

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

QUERUSCHE KLIPPEL ZANONA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA MT3 NA PLASTICIDADE SINÁPTICA DE
LONGA DURAÇÃO E INTERAÇÕES COM A SINALIZAÇÃO GABAÉRGICA EM
HIPOCAMPO DORSAL PELA ELETROFISIOLOGIA *IN VIVO*
EM ANIMAL ANESTESIADO**

PORTO ALEGRE

2015

QUERUSCHE KLIPPEL ZANONA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA MT3 NA PLASTICIDADE SINÁPTICA DE
LONGA DURAÇÃO E INTERAÇÕES COM A SINALIZAÇÃO GABAÉRGICA EM
HIPOCAMPO DORSAL PELA ELETROFISIOLOGIA *IN VIVO*
EM ANIMAL ANESTESIADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Área de concentração: memória – modulação muscarínica da plasticidade sináptica

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre

2015

Dedico este trabalho àqueles que sempre estiveram presentes nos momentos de alegrias e desafios e que, assim espero, ainda farão parte por uma longa jornada na vida:

À minha mãe, meu pai e minha irmã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Jorge Alberto Quillfeldt pela oportunidade, paciência e confiança.

Aos meus colegas de laboratório pelas contribuições e discussões. Obrigada também pela parceria e companheirismo em especial durante noites, finais de semana e feriados no Campus do Vale. Aos colegas Flávia Boss, Adriano Machado, Lizeth Predaza pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade que deram de lhes ensinar um pouco do que eu sei, pois ensinando me desafiaram a aprender muito mais.

Às amigas Johanna Duran, Ana Crestani e Fabiana Santana por todo o auxílio nos experimentos e por fazerem do nosso trabalho um estilo de vida, proporcionando discussões intrigantes.

Aos amigos Tiago Salomon e Débora Rodrigues pelos conselhos e suporte nesta jornada.

Ao Leonardo Gutterres pelos ensinamentos técnicos, companheirismo e, mais recentemente, pela parceria que me incentivou a retomar forças rumo a conclusão do presente trabalho.

À Mayara Pasquetti, pelo desenho gradeado do hipocampo, pela ideia do Piramidalis e a cooperação em programação com Matlab.

Um agradecimento em especial à minha coorientadora e mentora a Professora Maria Elisa Calcagnotto pelo apoio nos momentos de incerteza, pelos desafios intrigantes, pelos momentos de reflexão profunda e, principalmente, pelos vastos ensinamentos tanto na ciência, quanto na vida.

À SBNeC pela possibilidade de participar no curso de introdução ao Matlab que tornou este trabalho ainda mais rico e interessante.

Aos organizadores do Latin American School for Computational Neurosciences (Lascon) que me aceitaram como uma de suas alunas e me possibilitaram iniciar um aprofundamento nas neurociências computacionais, a qual tenho um particular carinho. Aos colegas Lasconianos pelas experiências e companheirismo durante o curso e, em especial, a Josiane Freitas pela amizade e confiança que perduram após o mesmo.

À Direção e colegas do Ceclimar por me propiciarem um ambiente rico de possibilidades e o desafio da conciliação das necessidades vida com os interesses pessoais, me levando a um novo patamar de crescimento pessoal.

Aos professores, alunos e laboratórios dos departamentos de bioquímica, biofísica, morfologia e farmacologia pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Neurociências e seus integrantes pelos vastos conhecimentos adquiridos durante o curso, pelo apoio na realização do projeto, pela cooperação entre os laboratórios e, finalmente pela oportunidade de finalização deste trabalho.

Obrigada!

*“A natureza é a fonte do verdadeiro conhecimento.
Ela tem lógica e leis próprias, não há efeito sem causa
nem invenção sem necessidade”*

– Leonardo da Vinci

RESUMO

A sinalização muscarínica exerce função modulatória sobre diferentes aspectos da cognição e emoções. Todos os cinco subtipos de receptores muscarínicos (mAChR), M₁ a M₅, são expressos no hipocampo de mamíferos e são ativados de forma sobreposta pela maioria dos fármacos, dificultando avanços significativos na compreensão da contribuição de cada componente desse sistema. A toxina muscarínica 3 (MT3) é um antagonista seletivo para o subtipo M₄, permitindo a investigação das ações modulatórias deste receptor no aprendizado, memória e plasticidade sináptica. Os M₄ são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que atuam via G_{i/o} desencadeando efeitos inibitórios sobre as células em que estão presentes. Estudos comportamentais anteriores indicam que a administração de MT3 imediatamente após o treino em uma tarefa aversiva produz efeito amnésico, enquanto que a administração antes da evocação, causa facilitação. Uma explicação para estes resultados é que os circuitos locais envolvidos na consolidação e na evocação da memória diferem em sua natureza. Nesse contexto, sugere-se que o efeito amnésico da MT3 sobre a consolidação seja consequência da supressão da inibição de interneurônios GABAérgicos; enquanto que na evocação, esse efeito se daria sobre as sinapses glutamatérgicas. Assim, no presente trabalho, com o objetivo de investigar como o receptor M₄ modula a plasticidade sináptica de longa duração e interage com uma dessas sinalizações, no caso a GABAérgica, utilizou-se a técnica de eletrofisiologia *in vivo* de hipocampo de ratos anestesiados. Para tanto, foram realizados registros extracelulares do potencial excitatório pós-sináptico de campo (fEPSP) de CA1 evocados por estimulação contralateral da via Colateral de Schaffer com infusão dos fármacos 15 min antes ou depois da estimulação elétrica de alta ou baixa frequência (HFS: 10 trens 0,5 Hz, 20 pulsos 100 Hz; ou LFS: 600 pulsos 1 Hz, respectivamente). MT3 (4,0 µg/µl), bicuculina (0,06 µg/µl), baclofen (0,2 µg/µl) e veículo, isoladamente ou combinados, não alteraram a amplitude da resposta evocada basal ou a facilitação por pulso pareado (FPP) 15 min após a infusão. MT3 aparentemente atenuou, mas não de forma significativa, a potenciação de longa duração (LTP) em relação ao controle (potenciação 60 min após a HFS de 31,8% e 66,0%, respectivamente). Além disso, não houve diferença significativa entre a amplitude do fEPSP no período basal e 60 min após a HFS sob ação da MT3. Bicuculina, embora não tenha abolido a LTP e nem causado alteração na FPP, produziu uma potenciação de apenas 36,4%. Baclofen promoveu uma potenciação semelhante à dos controles. A administração de baclofen também reduziu significativamente a FPP em relação ao basal. A administração conjunta de MT3 com bicuculina ou baclofen promoveu uma potenciação semelhante ao

controle. MT3 não apresentou efeito sobre a manutenção da LTP quando aplicada 15 min após a HFS. Por fim, não foi possível induzir a depressão de longa duração (LTD) com o protocolo de LFS utilizado. Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa entre os grupos devido ao baixo número de animais utilizados, os dados sugerem a possibilidade de uma amplitude reduzida da LTP quando da injeção de bicuculina. Baclofen alterou a FPP em relação ao fEPSP basal, o mesmo não tendo sido observado no grupo controle. Com a administração concomitante de MT3, tais alterações deixam de ser identificadas. Ainda que os achados experimentais sejam inconclusivos e preliminares, este trabalho permitiu a padronização da técnica de eletrofisiologia *in vivo* em animal anestesiado o que abre portas para futuras investigações.

Palavras-chave: Receptor muscarínico M₄, MT3, Hipocampo, Potenciação de longa duração, Plasticidade sináptica, Interneurônios GABAérgicos, Eletrofisiologia extracelular, Memória.

ABSTRACT

The cholinergic muscarinic system exerts modulatory function over different aspects of cognition and emotion. All five muscarinic receptors subtypes (mAChR), M₁ to M₅, are expressed at mammals hippocampus and at least two of them are simultaneously activated by most of the drugs, hindering significant advances on the role of each component of this system. The muscarinic toxin 3 (MT3) is a selective antagonist for the M₄ subtype, allowing the investigation of the modulatory actions of this receptor over learning, memory and synaptic plasticity. The M₄ are G protein coupled receptors (GPCRs) that act through G_{i/o} triggering inhibitory effects on which cells they are occur. Previous behavioral studies have shown that administration of MT3 soon after aversive task training exerts amnesic effects over memory, while administration prior to recall, leads to facilitation. A possible explanation to these results could be that the local circuits involved on memory consolidation and recall are different in nature. On this perspective, the amnesic effect of MT3 over memory consolidation should be consequence of GABAergic interneurons inhibition suppression; while the effect on recall, should be over glutamatergic synapses modulation. Thereby, the present work, with the objective to investigate how the M₄ receptor modulates long-term synaptic plasticity and interacts with the GABAergic system, *in vivo* electrophysiological approach of anesthetized rats' hippocampus was applied. Hence, field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) from CA1 were recorded after stimulation of contralateral Schaffer Collateral pathway with drugs infusion 15 min before or after high or low frequency electric stimulation (HFS: 10 trains 0.5 Hz, 20 pulses 100 Hz; LFS: 600 pulses 1 Hz, respectively). Neither MT3 (4.00 µg/µl), bicuculline (0.06 µg/µl), baclofen (0.20 µg/µl) nor vehicle, isolated or combined, changed the baseline evoked response amplitude 15 min after infusion nor the paired-pulse facilitation ratio (PPF). MT3 apparently attenuated, but not significantly, the long-term potentiation (LTP) compared to control (31.8% and 66.0% potentiation 60 min after HFS, respectively). In addition, there was no significant difference between baseline and 60 min after HFS fEPSP amplitude at MT3 group. Bicuculline, although did not abolish LTP neither changed PPF, it did produce a potentiation of only 36.4%. Baclofen induced a potentiation similar to control group. Baclofen administration also significantly reduced PPF compared to baseline. The simultaneous administration of MT3 and bicuculline or baclofen led to a potentiation similar to the control group. MT3 did not show any effect over LTP maintenance when applied 15 min after HFS. Lastly, it was not possible to induce long-term depression (LTD) with the used LFS protocol. Although there was no statistical significance

between groups due to the low animal numbers used, data suggest that bicuculline had reduced LTP amplitude. Baclofen did alter PPF and the same was not observed on control group. When bicuculline or baclofen were injected with MT3, those alterations were not observed. These are inconclusive and preliminary results, notwithstanding this work allowed to set up the *in vivo* electrophysiology technique in anesthetized animals what will provide new tools for future research.

Keywords: Muscarinic receptor M_4 , MT3, Hippocampus, Long-term potentiation, Synaptic plasticity, GABAergic interneurons, Extracellular electrophysiology, Memory.

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Localização de neurônios colinérgicos de projeção e suas vias no encéfalo.</i>	18
<i>Figura 2 – Fungos basidiomicetos que produzem muscarina.</i>	19
<i>Figura 3 – Estrutura esquemática dos receptores muscarínicos e as primeiras etapas de suas cascatas de sinalização.</i>	20
<i>Figura 4 – Possíveis circuitos envolvidos nos diferentes efeitos comportamentais da MT3.</i>	25
<i>Figura 5 – Visão geral dos equipamentos utilizados nos registros eletrofisiológicos</i>	29
<i>Figura 6 – Localização representativa da posição dos eletrodos.</i>	32
<i>Figura 7 – Protocolos de estimulação utilizados.</i>	34
<i>Figura 8 – Desenho experimental.</i>	34
<i>Figura 9 – Aquisição de dados de amplitude a partir do registro de um evento de pulso pareado.</i>	36
<i>Figura 10 – Histologia para verificação de posicionamento dos eletrodos.</i>	37
<i>Figura 11 – Ausência de efeitos dos tratamentos farmacológicos sobre a resposta basal.</i>	40
<i>Figura 12 – Efeitos da infusão dos fármacos na indução de LTP: MT3 e bicuculina.</i>	43
<i>Figura 13 – Efeitos da infusão dos fármacos na indução de LTP: MT3 e baclofen.</i>	44
<i>Figura 14 – Infusão de MT3 não afeta a manutenção da LTP.</i>	46
<i>Figura 15 – Dados relativos aos experimentos de infusão de fármaco 15 min antes da LFS.</i>	47
<i>Figura 16 – Boxplot dos dados referentes à LTP nos experimentos com infusão do fármaco antes da HFS.</i>	64

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Resumo dos efeitos da ativação dos receptores muscarínicos de acetilcolina.</i>	21
<i>Tabela 2 – Seletividade da MT3 pelos receptores muscarínicos.</i>	21
<i>Tabela 3 – Resumo dos efeitos comportamentais da infusão intra-hipocampal de MT3 2 µg/hemisfério sobre a memória em ratos Wistar.</i>	23
<i>Tabela 4 – Doses aplicadas dos fármacos.</i>	27
<i>Tabela 5 – Resumo das coordenadas de implantação dos eletrodos.</i>	32
<i>Tabela 6 – Relação de sobrevivência dos animais ao carbamato de etila durante os experimentos.</i>	38
<i>Tabela 7 – Resultados para amplitude do fEPSP e variação da FPP antes e após a infusão do fármaco.</i>	40
<i>Tabela 8 – Resultados para LTP e FPP com infusão do fármaco antes da HFS.</i>	42
<i>Tabela 9 – Resultados para LTP e FPP.</i>	45
<i>Tabela 10 – Síntese de resultados 60 min após a LFS.</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	acetilcolina
CA1	área <i>cornu ammonis</i> 1 do hipocampo
CA2	área <i>cornu ammonis</i> 2 do hipocampo
CA3	área <i>cornu ammonis</i> 3 do hipocampo
cDNA	fita complementar de ácido desoxirribonucleico
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Ch1-8	áreas de projeção colinérgica de 1 a 8
EPSP	potencial excitatório pós-sináptico, do inglês: <i>excitatory post-synaptic potential</i>
fEPSP	potencial excitatório pós-sináptico de campo, do inglês: <i>field excitatory post-synaptic potential</i>
FPP	facilitação por pulso pareado
GD	área giro denteado do hipocampo
GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
HFS	estimulação de alta frequência, do inglês: <i>high frequency stimulation</i>
LFS	estimulação de baixa frequência, do inglês: <i>low frequency stimulation</i>
LTD	depressão de longa duração, do inglês: <i>long-term depression</i>
LTP	potenciação de longa duração, do inglês: <i>long-term potentiation</i>
M ₁₋₅	receptores muscarínicos de acetilcolina, subtipos 1 a 5
mAChR	receptor muscarínico de acetilcolina
MT3	toxina muscarínica 3
e.l.	estrato lúcido
e.l.m.	estrato lacunoso-molecular
e.o.	estrato <i>oriens</i>
e.p.	estrato piramidal
e.r.	estrato radiado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Plasticidade sináptica e memória	15
1.2. Hipocampo.....	16
1.3. Sinalização Colinérgica	17
1.4. Receptores muscarínicos	19
1.5. Os receptores M₄ na memória e plasticidade hipocampal	22
1.6. Justificativa	23
1.7. Hipótese	25
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral.....	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais	27
3.2. Fármacos utilizados	27
3.2.1. MT3.....	28
3.2.2. Bicuculina	28
3.2.3. Baclofen	28
3.3. Eletrofisiologia in vivo	28
3.3.1. Equipamentos para registro eletrofisiológico.	29
3.3.2. Anestesia e preparo dos animais.....	30
3.3.3. Procedimento Eletrofisiológico	31
3.3.4. Indução e manutenção de LTP	33
3.3.1. Indução e manutenção de LTD.....	33
3.3.1. Controle Histológico	33
3.3.2. Programas de computador utilizados.....	34
3.4. Tratamento de dados e estatística	35
4. RESULTADOS	37
4.1. Controle histológico	37
4.2. Aproveitamento dos animais.....	37

4.3.	Considerações iniciais quanto aos registros eletrofisiológicos	38
4.4.	Ausência de efeitos dos tratamentos farmacológicos sobre a resposta basal...	39
4.5.	Efeitos da MT3 sobre a indução de LTP	41
4.6.	Ausência de efeitos sobre a manutenção da LTP	45
4.7.	Estimulação de baixa frequência.....	47
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
	APÊNDICE A – Tratamento de dados	61
	APÊNDICE B – Dados descritivos detalhados para os 60 min após a HFS/LFS	64
	ANEXO A – Parecer do PPG Neurociências	65
	ANEXO B – Carta de Aprovação na CEUA	66

1. INTRODUÇÃO

O encéfalo é uma estrutura capaz de remodelar neurônios e glia estruturalmente e funcionalmente conforme as necessidades do indivíduo. Dentre as diversas formas de neuroplasticidade existe a plasticidade sináptica, termo genérico que engloba os diversos processos relacionados com o aumento ou a diminuição da eficácia sináptica, ou seja, com a alteração da probabilidade ou intensidade da resposta de um neurônio A em relação a um neurônio B do qual recebe estímulo (CITRI; MALENKA, 2008; HEBB, 1949; MOHAPEL *et al.*, 2005; TETER; ASHFORD, 2002; ZANONA; CRESTANI, 2014). A plasticidade sináptica está envolvida em diversos eventos do desenvolvimento, maturação e adaptabilidade dos organismos ao meio onde se inserem, dentre eles o aprendizado e a memória.

1.1. Plasticidade sináptica e memória

Memória é, sob o ponto de vista evolutivo e comportamental, de suma importância ao indivíduo, uma vez que permite a integração emocional-comportamental criando informações e habilidades que fazem do indivíduo um ser único por suas experiências e, assim, permitem a construção da sua identidade. Em termos práticos, para fins de estudo, as memórias são classificadas quanto: à sua duração em imediata, de curta duração, de longa duração e remotas; ao conteúdo em intrínsecas e extrínsecas; à natureza em associativa e não associativa; à função em de trabalho e de referência; e à motivação em aversiva, neutra e com recompensa (QUILLFELDT, 2010).

O estudo dos mecanismos de habituação e sensitização em *Aplysia* por Eric Kandel e seus colaboradores indicam uma ligação direta entre plasticidade sináptica e a memória não associativa implícita. Neste modelo de aprendizado e memória, um toque leve no sifão do animal leva a retração da brânquia e, com a repetição do movimento, há uma redução progressiva da resposta comportamental, uma habituação. Essa resposta se dá devido à redução da liberação de neurotransmissores do neurônio sensitivo sobre o neurônio motor, diminuindo a resposta comportamental (KANDEL *et al.*, 2012).

Na sensitização, um estímulo nocivo prévio não pareado ao toque na brânquia libera serotonina sobre o terminal pré-sináptico, aumentando o aporte de cálcio para a célula. Isto faz com que um novo estímulo sensitivo de toque não-aversivo no sifão provoque uma contração brusca, mais intensa que a original, na brânquia. Além disso, a repetição desse aprendizado leva a uma maior duração dessa resposta amplificada de contração da brânquia,

ou seja, treinos sucessivos permitem modificações duradouras da resposta comportamental. Interessante notar que o mesmo se observa na resposta pós-sináptica excitatória no modelo celular do circuito neuronal associado a esse fenômeno, com a liberação sucessiva de serotonina levando a uma modificação duradoura da eficácia sináptica (KANDEL *et al.*, 2012). Outros estudos que utilizam objetos de estudo e paradigmas de aprendizado diferentes também sugerem existir forte associação entre a plasticidade sináptica e memórias associativas (CHAILLAN; TRUCHET; ROMAN, 2008; WHITLOCK *et al.*, 2006).

Desta forma, uma modificação de eficácia sináptica decorrente de interação dos mecanismos intracelulares está intimamente associada a possíveis alterações comportamentais (HÖLSCHER, 1999; NABAVI *et al.*, 2014; WHITLOCK *et al.*, 2006), mais que isso, a atividade de sistemas modulatórios, como o serotoninérgico, pode influenciar a eficácia sináptica ou mesmo determinar a ocorrência da mesma (LESCH; WAIDER, 2012; SUGISAKI *et al.*, 2011).

Duas décadas antes dos experimentos de Kandel com a *Aplysia*, Hebb (1949) propôs que células que disparam juntas tendem a fortalecer a interação entre si. O postulado de Hebb, ou modelo de aprendizado Hebbiano, como é conhecido, foi posteriormente complementado pelas conclusões de Stent (1973) e experimentalmente demonstrado pela primeira vez em mamíferos por Bliss e Lomo (1973) em hipocampo de coelhos.

1.2. Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura intimamente relacionada à memória explícita associativa de caráter contextual. O mesmo é constituído de neurônios principais, com morfologia piramidal e liberação glutamatérgica excitatória, dispostos em uma camada definida. Nas camadas por onde passam seus axônios e dendritos, estes neurônios entram em contato com uma vasta gama de interneurônios GABAérgicos inibitórios (GULYÁS; ACSÁDY; FREUND, 1999). Os interneurônios têm um papel central na modulação da resposta funcional de saída dos neurônios de CA1 determinando a atividade local da população neuronal (ANDERSEN *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2012; SHEPHERD, 2004).

O hipocampo se encontra localizado no córtex temporal e nos roedores ocupa uma vasta área encefálica ao longo do eixo septotemporal. Ele faz parte da formação hipocampal juntamente com o córtex entorrinal, perirrinal e pós-rinal. O hipocampo é composto pelo giro denteado, o hipocampo propriamente dito, que compreende as áreas: CA3, CA2 e CA1, e subículo.

Em secção transversal ao eixo longitudinal do hipocampo, se distinguem organizações celulares características em camadas, como no neocórtex. Porém diferentemente deste, o hipocampo apresenta apenas três camadas. Nas áreas do Corno de Amon os nomes atribuídos às camadas celulares se denominam, da mais externa para a mais interna, de: estrato *oriens* (e.o.), estrato piramidal (e.p.), estrato lúcido (e.l.) – apenas em CA3 –, estrato radiado (e.r) e estrato lacunoso-molecular (e.l.m.). Os corpos celulares dos neurônios principais, os piramidais glutamatérgicos, se encontram no e.p., seus dendritos basais e axônios adentram o e.o. e os dendritos apicais e a região terminal dos axônios as camadas mais internas: e.l., e.r. e e.l.m. (ANDERSEN *et al.*, 2007; PAXINOS; WATSON, 1998; SHEPHERD, 2004; VAN STRIEN; CAPPAERT; WITTER, 2009).

A circuitaria hipocampal é modulada por diferentes sistemas (CAHILL; MCGAUGH, 1988; GOLD *et al.*, 2013; IZQUIERDO; MEDINA, 1997) como, por exemplo, acetilcolina (DREVER; RIEDEL; PLATT, 2011), noradrenalina/adrenalina (TULLY; BOLSHAKOV, 2010), dopamina (OTMAKHOVA; LISMAN, 1996; REICHENBACH *et al.*, 2015; WISE, 2004), serotonina (ÖGREN *et al.*, 2008), histamina (BONINI *et al.*, 2011), além de diversos peptídios (ABE *et al.*, 1994; COSTENLA; CUNHA; DE MENDONÇA, 2010; FUJII *et al.*, 2004) e hormônios, como os glicocorticoides (GRAY; MILNER; MCEWEN, 2013; XIONG; KRUGERS, 2015) e estrógenos (COLCIAGO *et al.*, 2015). Dentre estes, um dos primeiros moduladores a ter reconhecido seus efeitos sobre a memória foi a acetilcolina, a inibição ou bloqueio de sua ação gerando efeitos amnésicos sobre a consolidação da memória (HASSELMO, 2006; JERUSALINSKY; KORNISIUK; IZQUIERDO, 1997).

As aferências colinérgicas chegam ao hipocampo de maneira difusa, fazendo contato com diversas camadas e estando mais concentradas nas regiões onde ficam os corpos celulares dos neurônios (ANDERSEN *et al.*, 2007). A principal aferência colinérgica hipocampal é o septo medial, o mesmo também dispondo de inervação GABAérgica em paralelo. Tanto a os neurônios colinérgicos, quanto os GABAérgicos que compõem este feixe de fibras do septo medial ao hipocampo apresentam acoplamento da oscilação *theta* – uma oscilação associada ao aprendizado – em relação à atividade hipocampal (ZHANG; LIN; NICOLELIS, 2010).

1.3. Sinalização Colinérgica

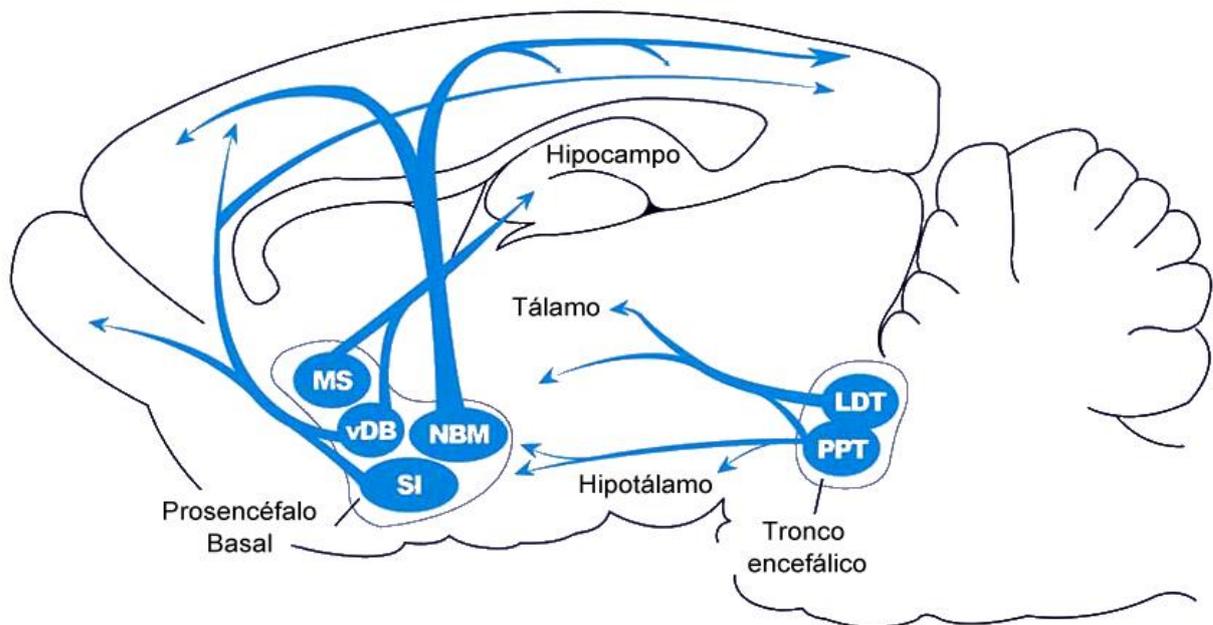
De maneira geral, os neurônios de projeção colinérgica provêm de oito regiões Ch1-Ch8 (THIELE, 2013), conforme segue (Figura 1):

a) As regiões Ch1-Ch4 estão localizadas no prosencéfalo basal e atuam sobre os processos cognitivos de atenção, aprendizado e memória através de aferências de: Ch1 (septo medial) e Ch2 (feixe vertical da banda diagonal de Broca) ao hipocampo, parte medial do córtex, núcleos talâmicos reticular, médio-dorsal e anteroventral/anteromedial; Ch3 (feixe horizontal da banda diagonal de Broca) ao bulbo olfatório; e Ch4 (núcleo basal magnocelular) ao córtex e amígdala.

b) No mesencéfalo caudal se encontram as regiões Ch5-Ch6 (núcleo tegmental pendunculopontino e laterodorsal) envolvidas no estado de alerta, ciclo sono-vigília e “sistema de recompensa” (JOHN S YEOMANS, 2012), as aferências dessas regiões projetam-se ao tálamo, prosencéfalo basal, hipotálamo e tegmento mesencefálico.

c) A região Ch7 (se sobrepõe à habênula) possui aferências ao núcleo interpeduncular do tronco encefálico e a Ch8 (núcleo parabigeminal) ao colículo superior.

Figura 1 – Localização de neurônios colinérgicos de projeção e suas vias no encéfalo.



Representação de encéfalo de *Rattus norvegicus* com identificação das principais áreas de projeção colinérgica. MS = septo medial, vDB = feixe vertical da Banda Diagonal de Broca, NBM = núcleo basal de Meynert, SI = substância inominada, LDT = núcleo laterodorsal tegmental, PPT = núcleo pendunculopontino tegmental. Fonte: modificado de Paul *et al.* (2015).

Junto aos neurônios de projeção colinérgicos, podem haver neurônios de projeção glutamatérgicos e GABAérgicos que perfazem as mesmas vias, como relatado para a via septomedial-hipocampo (THIELE, 2013), fazendo com que estudos de lesão inespecíficas destas áreas tenham resultados inconclusivos sobre o papel modulatório de cada

neurotransmissor dessas vias (EVERITT; ROBBINS, 1997; THIELE, 2013). Além disso, existem interneurônios colinérgicos em diversas áreas encefálicas como o córtex e núcleos da base (THIELE, 2013). Muito embora a acetilcolina liberada pelos neurônios colinérgicos atue tanto em receptores nicotínicos – receptores ionotrópicos da acetilcolina –, quanto em muscarínicos, ambos com influência sobre a plasticidade sináptica hipocampal (DREVER; RIEDEL; PLATT, 2011), os primeiros fogem ao escopo desta discussão e não serão aprofundados.

1.4. Receptores muscarínicos

Figura 2 – Fungos basidiomicetos que produzem muscarina.



a) *Amanita muscaria*: a muscarina foi isolada deste fungo, a que deve seu nome, porém, posteriormente verificou-se que ocorre em baixas concentrações nessa espécie. Seu efeito alucinógeno é devido a outro composto com ação neurotóxica: o muscimol, agonista de receptores GABA_A. Altas concentrações de muscarina são encontradas em outros fungos altamente tóxicos como: b) *Inocybe erubescens*, c) *Clitocybe dealbata* e d) *Clitocybe rivulosa*. (RUMACK; SPOERKE, 1994). Fonte das ilustrações: Wikipedia¹.

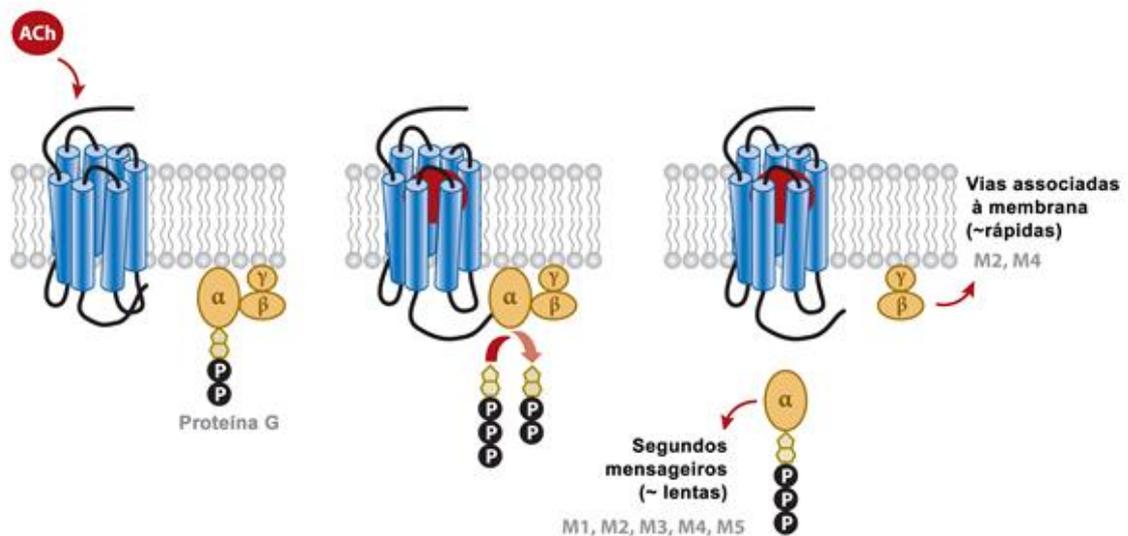
Os receptores muscarínicos constituem a família dos receptores metabotrópicos de acetilcolina (mAChR) e estão associados a uma vasta gama de funções cognitivas, comportamentais, sensoriais, motoras e simpáticas/parassimpáticas (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998; THIELE, 2013). O nome “muscarínicos” advém de sua interação com o alcaloide muscarina, primeiro ligante conhecido com efeito sobre o sistema nervoso visceral (RUMACK; SPOERKE, 1994) e originalmente isolado de fungos (Figura 2).

¹ Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Amanita_muscaria;
http://en.wikipedia.org/wiki/Inocybe_erubescens; http://en.wikipedia.org/wiki/Clitocybe_dealbata;
http://en.wikipedia.org/wiki/Clitocybe_rivulosa.

Como receptores metabotrópicos, os receptores muscarínicos (Figura 3) fazem parte da classe I (estruturalmente similares à rodopsina) de receptores 7 alfa-hélices transmembrana acoplados à proteína G (LEACH *et al.*, 2012). Nos mamíferos há cinco subtipos caracterizados, denominados M₁, M₂, M₃, M₄, e M₅ (Tabela 1) que podem ser agrupados em duas classes (Tabela 1), conforme a proteína G a que se associam: M₁, M₃ e M₅ a uma G_{q/11} e M₂ e M₄ a uma G_{i/o} (CAULFIELD; BIRDSALL, 1998).

Todos os subtipos de receptores muscarínicos se encontram distribuídos, muitas vezes sobrepostos, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Por exemplo M₁, M₂ e M₄ são abundantes no neocórtex e no estriado, mas M₂ é mais abundante no primeiro e M₄ no segundo (THIELE, 2013). No hipocampo ocorrem os subtipos M₁ ao M₄ (DREVER; RIEDEL; PLATT, 2011; ROUSE; LEVEY, 1996; ROUSE *et al.*, 1999).

Figura 3 – Estrutura esquemática dos receptores muscarínicos e as primeiras etapas de suas cascatas de sinalização.



Estrutura esquemática tridimensional das sete alfa-hélices transmembrana dos receptores acoplados à proteína G. Após a ligação da acetilcolina (ACh), o receptor pode interagir com a proteína G, constituída por três subunidades (α , β e γ). Na sua forma inativa, a proteína G se encontra associada a um difosfato de guanosina (GDP). Quando se associa a um receptor, o GDP da proteína G pode ser trocado por um trifosfato de guanosina (GTP), permitindo a dissociação da subunidade α . Para todos os subtipos, M₁-M₅, a subunidade α da Proteína G se difunde para o citosol onde atuará em diversos alvos. Além disso, no caso dos receptores inibitórios, M₂ e M₄, as subunidades $\beta\gamma$ podem se difundir através da membrana atuando em vias de sinalização associadas à mesma. Fonte: Modificado de Thiele (2013).

Tabela 1 – Resumo dos efeitos da ativação dos receptores muscarínicos de acetilcolina.

Grupo	Excitatórios (Tipo M ₁)			Inibitórios (Tipo M ₂)	
	M ₁	M ₃	M ₅	M ₂	M ₄
mAChR	M ₁	M ₃	M ₅	M ₂	M ₄
Acoplamento	G _{q/11}			G _{i/o}	
Sinalização	PLCβ → IP ₃ e DAG → ↑ Ca ⁺⁺ e PKC PLD ₂ → PLA ₂ → ↑ ácido araquidônico			bloqueia adenilato ciclase → ↓AMPc Gβγ → Ativação de canais retificadores de potássio Inibição de canais de cálcio dependentes de voltagem	
Efeitos	Despolarização e excitação			Hiperpolarização e inibição	
Distribuição no encéfalo	Córtex (++) Estriado (++) Cerebelo (+)	Cerebelo (±)	Área tegmental ventral Substância nigra Cerebelo (--)	Córtex (+) Estriado (-) Cerebelo (++)	Córtex (-) Estriado (+) Cerebelo (-)
Hipocampo	Presente s.o.	Presente s.l.m.	Ausente -	Presente s.o.	Presente s.r. e s.o.
CA1 (LEVEY <i>et al.</i>, 1995)	s.p. s.r. em neurônios piramidais e interneurônios			s.p. em interneurônios	principalmente em interneurônios

Para uma apreciação mais detalhada dos efeitos de cada receptor sobre os canais iônicos consultar Thiele (2013). Escala de dominância entre os receptores muscarínicos para cada área encefálica, da menor quantidade relativa para a maior: --, -, ±, + e ++. Assim, para o cerebelo, por exemplo, o receptor muscarínico predominante é o M₂ e o que ocorre em menor quantidade é o M₅. Fontes: Bruton *et al.* (2008) e Thiele (2013).

Tabela 2 – Seletividade da MT3 pelos receptores muscarínicos.

Receptor	Afinidade (pKi)	Tipo	Ação
M ₁	6,5-7,1	Antagonista	Antagonista
M ₂	6,0-6,3	Antagonista	Antagonista
M ₃	6,0	Antagonista	Antagonista
M ₄	8,7	Modulador alostérico	Negativa
M ₅	6,0	Antagonista	Antagonista

Fonte: IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology 2013/14²

² Disponível em: <http://www.guidetopharmacology.org/>

Devido à alta similaridade estrutural do sítio de ligação ortostérico entre os receptores muscarínicos, agonistas e antagonistas frequentemente apresentam pouca seletividade específica a cada subtipo (CHALLISS; TOBIN., 2013). Alternativamente, o uso de moduladores alostéricos permite maior seletividade, uma vez que atuam em regiões menos conservadas das proteínas (LEACH *et al.*, 2012). Os moduladores alostéricos, ao se ligarem nos receptores, alteram sua conformação modificando a afinidade dos agonistas e antagonistas ao sítio de ligação ortostérico, caso de diversas toxinas muscarínicas (BIRDSALL *et al.*, 2014; CHALLISS; TOBIN., 2013).

Duas das toxinas muscarínicas foram extraídas do veneno da serpente *Dendroaspis angusticeps* por Adem *et al.* em 1988 após a verificação da ação do veneno sobre sinaptossomos. Posteriormente, outras oito toxinas foram isoladas e caracterizadas, cada uma contendo uma sequência de 63-66 resíduos de aminoácidos (JERUSALINSKY *et al.*, 2000; JOLKKONEN, MIKAEL, 1996; SERVENT; FRUCHART-GAILLARD, 2009). Destas, a toxina muscarínica 3, MT3, é um modulador alostérico negativo que possui alta seletividade pelo receptor M₄, ligando-se com afinidade maior por este que pelos outros receptores muscarínicos. Embora apresente afinidade pelos receptores M₁ ela é 38 a 214 vezes menor que pelos M₄, conforme Tabela 2 (JERUSALINSKY *et al.*, 1998, JOLKKONEN, M *et al.*, 1994; OLIANAS *et al.*, 1999).

1.5. Os receptores M₄ na memória e plasticidade hipocampal

Os receptores M₄ são metabotrópicos, inibitórios, e predominantemente localizados em regiões pré-sinápticas, operando normalmente para inibir a liberação dos neurotransmissores da sinapse que controlam (JERUSALINSKY *et al.*, 1995; SÁNCHEZ *et al.*, 2009; VAN DER ZEE; LUITEN, 1999). Em estudos comportamentais, verificou-se que a infusão intra-hipocampal de MT3, antagonista M₄, tem expressiva atividade modulatória sob a formação e consolidação da memória aversiva contextual, tanto na esQUIVA inibitória, quanto no condicionamento aversivo contextual, causando amnésia se administrada após o treino (DIEHL, 2010; FERREIRA *et al.*, 2003; JERUSALINSKY *et al.*, 1998, 2000; LANZIOTTI, 2007) e facilitação se antes do teste (DIEHL *et al.*, 2007), conforme detalhado na Tabela 3.

Além disso, evidências indicam que há uma possível associação entre o sistema GABAérgico e a atividade dos receptores M₄. Nesse sentido, observa-se que a bicuculina é um antagonista dos receptores ionotrópicos GABA_A que apresenta efeito facilitatório sobre a consolidação da memória aversiva contextual na esQUIVA inibitória, enquanto que baclofen é

agonista dos receptores metabotrópicos GABA_B – predominantemente pré-sináptico (DUTAR; NICOLL, 1988) –, que apresenta efeito amnésico (ZARRINDAST *et al.*, 2002) ou facilitatório (LANZIOTTI, 2007) sobre a memória. Além disso, ambas, quando administradas em doses subefetivas e logo após o treino, revertem o efeito comportamental facilitatório da fisostigmina, um inibidor da acetilcolinesterase, (ZARRINDAST *et al.*, 2002) e o efeito amnésico da MT3 (LANZIOTTI, 2007) na esQUIVA inibitória.

De fato, receptores muscarínicos estão presentes em neurônios GABAérgicos hipocampais (VAN DER ZEE; LUITEN, 1993) e, em cultivo de células, ocorre modulação colinérgica da atividade GABAérgica com aumento da frequência das corrente inibitórias pós-sinápticas espontâneas por ativação inespecífica de receptores muscarínicos (GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Nesse sentido, foi demonstrado em trabalho anterior do nosso grupo (SÁNCHEZ *et al.*, 2009) que a MT3 bloqueia a indução de potenciação de longa duração (LTP) em sinapses de CA1 em fatias de hipocampo na mesma concentração responsável pelo efeito comportamental acima descrito.

Tabela 3 – Resumo dos efeitos comportamentais da infusão intra-hipocampal de MT3 2 µg/hemisfério sobre a memória em ratos Wistar.

Momento da Administração	Tarefa	“Fase” da memória	Efeito	Referência
Após treino	HAB	Consolidação	Sem efeito	(FERREIRA <i>et al.</i> , 2003; JERUSALINSKY <i>et al.</i> , 1998, 2000)
Após treino	EI	Consolidação	Amnésico	(DIEHL, 2010; FERREIRA <i>et al.</i> , 2003; JERUSALINSKY <i>et al.</i> , 1998, 2000; LANZIOTTI, 2007)
Após treino	LA	Consolidação	Amnésico	(FERREIRA, 2001)
Antes teste	HAB	Evocação	Sem efeito	(DIEHL <i>et al.</i> , 2007)
Antes teste	EI	Evocação	Facilitatório	(DIEHL <i>et al.</i> , 2007)
Após treino	CAC	Consolidação	Amnésico	(DIEHL, 2010)
Antes teste	CAC	Evocação	Facilitatório	(DIEHL, 2010)
Após reativação curta	CAC	Reconsolidação	Facilitatório	(DIEHL, 2010)
Após reativação longa	CAC	Extinção	Facilitatório	(DIEHL, 2010)
Antes teste, porém após reativação longa	CAC	Evocação após extinção	Facilitatório	(DIEHL, 2010)
45 min após treino	EI	Consolidação	Sem efeito	(DIEHL, 2010)
90 min após treino	EI	Consolidação	Facilitatório	(DIEHL, 2010)
180 min após treino	EI	Consolidação	Facilitatório	(DIEHL, 2010)
360 min após treino	EI	Consolidação	Sem efeito	(DIEHL, 2010)

As cores azul, laranja e preto objetivam facilitar a visualização dos resultados conforme a coluna “efeito”. Longa = 20 min; curta = 3 min; EI = esQUIVA inibitória; HAB = habituação; LA = labirinto aquático.

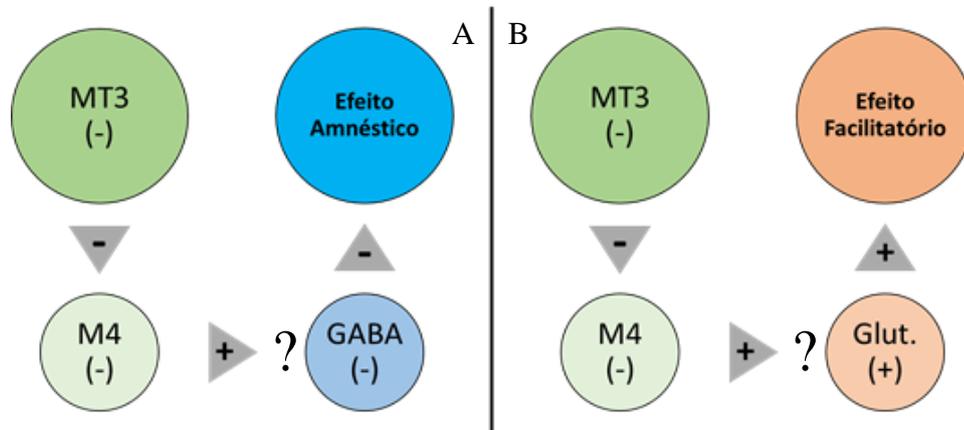
1.6. Justificativa

Resultados prévios (Tabela 3) indicam que não há efeito da MT3 em tarefas comportamentais sem caráter aversivo como a habituação (DIEHL *et al.*, 2007; FERREIRA *et*

al., 2003; JERUSALINSKY *et al.*, 1998, 2000). No entanto, ocorre modulação da memória via receptores M₄ no condicionamento aversivo contextual (DIEHL, 2010) e na esQUIVA inibitória (DIEHL, 2010; FERREIRA *et al.*, 2003; JERUSALINSKY *et al.*, 1998, 2000; LANZIOTTI, 2007). Além disso, para uma mesma tarefa aversiva, diferentes momentos de administração intrahipocampal do fármaco geram respostas comportamentais antagônicas. Ou seja, a administração de MT3 logo após o treino tem efeito amnésico sobre a consolidação da memória (DIEHL, 2010; FERREIRA, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003; JERUSALINSKY *et al.*, 1998, 2000; LANZIOTTI, 2007), enquanto a administração em momentos posteriores ao do estabelecimento do traço (pré-teste, após reativação curta ou longa) tem efeito facilitatório (DIEHL, 2010; DIEHL *et al.*, 2007). Finalmente, a concomitante administração intrahipocampal bilateral de MT3 logo após o treino da esQUIVA inibitória em dose efetiva e bicuculina, um antagonista de receptores GABA_A, em dose subefetiva de 0,06 µg/µl reverte o efeito amnésico da MT3 (LANZIOTTI, 2007). O mesmo ocorre quando da utilização de baclofen, um agonista GABA_B, em dose subefetiva de 0,20 µg/µl (LANZIOTTI, 2007).

Sendo assim, sugerimos que o efeito amnésico da MT3 durante a consolidação seja predominantemente devido à desinibição de células GABAérgicas, aumentando a liberação de GABA, reduzindo a excitabilidade neural. Também sugerimos que, após o estabelecimento do engrama, a MT3 atue inibindo receptores M₄ de células glutamatérgicas aumentando a excitabilidade e levando a um efeito comportamental facilitatório, conforme a Figura 4.

Figura 4 – Possíveis circuitos envolvidos nos diferentes efeitos comportamentais da MT3.



Esquema delineando os prováveis circuitos envolvidos que resumem os efeitos da MT3 sobre o comportamento de ratos em tarefas aversivas. Considerando que os receptores M_4 ocorrem tanto em células GABAérgicas quanto glutamatérgicas no hipocampo e que a MT3 inibe esses receptores, um efeito amnésico provavelmente se deve ao aumento das correntes inibitórias e, portanto, da atividade GABAérgica (A). Uma vez estabelecido o circuito associado ao traço mnemônico, a infusão de MT3 apresentaria efeito facilitatório levando a um aumento da excitabilidade neural por ação glutamatérgica (B).

1.7. Hipótese

Nossa hipótese é que, como um modelo celular de aprendizado, a modulação do potencial evocado extracelular 60 min após à indução de plasticidade de longa duração mediada por M_4 em CA1 hipocampal ocorre durante a indução da plasticidade sináptica. Essa modulação causando um efeito de aumento da resposta evocada por inibição dos interneurônios. Ainda, em momentos posteriores à indução da plasticidade a atividade dos receptores M_4 causaria uma diminuição da resposta evocada por inibir a atividade glutamatérgica.

Por conseguinte, a ação da MT3, antagonista deste receptor, provocaria efeitos contrários aos aqui descritos, a constar: a administração da mesma antes da indução de plasticidade sináptica de longa duração reduziria a resposta evocada por supressão da inibição da sinalização GABAérgica e após a indução aumentaria a resposta por reduzir a inibição sobre as células glutamatérgicas.

Ainda que, neste trabalho, não seja abordada a relação direta entre essa modulação e os tipos celulares, como etapa anterior, busca identificar pistas da ocorrência desses efeitos sobre a plasticidade sináptica no potencial de campo evocado. Ele inicia, também, a investigação da interação de M_4 com a sinalização GABAérgica sobre a excitabilidade glutamatérgica (via Colateral de Schaffer).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral*

Este trabalho visa estudar a modulação sináptica em CA1 hipocampal mediada pelo receptor colinérgico M₄ e sua interação com a sinalização GABAérgica para verificar o efeito deste receptor sobre a plasticidade funcional de longa duração *in vivo*.

2.2. *Objetivos Específicos*

1. Demonstrar a modulação mediada por receptores M₄ *in vivo* pelo estudo das respostas eletrofisiológicas evocadas em animal anestesiado mediante a infusão unilateral intra-hipocampal de 0,5µl de MT3 (4,0 µg/µl) e nos seguintes momentos experimentais:

- Antes da indução de LTP;
- Durante a manutenção de LTP;
- Antes da indução de depressão de longa duração (LTD).

2. Verificar a modulação colinérgica via receptores M₄ da atividade GABAérgica por infusão concomitante de MT3 com bicuculina (0,06 µg/µl) ou baclofen (0,2 µg/µl) na região CA1 do hipocampo antes da indução de LTP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos no Biotério do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências (IB) da mesma Instituição.

Para execução deste trabalho foram utilizados 100 ratos Wistar machos com peso entre 290 e 350 g e idade de 60 a 90 dias criados em caixas-moradia em grupos de cinco. As caixas foram forradas com maravalha e acondicionadas em sala com temperatura controlada a 22 °C e luminosidade em ciclo de 12 h com período claro diurno (7-19 h conforme horário de inverno) e escuro noturno (19-7 h) controlada por temporizador. A maravalha foi trocada duas vezes por semana sem manutenção de resquícios da que estava na caixa, igualmente os potes de água foram trocados e lavados com a mesma frequência sendo fornecidos *ad libitum*. Cada animal teve seus dados registrados em um formulário experimental apropriado.

Este trabalho foi executado segundo as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Brasil (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA) sob o número 23440 (ANEXO B).

3.2. Fármacos utilizados

Tabela 4 – Doses aplicadas dos fármacos.

Fármaco	Via de administração	Concentração (µg/µl)	Efeito comportamental na esQUIVA inibitória
MT3	Intrahipocampal	4,00	Amnésico
Bicuculina	Intrahipocampal	0,06	Sem efeito
Baclofen	Intrahipocampal	0,20	Sem efeito

Fonte dos dados: (LANZIOTTI, 2007)

Os fármacos utilizados na execução desse trabalho foram: a toxina muscarínica 3, a bicuculina e o baclofen. A infusão intrahipocampal e unilateral foi feita com uso de bomba de infusão a uma velocidade de 20 µl/h com volume total de 0,5 µl, para administração isolada, ou 0,56 µl, quando administrados dois fármacos concomitantemente. Desta forma, a dose de administração dos fármacos foi mantida uma vez que a máxima concentração de MT3 disponível era de 4 µg/µl. As concentrações utilizadas dos fármacos se encontram

discriminadas na Tabela 4 e foram selecionadas conforme resultados dos experimentos referidos nas descrições dos fármacos a seguir.

3.2.1. MT3

A toxina muscarínica 3 é o antagonista mais seletivo disponível para os receptores muscarínicos M₄. Em estudos comportamentais com infusão intra-hipocampal, a MT3 tem expressiva atividade modulatória na formação e manutenção da memória aversiva contextual, conforme descrito nas seções 1.5 e 1.6 (Tabela 3). Em estudos eletrofisiológicos, a MT3 impede a LTP induzida por estimulação de alta frequência (HFS) nas colaterais de Schaffer (SÁNCHEZ *et al.*, 2009).

3.2.2. Bicuculina

Bicuculina é um antagonista dos receptores ionotrópicos GABA_A que apresenta, na dose de 1µg/rato, efeito facilitatório sobre a consolidação da memória aversiva contextual na esQUIVA INIBITÓRIA (ZARRINDAST *et al.*, 2002). Em doses subefetivas (0,06 µg/µl) para testes comportamentais, a bicuculina reverte o efeito amnésico da MT3 (LANZIOTTI, 2007) e reduz o efeito do muscimol (ZARRINDAST *et al.*, 2002), um clássico agonista GABA_A.

3.2.3. Baclofen

Baclofen é agonista dos receptores metabotrópicos GABA_B que apresenta efeito amnésico clássico sobre a memória (ZARRINDAST *et al.*, 2002). No entanto, também pode apresentar efeito facilitatório sobre a memória (LANZIOTTI, 2007). Em dose subefetiva (0,2 µg/µl), é capaz de reverter os efeitos amnésicos da administração pós-treino de MT3 intra-hipocampal na esQUIVA INIBITÓRIA (LANZIOTTI, 2007).

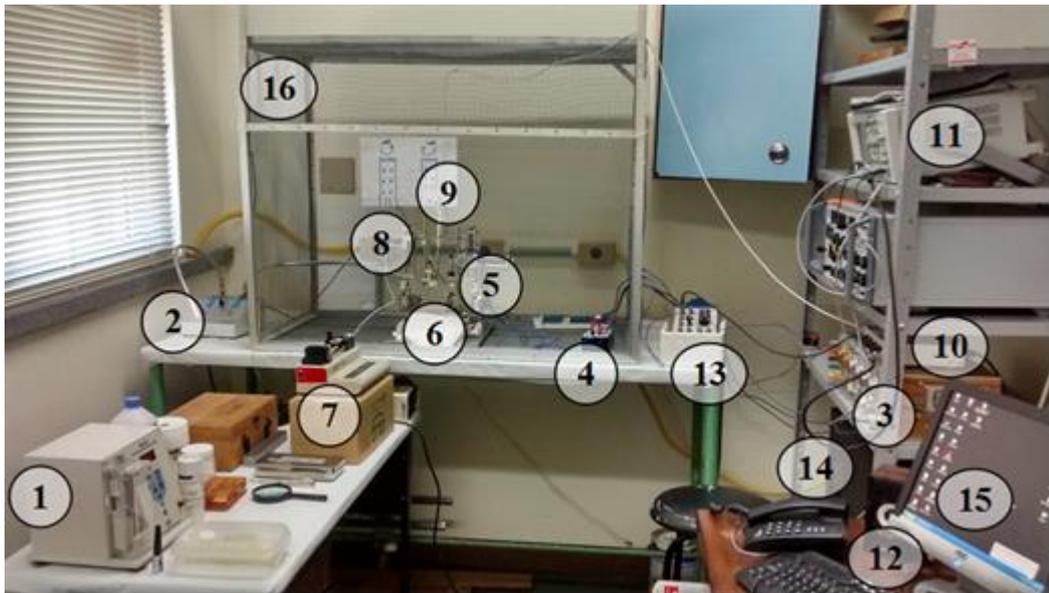
3.3. *Eletrofisiologia in vivo*

Os equipamentos utilizados serão aqui abordados em duas etapas, uma que considera os envolvidos com a estimulação elétrica e outra com o registro dos sinais dos potenciais evocados de campo (Figura 5). Os equipamentos utilizados para realização da estimulação foram: um gerador de pulsos e estimulador com controle de intensidade (Grass modelo S48F, EUA), uma unidade isoladora de estímulo fotoelétrica (Grass modelo PSIU6, EUA) e um eletrodo de estímulo bipolar manufaturado. O teste dos parâmetros de estimulação foi

efetuado antes de cada registro por visualização do estímulo gerado no osciloscópio (DSO3062A, Agilent Technologies, EUA).

3.3.1. *Equipamentos para registro eletrofisiológico.*

Figura 5 – Visão geral dos equipamentos utilizados nos registros eletrofisiológicos



Equipamentos utilizados: 1) estirador de micropipetas, 2) fonte de luz, 3) estimulador, 4) unidade isoladora de estímulo, 5) eletrodo de estímulo bipolar, 6) aparelho estereotáxico, 7) bomba de infusão, 8) eletrodo vidro para registro eletrofisiológico, 9) pré-amplificador, 10) amplificador, 11) osciloscópio, 12) caixa de som, 13) placa adaptadora BNC, 14) placa de aquisição e conversão de dados, 15) computador e 16) gaiola de Faraday.

Para a confecção do eletrodo de estímulo foram testados fios de cobre, platina, tungstênio e níquel-cromo. O fio de liga níquel-cromo (4:1; resistividade elétrica de 0,1 mOhm/cm) apresentou melhor desempenho, apresentando estimulação efetiva e possibilidade de reutilização. A confecção do eletrodo de estímulo bipolar consistiu da dobra do fio de níquel-cromo (50 μ m, Stablohm 650; California Fine Wire, EUA) sobre si mesmo pela metade e posterior torção do mesmo. O eletrodo foi fixado em uma das duas torres do estereotáxico e conectado à unidade isoladora de estímulo.

Para registro da atividade elétrica neuronal foram utilizados eletrodos de vidro. Os eletrodos de vidro foram feitos a partir de capilares de vidro (World Precision Instruments Borosilicate, 1B100F-4, EUA), preenchidos por solução de cloreto de potássio 3 mols/L e com fio de cloreto de prata em contato com a solução. O preparo dos eletrodos de vidro foi feito através da colocação do capilar em um estirador de pipetas vertical (World Precision Instruments, Two stage Micropipette Puller, Pul-2, EUA) com programa definido com duas

temperaturas de aquecimento $h = 50,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $H = 45,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Com vistas a uma infusão próxima ao eletrodo de registro, uma cânula de 1.3 mm foi colada à pipeta de vidro (capilar com ponta fina) com uso de cianoacrilato em gel ou líquido ou, alternativamente, cola de silicone em bastão aquecida.

O fio de AgCl e a pipeta, foram fixados no suporte (Warner Instruments E Series Pellet, 1.0mm, ESP-F10N, EUA) para conexão com o pré-amplificador e ao amplificador (Warner Instruments DP-311, EUA). Os parâmetros utilizados no amplificador foram: ganho de 1000 vezes com filtro para frequências maiores que 100 e menores que 3000 Hz. Provido do amplificador, o sinal de resposta neuronal foi distribuído a um osciloscópio (DSO3062A, Agilent Technologies, EUA; 60 MHz, 1 GSa/s; Entrada: 1 MOhm \sim 13 pF; 300 V RMS) e a uma placa adaptadora BNC (BNC2110, National Instruments, EUA), da qual os dados foram enviados para uma placa de aquisição e conversão analógico-digital no computador (PCI2120, National Instruments, EUA).

3.3.2. Anestesia e preparo dos animais

Embora a literatura ainda se refira ao carbamato de etila como uretano é aconselhável que não se utilize este termo uma vez que não há qualquer relação entre o polímero poliuretano e esta substância (IARC WORKING GROUP, 2007). O carbamato de etila na forma sólida pode se apresentar como grânulos brancos ou cristais transparentes, é hidrossolúvel e, ainda que volátil à temperatura ambiente, não apresenta qualquer odor.

A administração de 1 a 1,5 g/kg de carbamato de etila em ratos adultos causa analgesia e anestesia profunda e prolongada (8-10 h) sem provocar grande alteração na frequência respiratória e cardiovascular, pois mantêm uma atividade sustentada do sistema nervoso simpático com altas concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina (FLECKNELL; MEREDITH, 2009). Ainda assim, eventualmente, pode ocorrer obstrução das vias respiratórias, ao menos em camundongos, para a dose preconizada (MOLDESTAD *et al.*, 2009).

Em concentrações que induzam imobilidade, inconsciência e amnésia nos animais, aspectos indispensáveis para a realização de procedimentos cirúrgicos com ausência total de dor, os anestésicos exercem alterações sobre os canais de membrana, alterando a resposta farmacológica dos canais ou mesmo a condutância basal. O uretano ou carbamato de etila não gera corrente iônica *per se* e atua tanto sobre as correntes de canais glutamatérgicos AMPA e NMDA (as inibe), quanto sobre as gabaérgicas GABA_A (as potencia) e colinérgicas

nicotínicas neuronais nACh (as potencia) (HARA; HARRIS, 2002). No entanto, as alterações provocadas para concentrações utilizadas com fins anestésicos pelo carbamato de etila não são tão pronunciadas quanto à de outros anestésicos, como a cetamina ou o isoflurano (HARA; HARRIS, 2002; YAMAKURA; HARRIS, 2000). Isso, aliado ao fato de que é um anestésico hipnótico de longa duração (aproximadamente 10 h) faz do carbamato de etila uma das anestésias mais utilizadas em experimentos eletrofisiológicos *in vivo* (BARTH; MODY, 2011). Ainda assim, sua utilização não é recomendada pelo CEUA, necessitando sua utilização ser bem fundamentada e o procedimento ser classificado como sem recuperação quanto ao grau de severidade, uma vez que sua utilização e manuseio é contraindicada por apresentar risco à saúde do experimentador.

A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) classifica o carbamato de etila como 2A quanto ao seu efeito carcinogênico, uma vez que há ampla evidência em animais e limitada evidência em humanos do mesmo (IARC WORKING GROUP, 2007). Entre os efeitos relatados para essa substância, se destacam a teratogênese, a citotoxicidade e a mutagênese. Desta forma, procedimentos de prevenção de contaminação tanto para proteção pessoal do experimentador quanto ambiental foram utilizados, incluindo a utilização de: luvas, máscara, jaleco, frascos vedados e capela com exaustão.

Os animais foram anestesiados com carbamato de etila 0,5 g/ml em injeção intraperitoneal na dose de 3 ml/kg. Após verificação da eficácia do anestésico, os animais foram transferidos da caixa moradia para um aparelho estereotáxico (torre esquerda KOPF, EUA; torre direita SPS Ltda) posicionado dentro da gaiola de Faraday (Figura 5). Para evitar ressecamento dos olhos foi aplicada uma camada de gel lubrificante nos olhos, uma vez que o procedimento completo de preparo e registro foi de 4 a 9 h.

3.3.2.1. *Craniotomia*

O crânio foi exposto por incisão com uma tesoura curva na região dorsal central da cabeça. Com o auxílio de uma broca odontológica, foi feita a craniotomia bilateral na porção dorsal temporal do animal, sob a posição de inserção dos eletrodos.

3.3.3. Procedimento Eletrofisiológico

As coordenadas de implantação dos eletrodos foram inicialmente obtidas com base em atlas de coordenadas estereotáxicas para encéfalo de ratos (PAXINOS; WATSON, 1998), Tabela 5 e Figura 6. O eletrodo de estímulo foi posicionado na via Colateral de Schaffer (4,0

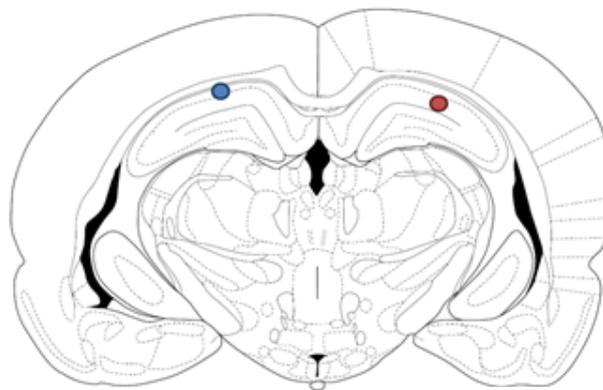
mm posterior ao bregma; 3,0 mm da linha média; e 3,0 mm ventral à dura). O eletrodo de registro, preenchido com cloreto de potássio, foi implantado nos dendritos basais de CA1 (4,0 mm posterior ao bregma e 2,5 mm a partir da linha média). Posteriormente, a profundidade ideal do eletrodo de registro foi determinada conforme registro eletrofisiológico de estímulos aplicados durante a implantação com posição inicial do eletrodo a 2,5 mm da superfície da abertura craniana. A validação do experimento foi determinada por observação histológica posterior dos animais.

Tabela 5 – Resumo das coordenadas de implantação dos eletrodos.

Eletrodo	Direção	Coordenada (mm)
Estímulo	Posterior	4,0
	Esquerda	3,0
	Ventral	3,0
Registro	Posterior	4,0
	Esquerda	2,5
	Ventral	conforme texto

Valores correspondem às distâncias relativas a partir da linha média e do bregma.

Figura 6 – Localização representativa da posição dos eletrodos.



Bregma – 4.16 mm

Ilustração de corte coronal de encéfalo de rato com a localização representativa da posição final dos eletrodos: de estímulo na via Colateral de Schaffer no hemisfério direito (círculo vermelho) e de registro em CA1 (círculo azul). Fonte: Modificada de Paxinos e Watson (1998).

Após a otimização da localização dorso-ventral dos eletrodos a relação entre a intensidade de estímulo e a amplitude do potencial excitatório pós-sináptico de campo (fEPSP) foi verificada. A intensidade de estímulo utilizada nos experimentos foi ajustada àquela que evocasse metade da máxima amplitude do fEPSP, determinada visualmente com auxílio do osciloscópio para cada animal.

3.3.4. Indução e manutenção de LTP

Durante o período basal de registro das respostas evocadas de campo foram gerados pulsos pareados de estimulação elétrica com intervalos entre pulsos de 50 ms e frequência de 0,1 Hz (Figura 7) por pelo menos 20 min ou até estabilização da resposta evocada. Após, foi infundido 0,5 μ L de fármaco a uma velocidade de infusão de 20 μ L/min. As respostas evocadas durante este período e nos 15 min subsequentes constituíram o período pré-HFS, cujos cinco últimos minutos foram utilizados para verificação de efeitos dos fármacos sobre o registro do período basal. Ao final desse período, a LTP foi induzida por um protocolo de estimulação elétrica de alta frequência (HFS) modificado de Li, Cullen et al. (2007) – 10 ciclos de 20 pulsos a 100 Hz, repetidos a cada 2 s. Então, novamente foram registrados os fEPSP evocados por pulso pareado, conforme protocolo mencionado, durante 120 min. Os dados obtidos 60 min após a HFS foram comparados aos obtidos durante o período basal de estimulação para averiguar a ocorrência de uma potenciação duradoura (LTP).

Para o experimento do efeito dos tratamentos sobre a manutenção da LTP, os fármacos foram administrados 15 min após a estimulação por HFS (Figura 8).

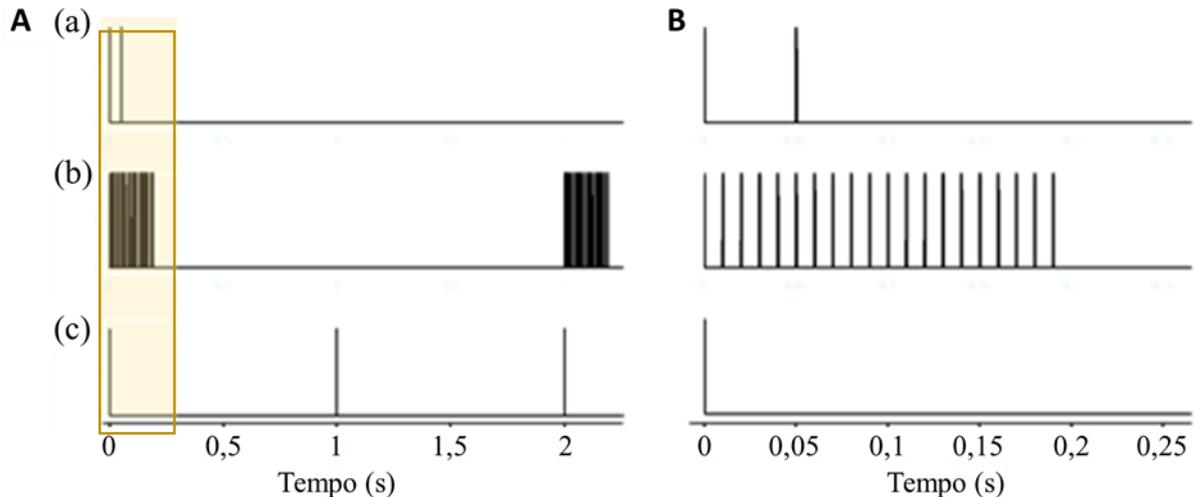
3.3.1. Indução e manutenção de LTD

Foram registrados os fEPSP evocados, nas mesmas condições citadas na sessão 3.3.4, porém com a substituição da HFS por uma estimulação de baixa frequência (LFS) de 600 pulsos a 1 Hz (CASTRO-ALAMANCOS; CALCAGNOTTO, 1999). A amplitude dos fEPSP obtidas 60 min após a LFS foram comparadas às obtidos durante o período basal de estimulação para averiguar a ocorrência da LTD.

3.3.1. Controle Histológico

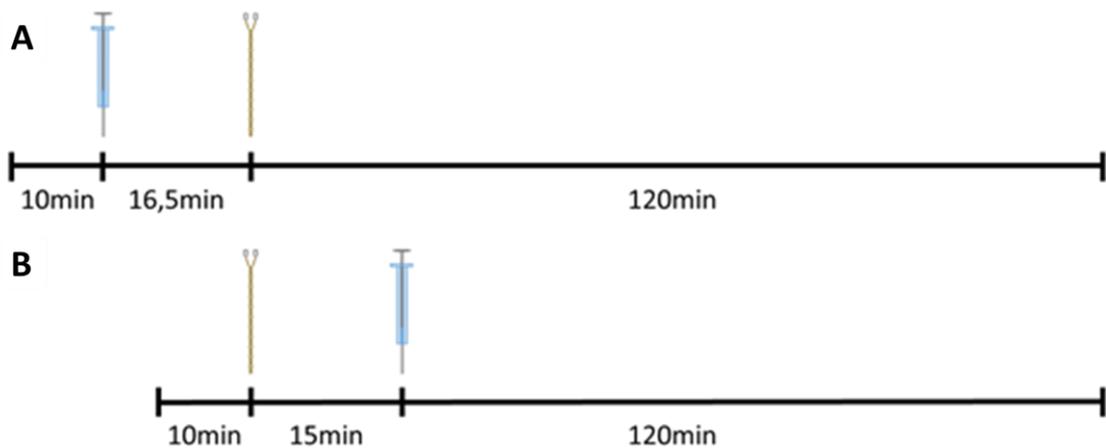
Ao término dos experimentos, os encéfalos foram extraídos e imediatamente fixados em paraformaldeído a 10% por 24 h e armazenados sob refrigeração em sacarose a 30%, renovada com frequência de aproximadamente uma vez por semana. Após, pelo menos, quatro dias, fatias finas (50 μ m) foram preparadas em vibrátomo (Leica, VT1000S, Alemanha) e posteriormente coradas por coloração de Nissl. A lesão causada pelos eletrodos foi identificada por microscopia de luz, para averiguação do posicionamento dos eletrodos.

Figura 7 – Protocolos de estimulação utilizados.



Diferentes protocolos de estimulação utilizados apresentados em uma mesma escala temporal. Em B) ampliação do período em destaque de A). (a) pulsos pareados com intervalos entre pulsos de 50 ms e entre eventos de estimulação de 10 s, o segundo par não está aparente pois a escala total de tempo apresentado é de 2,2 s. (b) HFS em trens de 20 pulsos com intervalo de 10 ms entre pulsos e 2 s entre trens. (c) LFS com 1 pulso a cada segundo por 10 min.

Figura 8 – Desenho experimental.



A) Infusão antes da HFS/LFS: foram registrados fEPSP evocados por pulsos pareados por, no mínimo, 10 min após a estabilização da resposta basal. A seguir, 16,5 min após o início da infusão do fármaco ou veículo foram registrados. Então, foi realizada a indução elétrica de plasticidade por HFS ou LFS, após a qual, foram registrados fEPSP evocados por pulsos pareados por mais 120 min. B) Infusão após a HFS/LFS: após o registro das respostas evocadas basais foi aplicada a HFS, 15 min depois o fármaco ou veículo foi infundido. O desenho das seringas mostra o momento de infusão do fármaco e o eletrodo de estímulo o momento da estimulação.

3.3.2. Programas de computador utilizados

O programa utilizado para registro dos dados foi o WinLTP (WinLTP Ltd., Reino Unido) com licença de uso básica (<http://www.winltp.com/index.html>). Posteriormente, os eventos, que consistem em um conjunto de dois artefatos de estimulação do pulso pareado e

suas respectivas respostas evocadas, foram isolados do sinal contínuo com uso do Clampfit 10.0 (Molecular Devices, EUA). No mesmo programa, foram extraídos dados de inclinação e amplitude de cada resposta evocada pelos pulsos pareados (Figura 9). Estes dados foram processados com uso de algoritmo desenvolvido em Matlab 7.9 (Mathworks, EUA) e os testes estatísticos foram realizados no SPSS 20 (IBM, EUA). Os gráficos utilizados no texto final desta dissertação foram elaborados com o uso do Matlab ou Excel 2013 (Microsoft, EUA).

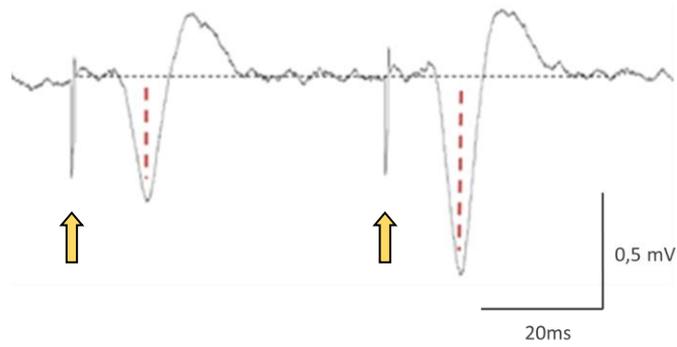
3.4. Tratamento de dados e estatística

O tratamento de dados consistiu da 1) tabulação dos dados obtidos, 2) normalização em relação ao basal, 3) seleção de número de eventos amostrados por etapa de registro, 4) cálculo da média de cada animal a cada 5 min e 5) cálculo da média do grupo, desvios e erros das médias. Após a tabulação dos dados com o uso do Clampfit, os dados foram importados para o Matlab para processamento das outras etapas de tratamento (maiores detalhes no APÊNDICE A). Do conjunto de dados foram suprimidos valores de amplitude e inclinação que desviaram mais de 5 desvios padrão da média.

Os dados utilizados para estatística e composição dos gráficos deste trabalho são os dados relativos à amplitude da resposta ao primeiro estímulo do pulso pareado, para verificação de LTP, e a relação das amplitudes das respostas entre o segundo e o primeiro pulsos de cada estímulo pareado, para a FPP. Observamos que, uma vez que foram encontradas dificuldades para armazenamento e baixa disponibilidade do fármaco MT3, o número de animais registrados por grupo farmacológico apresenta-se reduzido nessa dissertação para 3 animais por grupo de maneira geral, assim, qualquer estimativa populacional pode apresentar tendenciosidade.

Os testes estatísticos utilizados foram teste t pareado, teste t para amostras independentes, teste de análise de variância de uma via (ANOVA) e teste de Kruskal-Wallis, todos com um nível de significância de 5% e escolhidos conforme as características da distribuição dos dados a serem comparados.

Figura 9 – Aquisição de dados de amplitude a partir do registro de um evento de pulso pareado.



Aproximadamente 10 ms após o artefato de estímulo (seta amarela), apresentou-se o potencial excitatório pós-sináptico de campo (fEPSP) evocado pelo mesmo. A amplitude da resposta evocada foi extraída entre 10 % e 90 % de uma reta traçada entre a linha basal e o pico da resposta (tracejado em vermelho).

4. RESULTADOS

4.1. Controle histológico

Inicialmente tentou-se utilizar azul de metileno como corante dentro do eletrodo do registro para facilitar a visualização, porém o mesmo precipitou quando diluído em cloreto de potássio. Além disso, não foi possível detectar com exatidão o posicionamento dos eletrodos de registro em todos os animais apenas pela lesão gerada (Figura 10), sugerindo-se que, em estudos posteriores, seja buscada nova alternativa. Ainda assim, os animais em que a coloração de Nissl e a microscopia de luz foram suficientes para determinação da posição dos eletrodos, a mesma estava correta.

Figura 10 – Histologia para verificação de posicionamento dos eletrodos.

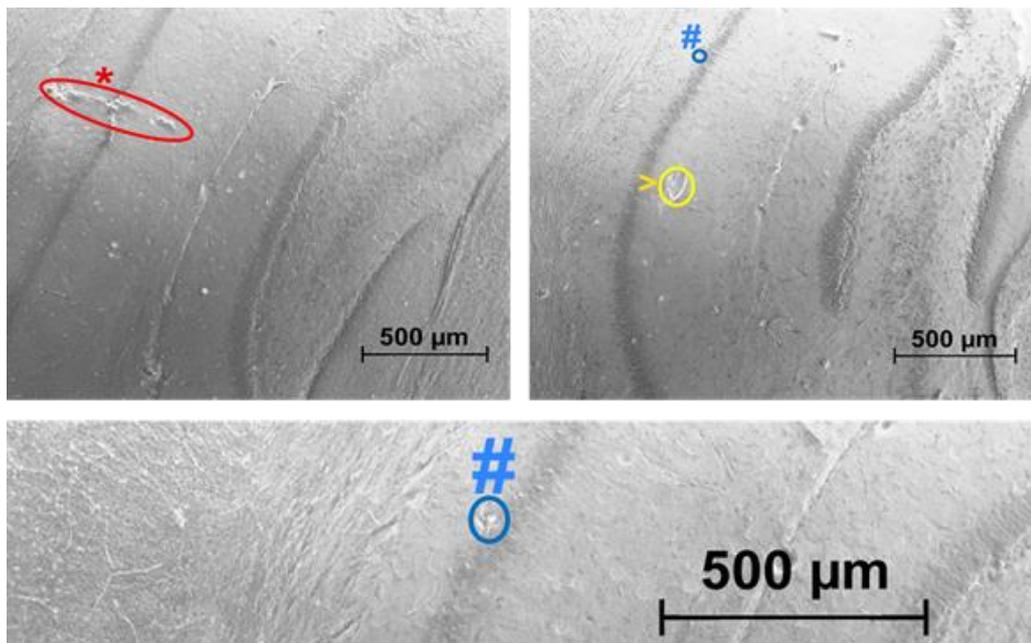


Imagem demonstrativa do posicionamento dos eletrodos no hipocampo dorsal de ratos sob microscopia de luz invertida (Zeiss Axiovert 200, Alemanha)³. Em destaque as lesões visualizadas no hipocampo em virtude da inserção do eletrodo de estímulo (*, vermelho), eletrodo de registro (#, azul) e agulha de infusão (>, amarelo).

4.2. Aproveitamento dos animais

Considerando-se as particularidades do anestésico empregado é relevante apresentar dados a respeito da sobrevivência dos animais durante o procedimento. Foram utilizados 104

³ Imagem obtida em colaboração com o laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica da UFRGS.

animais, sendo 38 durante a padronização e estabelecimento do método, e 66 na realização dos experimentos propriamente ditos, conforme Tabela 6. Destes últimos, 17 não geraram dados aproveitáveis: 4 sem resposta detectável, 10 morreram por conta do carbamato de etila e 3 em até uma hora após aplicação da anestesia, inviabilizando a análise dos dados. Assim, o procedimento experimental foi completado com sucesso em cerca de 3/4 dos 66 animais utilizados, tendo as sessões duração mínima de 4 h 11 min e máxima de 9 h 20 min, desde a aplicação da anestesia até a finalização do registro.

Tabela 6 – Relação de sobrevivência dos animais ao carbamato de etila durante os experimentos.

	Total	104	100,0%
	Registros Completos	78	75,0%
	Registros Incompletos	26	25,0%
→	Piloto – Total	38	100,0%
	Piloto – Completos	29	76,3%
	Piloto – Incompletos	9	23,7%
→	Experimentos – Total	66	100,0%
	Experimentos – Completos	49	74,2%
	Experimentos – Incompletos	17	25,8%

4.3. Considerações iniciais quanto aos registros eletrofisiológicos

As sinapses das Colaterais de Schaffer em CA1, tanto ipsilateral, quanto contralateral, estabelecem plasticidade de longa duração para uma vasta gama de protocolos de indução. Esta alteração duradoura da eficácia sináptica é verificada se for possível registrá-la por pelo menos 60 min após a indução. Neste trabalho, os registros prolongados de aproximadamente 2 h após a HFS ou a LFS foram feitos para assegurar a confiabilidade dos dados que foram comparados no período de 60 min após a indução. Animais cujos registros não se mantiveram estáveis ou que apresentavam algum comportamento anômalo foram descartados.

Outra observação importante é que na via Colateral de Schaffer – CA1 o intervalo de pulso pareado escolhido de 50 ms induz facilitação por pulso pareado (FPP), ou seja, a resposta ao segundo pulso é sempre maior que a primeira, considerando-se uma estimulação que evoca 50% da resposta máxima (CREAGER; DUNWIDDIE; LYNCH, 1980). Isso indica que as sinapses envolvidas apresentam uma baixa probabilidade de liberação de neurotransmissores e, desta forma, as alterações transientes na concentração de cálcio intracelular, causadas pelo primeiro estímulo, permitem uma maior liberação de neurotransmissores na chegada do segundo estímulo. Quando ocorre plasticidade sináptica de

longa duração podem ocorrer modificações nos mecanismos que viabilizam essa facilitação transitória que comumente se devem a modificações pré-sinápticas (DEBANNE *et al.*, 1996). Essas modificações foram numericamente analisadas observando-se a variação na relação entre as intensidades das respostas evocadas pelos dois pulsos do estímulo pareado, denominado índice de FPP.

Neste trabalho, o parâmetro utilizado para medir a intensidade das respostas, tanto na verificação da LTP ou LTD quanto da alteração da FPP foi a amplitude do fEPSP (Figura 9).

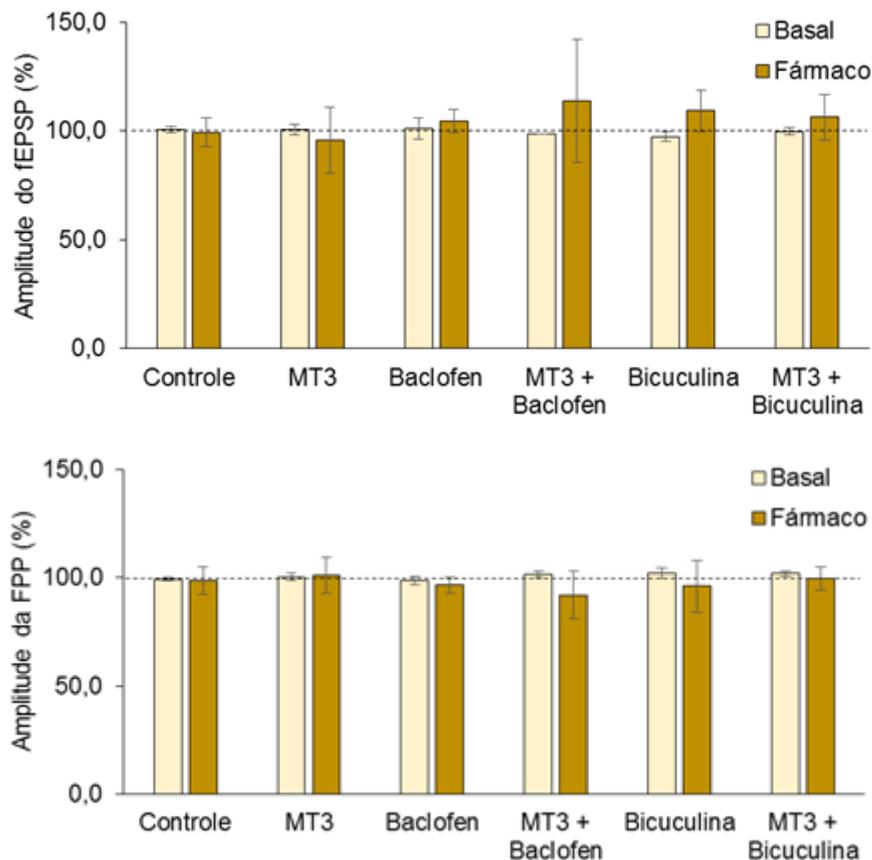
4.4. Ausência de efeitos dos tratamentos farmacológicos sobre a resposta basal

Não se observou qualquer interferência farmacológica, nas concentrações de fármacos utilizados, sobre a amplitude da resposta basal registrada em todos os experimentos com infusão prévia à indução elétrica de LTP/LTD (Tabela 7; Figura 11 e Figura 12; Figura 13 a, b e d; Figura 15 a e b). Detalhadamente, na comparação entre os últimos 5 min antes da infusão do fármaco e os que antecedem a HFS ou LFS (quadrado cinza em relação ao preto na Figura 12, Figura 13 e Figura 15) não houve diferença significativa do fEPSP para nenhum dos tratamentos farmacológicos (teste *t* pareado, controle *t* (6) = -0,554, *P* = 0,695; MT3 *t* (4) = -0,666, *P* = 0,542; baclofen *t* (2) = 1,319, *P* = 0,318; baclofen + MT3 *t* (2) = 0,929, *P* = 0,451; bicuculina *t* (2) = 1,926, *P* = 0,194; bicuculina + MT3 *t* (2) = 0,968, *P* = 0,435; Tabela 7 e Figura 11). O mesmo ocorreu na análise dos efeitos dos tratamentos sobre a FPP (controle *t* (6) = -0,282, *P* = 0,788; MT3 *t* (4) = 0,217, *P* = 0,839; baclofen *t* (2) = -0,614, *P* = 0,602; baclofen + MT3 *t* (2) = -1,592, *P* = 0,252; bicuculina *t* (2) = -1,068, *P* = 0,397; e bicuculina + MT3 *t* (2) = -0,617, *P* = 0,600; Tabela 7 e Figura 11). Desta forma, ambos os dados, amplitude do fEPSP ou índice de FPP, foram normalizados em relação ao período basal e analisados em relação ao período que antecede a HFS ou a LFS, apresentando, ambos os períodos, valores equivalentes de amplitude e facilitação do fEPSP.

Tabela 7 – Resultados para amplitude do fEPSP e variação da FPP antes e após a infusão do fármaco.

	Tratamento	n	Basal		Fármaco		P
			(Média ± DP)	(Média ± DP)			
EPSP	Controle	7	100,7 ± 1,3 %	99,3 ± 6,6 %	0,600		
	MT3	5	100,7 ± 2,4 %	95,9 ± 15,0 %	0,542		
	Baclofen	3	101,2 ± 4,9 %	104,5 ± 5,5 %	0,318		
	MT3 + Baclofen	3	98,8 ± 0,1 %	114,0 ± 28,4 %	0,451		
	Bicuculina	3	97,4 ± 2,1 %	109,2 ± 9,6 %	0,194		
	MT3 + Bicuculina	3	99,8 ± 1,6 %	106,5 ± 10,5 %	0,435		
FPP	Controle	7	99,2 ± 0,8 %	98,5 ± 6,2 %	0,788		
	MT3	5	100,2 ± 1,9 %	101,0 ± 8,4 %	0,839		
	Baclofen	3	98,5 ± 1,9 %	96,5 ± 3,7 %	0,602		
	MT3 + Baclofen	3	101,6 ± 1,4 %	92,0 ± 11,0 %	0,252		
	Bicuculina	3	102,1 ± 2,4 %	96,0 ± 11,9 %	0,397		
	MT3 + Bicuculina	3	102,0 ± 1,2 %	99,6 ± 5,4 %	0,600		

Figura 11 – Ausência de efeitos dos tratamentos farmacológicos sobre a resposta basal.



Nos experimentos em que a infusão foi feita antes da HFS ou LFS nenhum dos tratamentos apresentou diferença significativa (média ± desvio padrão) entre os 5 min que antecedem a infusão (*Basal*) e os que antecedem a HFS/LFS (*Fármaco*), tanto no que tange a amplitude do fEPSP (acima) quanto na FPP (abaixo). Dados apresentados em % do valor médio obtido nos 10 min finais de registro anteriores à infusão de fármaco.

4.5. Efeitos da MT3 sobre a indução de LTP

Para averiguar a ocorrência de plasticidade de longa duração tardia foram comparados os dados referentes aos períodos de 60 min após a HFS com os que antecedem essa estimulação (pré-HFS), que correspondeu ao registro basal conforme mencionado no item anterior. Além disso, os dados utilizados de cada animal correspondem à média dos valores obtidos em uma janela de 5 min imediatamente anteriores aos períodos citados, conforme ilustrado nas Figura 12 e Figura 13. As médias dos grupos com os diferentes tratamentos são apresentadas no texto em percentual de alteração em relação ao período basal, acompanhadas do erro padrão obtido.

O protocolo de HFS utilizado foi eficaz, uma vez que os animais controle apresentaram aumento de $66,0 \pm 8,44\%$ (teste *t* pareado, $t(3) = 7,82$, $P = 0,004$) na amplitude da resposta evocada pelo primeiro potencial evocado do pulso pareado. Ou seja, o protocolo utilizado foi capaz de induzir LTP. Quanto à facilitação, o grupo controle apresentou uma redução não significativa do índice de FPP ($fEPSP2/fEPSP1$) de $10,8 \pm 6,15\%$ (teste *t* pareado, $t(3) = -1,755$, $P = 0,177$).

Analisados isoladamente (sem comparar com o grupo controle), os animais infundidos com MT3 apresentaram potenciação de $31,8 \pm 15,11\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 0,170$, $P = 0,170$) e redução do índice de FPP de $8,1 \pm 2,70\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = -3,001$, $P = 0,095$), porém ambas alterações não foram estatisticamente significativas (Figura 12, Tabela 8).

Os animais infundidos com bicuculina, antagonista de receptores $GABA_A$, apresentaram potenciação significativa de $36,4 \pm 1,03\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 35,331$, $P = 0,001$). A bicuculina não alterou a FPP ($-1,7 \pm 3,73\%$, teste *t* pareado, $t(2) = -0,453$, $P = 0,695$). A administração concomitante de MT3 + bicuculina apresentou potenciação de $68,7 \pm 25,25\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 2,721$, $P = 0,113$) e redução do índice de FPP de $13,7 \pm 8,09\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = -1,69$, $P = 0,233$), porém nenhum dos dois parâmetros foi estatisticamente significativo (Figura 12, Tabela 8).

O tratamento com baclofen, agonista de receptores $GABA_B$, obteve aumento significativo do $fEPSP$ em $78,7 \pm 15,44\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 5,094$, $P = 0,036$), com redução do índice de FPP em $23,4 \pm 4,35\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = -5,37$, $P = 0,033$). Quando administrado concomitantemente à MT3, o grupo que recebeu baclofen apresentou potenciação de $66,9 \pm 8,18\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 8,173$, $P = 0,015$) e redução de $10,9 \pm 2,33\%$ da FPP (teste *t* pareado, $t(2) = -4,679$, $P = 0,043$), ambas estatisticamente significativas (Figura 13, Tabela 8).

Embora a variação dos dados obtidos nos animais do grupo tratado com MT3 tenha sido expressiva é possível se verificar uma tendência na redução da amplitude da LTP, quando comparado com o grupo controle (Figura 12 e Figura 13, Tabela 8). Por outro lado, os dados relativos a bicuculina apresentaram uma grande homogeneidade e metade dos valores de potenciação obtidos no grupo controle (Figura 12, Tabela 8). Os valores médios de potenciação obtidos para os grupos baclofen, MT3 + bicuculina ou MT3 + baclofen não diferiram dos controles. Nenhum dos grupos diferiram significativamente dos controles quanto à mediana dos fEPSPs 60 min após a HFS entre os tratamentos farmacológicos (Kruskal-Wallis, $H(5) = 7,095$, $P = 0,281$, Tabela 8, APÊNDICE B), sendo os escores obtidos para cada grupo de 10 para o grupo controle, 5 MT3, 5,7 bicuculina, 12 MT3 + bicuculina, 13 baclofen e 14 MT3 + baclofen,

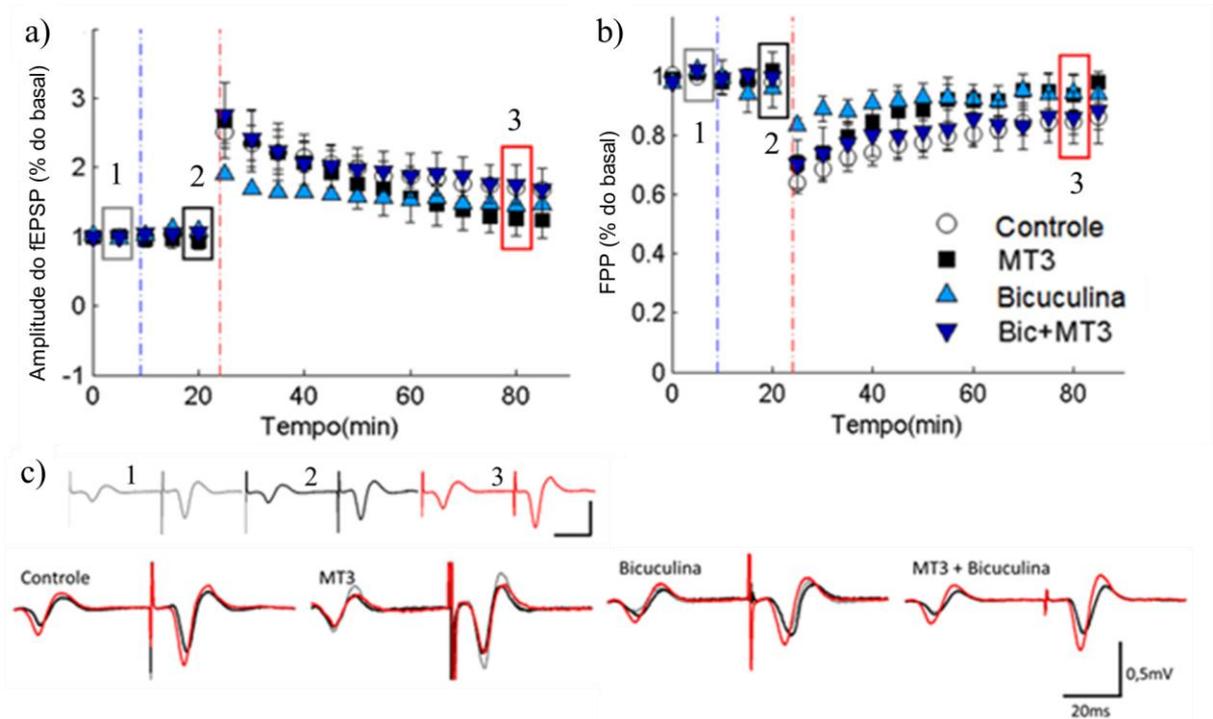
Quanto à FPP, o grupo injetado com MT3 apresentou valores similares ao controle. A injeção de bicuculina gerou valores aproximadamente seis vezes menores e o baclofen duas vezes maiores de alteração da FPP que os controles (Figura 12 e Figura 13, Tabela 8). Tendo a administração concomitante de qualquer desses dois com a MT3 gerou facilitações similares ao grupo controle. Também não houve diferença significativa com relação à modificação da FPP na comparação entre os grupos tratados (ANOVA de uma via, $F(5, 13) = 1,481$, $P = 0,262$, Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados para LTP e FPP com infusão do fármaco antes da HFS.

Tratamento	fEPSP		P¹	FPP		P¹
Controle (n = 4)	+ 66,0	± 8,44 %	0,004	- 10,8	± 6,15 %	0,177
MT3 (n = 3)	+ 31,8	± 15,11 %	0,170	- 8,1	± 2,70 %	0,095
Bicuculina (n = 3)	+ 36,4	± 1,03 %	0,001	- 1,7	± 3,73 %	0,695
MT3 + Bicuculina (n = 3)	+ 68,7	± 25,25 %	0,113	- 13,7	± 8,09 %	0,233
Baclofen (n = 3)	+ 78,7	± 15,44 %	0,036	- 23,4	± 4,35 %	0,033
MT3 + Baclofen (n = 3)	+ 66,9	± 8,18 %	0,015	- 10,9	± 2,33 %	0,043
Entre grupos			0,214 ²			0,262 ³

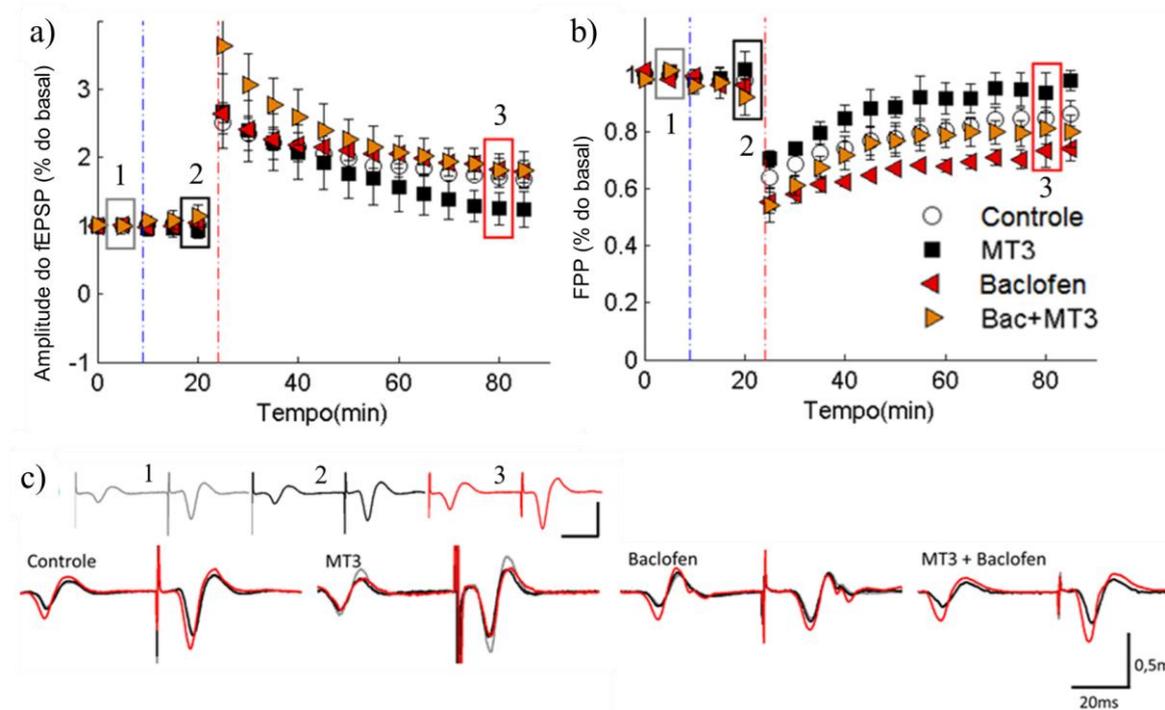
Dados apresentados como diferença média ± SEM antes da HFS e após 60 min da mesma. Teste *t* pareado (1). Comparação entre grupos para 60 min após a HFS por Kruskal-Wallis (2) ou ANOVA de uma via (3). Maiores detalhes da distribuição amostral no APÊNDICE B.

Figura 12 – Efeitos da infusão dos fármacos na indução de LTP: MT3 e bicuculina.



a) Amplitude do fEPSP relativa ao basal para cada grupo farmacológico com os dados agrupados em períodos de 5 min (média \pm SEM). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a HFS. b) Facilitação por pulso pareado relativa ao basal (amplitude do fEPSP evocado pelo segundo pulso do estímulo pareado em relação ao primeiro pulso). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a HFS. **Linhas tracejadas azuis** representam o momento de infusão do fármaco e as **vermelhas** o momento da HFS. Os **retângulos** marcam os períodos de 5 min utilizados nas análises estatísticas sendo (1) **cinza** o período basal, (2) **preto** após a infusão do fármaco e (3) **vermelho** 60 min após a HFS. c) Acima, traçados representativos de um animal controle para cada período: (1) cinza corresponde ao período basal, (2) preto ao fármaco e (3) vermelho a 60 min após HFS, conforme retângulos nos gráficos a) e b). Abaixo, sobreposição dos mesmos para um animal controle e, igualmente, traçados representativos para os demais grupos. Ambas as escalas representam as mesmas dimensões: 0,5 mV e 20 ms. Número de indivíduos igual para todos os grupos (n = 3), exceto controle (n = 4).

Figura 13 – Efeitos da infusão dos fármacos na indução de LTP: MT3 e baclofen.



a) Amplitude do fEPSP relativa ao basal para cada grupo farmacológico com os dados agrupados em períodos de 5 min (média \pm SEM). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a HFS. b) Facilitação por pulso pareado relativa ao basal (amplitude do fEPSP evocado pelo segundo pulso do estímulo pareado em relação ao primeiro pulso). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a HFS. **Linhas tracejadas azuis** representam o momento de infusão do fármaco e as **vermelhas** o momento da HFS. Os **retângulos** marcam os períodos de 5 min utilizados nas análises estatísticas sendo (1) **cinza** o período basal, (2) **preto** após a infusão do fármaco e (3) **vermelho** 60 min após a HFS. c) Acima, traçados representativos de um animal controle para cada período: (1) cinza corresponde ao período basal, (2) preto ao fármaco e (3) vermelho a 60 min após HFS, conforme retângulos nos gráficos a) e b). Abaixo, sobreposição dos mesmos para um animal controle e, igualmente, traçados representativos para os demais grupos. Ambas as escalas representam as mesmas dimensões: 0,5 mV e 20 ms. Número de indivíduos igual para todos os grupos ($n = 3$) exceto controle ($n = 4$). Dados para animais controle e MT3 são os mesmos da Figura 12, a separação dos dados em duas figuras foi feita para facilitar a visualização dos resultados para infusão de bicuculina na figura anterior e baclofen nesta.

4.6. Ausência de efeitos sobre a manutenção da LTP

Para investigar os efeitos da MT3 quanto à manutenção da LTP, foram feitos registros com infusão do fármaco após 15 min da indução da HFS (Figura 14, Tabela 9). Os animais controle apresentam uma potenciação do fEPSP de $125,0 \pm 34,60\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 3,613$, $P = 0,069$) e os infundidos com MT3 de $100,4 \pm 24,27\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = 4,138$, $P = 0,054$), não havendo diferença estatística entre os grupos (teste *t*, $t(4) = 0,558$, $P = 0,606$).

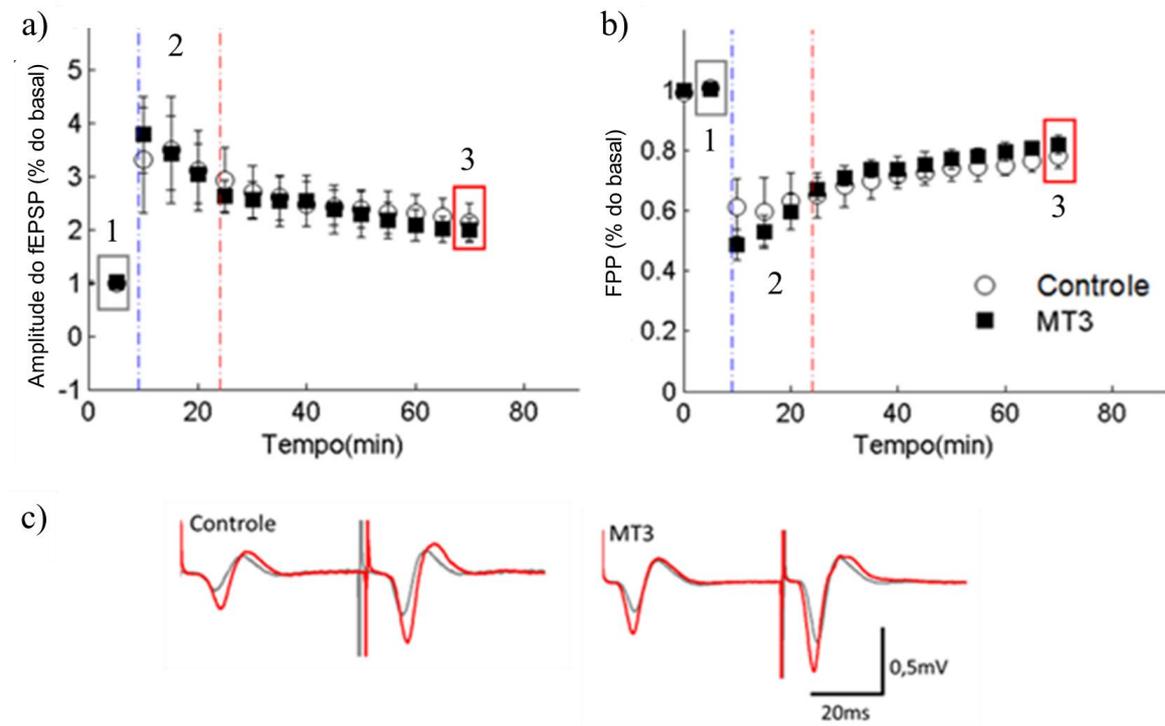
Houve redução significativa da FPP tanto no grupo controle de $24,5 \pm 5,30\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = -4,619$, $P = 0,044$), quanto no grupo com infusão de MT3 $19,7 \pm 2,72\%$ (teste *t* pareado, $t(2) = -7,22$, $P = 0,019$), porém não houve diferença estatística entre os grupos (teste *t*, $t(4) = -1,132$, $P = 0,321$). Em suma, a MT3 não modificou as características da LTP ou da FPP induzida pela HFS observadas nos animais controle, indicando que não há efeito da MT3 quando infundida 15 min após a HFS.

Tabela 9 – Resultados para LTP e FPP.

Tratamento	fEPSP	P¹	FPP	P¹
Controle (n = 3)	+ 125,0 ± 34,60 %	0,069	- 24,5 ± 5,30 %	0,044
MT3 (n = 3)	+ 100,4 ± 24,27 %	0,054	- 19,7 ± 2,72 %	0,019
Entre grupos		0,606 ²		0,321 ²

Dados apresentados em diferença média ± SEM antes da HFS e após 60 min da mesma. Teste *t* pareado (1). Comparação entre grupos para 60 min após a HFS por teste *t* para amostras independentes (2).

Figura 14 – Infusão de MT3 não afeta a manutenção da LTP.



a) Amplitude do fEPSP relativa ao basal para cada grupo farmacológico com os dados agrupados em períodos de 5 min (média \pm SEM). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a HFS. b) Facilitação por pulso pareado relativa ao basal (amplitude do fEPSP evocado pelo segundo pulso do estímulo pareado em relação ao primeiro pulso). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a HFS. **Linhas tracejadas vermelhas** representam o momento de infusão do fármaco e as **azuis** o momento da HFS. **Retângulos** marcam os períodos de 5 min utilizados nas análises estatísticas sendo (1) **cinza** o período basal e (3) **vermelho** 60 min após a HFS. c) Traçados representativos sobrepostos dos períodos analisados: cinza corresponde ao período basal e vermelho a 60 min após HFS, conforme retângulos nos gráficos a) e b). Número de 3 indivíduos para todos os grupos.

4.7. Estimulação de baixa frequência

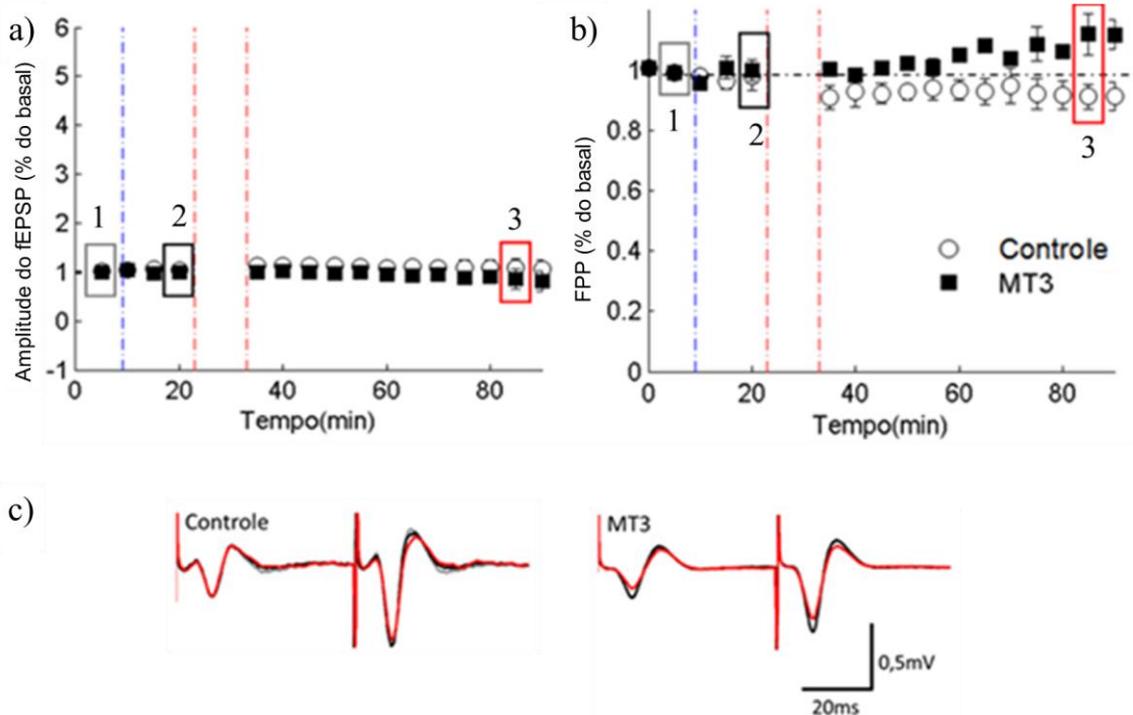
Não foi possível induzir LTD expressiva nas colaterais de Schaffer com o protocolo de 600 pulsos a 1 Hz no grupo controle ($-10,5 \pm 11,40$ %, teste t pareado, $t(2) = -0,889$, $P = 0,468$, Figura 15, Tabela 10). No entanto, é interessante notar que para o índice de FPP os valores mínimos e máximos atingidos 60 min após a LFS para os animais controle foram de 90% e 99% enquanto que os MT3 atingiram 107% e 117% (maiores detalhes da distribuição amostral no APÊNDICE B).

Tabela 10 – Síntese de resultados 60 min após a LFS.

Tratamento	fEPSP	P	FPP	P
Controle (n = 3)	$-10,5 \pm 11,40$ %	0,468	$-5,4 \pm 7,24$ %	0,532
MT3 (n = 2)	$-18,1 \pm 23,90$ %	-	$11,8 \pm 8,40$ %	-

Dados apresentados em diferença média \pm SEM antes da LFS e após 60 min da mesma, teste t pareado.

Figura 15 – Dados relativos aos experimentos de infusão de fármaco 15 min antes da LFS.



a) Amplitude do fEPSP relativa ao basal para cada grupo farmacológico com os dados agrupados em períodos de 5 min (média \pm SEM). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a LFS. b) Facilitação por pulso pareado relativa ao basal (amplitude do fEPSP evocado pelo segundo pulso do estímulo pareado em relação ao primeiro pulso). Não houve diferença estatística entre grupos 60 min após a LFS. **Linhas tracejadas azuis** representam o momento de infusão do fármaco e as **vermelhas** o momento da LFS. **Retângulos** marcam os períodos de 5 min utilizados nas análises estatísticas sendo (1) **cinza** o período basal, (2) **preto** após a infusão do fármaco e (3) **vermelho** 60 min após a LFS. c) Traçados representativos sobrepostos dos períodos analisados: cinza corresponde ao período basal, preto antes da LFS e vermelho 60 min após a LFS, conforme retângulos nos gráficos a) e b). Número de 3 indivíduos o controle e 2 para MT3.

5. DISCUSSÃO

Conforme previamente descrito, a sinalização colinérgica muscarínica exerce função modulatória sobre diferentes aspectos da cognição e emoções (DEIANA; PLATT; RIEDEL, 2011; HASSELMO, 2006; JERUSALINSKY; KORNISIUK; IZQUIERDO, 1997; TELES-GRILLO RUIVO; MELLOR, 2013). Todos os cinco subtipos de mAChR são expressos no hipocampo dos mamíferos, onde participam não apenas de funções cognitivas, mas também de processos plásticos sinápticos como a LTP. Essa diversidade de alvos moleculares ativados de forma sobreposta pela maioria dos fármacos tem dificultado avanços significativos na compreensão da contribuição de cada componente desse sistema (BELL; BELL; MCQUISTON, 2013; HARVEY *et al.*, 1998).

A MT3 é um fármaco altamente seletivo para o subtipo M₄ permitindo a investigação das ações modulatórias específicas deste receptor no aprendizado e na memória (JERUSALINSKY *et al.*, 1998, 2000). Os M₄ são receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que atuam via G_{i/o} desencadeando efeitos inibitórios sobre a excitabilidade neural das células em que estão presentes (JERUSALINSKY *et al.*, 1995; SÁNCHEZ *et al.*, 2009; VAN DER ZEE; LUITEN, 1999).

Estudos comportamentais anteriores indicaram que a administração intra-hipocampal de MT3 imediatamente após o treino em uma tarefa aversiva produz efeito amnésico (DIEHL, 2010; FERREIRA, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003; LANZIOTTI, 2007), enquanto a administração em momentos posteriores, por exemplo, antes da evocação (quando o engrama já estaria estabelecido), causa facilitação (DIEHL, 2010; DIEHL *et al.*, 2007). Uma explicação para estes resultados aparentemente antagônicos é a de que os circuitos locais envolvidos na consolidação e na evocação da memória diferem em sua natureza, possivelmente devido a modificações plásticas advindas dos processos envolvidos na consolidação do referido engrama. O efeito amnésico da MT3 sobre a consolidação é interpretado como devendo-se à desinibição de interneurônios GABAérgicos, reduzindo a excitabilidade neural de seus alvos excitatórios (por exemplo, neurônios glutamatérgicos); já na evocação, o efeito passaria a se dar sobretudo na modulação de células glutamatérgicas. Embora este seja um modelo plausível, sua realidade precisa ser demonstrada.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de investigar como o subsistema de receptores M₄ modula a plasticidade sináptica de longa duração (LTP e LTD), e como tal ação interage com o sistema GABAérgico, utilizando-se um modelo de registro eletrofisiológico

extracelular *in vivo* que permite a infusão concomitante de fármacos de modo similar à que foi feita nos experimentos comportamentais.

O protocolo de estimulação elétrica de alta frequência utilizado foi suficiente para induzir LTP, com os animais controle exibindo aumento significativo (relativo à linha basal) da ordem de $66,0 \pm 8,44\%$ na amplitude da resposta evocada (Tabela 8). Entretanto, a FPP não apresentou diferença estatística significativa não sendo possível afirmar que ocorreu modificação pré-sináptica com aumento da probabilidade de liberação de neurotransmissores com este protocolo.

Por outro lado, não houve diferença significativa entre a amplitude da resposta evocada no período basal e 60 min após a HFS no grupo MT3. Em comparação com o grupo controle, não houve diferença significativa em termos de variação de amplitude ou alteração da FPP, provavelmente devido à grande variabilidade estatística dos registros, especialmente do grupo tratado com MT3 e ao número de animais empregados.

Esses achados preliminares contrastam com um experimento *ex vivo* no qual a LTP é completamente abolida com a aplicação da MT3 (SÁNCHEZ *et al.*, 2009). É bastante possível que a diferença se deva aos protocolos, bastante diversos. O uso de protocolo *in vivo* permite a preservação de importantes interconexões envolvidas na modulação colinérgica (entre outras) como a via septomedial e as vias associativas e comissurais do hipocampo, enquanto nas fatias, por registro *in vitro*, muitas dessas conexões se encontram seccionadas. Além disso, no referido trabalho, o fármaco é borrifado sobre as fatias enquanto que, neste, o mesmo foi infundido na estrutura, configurando uma difusão diferenciada da toxina no tecido. Uma outra importante observação reside no fato de que, conforme Sánchez *et al.* (2009), a MT3 altera a resposta basal, o mesmo não tendo sido observado neste trabalho.

Num segundo grupo de experimentos dessa dissertação, para investigar os efeitos da MT3 sobre a manutenção da LTP, a mesma foi infundida 15 min após a HFS. Ambos os grupos, controle e MT3 apresentaram uma potenciação 100% maior que os valores de amplitude do fEPSP basal, porém não houve significância estatística (Figura 14, Tabela 9). Além disso, ambos apresentaram alteração significativa da facilitação em relação ao basal. Observando-se que nos animais controle com infusão do fármaco anterior à HFS houve LTP significativa de 66% e não houve alteração da facilitação (Tabela 8), conclui-se que é necessário o aumento do número amostral para melhor análise dos resultados. Ainda assim, a ausência de diferença entre os grupos tratado e controle sugere que não há interferência por parte da toxina na manutenção da LTP.

Segundo Diehl (2010), durante um aprendizado contextual, se o animal é infundido com MT3 logo após o treino gera-se efeito amnésico, porém em 45 ou 360 min esse efeito é neutro e em 90 ou 190 min é inverso. Embora não haja correspondência exata entre os processos envolvidos com a memória e a plasticidade sináptica, ambos estão relacionados, sendo possível inferir que houvesse efeitos na manutenção da LTP exercidos pela MT3. No entanto, o mesmo não foi verificado para o intervalo de observação utilizado. Isso pode ser devido a inúmeras causas, algumas delas são que a LTP, conforme induzida neste trabalho, é uma alteração específica em uma via sináptica, não envolvendo diversas estruturas cerebrais engajadas com a aquisição e consolidação da memória (ZANATTA *et al.*, 1997); a ausência de mecanismos que ocorrem no animal acordado e interagindo com o ambiente como a reverberação da informação entre as vias hipocampais por diversas horas após o treino (CARR; JADHAV; FRANK, 2011); ou ainda a interação entre a LTP e a LTD no aprendizado e memória é muito mais tênue que o modelo de plasticidade induzida por HFS.

Quanto à estimulação por LFS, ela não foi capaz de induzir LTD no grupo controle (Figura 15, Tabela 10), o que, para LTD homossináptica hipocampal em animais adultos, havia sido relatado anteriormente (ERRINGTON *et al.*, 1995; STAUBLI; SCAFIDI, 1997). O protocolo clássico introduzido por Dudek e Bear (1992) e utilizado nesse trabalho é capaz de induzir LTD homossináptica hipocampal quando a estimulação é ipsilateral (HEYNEN; ABRAHAM; BEAR, 1996). Protocolos alternativos podem ser utilizados para estimulação contralateral, ainda sim, a LFS é menos determinante de sucesso na indução de LTD do que a HFS na potenciação (STAUBLI; SCAFIDI, 1997). Desta forma, outros protocolos devem ainda ser testados no estabelecimento de uma LTD por indução elétrica satisfatória.

Por fim, uma vez que a hipótese testada é a de que o bloqueio dos receptores M₄ pela MT3 se dê sobretudo sobre interneurônios GABAérgicos, e menos sobre neurônios principais glutamatérgicos durante a indução da LTP, foi investigada a interação farmacológica entre MT3 e bicuculina ou baclofen infundidos 15 min antes da HFS.

O tratamento com bicuculina na concentração de 0,06 µg/µl gerou potenciação de 36,4% e não alterou a FPP em relação aos registros basais (Figura 12, Tabela 8). Ainda que não tenha sido identificada diferença estatística entre os efeitos da bicuculina em relação aos controles, isso provavelmente se deve à insuficiência amostral, uma vez que os valores obtidos para a bicuculina equivalem à metade dos obtidos no grupo controle. A aplicação concomitante de MT3 e bicuculina apresentou potenciação e redução da FPP não significativas de 68,7% e 13,7% respectivamente, valores próximos ao obtidos para o grupo

controle. Embora não seja possível afirmar, os dados sugerem que a bicuculina apresenta um efeito próprio que foi revertido pela administração concomitante de MT3.

O baclofen promoveu uma potenciação semelhante à dos controles de 78,7% e reduziu significativamente a FPP em relação aos registros basais na concentração de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Figura 13, Tabela 8). A administração concomitante de MT3 apresentou LTP de 66,9% e redução da facilitação de 10,9% em relação aos dados basais, valores similares ao do grupo controle. Assim, os dados indicam que há um efeito do baclofen que é revertido pela administração de MT3.

No comportamento, 0,06 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de bicuculina é uma dose subefetiva, não demonstrando efeito sobre o aprendizado e a MT3 4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ é amnésica, sendo o efeito da MT3 revertido pela aplicação concomitante de bicuculina (LANZIOTTI, 2007). Similarmente 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de baclofen é também uma dose subefetiva comportamentalmente que também reverte o efeito da MT3 (LANZIOTTI, 2007). Ainda que diferente do esperado pelos resultados comportamentais, é interessante que os achados preliminares aqui apresentados mostram uma diminuição dos efeitos da bicuculina e do baclofen na LTP *in vivo*. Devido ao pequeno número amostral, esta investigação deve ser completada para termos segurança deste resultado.

A ativação de M_4 , alvo alostérico da MT3, leva a uma redução na produção de AMPc por inibição da adenilato ciclase, reduzindo a excitabilidade e a liberação de neurotransmissores (BELL; BELL; MCQUISTON, 2013; KOSTENIS; ZENG; WESS, 1999). Desta forma, se a modulação de M_4 se desse sobre as células glutamatérgicas durante a indução da LTP, a infusão de MT3 levaria a um aumento na liberação de glutamato com uma potenciação ainda mais expressiva em relação aos animais controle. No entanto, se os receptores M_4 não estivessem sendo modulados em células excitatórias, mas sim em células inibitórias, a ativação deste receptor levaria a uma redução da inibição sobre a sinapse glutamatérgica estudada, e a MT3 geraria uma redução da potenciação, conforme a tendência apresentada. Para verificar essa hipótese utilizamos doses comportamentalmente subefetivas de bicuculina e baclofen 15 min antes da HFS em presença ou ausência da MT3. Nem a bicuculina, nem o baclofen apresentaram efeitos sobre a resposta evocada basal. O grupo da bicuculina teve uma potenciação em 60 min após a HFS de $36,4 \pm 1,03$ %, similar ao grupo MT3, porém significativa em relação ao basal, e sem apresentar FPP. Já o baclofen, além de ter induzido uma potenciação de $78,7 \pm 15,44$ %, também apresentou redução da FPP em $23,4 \pm 4,35$ % em relação ao período pré-HFS. Embora essas modificações não tenham indicado diferença estatística em relação ao grupo controle, elas indicam uma tendência desses grupos

de tratamento a apresentarem efeitos próprios. Se isso for verdade, é possível que a utilização da subdose escolhida com base nos resultados comportamentais (LANZIOTTI, 2007) precise ser revisada com a realização de uma curva dose de fármaco-resposta, específica para os efeitos desses fármacos no protocolo utilizado. Na análise entre grupos de tratamento farmacológico não foram identificadas diferenças significativas, mas observando-se os gráficos correspondentes nota-se que há uma tendência aparente da MT3 infundida junto com outros fármacos de aproximá-los ao grupo controle, amplificando as modificações com a bicuculina e reduzindo as mesmas com baclofen. Porém os resultados são inconclusivos até o momento. Se esta tendência se confirmar, mais estudos serão necessários para investigar se esses efeitos sinérgicos de MT3 e bicuculina ou MT3 e baclofen se dão sobre as mesmas células inibitórias ou sobre células diferentes.

Células em cesto que expressam colecistoquinina são moduladas em sua atividade por receptores M_3 e a ativação glutamatérgica aumenta essa excitabilidade celular. No entanto, as células em cesto que expressam parvalbumina não são afetadas por esta ativação e apresentam sensibilidade aos receptores M_1 (CEA-DEL RIO *et al.*, 2010). Assim, provavelmente os receptores M_4 também devem possuir especificidade celular para subtipos de interneurônios inibitórios, ainda mais considerando sua peculiar distribuição tecidual uma vez que em CA1, eles se encontram distribuídos em neurônios de neuritos finos que adentram os estratos radiado e de orientação e também em neuropilos nessas mesmas regiões, sendo grande parte dessas localizações pré-sinápticas e não-colinérgicas (LEVEY *et al.*, 1995). Essa distribuição vai a favor de nossa hipótese inicial de que M_4 age como heteroceptor modulando sinapses GABAérgicas.

Apesar dos achados deste trabalho serem ainda preliminares e inconclusivos, isso não diminui seu valor prático, na medida em que permitiu a padronização de uma técnica antes indisponível na Universidade. A técnica de eletrofisiologia *in vivo* em animal anestesiado permite investigar relações entre os resultados comportamentais e a plasticidade sináptica com a manutenção de grande parte das estruturas encefálicas íntegras. A implementação dessa técnica, realizada neste trabalho, abre portas para futuras investigações.

6. CONCLUSÕES

- Veículo, MT3, baclofen e bicuculina, isoladamente ou combinados, não alteraram a amplitude do fEPSP basal quando infundidos pela via intrahipocampal;
- A *LTP* foi induzida na via Colateral de Schaffer contralateral num protocolo de estimulação que consiste de 10 trens a 0,5 Hz constituídos de 20 pulsos a 100 Hz;
- *MT3* reduziu a *LTP* em relação ao controle, mas não de forma significativa;
- Os resultados de *LTP* e *FPP* para *bicuculina* e *bicuculina* + *MT3* injetados no hipocampo não diferiram dos controles;
- *Baclofen* reduziu significativamente a *FPP* em relação ao fEPSP basal;
- Os resultados de *LTP* e *FPP* para o grupo com injeção de *MT3* + *baclofen* intrahipocampal também não diferiram dos controles;
- A *MT3* não exerceu efeito na *manutenção da LTP* quando aplicada 15 min após a indução da mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, K. *et al.* Facilitatory but nonessential role of the muscarinic cholinergic system in the generation of long-term potentiation of population spikes in the dentate gyrus in vivo. *Neuropharmacology*, v. 33, n. 7, p. 847–852, jul. 1994.
- ADEM, A. *et al.* Toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* that inhibit the binding of quinuclidinyl benzilate to muscarinic acetylcholine receptors. *Biochimica et biophysica acta*, v. 968, n. 3, p. 340–5, 11 mar. 1988.
- ANDERSEN, P. *et al.* *The Hippocampus Book*. Oxford University Press, 2007.
- BARTH, A. M. I.; MODY, I. Changes in hippocampal neuronal activity during and after unilateral selective hippocampal ischemia in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 31, n. 3, p. 851–860, 2011.
- BELL, L. A.; BELL, K. A.; MCQUISTON, A. R. Synaptic muscarinic response types in hippocampal CA1 interneurons depend on different levels of presynaptic activity and different muscarinic receptor subtypes. *Neuropharmacology*, v. 73, p. 160–173, 2013.
- BIRDSALL, N. J. M. *et al.* *Acetylcholine receptors (muscarinic): M4 receptor*. Disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/ObjectDisplayForward?objectId=16>>.
- BLISS, T. V. P.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of physiology*, v. 232, p. 331–356, 1973.
- BONINI, J. S. *et al.* Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. *Neural Plasticity*, v. 2011, 2011.
- BRUNTON, L. *et al.* Drugs acting at synaptic and neuroeffector junctional sites. *Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*. McGraw-Hill Professional, 2008. p. 85–113.
- CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Modulation of memory storage processes. *Perspectives on memory research*, n. 3, p. 33–64, 1988.
- CARR, M. F.; JADHAV, S. P.; FRANK, L. M. Hippocampal replay in the awake state: a potential substrate for memory consolidation and retrieval. *Nature neuroscience*, v. 14, n. 2, p. 147–53, fev. 2011.
- CASTRO-ALAMANCOS, M. A.; CALCAGNOTTO, M. E. Presynaptic long-term potentiation in corticothalamic synapses. v. 19, n. 20, p. 9090–9097, 1999.
- CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological reviews*, v. 50, n. 2, p. 279–90, jun. 1998.

- CEA-DEL RIO, C. a *et al.* M₃ muscarinic acetylcholine receptor expression confers differential cholinergic modulation to neurochemically distinct hippocampal basket cell subtypes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 30, n. 17, p. 6011–24, 28 abr. 2010.
- CHAILLAN, F. A.; TRUCHET, B.; ROMAN, F. S. Extracellular recordings of rodents in vivo: their contribution to integrative neuroscience. *Journal of Integrative Neuroscience*, v. 7, n. 2, p. 287–313, 2008.
- CHALLISS, R. A. J.; TOBIN., A. B.. *Acetylcholine receptors (muscarinic), introduction*. Disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyIntroductionForward?familyId=2>>.
- CITRI, A.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 18–41, jan. 2008.
- COLCIAGO, A. *et al.* Learning and memory: Steroids and epigenetics. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 150, p. 64–85, 2015.
- COSTENLA, A. R.; CUNHA, R. A.; DE MENDONÇA, A.. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 20, n. SUPPL.1, 2010.
- CREAGER, B. Y. R.; DUNWIDDIE, T.; LYNCH, G.. Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region. *Journal of physiology*, v. 299, p. 409–424, 1980.
- DEBANNE, D. *et al.* Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *Journal of physiology*, v. 491, n. 1, p. 163–176, 1996.
- DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G.. The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural brain research*, v. 221, n. 2, p. 389–411, 10 ago. 2011.
- DIEHL, F. *et al.* Facilitatory effect of the intra-hippocampal pre-test administration of MT3 in the inhibitory avoidance task. *Behavioural brain research*, v. 177, n. 2, p. 227–31, 27 fev. 2007.
- DIEHL, F. *Plasticidade de receptores colinérgicos muscarínicos M4 hipocâmpais decorrente de uma consolidação da memória como possível marcador sináptico do engrama: ensaios farmacológicos-comportamentais*. Tese (Doutorado em Neurociências) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS, Porto Alegre, 2010.
- DREVER, B. D; RIEDEL, G.; PLATT, B.. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural brain research*, v. 221, n. 2, p. 505–14, 10 ago. 2011.
- DUTAR, P.; NICOLL, R. A. Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron*, v. 1, n. 7, p. 585–591, set. 1988.

- ERRINGTON, M. L. *et al.* Stimulation at 1-5 Hz does not produce long-term depression or depotentiation in the hippocampus of the adult rat in vivo. *J Neurophysiol*, v. 74, n. 4, p. 1793–1799, 1 out. 1995.
- EVERITT, B. J.; ROBBINS, T. W. Central cholinergic systems and cognition. *Annual review of psychology*, v. 48, p. 649–684, 1997.
- FERREIRA, A. R. *Efeitos da modulação muscarínica hipocampal na memória de ratas em diferentes tarefas comportamentais*. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências, UFRGS, Porto Alegre, 2001.
- FERREIRA, A. R. *et al.* Role of hippocampal M₁ and M₄ muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 74, n. 2, p. 411–5, jan. 2003.
- FLECKNELL, P.; MEREDITH, Anna. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3. ed. Elsevier Inc., 2009.
- FUJII, S. *et al.* A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Research*, v. 999, n. 1, p. 20–28, 2004.
- GOLD, P. E. *et al.* Modulation of multiple memory systems: from neurotransmitters to metabolic substrates. *Hippocampus*, v. 23, n. 11, p. 1053–1065, 2013.
- GONZÁLEZ, J. C. *et al.* Presynaptic muscarinic receptor subtypes involved in the enhancement of spontaneous GABAergic postsynaptic currents in hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience*, v. 33, n. 1, p. 69–81, jan. 2011.
- GRAY, J. D.; MILNER, T. A.; MCEWEN, B. S. Dynamic plasticity: The role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors. *Neuroscience*, v. 239, p. 214–227, 2013.
- GULYÁS, A. I.; ACSÁDY, L.; FREUND, T. F. Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus. *Neurochemistry International*, v. 34, n. 5, p. 359–372, 1999.
- HARA, K.; HARRIS, R. A. The Anesthetic Mechanism of Urethane: The Effects on Neurotransmitter-Gated Ion Channels. *Anesthesia & Analgesia*, v. 94, n. 2, p. 313–318, fev. 2002.
- HARVEY, A. L. *et al.* What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, v. 36, n. 11, p. 1635–40, nov. 1998.
- HASSELMO, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 16, n. 6, p. 710–715, 2006.
- HEBB, D. O. *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. 1949. v. 44.

- HEYNEN, A. J.; ABRAHAM, W. C.; BEAR, M. F. Bidirectional modification of CA1 synapses in the adult hippocampus in vivo. *Nature*, v. 381, n. 6578, p. 163–6, 9 maio 1996.
- HÖLSCHER, C. Synaptic plasticity and learning and memory: LTP and beyond. *Journal of neuroscience research*, v. 58, n. 1, p. 62–75, 1 out. 1999.
- IARC WORKING GROUP. Alcohol consumption and ethyl carbamate. 2007, Lyon, França: [s.n.], 2007.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*, v. 68, n. 3, p. 285–316, 1997.
- JERUSALINSKY, D. *et al.* Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport*, v. 9, n. 7, p. 1407–11, 11 maio 1998.
- JERUSALINSKY, D. *et al.* Muscarinic toxins from the venom of Dendroaspis snakes with agonist-like actions. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 33, n. 4, p. 389–97, abr. 1995.
- JERUSALINSKY, D. *et al.* Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 38, n. 6, p. 747–61, jun. 2000.
- JERUSALINSKY, D.; KORNISIUK, E.; IZQUIERDO, I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochemical research*, v. 22, n. 4, p. 507–15, abr. 1997.
- JOLKKONEN, M. *et al.* A toxin from the green mamba Dendroaspis angusticeps: amino acid sequence and selectivity for muscarinic m4 receptors. *FEBS letters*, v. 352, n. 1, p. 91–4, 19 set. 1994.
- JOLKKONEN, M. *Muscarinic Toxins from Dendroaspis (Mamba) Venom*. Tese (Doutor de Filosofia em Bioquímica) – Universidade de Uppsala, Uppsala, 1996.
- KANDEL, E. R. *et al.* *Principles of Neural Science*. Fifth ed. New York: McGraw Hill Professional, 2012.
- KOSTENIS, E.; ZENG, F. Y.; WESS, J. Structure-function analysis of muscarinic receptors and their associated G proteins. *Life Sciences*, v. 64, n. 6-7, p. 355–362, 1999.
- LANZIOTTI, V. M. N. B. *Interações do sistema gabaérgico com os receptores muscarínicos M4 no processamento da memória*. 2007. UFRGS, 2007.
- LEACH, K. *et al.* Structure-Function Studies of Muscarinic Acetylcholine Receptors. In: FRYER, A. D.; CHRISTOPOULOS, A.; NATHANSON, N. M. (Org.). *Muscarinic Receptors*. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. v. 208. p. 29–48.

- LEÃO, R. N. *et al.* OLM interneurons differentially modulate CA3 and entorhinal inputs to hippocampal CA1 neurons. *Nature neuroscience*, v. 15, n. 11, p. 1524–30, nov. 2012.
- LESCH, K.; WAIDER, J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*, v. 76, n. 1, p. 175–91, 4 out. 2012.
- LEVEY, A. I. *et al.* Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 15, n. 5 Pt 2, p. 4077–92, maio 1995.
- MOHAPEL, P. *et al.* Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiology of Aging*, v. 26, n. 6, p. 939–946, 2005.
- MOLDESTAD, O. *et al.* Tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 176, n. 2, p. 57–62, 2009.
- NABAVI, S. *et al.* Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, v. 511, n. 7509, p. 348–52, 17 jul. 2014.
- ÖGREN, S. O. *et al.* The role of 5-HT1A receptors in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, v. 195, n. 1, p. 54–77, 2008.
- OLIANAS, M. C. *et al.* Selectivity profile of muscarinic toxin 3 in functional assays of cloned and native receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 288, n. 1, p. 164–70, jan. 1999.
- OTMAKHOVA, N. A.; LISMAN, J. E. D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 16, n. 23, p. 7478–7486, 1996.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th. ed. San Diego: Academic Press, 1998.
- QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. *Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research*. 1st. ed. São Paulo, SP: Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia, 2010. p. 227–269.
- REICHENBACH, N. *et al.* Differential effects of dopamine signalling on long-term memory formation and consolidation in rodent brain. *Proteome Science*, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2015.
- ROUSE, S. T. *et al.* Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life sciences*, v. 64, n. 6-7, p. 501–9, jan. 1999.
- ROUSE, S. T.; LEVEY, A. I. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity in septohippocampal neurons and other identified hippocampal afferents. *The Journal of comparative neurology*, v. 375, n. 3, p. 406–16, 18 nov. 1996.

- RUMACK, B. H.; SPOERKE, D. G. *Handbook of Mushroom Poisoning: Diagnosis and Treatment*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
- SÁNCHEZ, G. *et al.* M₄ muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. *Journal of neuroscience research*, v. 87, n. 3, p. 691–700, 15 fev. 2009.
- SERVENT, D.; FRUCHART-GAILLARD, C. Muscarinic toxins: Tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *Journal of Neurochemistry*, v. 109, n. 5, p. 1193–1202, 2009.
- SHEPHERD, G. M. *The Synaptic Organization of the Brain*. 5th. ed. New York: Oxford University Press, 2004.
- STAUBLI, U.; SCAFIDI, J. Studies on Long-Term Depression in Area CA1 of the Anesthetized and Freely Moving Rat. *The Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 12, p. 4820–4828, 15 jun. 1997.
- STENT, G. S. A. physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 70, n. 4, p. 997–1001, 1973.
- SUGISAKI, E. *et al.* Cholinergic modulation on spike timing-dependent plasticity in hippocampal CA1 network. *Neuroscience*, v. 192, p. 91–101, 29 set. 2011.
- TELES-GRILLO RUIVO, L. M.; MELLOR, J. R. Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, v. 5, n. JUL, p. 1–15, 2013.
- TETER, B.; ASHFORD, J. W. Neuroplasticity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, v. 70, n. 3, p. 402–437, 2002.
- THIELE, A. Muscarinic signaling in the brain. *Annual review of neuroscience*, v. 36, p. 271–94, 2013.
- TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. *Molecular brain*, v. 3, p. 15, 2010.
- VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. GABAergic neurons of the rat dorsal hippocampus express muscarinic acetylcholine receptors. *Brain research bulletin*, v. 32, n. 6, p. 601–9, jan. 1993.
- VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Progress in Neurobiology*, v. 58, n. 5, p. 409–471, ago. 1999.
- VAN STRIEN, N. M.; CAPPAERT, N. L. M.; WITTER, M. P. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 10, n. 4, p. 272–282, 2009.

- WHITLOCK, J. R. *et al.* Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, v. 313, n. August, p. 1093–1097, 2006.
- WISE, R. A. Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 5, n. 6, p. 483–494, 2004.
- XIONG, H.; KRUGERS, H. J. Tuning hippocampal synapses by stress-hormones: Relevance for emotional memory formation. *Brain Research*, p. 1–7, 2015.
- YAMAKURA, T.; HARRIS, R. A. Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology*, v. 93, n. 4, p. 1095–1101, 2000.
- YEOMANS, J. S. Muscarinic Receptors in Brain Stem and Mesopontine Cholinergic Arousal Functions. In: FRYER, A. D.; CHRISTOPOULOS, A.; NATHANSON, N. M. (Org.). *Muscarinic Receptors*. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. v. 208. p. 243–259.
- ZANATTA, M. S. *et al.* Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. *Brazilian journal of medical and biological research*, 1997. v. 30, n. 2, p. 235–240, 1997.
- ZANONA, Q. K.; CRESTANI, A. P. Neuroplasticidade. In: ZANCAN, D. *et al.* (Org.). *Apostila do V Curso de Neurociências*. Porto Alegre: [s.n.], 2014. .
- ZARRINDAST, M. R. *et al.* Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *Journal of Psychopharmacology*, v. 16, n. 4, p. 313–319, 1 jul. 2002.
- ZHANG, H.; LIN, S.; NICOLELIS, M. A. L. Spatiotemporal coupling between hippocampal acetylcholine release and theta oscillations in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 30, n. 40, p. 13431–40, 6 out. 2010.

APÊNDICE A – TRATAMENTO DE DADOS

1. Pré-tratamento de dados: Medir dados do animal com o Clampfit
 - a. Selecione eventos de registro de resposta
 - b. Após, indique início e final das respostas a cada um dos pulsos pareados
 - c. Extraia em “estatística” a amplitude e a inclinação das respostas selecionadas
2. Colocar dados tabulados de amplitude e inclinação da resposta em arquivo “.m” no MATLAB criando:
 - a. Uma variável de arranjo de células que identifique os parâmetros de experimentação formada pela letra A (de animal) e um número seriado com dois algarismos, conforme:
 - i. $A01 = [\{ \text{'animal'} \} \{ \text{'HFS ou LFS'} \} \{ \text{'fármaco'} \} \{ \text{'momento da infusão'} \}]$
 - b. E três matrizes, uma pra cada período de registro, conforme:
 - c. A01b – período basal
 - d. A01f – fármaco, ou período de registro correspondente para controles
 - e. A01p – período após a indução de plasticidade por HFS ou LFS
 - i. OBS: o algoritmo atualmente não tem suporte para tratar dados do período que corresponde a indução de HFS ou LFS.
3. Abrir “Resume”
 - a. Trocar valor da variável “filename” para o nome do arquivo “.m” recém gerado, verificar intervalo entre pulsos pareados e o número total de animais incluídos no arquivo;
 - b. Iniciar programa “Resume” que:
 1. Importa dados para variáveis do MATLAB abrindo ou iniciando o arquivo “.m”
 2. Inicia Passo 1
 - a. Tabula os dados brutos em um arquivo “.xls” com nome conforme identificação do animal na planilha “RawData”, com o seguinte cabeçalho:
 - i. Animal
 - ii. Grupo de tratamento
 - iii. Protocolo de indução: HFS ou LFS
 - iv. Momento da infusão: pré ou pós
 - v. Período: 1, 2 ou 3
 - vi. Tempo
 - vii. Amplitude do fEPSP evocado pelo 1º pulso de estímulo

- viii. Amplitude do fEPSP evocado pelo 2º pulso de estímulo
 - ix. Inclinação do fEPSP evocado pelo 1º pulso de estímulo
 - x. Inclinação do fEPSP evocado pelo 2º pulso de estímulo
- b. Normaliza os dados dividindo o valor registrado para cada tempo pela média dos 10 últimos minutos do período denominado basal;
- c. Calcula a taxa de facilitação por pulso pareado
- i.
$$\frac{\text{Amplitude ou inclinação da resposta ao pulso 2}}{\text{Amplitude ou inclinação da resposta ao pulso 1}}$$
- d. Identifica e cria uma variável de filtro para valores de amplitude ou inclinação do fEPSP muito fora do esperado:
- i. Utiliza limiar de seleção de valores baseados na média dos 10 min próximos ao dado avaliado mais ou menos 5 desvios padrão, conforme:
 - $\text{Média fEPSP}_{10\text{min}} \pm 5 \times SD$
 - ii. Divide todos os dados pela média dos 10 últimos minutos de período basal;
- e. Salva uma imagem por animal com gráficos para: amplitude, inclinação e taxa de facilitação por pulso pareado do fEPSP;
- i. Tabula dados normalizados em arquivo “.xls” na planilha “NormData”, com o cabeçalho da tabela anterior acrescido das seguintes colunas:
 - Facilitação por pulso pareado calculada pela amplitude dos fEPSP
 - Facilitação por pulso pareado calculada pela inclinação dos fEPSP
 - Variável de filtro, que indica os valores que serão suprimidos no restante do processamento de dados;
3. Inicia Passo 2
- a. Aloca cada animal conforme tratamento farmacológico utilizado e conta número de animais por grupo;
 - b. Seleciona número de medidas a serem utilizados para processamento de dados em cada Período:
 - i. 1 (basal): 60 medidas, equivalente a 10 min finais do período considerando intervalo entre pulsos utilizado que foi de 10 s.
 - ii. 2: 90 medidas, equivalente a 15 min finais do período
 - iii. 3: conforme protocolo
 - Fármaco pré-HFS/LFS: 390 medidas (65 min) iniciais do período
 - Fármaco pós-HFS/LFS: 300 medidas (50 min) iniciais do período

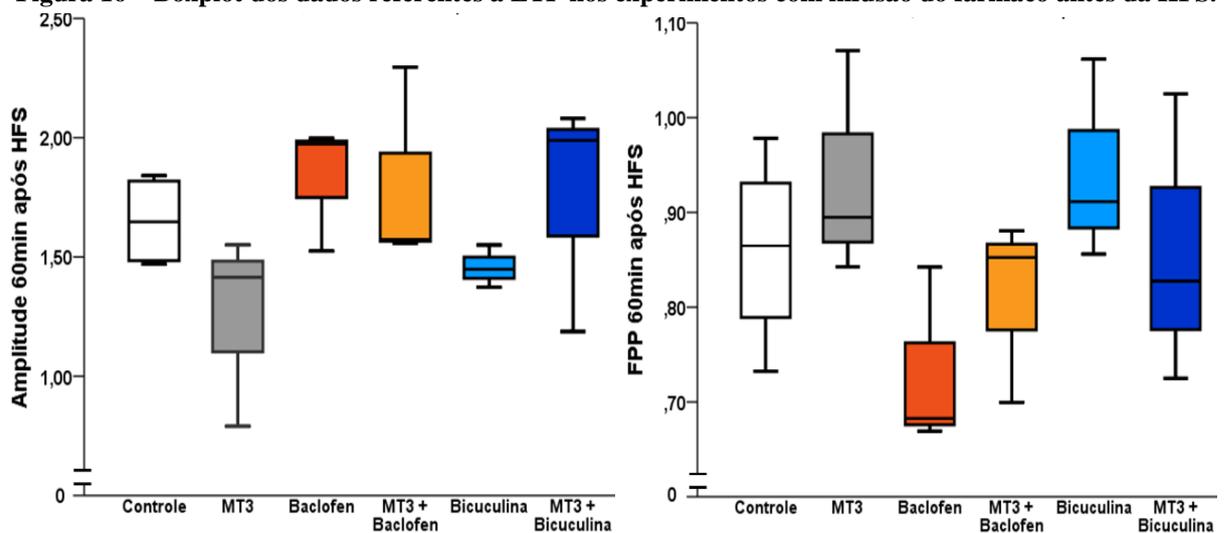
- c. Cria médias de 30 em 30 pontos (5 min) e calcula os desvios pra cada animal
 - d. Salva uma imagem de cada variável (amplitude, inclinação e facilitação por pulso pareado), com gráficos por grupo de tratamento farmacológico, onde consta a média e os desvios padrão de 5 em 5 min para cada animal.
4. Inicia Passo 3
- a. Calcula a média e o erro padrão da média pra cada grupo farmacológico a partir da média de cada animal calculada no passo anterior
 - b. Salva imagem de gráfico plotado das médias e erro padrão da média de 5 em 5 min para cada variável avaliada com todos os grupos farmacológicos no mesmo gráfico.

**APÊNDICE B – DADOS DESCRITIVOS DETALHADOS
PARA OS 60 MIN APÓS A HFS/LFS**

	Tratamento	N	Média	Erro padrão	Intervalo de confiança 95%		Mediana	Variância	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Shapiro-Wilk	
Amplitude	pré HFS #												
	Controle	4	1,651	0,097	1,343	1,960	1,647	0,038	0,194	1,47	1,84	0,145	
	MT3	3	1,252	0,234	0,245	2,259	1,415	0,164	0,405	0,79	1,55	0,321	
	Bicuculina	3	1,457	0,051	1,237	1,677	1,448	0,008	0,089	1,37	1,55	0,834	
	MT3 + Bicuculina	3	1,752	0,284	0,532	2,972	1,989	0,241	0,491	1,19	2,08	0,178	
	Baclofen	3	1,832	0,154	1,170	2,494	1,974	0,071	0,266	1,52	2,00	0,085	
	MT3 + Baclofen	3	1,809	0,243	0,762	2,856	1,575	0,178	0,421	1,56	2,30	0,040	
pós HFS													
Controle	3	2,243	0,338	0,790	3,695	2,011	0,342	0,585	1,81	2,91	0,331		
MT3	3	2,014	0,234	1,007	3,020	1,803	0,164	0,405	1,76	2,48	0,107		
Facilitação por Pulso Pareado	pré LFS												
	Controle	4	0,893	0,093	0,494	1,292	0,964	0,026	0,161	0,71	1,01	0,247	
	MT3	2	0,817	0,205	-1,786	3,419	0,817	0,084	0,290	0,61	1,02	-	
	pré HFS #												
	Controle	4	0,860	0,051	0,698	1,022	0,865	0,010	0,102	0,73	0,98	0,957	
	MT3	3	0,936	0,069	0,639	1,233	0,895	0,014	0,120	0,84	1,07	0,423	
	Bicuculina	3	0,943	0,061	0,679	1,207	0,911	0,011	0,106	0,86	1,06	0,502	
MT3 + Bicuculina	3	0,859	0,088	0,481	1,238	0,828	0,023	0,152	0,73	1,03	0,655		
Baclofen	3	0,731	0,056	0,492	0,970	0,683	0,009	0,096	0,67	0,84	0,132		
MT3 + Baclofen	3	0,811	0,056	0,569	1,053	0,852	0,009	0,097	0,70	0,88	0,277		
pós HFS													
Controle	3	0,763	0,033	0,622	0,903	0,776	0,003	0,057	0,70	0,81	0,602		
MT3	3	0,806	0,021	0,717	0,896	0,794	0,001	0,036	0,78	0,85	0,413		
pré LFS													
Controle	4	0,954	0,026	0,841	1,068	0,967	0,002	0,046	0,90	0,99	0,538		
MT3	2	1,118	0,049	0,492	1,744	1,118	0,005	0,070	1,07	1,17	-		

Valores calculados em relação ao basal (exceto N e Shapiro-Wilk). Os dados de amplitude e índice de FPP provém dos mesmos animais. # Dados apresentados na Figura 16.

Figura 16 – Boxplot dos dados referentes à LTP nos experimentos com infusão do fármaco antes da HFS.



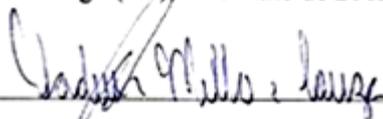
ANEXO A – PARECER DO PPG NEUROCIÊNCIAS

PPG-Ciências Biológicas Neurociências	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
--	---

PARECER

Somos favoráveis à aprovação do projeto “CARACTERIZAÇÃO ELETROFISIOLÓGICA IN VIVO DA MODULAÇÃO DA INIBIÇÃO DEPENDENTE DE RECEPTORES M4 EM HIPOCAMPO DORSAL” da aluna deste PPG Querusche Klippel Zanona, que está sob a orientação do Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt. Referido projeto atende a todas as orientações para encaminhamento de Projetos de Pesquisa à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Universidade. Possui tema relevante e mérito científico. A introdução está bem fundamentada e os objetivos são adequados. A metodologia é coerente com os objetivos. Há, neste momento, infraestrutura adequada em nosso Instituto para sua realização. O cronograma de execução prevê 24 meses para sua realização.

Porto Alegre(RS), 8 de maio de 2012.



Prof. Tadeu Mello e Souza

Pela Comissão Coordenadora

PPG-Ciências Biológicas-Neurociências

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO NA CEUA



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23440

Título: Caracterização Eletrofisiológica <i>in vivo</i> da Modulação da Inibição dependente de receptores M4 no Hipocampo Dorsal de ratos

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

JORGE ALBERTO QUILLFELDT - coordenador desde 01/07/2012

MARIA ELISA CALCAGNOTTO - pesquisador desde 01/07/2012

Querusche Klippel Zanona - pesquisador desde 01/07/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 17/12/2012 - Sala do 2º andar - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 417 ratos, Wistar, machos, adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 4 de Janeiro de 2013

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética