate gyrus circuitry in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **The Journal of Comparative Neurology** v. 519, n. 11, p. 2175-2192 , 1 ago. 2011.

CANTERAS, N S; SWANSON, L W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology** v. 324, n. 2, p. 180-194 , 8 out. 1992.

CARLETON, Alan *et al.* Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. **Nature Neuroscience** v. 6, n. 5, p. 507-518 , maio 2003.

CAVALHEIRO, E A *et al.* Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** v. 32, n. 6, p. 778-782 , dez. 1991.

CHANG, Qing; GOLD, Paul E. Switching memory systems during learning: changes in patterns of brain acetylcholine release in the hippocampus and striatum in rats. **The Journal of Neuroscience** v. 23, n. 7, p. 3001-3005 , 1 abr. 2003.

CHO, Kyung-Ok *et al.* Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. **Nature Communications** v. 6, p. 6606 , 26 mar. 2015.

CLEMENSON, Gregory D; DENG, Wei; GAGE, Fred H. Environmental enrichment and neurogenesis: from mice to humans. **Current opinion in behavioral sciences** v. 4, p. 56-62 , ago. 2015.

COHEN, N J; SQUIRE, L R. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. **Science (New York)** v. 210, n. 4466, p. 207-210 , 10 out. 1980.

COLUCCI-D'AMATO, Luca; DI PORZIO, Umberto. Neurogenesis in adult CNS: from denial to opportunities and challenges for therapy. **Bioessays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology** v. 30, n. 2, p. 135-145 , fev. 2008.

COOPER-KUHN, Christiana M; WINKLER, Jürgen; KUHN, H Georg. Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. **Journal of Neuroscience Research** v. 77, n. 2, p. 155-165 , 15 jul. 2004.

CRUMEYROLLE-ARIAS, Michèle *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. **Psychoneuroendocrinology** v. 42, p. 207-217 , abr. 2014.

CRYAN, John F; DINAN, Timothy G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. **Nature Reviews. Neuroscience** v. 13, n. 10, p. 701-712 , out. 2012.

CRYAN, John F; MARKOU, Athina; LUCKI, Irwin. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 23, n. 5, p. 238-245 , maio 2002.

CRYAN, John F; VALENTINO, Rita J; LUCKI, Irwin. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 29, n. 4-5, p. 547-569 , 2005.

DA PENHA BERZAGHI, M *et al.* Cholinergic regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) but not neurotrophin-3 (NT-3) mRNA levels in the developing rat

hippocampus. **The Journal of Neuroscience** v. 13, n. 9, p. 3818-3826 , set. 1993.

DASARI, Sameera; GULLEDGE, Allan T. M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. **Journal of Neurophysiology** v. 105, n. 2, p. 779-792 , fev. 2011.

DASH, P K; MACH, S A; MOORE, A N. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury. **Journal of Neuroscience Research** v. 63, n. 4, p. 313-319 , 15 fev. 2001.

DE KLOET, E R. Neurobiology of adaptation disorders. **Acta neuropsychiatrica** v. 11, n. 1, p. 11-14 , mar. 1999.

DE-MELLO, N; SOUZA-JUNIOR, I Q; CAROBREZ, A P. Pilocarpine prevents age-related spatial learning impairments in rats. **Behavioural Brain Research** v. 158, n. 2, p. 263-268 , 30 mar. 2005.

DENG, Wei; AIMONE, James B; GAGE, Fred H. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? **Nature Reviews. Neuroscience** v. 11, n. 5, p. 339-350 , maio 2010.

DENG, Wei; GAGE, Fred H. The effect of immature adult-born dentate granule cells on hyponeophagial behavior is related to their roles in learning and memory. **Frontiers in Systems Neuroscience** v. 9, p. 34 , 6 mar. 2015.

DESBONNET, Lieve *et al.* Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 48, p. 165-173 , ago. 2015.

DIAZ HEIJTZ, Rochellys *et al.* Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 108, n. 7, p. 3047-3052 , 15 fev. 2011.

DRAGUNOW, M; FAULL, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. **Journal of Neuroscience Methods** v. 29, n. 3, p. 261-265 , set. 1989.

DRANOVSKY, Alex; HEN, René. Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. **Biological Psychiatry** v. 59, n. 12, p. 1136-1143 , 15 jun. 2006.

DREVETS, Wayne C; ZARATE, Carlos A; FUREY, Maura L. Antidepressant effects of the muscarinic cholinergic receptor antagonist scopolamine: a review. **Biological Psychiatry** v. 73, n. 12, p. 1156-1163 , 15 jun. 2013.

DUARTE, Filipe S *et al.* Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety? **Psychopharmacology** v. 227, n. 2, p. 209-219 , maio 2013.

DUARTE, Filipe Silveira *et al.* NK1 receptors antagonism of dorsal hippocampus counteract the anxiogenic-like effects induced by pilocarpine in non-convulsive Wistar rats. **Behavioural Brain Research** v. 265, p. 53-60 , 15 maio 2014.

DUARTE, Filipe Silveira *et al.* Short- and long-term anxiogenic effects induced by a single injection of subconvulsant doses of pilocarpine in rats: investigation of the putative role of hippocampal pathways. **Psychopharmacology** v. 212, n. 4, p. 653-661 , dez. 2010.

DULAWA, Stephanie C; HEN, Rene. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 29, n. 4-5, p. 771-783 , 2005.

EDBAUER, Dieter *et al.* Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. **Neuron** v. 65, n. 3, p. 373-384 , 11 fev. 2010.

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

ESTANISLAU, Celio *et al.* Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. **Behavioural Processes** v. 86, n. 1, p. 46-51, jan. 2011.

EVANS, Ronald M. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. **Molecular Endocrinology** v. 19, n. 6, p. 1429-1438, jun. 2005.

FANSELOW, Michael S; DONG, Hong-Wei. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron** v. 65, n. 1, p. 7-19, 14 jan. 2010.

FONTANA, Xavier *et al.* Cell proliferation in the adult hippocampal formation of rodents and its modulation by entorhinal and fimbria-fornix afferents. **Cerebral Cortex** v. 16, n. 3, p. 301-312, mar. 2006.

FRIEDMAN, Robin C *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research** v. 19, n. 1, p. 92-105, jan. 2009.

GAGE, Fred H. Neurogenesis in the adult brain. **The Journal of Neuroscience** v. 22, n. 3, p. 612-613, 1 fev. 2002.

GAO, Fei *et al.* Dendritic morphology, synaptic transmission, and activity of mature granule cells born following pilocarpine-induced status epilepticus in the rat. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v. 9, p. 384, 7 out. 2015.

GAZARINI, L *et al.* Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. **Learning & Memory** v. 20, n. 4, p. 210-219, 19 mar. 2013.

GHEUSI, G *et al.* Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 97, n. 4, p. 1823-1828, 15 fev. 2000.

GIBNEY, S M *et al.* Colorectal distension-induced prefrontal cortex activation in the Wistar-Kyoto rat: implications for irritable bowel syndrome. **Neuroscience** v. 165, n. 3, p. 675-683 , 3 fev. 2010.

GLEESON, J G *et al.* Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. **Neuron** v. 23, n. 2, p. 257-271 , jun. 1999.

GOLDMAN, S A; NOTTEBOHM, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 80, n. 8, p. 2390-2394 , abr. 1983.

GOULD, E *et al.* Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neuroscience** v. 2, n. 3, p. 260-265 , mar. 1999.

GOULD, E *et al.* Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. **The Journal of Neuroscience** v. 17, n. 7, p. 2492-2498 , 1 abr. 1997.

GOULD, E *et al.* Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood. **Biological Psychiatry** v. 48, n. 8, p. 715-720 , 15 out. 2000.

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

GRAY, J A; MCNAUGHTON, N. Comparison between the behavioural effects of septal and hippocampal lesions: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 7, n. 2, p. 119-188 , 1983.

GRISHIN, Anton A; BENQUET, Pascal; GERBER, Urs. Muscarinic receptor stimulation reduces NMDA responses in CA3 hippocampal pyramidal cells via Ca²⁺-dependent activation of tyrosine phosphatase. **Neuropharmacology** v. 49, n. 3, p. 328-337 , set. 2005.

GURURAJAN, A *et al.* MicroRNAs as biomarkers for major depression: a role for let-7b and let-7c. **Translational psychiatry** v. 6, n. 8, p. e862 , 2 ago. 2016.

HAN, Jinju *et al.* Functional Implications of miR-19 in the Migration of Newborn Neurons in the Adult Brain. **Neuron** v. 91, n. 1, p. 79-89 , 6 jul. 2016.

HARAMATI, Sharon *et al.* MicroRNA as repressors of stress-induced anxiety: the case of amygdalar miR-34. **The Journal of Neuroscience** v. 31, n. 40, p. 14191-14203 , 5 out. 2011.

HARRISON, Virginia; MACKENZIE ROSS, Sarah. Anxiety and depression following cumulative low-level exposure to organophosphate pesticides. **Environmental Research** v. 151, p. 528-536 , nov. 2016.

HASSELMO, Michael E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Current Opinion in Neurobiology** v. 16, n. 6, p. 710-715 , dez. 2006.

HASSELMO, Michael E; SARTER, Martin. Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. **Neuropsychopharmacology** v. 36, n. 1, p. 52-73 , jan. 2011.

HERZOG, Christopher D *et al.* Microdialysis without acetylcholinesterase inhibition reveals an age-related attenuation in stimulated cortical acetylcholine release. **Neurobiology of Aging** v. 24, n. 6, p. 861-863 , out. 2003.

HOELLER, Alexandre A *et al.* The Role of Hippocampal NMDA Receptors in Long-Term Emotional Responses following Muscarinic Receptor Activation. **Plos One** v. 11, n. 1, p. e0147293 , 21 jan. 2016.

HOELLER, Alexandre Ademar *et al.* GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. **Brain Research** v. 1532, p. 21-31 , 26 set. 2013.

- IMAYOSHI, Itaru *et al.* Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. **Nature Neuroscience** v. 11, n. 10, p. 1153-1161 , out. 2008.
- ISSLER, Orna; CHEN, Alon. Determining the role of microRNAs in psychiatric disorders. **Nature Reviews. Neuroscience** v. 16, n. 4, p. 201-212 , abr. 2015.
- JEON, Won Je *et al.* The Role of Muscarinic Receptors in the Pathophysiology of Mood Disorders: A Potential Novel Treatment? **Current neuropharmacology** v. 13, n. 6, p. 739-749 , 2015.
- JIMENEZ-MATEOS, Eva M *et al.* Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. **Nature Medicine** v. 18, n. 7, p. 1087-1094 , jul. 2012.
- KANEKO, Naoko; OKANO, Hideyuki; SAWAMOTO, Kazunobu. Role of the cholinergic system in regulating survival of newborn neurons in the adult mouse dentate gyrus and olfactory bulb. **Genes To Cells** v. 11, n. 10, p. 1145-1159 , out. 2006.
- KAWAHARA, Hironori; IMAI, Takao; OKANO, Hideyuki. MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. **Frontiers in Neuroscience** v. 6, p. 30 , 12 mar. 2012.
- KEMPERMANN, Gerd. Adult neurogenesis: an evolutionary perspective. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** v. 8, n. 2, p. a018986 , fev. 2016.
- KEMPERMANN, Gerd; WISKOTT, Laurenz; GAGE, Fred H. Functional significance of adult neurogenesis. **Current Opinion in Neurobiology** v. 14, n. 2, p. 186-191 , abr. 2004.
- KERNIE, Steven G; PARENT, Jack M. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. **Neurobiology of Disease** v. 37, n. 2, p. 267-274 , fev. 2010.

KHEIRBEK, Mazen A *et al.* Neurogenesis and generalization: a new approach to stratify and treat anxiety disorders. **Nature Neuroscience** v. 15, n. 12, p. 1613-1620 , dez. 2012.

KLEIN, Sabine *et al.* Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology** v. 263, p. 263-271 , jan. 2015.

KOTANI, S *et al.* Pharmacological evidence of cholinergic involvement in adult hippocampal neurogenesis in rats. **Neuroscience** v. 142, n. 2, p. 505-514 , 13 out. 2006.

KUBOVÁ, H; MAREŠ, P. Are morphologic and functional consequences of status epilepticus in infant rats progressive? **Neuroscience** v. 235, p. 232-249 , 3 abr. 2013.

LANG, Ming-Fei; SHI, Yanhong. Dynamic Roles of microRNAs in Neurogenesis. **Frontiers in Neuroscience** v. 6, p. 71 , 21 maio 2012.

LESTING, Jörg *et al.* Impaired extinction of fear and maintained amygdala-hippocampal theta synchrony in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia** v. 52, n. 2, p. 337-346 , fev. 2011.

LEUNER, B; SHORS, T J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience** v. 251, p. 108-119 , 22 out. 2013.

LEVONE, Brunno R.; CRYAN, John F.; O'LEARY, Olivia F. Role of adult hippocampal neurogenesis in stress resilience. **Neurobiology of stress** v. 1, p. 147-155 , jan. 2015.

LI, Shiyong *et al.* Let-7 microRNAs regenerate peripheral nerve regeneration by targeting nerve growth factor. **Molecular Therapy** v. 23, n. 3, p. 423-433 , mar. 2015.

LIU, Changmei; ZHAO, Xinyu. MicroRNAs in adult and embryonic neurogenesis. **Neuromolecular Medicine** v. 11, n. 3, p. 141-152 , 14 jul. 2009.

LOPES, Mark William *et al.* Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior** v. 55, p. 92-100 , fev. 2016.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology** v. 8, n. 6-7, p. 523-532 , nov. 1997.

MA, W *et al.* Acetylcholine stimulates cortical precursor cell proliferation in vitro via muscarinic receptor activation and MAP kinase phosphorylation. **The European Journal of Neuroscience** v. 12, n. 4, p. 1227-1240 , abr. 2000.

MALBERG, J E *et al.* Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience** v. 20, n. 24, p. 9104-9110 , 15 dez. 2000.

MALBERG, Jessica E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. **Journal of Psychiatry & Neuroscience** v. 29, n. 3, p. 196-205 , maio 2004.

MARK, G P; RADA, P V; SHORS, T J. Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. **Neuroscience** v. 74, n. 3, p. 767-774 , out. 1996.

MAZARATI, Andrey M *et al.* Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease** v. 34, n. 3, p. 457-461 , jun. 2009.

MAZZARELLO, P; CALLIGARO, A L; CALLIGARO, A. Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology** v. 2, n. 10, p. 776-781 , out. 2001.

MCEWEN, B S; SAPOLSKY, R M. Stress and cognitive function. **Current Opinion in Neurobiology** v. 5, n. 2, p. 205-216 , abr. 1995.

MCEWEN, Bruce S; GRAY, Jason D; NASCA, Carla. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. **The Journal of Endocrinology** v. 226, n. 2, p. T67-83 , ago. 2015.

MCINTYRE, Christa K *et al.* Competition between memory systems: acetylcholine release in the hippocampus correlates negatively with good performance on an amygdala-dependent task. **The Journal of Neuroscience** v. 22, n. 3, p. 1171-1176 , 1 fev. 2002.

MEERSON, Ari *et al.* Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions. **Journal of Molecular Neuroscience** v. 40, n. 1-2, p. 47-55 , jan. 2010.

MELLIOS, Nikolaos *et al.* A set of differentially expressed miRNAs, including miR-30a-5p, act as post-transcriptional inhibitors of BDNF in prefrontal cortex. **Human Molecular Genetics** v. 17, n. 19, p. 3030-3042 , 1 out. 2008.

MELLO, Andrea Feijo *et al.* [Depression and stress: is there an endophenotype?]. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)** v. 29 Suppl 1, p. S13-8 , maio 2007.

MERALI, Zul; LEVAC, Carla; ANISMAN, Hymie. Validation of a simple, ethologically relevant paradigm for assessing anxiety in mice. **Biological Psychiatry** v. 54, n. 5, p. 552-565 , 1 set. 2003.

MEZADRI, T J *et al.* Repeated rat-forced swim test: reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods** v. 195, n. 2, p. 200-205 , 15 fev. 2011.

MINEUR, Yann S *et al.* Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 110, n. 9, p. 3573-3578 , 26 fev. 2013.

MINEUR, Yann S; PICCIOTTO, Marina R. Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 31, n. 12, p. 580-586 , dez. 2010.

MIZOGUCHI, K *et al.* Effect of chronic stress on cholinergic transmission in rat hippocampus. **Brain Research** v. 915, n. 1, p. 108-111 , 5 out. 2001.

MOLENDIJK, Marc L; DE KLOET, E Ronald. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. **Psychoneuroendocrinology** v. 62, p. 389-391 , dez. 2015.

MOLONEY, Rachel D *et al.* Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis in Visceral Pain: Relevance to Irritable Bowel Syndrome. **CNS Neuroscience & Therapeutics** v. 22, n. 2, p. 102-117 , fev. 2016.

MOSER, E; MOSER, M B; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **The Journal of Neuroscience** v. 13, n. 9, p. 3916-3925 , set. 1993.

MOSER, M B *et al.* Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 92, n. 21, p. 9697-9701 , 10 out. 1995.

MU, Yangling; LEE, Star W; GAGE, Fred H. Signaling in adult neurogenesis. **Current Opinion in Neurobiology** v. 20, n. 4, p. 416-423 , ago. 2010.

MULLEN, R J; BUCK, C R; SMITH, A M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **Development** v. 116, n. 1, p. 201-211 , set. 1992.

MUSCAT, R; PAPP, M; WILLNER, P. Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. **Biological Psychiatry** v. 31, n. 9, p. 937-946 , 1 maio 1992.

MYERS, Catherine E; BERMUDEZ-HERNANDEZ, Keria; SCHARFMAN, Helen E. The influence of ectopic migration of granule cells into the hilus on dentate gyrus-CA3 function. **Plos One** v. 8, n. 6, p. e68208 , 28 jun. 2013.

MYHRER, Trond; ENGER, Siri; AAS, Pål. Anticonvulsant efficacy of drugs with cholinergic and/or glutamatergic antagonism microinfused into area tempestas of rats exposed to soman. **Neurochemical Research** v. 33, n. 2, p. 348-354 , fev. 2008.

NAGAO, T; ALONSO, A; AVOLI, M. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. **Neuroscience** v. 72, n. 2, p. 399-408 , maio 1996.

NARLA, Sridhar T *et al.* Activation of developmental nuclear fibroblast growth factor receptor 1 signaling and neurogenesis in adult brain by $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist. **Stem cells translational medicine** v. 2, n. 10, p. 776-788 , out. 2013.

NOKIA, Miriam S *et al.* Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **The Journal of Physiology** v. 594, n. 7, p. 1855-1873 , 1 abr. 2016.

O'CONNOR, Richard M *et al.* microRNAs as novel antidepressant targets: converging effects of ketamine and electroconvulsive shock therapy in the rat hippocampus. **The International Journal of Neuropsychopharmacology** v. 16, n. 8, p. 1885-1892 , set. 2013.

O'KEEFE, John; NADEL, Lynn. Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. **Behavioral and Brain Sciences** v. 2, n. 04, p. 487-494 , dez. 1979.

O'LEARY, Olivia F; CRYAN, John F. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 35, n. 12, p. 675-687 , dez. 2014.

O'MAHONY, S M *et al.* Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. **Behavioural Brain Research** v. 277, p. 32-48 , 15 jan. 2015.

OGBONNAYA, Ebere S *et al.* Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. **Biological Psychiatry** v. 78, n. 4, p. e7-9 , 15 ago. 2015.

OKAICHI, Y; OKAICHI, H. Effects of fimbria-fornix lesions on avoidance tasks with temporal elements in rats. **Physiology & Behavior** v. 56, n. 4, p. 759-765 , out. 1994.

OLTON, D S. The function of septo-hippocampal connections in spatially organized behaviour. **Ciba Foundation symposium** n. 58, p. 327-349 , 1977.

OSTEN, P.; WISDEN, W.; SPRENGEL, R. Molecular Mechanisms of Synaptic Function in the Hippocampus: Neurotransmitter Exocytosis and Glutamatergic, GABAergic, and Cholinergic Transmission. **The hippocampus** . [S.l.: s.n.], 2007.

PAPP, M; WILLNER, P; MUSCAT, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. **Psychopharmacology** v. 104, n. 2, p. 255-259 , 1991.

PARENT, J M *et al.* Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **The Journal of Neuroscience** v. 17, n. 10, p. 3727-3738 , 15 maio 1997.

PATTERSON, Elaine *et al.* Gut microbiota, obesity and diabetes. **Postgraduate Medical Journal** v. 92, n. 1087, p. 286-300 , maio 2016.

PAUL, Saswati *et al.* Interaction of basal forebrain cholinergic neurons with the glucocorticoid system in stress regulation and cognitive impairment. **Frontiers in aging neuroscience** v. 7, p. 43 , 2 abr. 2015.

PICCIOTTO, M R *et al.* Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. **Neuropsychopharmacology** v. 22, n. 5, p. 451-465 , maio 2000.

PORSOLT, R D *et al.* Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology** v. 47, n. 4, p. 379-391 , 15 fev. 1978.

PORSOLT, R D; LE PICHON, M; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature** v. 266, n. 5604, p. 730-732 , 21 abr. 1977.

POSSAMAI, Fernanda *et al.* Influence of enrichment on behavioral and neurogenic effects of antidepressants in Wistar rats submitted to repeated forced swim test. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 58, p. 15-21 , 3 abr. 2015.

POWERS, Alice Schade. Adult neurogenesis in mammals and nonmammals. Commentary on Kempermann G (2012): new neurons for “survival of the fittest”. *Nat Rev Neurosci* 13:727-736. **Brain, Behavior and Evolution** v. 81, n. 4, p. 206-208 , 25 maio 2013.

PREDIGER, R D; DE-MELLO, N; TAKAHASHI, R N. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. **European Journal of Pharmacology** v. 531, n. 1-3, p. 176-182 , 15 fev. 2006.

REHFELD, Frederick *et al.* Lin28 and let-7: ancient milestones on the road from pluripotency to neurogenesis. **Cell and Tissue Research** v. 359, n. 1, p. 145-160 , jan. 2015.

REICHARDT, Louis F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** v. 361, n. 1473, p. 1545-1564 , 29 set. 2006.

RISBUD, Rashmi M; PORTER, Brenda E. Changes in microRNA expression in the whole hippocampus and hippocampal

synaptoneurosome fraction following pilocarpine induced status epilepticus. **Plos One** v. 8, n. 1, p. e53464 , 7 jan. 2013.

RYAN, Brigid; JOILIN, Greig; WILLIAMS, Joanna M. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. **Frontiers in Molecular Neuroscience** v. 8, p. 4 , 23 fev. 2015.

SALOMÉ, Nicolas *et al.* Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. **Biological Psychiatry** v. 55, n. 7, p. 715-723 , 1 abr. 2004.

SAMUELS, Benjamin Adam *et al.* Modeling treatment-resistant depression. **Neuropharmacology** v. 61, n. 3, p. 408-413 , set. 2011.

SARTER, Martin; PARIKH, Vinay; HOWE, W Matthew. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. **Nature Reviews. Neuroscience** v. 10, n. 5, p. 383-390 , maio 2009.

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

SCHARFMAN, Helen E. Functional implications of seizure-induced neurogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology** v. 548, p. 192-212 , 2004.

SCHARFMAN, Helen E; HEN, Rene. Neuroscience. Is more neurogenesis always better? **Science (New York)** v. 315, n. 5810, p. 336-338 , 19 jan. 2007.

SCHARFMAN, Helen E; PIERCE, Joseph P. New insights into the role of hilar ectopic granule cells in the dentate gyrus based on quantitative anatomic analysis and three-dimensional reconstruction. **Epilepsia** v. 53 Suppl 1, p. 109-115 , jun. 2012.

SCHLIEBS, R; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission** v. 113, n. 11, p. 1625-1644 , nov. 2006.

SCHRATT, Gerhard M *et al.* A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. **Nature** v. 439, n. 7074, p. 283-289 , 19 jan. 2006.

SCORZA, Fulvio A *et al.* The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? **Anais da Academia Brasileira de Ciencias** v. 81, n. 3, p. 345-365 , set. 2009.

SCOTT, Karen A *et al.* Thinking small: towards microRNA-based therapeutics for anxiety disorders. **Expert Opinion on Investigational Drugs** v. 24, n. 4, p. 529-542 , abr. 2015.

SCOVILLE, W B; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry** v. 20, n. 1, p. 11-21 , fev. 1957.

SEO, Dong-Oh *et al.* Adult Hippocampal Neurogenesis Modulates Fear Learning through Associative and Nonassociative Mechanisms. **The Journal of Neuroscience** v. 35, n. 32, p. 11330-11345 , 12 ago. 2015.

SHI, Yanhong *et al.* Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. **Nature** v. 427, n. 6969, p. 78-83 , 1 jan. 2004.

SHI, Yanhong *et al.* MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. **The Journal of Neuroscience** v. 30, n. 45, p. 14931-14936 , 10 nov. 2010.

SIERRA, A; ENCINAS, J M; MALETIC-SAVATIC, M. Adult human neurogenesis: from microscopy to magnetic resonance imaging. **Frontiers in Neuroscience** v. 5, p. 47 , 4 abr. 2011.

SIMON, Mária; CZÉH, Boldizsár; FUCHS, Eberhard. Age-dependent susceptibility of adult hippocampal cell proliferation to chronic

psychosocial stress. **Brain Research** v. 1049, n. 2, p. 244-248 , 12 jul. 2005.

SLATTERY, David A; CRYAN, John F. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources** v. 55, n. 2, p. 297-309 , 2014.

SLATTERY, David A; MARKOU, Athina; CRYAN, John F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology** v. 190, n. 4, p. 555-568 , mar. 2007.

SMALHEISER, Neil R *et al.* MicroRNA expression in rat brain exposed to repeated inescapable shock: differential alterations in learned helplessness vs. non-learned helplessness. **The International Journal of Neuropsychopharmacology** v. 14, n. 10, p. 1315-1325 , nov. 2011.

SMALL, Keri M *et al.* Ventral tegmental area muscarinic receptors modulate depression and anxiety-related behaviors in rats. **Neuroscience Letters** v. 616, p. 80-85 , 11 mar. 2016.

SMOLDERS, I *et al.* Effectiveness of vigabatrin against focally evoked pilocarpine-induced seizures and concomitant changes in extracellular hippocampal and cerebellar glutamate, gamma-aminobutyric acid and dopamine levels, a microdialysis-electrocorticography study in freely moving rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 283, n. 3, p. 1239-1248 , dez. 1997.

SQUIRE, L R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological Review** v. 99, n. 2, p. 195-231 , abr. 1992.

STRANGE, Bryan A *et al.* Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews. Neuroscience** v. 15, n. 10, p. 655-669 , out. 2014.

SU, X *et al.* TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. **Cell Stem Cell** v. 5, n. 1, p. 64-75 , 2 jul. 2009.

TANAPAT, P *et al.* Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. **The Journal of Neuroscience** v. 19, n. 14, p. 5792-5801 , 15 jul. 1999.

THIERRY, Bernard *et al.* Searching—waiting strategy: A candidate for an evolutionary model of depression? **Behavioral and Neural Biology** v. 41, n. 2, p. 180-189 , jul. 1984.

THORED, Pär *et al.* Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. **Stem Cells** v. 24, n. 3, p. 739-747 , mar. 2006.

UCHIDA, Shusaku *et al.* Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. **The European Journal of Neuroscience** v. 27, n. 9, p. 2250-2261 , maio 2008.

VAN DER BORGHT, Karin *et al.* Input from the medial septum regulates adult hippocampal neurogenesis. **Brain Research Bulletin** v. 67, n. 1-2, p. 117-125 , 30 set. 2005.

VEENA, J *et al.* Oxotremorine treatment restores hippocampal neurogenesis and ameliorates depression-like behaviour in chronically stressed rats. **Psychopharmacology** v. 217, n. 2, p. 239-253 , set. 2011.

VIEIRA, Cíntia *et al.* Frequency of climbing behavior as a predictor of altered motor activity in rat forced swimming test. **Neuroscience Letters** v. 445, n. 2, p. 170-173 , 14 nov. 2008.

VO, Ngan *et al.* A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 102, n. 45, p. 16426-16431 , 8 nov. 2005.

WANG, Jing-Wen *et al.* Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. **The Journal of Neuroscience** v. 28, n. 6, p. 1374-1384 , 6 fev. 2008.

WESS, Jürgen; EGLIN, Richard M; GAUTAM, Dinesh. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews. Drug Discovery** v. 6, n. 9, p. 721-733 , set. 2007.

WIBRAND, Karin *et al.* Differential regulation of mature and precursor microRNA expression by NMDA and metabotropic glutamate receptor activation during LTP in the adult dentate gyrus in vivo. **The European Journal of Neuroscience** v. 31, n. 4, p. 636-645 , fev. 2010.

YAMASAKI, Miwako; MATSUI, Minoru; WATANABE, Masahiko. Preferential localization of muscarinic M1 receptor on dendritic shaft and spine of cortical pyramidal cells and its anatomical evidence for volume transmission. **The Journal of Neuroscience** v. 30, n. 12, p. 4408-4418 , 24 mar. 2010.

YAN, Shaofeng *et al.* Let-7f Inhibits Glioma Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Targeting Periostin. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 116, n. 8, p. 1680-1692 , ago. 2015.

ZAFRA, F *et al.* Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. **The EMBO Journal** v. 9, n. 11, p. 3545-3550 , nov. 1990.

ZAFRA, F *et al.* Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 88, n. 22, p. 10037-10041 , 15 nov. 1991.

ZAFRA, F *et al.* Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. **The Journal of Neuroscience** v. 12, n. 12, p. 4793-4799 , dez. 1992.

ZHAN, Ren-Zhi; TIMOFEEVA, Olga; NADLER, J Victor. High ratio of synaptic excitation to synaptic inhibition in hilar ectopic granule cells

of pilocarpine-treated rats. **Journal of Neurophysiology** v. 104, n. 6, p. 3293-3304 , dez. 2010.

ZHANG, N *et al.* MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. **Oncogene** v. 33, n. 24, p. 3119-3128 , 12 jun. 2014.

ZHANG, Qian *et al.* Role of microRNA 30a targeting insulin receptor substrate 2 in colorectal tumorigenesis. **Molecular and Cellular Biology** v. 35, n. 6, p. 988-1000 , mar. 2015.

ZHAO, Chunnian *et al.* A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. **Nature Structural & Molecular Biology** v. 16, n. 4, p. 365-371 , abr. 2009.

Apêndice A
Publicações Relacionadas ao Doutorado:

Artigos Publicados

HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; DUARTE, F.S.; LEME, L.R.; **COSTA, APR**; SANTOS, E.C.S.; DE PIERI, C.H.; DOS SANTOS, A.A.; NAIME, A.A.; FARINA, M.; DE LIMA, T.C.M. GABA-A receptor modulators alter emotionality and hippocampal theta rhythm in an animal model of long-lasting anxiety. *Brain Research* v.1532, p.21–31, 2013.

HOELLER, A.A.; **COSTA, A.P.R.**, BICCA M.A.; MATHEUS, F.C.; LACH, G.; SPIGA, F.; LIGHTMAN, S.L.; WALZ R.; COLLINGRIDGE, G.L.; BORTOLOTTI, Z.A.; DE LIMA, T.C.M. The role of hippocampal NMDA receptors in long-term emotional responses following muscarinic receptor activation. *Plos One* 11(1), 2016.

Artigos em preparação

COSTA, A.P.R.; LEVONE, B.R.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.L.; DINAN, T.G., O’LEARY, O.F.; DE LIMA, T.C.M.; CRYAN, J.F. Aberrant neurogenesis induced by non-convulsant dose of pilocarpine – A ser submetido para a revista **Journal of Neuroscience**. Fator de Impacto: 5.9

COSTA, A.P.R.; GUARURAJAN, A.; MOLONEY, G., LINO-DE-OLIVEIRA, C.L.; DINAN, T.G., DE LIMA, T.C.M.; CRYAN, J.F. MicroRNA expression after a single treatment with an anxiogenic dose of pilocarpine in rats – A ser submetido à revista **Behavior Brain Research**. Fator de Impacto:3.02

Resumos em Eventos

COSTA, A.P.R.; GUARURAJAN, A.; MOLONEY, G., LINO-DE-OLIVEIRA, C.L.; DINAN, T.G., DE LIMA, T.C.M.; CRYAN, J.F. MicroRNA expression after a single treatment with an anxiogenic dose of pilocarpine in rats. 29th ECNP Congress, 2016 - Áustria. **CDE Grant Winner**.

COSTA, A.P.R.; LEVONE, B.R., LINARTEVICH, V.F.; VANZ F., BOUTAUD, C.A.V.; VALENZUELA, C.M.Q.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DINAN, T.G.; O'LEARY, O.; CRYAN, J.F.; DE LIMA, T.C.M.

Does aberrant hippocampal neurogenesis affect rat's behavior in different behavioral tests? IBNS meeting 2016, Budapeste – Hungria, 2016.

COSTA, A.P.R.; HOELLER, A.A.; VAZ, J.D.C.; DE PIERI, C.H.; LINO-DEOLIVEIRA, C.L.; CRYAN, J.F.; DE LIMA, T.C.M.
Pilocarpine: a novel pharmacological animal model for anxiety-related disorders? 9th IBRO World Congress of Neuroscience, Rio de Janeiro, 2015.

COSTA, A.P.R.; LEVONE, B.R.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.L.; DINAN, T.G., O'LEARY, O.F.; DE LIMA, T.C.M.; CRYAN, J.F.
Hippocampal neuronal activation and neurogenesis induced by pilocarpine in a pharmacological model of anxiety. Society for Neuroscience Annual Meeting, **IBRO/SfN Travel Award Winner**, Chicago, 2015.