

CLEITON LOPES AGUIAR

Modulação colinérgica da plasticidade sináptica cortical: Efeitos da ativação de receptores muscarínicos sobre a indução e manutenção da depressão de longa-duração (LTD) na via hipocampo - córtex pré-frontal medial de ratos *in vivo*.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

Modulação colinérgica da plasticidade sináptica cortical: Efeitos da ativação de receptores muscarínicos sobre a indução e manutenção da depressão de longa-duração (LTD) na via hipocampo - córtex pré-frontal medial de ratos *in vivo*.

Cleiton Lopes Aguiar

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências - modalidade Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. João Pereira Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo N. Romcy-Pereira

RIBEIRÃO PRETO – SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes Aguiar, Cleiton

Modulação colinérgica da plasticidade sináptica cortical: Efeitos da ativação de receptores muscarínicos sobre a indução e manutenção da depressão de longa-duração (LTD) na via hipocampo - córtex pré-frontal medial de ratos *in vivo*, 2010.

102 páginas

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia/Neurociências

Orientador: Leite, João Pereira.

1. Córtex pré-frontal. 2. Hipocampo. 3. Plasticidade sináptica. 4. Depressão de longa-duração. 5. Sistema colinérgico.

Cleiton Lopes Aguiar

Modulação colinérgica da plasticidade sináptica cortical: Efeitos da ativação de receptores muscarínicos sobre a indução e manutenção da depressão de longa-duração (LTD) na via hipocampo - córtex pré-frontal medial de ratos *in vivo*.

Dissertação apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências - modalidade Neurociências.

Comissão Julgadora

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa

Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Prof. Dr. João Pereira Leite

Orientador

Dedico este trabalho à minha noiva
Gisele (minha cúmplice, amiga e amor
da minha vida) e aos meus pais (Vitor e
Roseli) que forneceram bases sólidas o
suficiente para que eu pudesse sonhar...

"O pensamento é uma corrente elétrica, uma tempestade se espalhando pelo cérebro. Só isso. É um relâmpago em milivolts, em milissegundos. Tudo o que fazemos vem de uma tempestade elétrica na nossa cabeça. Uma tempestade tão complexa e tão difícil de prever como as que acontecem no céu. Mas move tudo o que nós fazemos, como sonhar, imaginar, pensar, prever, andar, falar, correr, tudo. Essa é a raiz de toda a humanidade, centenas de bilhões de elementos disparando pequenas descargas elétricas que geram um campo magnético muito pequeno, mas mesmo assim poderoso o suficiente para gerar tudo que a história da humanidade já gerou".

(Miguel Nicolelis, Revista do Brasil - Julho de 2009).

“Nenhum aquário é maior do que o mar
Mas o mar espelhado em seus olhos
Maior, me causa um efeito
De concha no ouvido, barulho de mar
Pipoco de onda, ribombo de espuma e sal
Nenhuma taça me mata a sede
Mas o sarrabulho me embriaga
Mergulho na onda vaga
Eu caio na rede
Não tem quem não caia
Eu caio na rede
Não tem quem não caia
Caio na rede...

Às vezes eu penso que sai dos teus olhos o feixe
De raio que controla a onda cerebral do peixe”.

(Lenine – A rede)

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Primeiramente à minha noiva (Gisele), meus pais (Vitor e Roseli) e minha irmã (Leisa): pilares fundamentais em minha vida pessoal. Estiveram ao meu lado nos momentos que mais precisei e foram pacientes quando precisei mergulhar completamente nos experimentos... Sem eles nada disso seria possível;

Ao meu orientador (Prof. Dr. João Pereira Leite) e ao meu co-orientador (Prof. Dr. Rodrigo N. Romcy-Pereira) por serem os maiores responsáveis pela minha formação acadêmica. Sustento imensa admiração por eles. Não só pela extrema competência que possuem como pesquisadores, mas também pela gentileza, honestidade e caráter que lhes são intrínsecos;

Aos meus amigos Lézio e Rafael pela importantíssima contribuição para o desenvolvimento desse trabalho, incluindo: discussões teóricas, revisão gramatical e ortográfica e ajuda no dia-a-dia dos experimentos. Além disso, agradeço a eles pela honestidade, altruísmo e companheirismo acima de tudo;

Aos meus amigos de graduação por me ajudarem (e me motivarem) a dar os primeiros passos na ciência e por tudo que me ensinaram sobre a vida por meio de risadas, planos infalíveis, idéias malucas, psicodelias, conselhos e apoio nas horas mais difíceis (Caio, Lucas, Luis Fernando, Milton, e Tiago);

À técnica de nosso laboratório (Sra. Renata Scanduzzi) por tudo o que me ensinou e pela maneira gentil e prestativa que sempre nos ajudou no laboratório;

Ao técnico do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento (Sr. Renato Meireles) pela assistência de informática ao nosso laboratório do anexo A e pela forma gentil, bem humorada e prestativa com que sempre nos tratou;

À secretária do programa de pós-graduação em Neurologia/Neurociências (Sra. Silvana Lo Turco) e ao funcionário Sr. Jorge Ikawa da Sessão de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela forma gentil e prestativa que me atenderam e me orientaram sempre que precisei;

Aos meus amigos de laboratório (Ana Clara, Ana Cláudia, Graziela, Jana, José, Ludmyla, Mariana, Matheus e Raquel) pelas proveitosas discussões teóricas e práticas e pelo companheirismo, gentileza, bom humor e espírito de equipe;

Aos integrantes do Laboratório de Biologia Molecular que gentilmente cederam suas dependências para utilizarmos a balança de precisão: Prof. Dra. Daniela da Cunha Pretti Tirapelli, Sr. Fermino Sanches Lizarte Neto, Sr. Paulo César Novaes, Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior e Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli;

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos por ceder gentilmente o microscópio óptico para as análises histológicas e ao seu aluno de pós-graduação M^e. José Luiz Liberato por nos ensinar a operar o equipamento;

Ao bioterista do departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento (Sr. Marcos) por ser extremamente competente e prestativo, mantendo sempre o nosso biotério limpo e organizado;

Aos estimados funcionários responsáveis pela segurança e limpeza do anexo A;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Cooperação Interinstitucional de Apoio a Pesquisas sobre o Cérebro (CInAPCe) da FAPESP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA), por financiar, direta ou indiretamente, o presente trabalho;

ÍNDICE

RESUMO	xvi
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Modelos celulares de memória	01
1.1.1. Potencialização de longa duração (LTP).....	04
1.1.2. Depressão de longa-duração (LTD)	07
1.2. Sistema colinérgico e memória	11
1.3. Modulação colinérgica da plasticidade sináptica no hipocampo e córtex	15
1.4. A via CA1-mPFC	18
2. OBJETIVOS GERAIS	23
2.1. Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Animais	24
3.2. Cirurgia e implante de eletrodos	25
3.3. Registros iniciais dos fPSPs e determinação das curvas E/S	27
3.4. Protocolos de indução de LTD	27
3.5. Registros de potenciais locais de campo (LFPs)	28
3.6. Histologia	28
3.7. Análise de dados	29
3.8. Paradigmas experimentais	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Possíveis mecanismos envolvidos	52
5.2. Implicações para estudos de memória de trabalho	62
5.3. Implicações para estudos do papel do sono no aprendizado e memória	65
5.4. Implicações para estudos da esquizofrenia	70
5.5. Implicações para estudos das comorbidades psiquiátricas nas epilepsias	73
6. CONCLUSÕES	74
7. BIBLIOGRAFIA	77
8. ANEXO (Artigo publicado em 2008)	102

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACh	Acetilcolina
aCSF	Líquido cefaloraquidiano artificial
AF-DX 116	Antagonista seletivo para receptores M2
AMPA	Ácido -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazol propiônico
Arc	Gene de expressão imediata dependente de atividade neuronal
BL1	Primeiros 10min de linha de base
BL2	10 a 20min de linha de base
BL3	Últimos 10min de linha de base
CA1	Subregião do hipocampo
CA3	Subregião do hipocampo
CaMKII	Proteína cinase do tipo II dependente de cálcio/calmodulina
D1	Subtipo de receptor dopaminérgico
D2	Subtipo de receptor dopaminérgico
DMTP	Tarefa de local coincidente com retardo (teste de memória de trabalho)
DNMTP	Tarefa de local não coincidente com retardo (teste de memória de trabalho)
EC	Córtex entorrinal
eCB-LTD	Depressão de longa duração dependente de ativação receptor endocanibinoide
ELT	Epilepsia do lobo temporal
fEPSP	Potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo
fMRI	Imagem por ressonância magnética funcional
fPSPs	Potenciais pós-sinápticos de campo
G _i	Proteína G acoplada a receptores metabotrópicos de ação inibitória
GluR1	Subunidade de receptor AMPA
GluR2	Subunidade de receptor AMPA
G _q	Proteína G acoplada a receptores metabotrópicos de ação excitatória
GSK-3	Enzima cinase-3 da glicogênio sintase
HFS	Estimulação elétrica em alta frequência
IP ₃	Inositol trifosfato

KET	Cloridrato de cetamina
LFPs	Potenciais de campo locais
LFS	Estimulação elétrica em baixa frequência
LFS600	Estimulação elétrica em baixa frequência para indução de LTD fraca
LFS900	Estimulação elétrica em baixa frequência para indução de LTD forte
LTD	Depressão de longa duração
LTDm	Depressão de longa duração dependente de ativação de receptor muscarínico
LTP	Potencialização de longa duração
M1, M3 e M5	Receptores muscarínicos de ação excitatória
M2 e M4	Receptores muscarínicos de ação inibitória
mGluR	Receptor metabotrópico de L-glutamato
mGluR-LTD	Depressão de longa duração dependente de ativação receptor metabotrópico de glutamato
MK-801	Dizocilpina (Antagonista NMDA não-competitivo)
mPFC	Córtex pré-frontal medial
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Gás óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
PCP	Fenciclidina
PILO	Pilocarpina (agonista muscarínico não seletivo)
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PP	Via perfurante
PP2B	Fosfatase 2B ou calcineurina
PPI	Inibição de pré-pulso em sobressalto acústico
REM	Sono paradoxal ou do inglês, <i>rapid eye movement</i>
S1	Córtex somatosensorial primário
SPWRs	Complexos sharp waves/ripples
STD-LTD	LTD dependente de <i>Spiking-Timing</i>
SWS	Sono de ondas lentas
V1	Córtex visual primário

Veh	Veículo utilizado para diluir a droga
zif-268	Gene de expressão imediata dependente de atividade neuronal

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise dos fPSPs obtidos durante a linha de base em cada grupo.....	35
Tabela 2. Comparação de BL1, BL2 e BL3 intra-grupos para verificação da estabilidade da linha de base ao longo de 30min.....	36
Tabela 3. Resumo dos principais aspectos comportamentais e neurofisiológicos associados ao aumento ou à diminuição da atividade colinérgica central em condições normais e patológicas.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Vias colinérgicas no sistema nervoso central de ratos.....	15
Figura 2. A via CA1-mPFC e outras eferências e aferências relevantes para o estudo da plasticidade sináptica, memória, emoções, epilepsias e transtornos psiquiátricos.....	23
Figura 3. Posicionamento de eletrodos de estímulo no hipocampo e registro no mPFC e de cânula-guia para microinjeção de drogas.....	27
Figura 4. Posicionamento de eletrodos e cânula.....	33
Figura 5. Efeitos da pré-ativação muscarínica sobre a LTD fraca na via CA1-mPFC.....	38
Figura 6. Efeitos da ativação muscarínica sobre os fPSPs basais da via CA1-mPFC.....	40
Figura 7. Efeitos da pós-ativação muscarínica sobre a LTD fraca na via CA1-mPFC.....	41
Figura 8. Efeitos do bloqueio de receptores do tipo NMDA sobre a facilitação muscarínica da LTD fraca na via CA1-mPFC.....	42
Figura 9. Efeitos do bloqueio de receptores do tipo NMDA sobre a LTD forte na via CA1-mPFC.....	43
Figura 10. Verificação da atividade oscilatória durante e após micro-injeção i.c.v. nos experimentos de LTD na via CA1-mPFC.....	46
Figura 11. Verificação da atividade oscilatória durante e após micro-injeção i.c.v. nos experimentos de LTD na via CA1-mPFC.....	47

Figura 12. Análise dos efeitos de diferentes doses (10, 20 e 40nmoles) de PILO i.c.v. nos padrões oscilatórios de CA1 e do mPFC..... 48

Figura 13. Possível mecanismo pelo qual a ativação colinérgica poderia facilitar a plasticidade sináptica cortical dependente de NMDA..... 61

1. Resumo

O sistema colinérgico encefálico desempenha um papel central em processos de aprendizado e consolidação de memória. Particularmente, o córtex pré-frontal medial (mPFC) apresenta aumento nos níveis de acetilcolina (ACh) durante e após tarefas de memória. Além disso, a ativação colinérgica muscarínica facilita a potencialização de longa duração (LTP) e depressão de longa-duração (LTD) no hipocampo e córtex. Recentemente, demonstramos que o agonista muscarínico pilocarpina (PILO), promove prolongamento da fase tardia da LTP na via hipocampo (CA1)-mPFC *in vivo* associado a surgimento de oscilações rápidas no hipocampo e no córtex. Assim, no presente trabalho investigamos a dinâmica da modulação colinérgica muscarínica sobre a LTD na via CA1-mPFC *in vivo* e sua dependência da neurotransmissão glutamatérgica mediada por receptores do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Para isso, ratos anestesiados com uretana e mantidos a temperatura controlada de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, foram submetidos a implante de microeletrodos para estimulação em CA1 e registro de potenciais pós-sinápticos de campo (fPSPs) no mPFC. Após 30min de registro de linha de base, a LTD foi induzida por meio de trens de pulsos elétricos de baixa frequência (LFS) e monitorada por 240min. Neste protocolo, os animais receberam PILO (40nmol; $1\mu\text{L}$; i.c.v.) ou Veh (líquido cefalorraquidiano artificial, aCSF) imediatamente antes ou 20min após LFS. Além disso, com o objetivo de avaliar o papel dos receptores NMDA (NMDAR) na modulação muscarínica da LTD cortical, um grupo independente de animais recebeu microinjeção intra-mPFC do antagonista seletivo de NMDAR (AP7; 20nmol; $0,4\mu\text{L}$) ou Veh (NaCl 0,15M) 10min antes de microinjeção de PILO. Nossos resultados mostram que a pré-ativação muscarínica por PILO facilita a LTD na via CA1-mPFC. Contudo, PILO sozinha ou aplicada 20min após LFS não é capaz de modular nem a neurotransmissão basal nem a manutenção da LTD na via CA1-mPFC. Além disso, o efeito da pré-ativação de PILO sobre a LTD é dependente da ativação de NMDARs, já que a aplicação de AP7 inibe a manutenção da LTD cortical. Portanto, em conjunto com os dados de LTP cortical, recentemente publicados pelo nosso laboratório, sugerimos que a atividade de receptores muscarínicos seja fundamental para modular a plasticidade sináptica de maneira bidirecional (LTP e LTD), dependendo dos padrões de disparos dos neurônios da região CA1 do hipocampo. Por ser uma das principais saídas de informação do hipocampo

para o córtex, estudos sobre a modulação da plasticidade sináptica na via CA1-mPFC podem fornecer novos dados sobre os mecanismos envolvidos na consolidação de memórias de longo prazo, no papel do sono sobre a consolidação de memórias, e sobre alterações cognitivas em epilepsias, psicoses e comorbidades psiquiátricas.

1.1. Abstract

The brain cholinergic system has a critical role in memory consolidation processes. Particularly, the medial prefrontal cortex (mPFC) shows an increase of acetylcholine (ACh) levels during and after memory tasks. Additionally, cholinergic muscarinic activation enhances long-term potentiation (LTP) and depression (LTD) in the hippocampus and cortex. We have recently demonstrated that muscarinic agonist pilocarpine (PILO) promotes an increase of the late-phase of LTP in the hippocampus-mPFC pathway associated with increases of rapid oscillations emergence in the hippocampus and cortex. Therefore, in the present work, we investigated the dynamic of cholinergic muscarinic modulation on LTD in the hippocampal-mPFC pathway and its glutamatergic neurotransmission dependence mediated by N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR). For this, urethane-anaesthetized rats under temperature body control ($37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$), were implanted with CA1 and mPFC microelectrodes for stimulation and recording of postsynaptic potentials (fPSP). After 30min of fPSP baseline recordings, LTD was induced by trains of electric pulses at low-frequency stimulation (LFS) and monitored for additional 240min. In this protocol rats received either a microinjection of PILO (40nmol; $1\mu\text{L}$, i.c.v.) or Veh (artificial cerebrospinal fluid, aCSF), immediately before or 20min after LFS. Beside this, in the order to assess the NMDAR role in the cortical LTD muscarinic modulation, a independent group of subjects received a selective NMDAR antagonist or vehicle (AP7; 20nmols; $0,4\mu\text{L}$ in NaCl 0,15M; intra-mPFC) 10min before PILO microinjection. Our results show that muscarinic pre-activation by PILO enhances the LTD in the CA1-mPFC pathway. However, PILO alone or applied 20min after LFS does not affect neither basal neurotransmission nor the late-phase of LTD in the CA1-mPFC. Also, the PILO pre-activation effect on LTD is NMDAR-dependent, since the administration of AP7 inhibits the cortical LTD maintenance. Thus, together with the data about muscarinic

modulation of cortical LTP recently published by our laboratory, we suggest that muscarinic receptors activity is central to modulate the synaptic plasticity in a bidirectional way (LTP and LTD), depending of hippocampus CA1 firing rate. Because is one of the main information outflow from hippocampus to mPFC, studies about modulation of synaptic plasticity of CA1-mPFC pathway plasticity may provide new data about the mechanisms involved in the long-term consolidation of memories, the role of sleep on memory consolidation and about cognitive impairments in epilepsy, psychosis and psychiatry comorbidities.

1. Introdução

A capacidade de ajustar o comportamento frente a uma situação já vivenciada é uma característica altamente conservada nos animais e depende de um processo diversificado de aquisição, retenção e evocação de informações denominado memória. Esta permite que novos contextos, associações e repertórios comportamentais sejam adquiridos, armazenados e posteriormente evocados frente a diferentes situações, conferindo plasticidade comportamental. Particularmente importante é o fato de que a percepção de quem somos, ou seja, nossa autobiografia está intrinsecamente associada à memória. Acredita-se que o substrato biológico desse processo seja a plasticidade sináptica, ou seja, a modificação dependente de atividade da força ou eficácia da comunicação entre dois neurônios pré-existentes. Diversos estudos sugerem que a plasticidade sináptica tenha um papel central no desenvolvimento inicial do sistema nervoso central e continue modificando as sinapses de neurônios “adultos”. Além disso, existe um acúmulo de evidências apontando que a disfunção de alguns de seus mecanismos contribui para o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos e outras neuropatologias, como epilepsia. Contudo, os mecanismos pelos quais estes processos ocorrem ainda são muito pouco conhecidos. Por esses motivos, pela proximidade ao nosso cotidiano e pela própria beleza que lhe é intrínseca, a investigação das bases neuronais da memória desperta grande interesse em crianças, alunos, especialistas da área, entre outros.

1.1. Modelos celulares de memória

No final do século XIX, o neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), após meticulosamente estudar a citoarquitetura do sistema nervoso, postulou que as redes neuronais não apresentavam uma continuidade citoplasmática como se

acreditava até então, mas que estavam conectadas por junções especializadas que mais tarde foram denominadas de sinapses por Charles S. Sherrington (1852-1952). Segundo Cajal, o aprendizado não resulta da proliferação de novas células nervosas, mas sim de novas ramificações nervosas e fortalecimento de conexões entre neurônios pré-existentes. Deste modo, eventos externos seriam representados por padrões espaço-temporais de atividade neural, sendo eles próprios agentes de modificações sinápticas (Defelipe, 2006).

No início do século XX, Karl Lashley realizou experimentos importantes tentando encontrar a sede do engrama, ou seja, do substrato biológico que armazenaria as informações. Lashley avaliou os efeitos de diferentes lesões corticais em ratos sobre o desempenho em tarefas de memória. Seus resultados indicaram que os desempenhos de ratos com lesão no córtex eram mais afetados de acordo com a quantidade de massa cortical removida, independente da localização. Lashley concluiu que a memória tinha uma localização distribuída no sistema nervoso, não existindo funções específicas para cada área cortical (Milner, Squire *et al.*, 1998).

Com o objetivo de explicar o processo de armazenamento de informações no cérebro, Konorski e Donald Hebb propuseram a teoria da detecção de eventos coincidentes, na qual uma sinapse conectando duas células nervosas seria fortalecida se estivessem ativas ao mesmo tempo. Assim as conexões neuronais mais ativas tenderiam a se fortalecer e se estabilizar, ao contrário das mais inativas. Fortalecimento e estabilização representariam o aumento da probabilidade de, por exemplo, ocorrerem potenciais de ação em uma célula B quando uma célula A, conectada à B, dispara. Estas conexões são chamadas de sinapses dependentes de atividade ou hebbianas (Hebb, 1949).

Hebb ainda forneceu mais alguns conceitos, considerados modernos até para os dias de hoje, sobre o funcionamento do encéfalo. Para explicar os resultados de Lashley de que o aprendizado não poderia estar localizado em regiões únicas do cérebro, Hebb sugeriu que (1) as informações fossem processadas por populações de neurônios e (2) que estas populações estariam amplamente distribuídas, envolvendo diversas áreas encefálicas. Assim, quanto mais amplas as lesões corticais que Lashley efetuava, maiores os prejuízos em sistemas visuais, somestésicos, motores, entre outros, que prejudicavam o desempenho dos ratos na tarefa. Em conclusão, Hebb negou a existência de um único centro de memória. Ao contrário, para ele diversas regiões do sistema nervoso central seriam responsáveis por representar um único evento, através dos diferentes graus de fortalecimento de suas conexões (Hebb, 1949; Milner, Squire *et al.*, 1998). O conceito de sinapse dependente de atividade de Konorski e Hebb é hoje considerado a principal hipótese sobre o mecanismo fundamental de formação de memória.

A busca pelo substrato biológico responsável por armazenar memórias tinha um foco bem claro: o neocórtex de mamíferos. Alguns estudos muito relevantes forneceram evidências de que não só o córtex era essencial para os processos de consolidação de memórias. Diversos estudos com pacientes com lesão no lobo temporal indicaram que esta região estava relacionada ao processamento de novas memórias. Um paciente em especial, conhecido como H.M., foi submetido a uma remoção bilateral dos lobos temporais, incluindo a formação hipocampal, para tratamento de epilepsia. Este procedimento de remoção resultou em uma profunda e permanente amnésia anterógrada, incapacitando-o de formar novas memórias explícitas ou declarativas. Mais tarde, Brenda Milner e seus colaboradores investigaram o desempenho de H.M. em

outras formas de aprendizagem. Experimentos que testavam memória de trabalho, condicionamento, aprendizagem motora entre outras habilidades, mostraram que o desempenho de H.M. não era prejudicado. Um exemplo disso era que, mesmo sem saber que tinha feito os mesmos testes de habilidade motora do dia anterior, H.M. melhorava seu desempenho dia após dia. Estes testes, em conjunto, demonstraram pela primeira vez a existência de múltiplos sistemas de memória (Squire, 1992; Milner, Squire *et al.*, 1998; Scoville e Milner, 2000).

1.1.1. Potencialização de longa duração (LTP)

Em 1966, Per Andersen realizou estudos que descreveram a relativa simplicidade tanto da arquitetura neural do hipocampo, quanto dos potenciais de campo eliciados quando estimulava as suas projeções axonais (Andersen, Blackstad *et al.*, 1966). Estes estudos influenciaram profundamente as idéias de Tim Bliss, na época aluno de Ben Delisle Burns, motivando-o a visitar o laboratório de Andersen (Bliss, 2003). Pouco antes disso, Terje Lomo, estudante de pós-doutorado no laboratório de Andersen, publicara seus primeiros resultados, demonstrando que um único e curto estímulo, seguido de um período de estímulos condicionados na via perfurante (PP) levava a uma resposta potencializada dos neurônios do giro-denteado (DG) (Lomo, 2003). Alguns anos mais tarde, Bliss e Lomo (1973) publicaram a primeira observação experimental de um fenômeno de potencialização sináptica, de duração compatível com a manutenção da memória. A aplicação de estímulos elétricos em alta frequência (HFS, do inglês *high frequency stimulation*) na PP - projeções monosinápticas que conectam o córtex entorrinal (EC) ao hipocampo - de coelhos provocava a potencialização sustentada dos potenciais excitatórios pós-sinápticos de campo (fEPSP) na região do

DG (Bliss e Lomo, 1973). Este fenômeno foi chamado de potencialização de longo prazo (ou LTP, do inglês *long-term potentiation*).

Estudos subseqüentes descreveram as principais propriedades da LTP como: especificidade, cooperatividade e associatividade. A especificidade significa que, apesar da ampla comunicação de populações neuronais, a indução de LTP ocorre apenas em uma via específica. Por exemplo, o estímulo da via perfurante elicia respostas pós-sinápticas no DG do hipocampo e no córtex pré-frontal medial (mPFC). Entretanto, quando aplicado um protocolo específico para indução de LTP no DG, nada acontece com a magnitude dos potenciais eliciados no mPFC. Já na cooperatividade, estímulos subliminares podem induzir LTP em uma sinapse caso uma sinapse adjacente no mesmo neurônio tenha recebido estímulos tetânicos recentemente. Um exemplo típico dessa propriedade é a indução de LTP no hipocampo por meio de protocolo subliminar aplicado após estimulação prévia da amígdala basolateral. Uma derivação da cooperatividade é a associatividade. Nesse caso, se projeções de neurônios diferentes são ativadas ao mesmo tempo, as respostas eliciadas no neurônio que recebeu essas projeções apresentam um aumento em sua magnitude. Juntas, estas propriedades constituem importantes argumentos a favor da hipótese de que a LTP pode ser um modelo plausível para explicar alguns dos mecanismos de aprendizagem e memória (Bliss e Collingridge, 1993; Citri e Malenka, 2007).

Diversos trabalhos atuais forneceram fortes evidências adicionais em direção a essa mesma idéia: (1) A LTP é facilmente observada no hipocampo, área do cérebro de mamíferos mais estreitamente relacionada à formação de memória; (2) estimulação elétrica de frequência igual à atividade rítmica neuronal que ocorre naturalmente durante o comportamento exploratório (ritmo teta) é capaz de induzir LTP quando

aplicada no hipocampo; (3) inibidores de LTP hipocampal também bloqueiam aprendizagem e retenção de tarefas em roedores e primatas; (4) diversas alterações moleculares e neuroquímicas que ocorrem após a indução de LTP também ocorrem durante a aquisição de memória; (5) o bloqueio dessas vias altera tanto LTP como memória; (6) o aprendizado de uma tarefa de esquivas inibitória é capaz de induzir LTP no hipocampo; (7) a LTP possui pelo menos duas fases distintas: fase inicial que dura de 2 – 3 horas e fase tardia que pode durar de horas a dias. Essas duas fases distintas poderiam corresponder às memórias de curto e longo prazo (Bliss e Collingridge, 1993; Lynch, 2004; Whitlock, Heynen *et al.*, 2006; Cammarota, Bevilaqua *et al.*, 2008; Izquierdo, Bevilaqua *et al.*, 2008; Izquierdo, Cammarota *et al.*, 2008).

Diversos estudos sobre as bases moleculares da LTP mostraram que o L-glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de mamíferos, é fundamental para que este fenômeno ocorra. Vesículas presentes no terminal pré-sináptico liberam esse neurotransmissor na fenda sináptica. Em seguida, receptores de L-glutamato tipo-ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) são ativados, abrindo seus canais e permitindo a passagem de íons Na^+ e K^+ para o meio intracelular. Esse trânsito de íons entre o meio extracelular e o intracelular gera uma despolarização da membrana pós-sináptica. Neste momento, os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDARs) mudam de conformação, em resposta à despolarização, liberando os íons Mg^{2+} que normalmente bloqueiam o seu canal. Quando os NMDARs estão livres do bloqueio fisiológico de Mg^{2+} há um grande influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular. Outros canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são também abertos, amplificando esses efeitos. Nesse momento também ocorre ativação de receptores

metabotrópicos de glutamato (mGluR), que agem ativando cascatas intracelulares que promoverão efeitos mais tardios (Frey, Huang *et al.*, 1993; Lynch, 2004).

Estudos sobre o funcionamento dos NMDARs forneceram fortes evidências de que aprendizagem, memória e LTP são fenômenos muito relacionados. Drogas que antagonizam a ação do L-glutamato nos receptores AMPA e NMDAR bloqueiam tanto LTP no hipocampo como aquisição de memórias hipocampo-dependentes. Além disso, o fato dos NMDARs só permitirem a entrada de íons Ca^{2+} após eliminação de Mg^{2+} por despolarização prévia da membrana constitui um meio de formação de associações entre estímulos, ou seja, de detecção de dois eventos coincidentes (sinapse dependente de atividade ou hebbiana). Nesse caso, a primeira ativação simultânea dos neurônios poderia agir expulsando os íons Mg^{2+} dos NMDARs pós-sinápticos. Nos eventos subsequentes, os níveis intracelulares bem mais altos de Ca^{2+} na célula pós-sináptica garantiriam maior potencialização de suas respostas a cada ativação da célula pré-sináptica (Bliss e Collingridge, 1993; Lynch, 2004; Lynch, Rex *et al.*, 2007).

1.1.2- Depressão de longa duração (LTD)

Como mencionado, Konorski e Hebb postularam que a comunicação sináptica poderia sofrer aumento ou diminuição em sua eficácia dependendo de sua atividade. De acordo com essa idéia, foi demonstrado que protocolo de HFS na via perfurante gerava aumento da eficácia sináptica (LTP) no DG do hipocampo (Bliss e Gardner-Medwin, 1973). Quase duas décadas mais tarde, Dudek e Bear (1992) mostraram pela primeira vez que a eficácia da comunicação sináptica das sinapses da via CA3-CA1 do hipocampo também poderia ser diminuída se aplicado um padrão de estimulação elétrica em baixa frequência (LFS, do inglês *low frequency stimulation*). Este fenômeno ficou conhecido como depressão de longa duração (LTD, do inglês, *long-term*

depression) e é: (1) sustentado por mais de 1h, (2) dependente de NMDAR e (3) inócua para indução subsequente de LTP, ou seja, não altera metaplasticidade (Dudek e Bear, 1992). A demonstração experimental de que a comunicação sináptica poderia ser modulada bidirecionalmente de acordo com a atividade, sugere que exista um contínuo entre LTP e LTD e que as memórias sejam registradas por meio de padrões de distribuição dos níveis de eficácia sináptica de vias presentes em um ou mais circuitos neuronais, e não simplesmente por indução de LTP e posterior volta à eficiência basal como se acreditava até então (Malenka e Bear, 2004; Citri e Malenka, 2007).

Na maioria dos casos, LTP e LTD compartilham características importantes como: (1) dependência de ativação de NMDARs, (2) manutenção dependente de síntese de novas proteínas e (3) curso temporal equivalente a processos mnemônicos (Takita, Izaki *et al.*, 1999; Citri e Malenka, 2007). Adicionalmente, também podem ser induzidas em diversas outras regiões do cérebro de roedores, como amígdala, cerebelo, córtex perirrinal e mPFC (Massey e Bashir, 2007). Contudo, LTP e LTD dependentes de NMDA diferem substancialmente quanto às suas cascatas de sinalização intracelulares (Malenka e Bear, 2004). Embora ambos os processos dependam da presença de Ca^{2+} intracelular, esses fenômenos diferem quanto à sua quantidade. A LTP está associada a grandes influxos deste íon enquanto a LTD ocorre em níveis mais baixos (Nakano, Yamada *et al.*, 2004). Altas concentrações de Ca^{2+} ativam uma maior quantidade de proteínas cinases, que irão fosforilar substratos protéicos de uma variedade de vias de sinalização intracelular. Em contrapartida, pequenas concentrações de Ca^{2+} mobilizam, preferencialmente, proteínas fosfatases, que irão desfosforilar muitas vezes as mesmas proteínas (Wang e Kelly, 1996). Resumidamente, muitos achados têm demonstrado que uma maior mobilização de proteínas cinases ativa

cascatas de sinalização responsáveis pela inserção de novos receptores de L-glutamato do tipo AMPA no terminal pós-sináptico potencializando a eficiência da transmissão sináptica. Ao passo que a mobilização de fosfatases ativa cascatas de sinalização responsáveis pela endocitose destes receptores, diminuindo a eficiência da transmissão sináptica (Bliss e Collingridge, 1993; Wang e Kelly, 1996; Citri e Malenka, 2007). Ao contrário da LTP, ainda existem poucos trabalhos sobre a manutenção da LTD. Contudo já existem algumas evidências de que a LTD está associada a encolhimento no tamanho das espinhas dendríticas e que isso poderia ser devido à perda de receptores AMPA nos terminais pós-sinápticos (Luscher, Nicoll *et al.*, 2000; Zhou, Homma *et al.*, 2004). Consistentemente, alguns estudos indicam que o tamanho da espinha dendrítica está relacionado ao número de receptores AMPA expostos em sua superfície (Takumi, Ramirez-Leon *et al.*, 1999).

O estudo dos eventos moleculares envolvidos no contínuo entre LTP e LTD, ou seja, na possibilidade de conversão entre LTP e LTD, pode ser uma ferramenta útil para um maior entendimento dos mecanismos de armazenamento e extinção de memórias em tarefas comportamentais, manifestação de transtornos psiquiátricos e desenvolvimento de adicção por drogas de abuso (Martin e Morris, 2002; Brebner, Wong *et al.*, 2005; Citri e Malenka, 2007; Massey e Bashir, 2007). Nesse contexto, foi observado que encéfalos de pacientes esquizofrênicos apresentam alterações na expressão de calcineurina (também conhecida como fosfatase 2B ou PP2B), uma proteína fosfatase amplamente presente no tecido nervoso, dependente de Ca^{2+} e calmodulina e fundamental para o mecanismo básico de internalização de receptores AMPA, necessários para indução da LTD (Rusnak e Mertz, 2000; Gerber, Hall *et al.*, 2003). Consistente com esses resultados foi demonstrado que camundongos modificados geneticamente para não

expressarem calcineurina no prosencéfalo basal durante a fase adulta apresentam diversas alterações comportamentais que se assemelham à psicose, como hiperlocomção, diminuição da interação social, prejuízo no filtro sensorio-motor medido por teste de inibição de pré-pulso em sobressalto gerado por estímulo acústico (PPI, do inglês, *prepulse inhibition*) e deficiência em tarefa de inibição latente em medo condicionado (Miyakawa, Leiter *et al.*, 2003). Outros estudos *post-mortem* têm reportado alterações na expressão da enzima cinase-3 da glicogênio sintase (GSK-3) (Ahn, Youn *et al.*, 2003; Kozlovsky, Shanon-Weickert *et al.*, 2004). Esta enzima regula o estado de fosforilação de várias proteínas e também está amplamente presente no tecido nervoso. Além disso, faz parte de cascatas de sinalização responsáveis por diversos mecanismos de proliferação e adesão celular, além de plasticidade sináptica (Beasley, Cotter *et al.*, 2001; Nadri, Dean *et al.*, 2004). É interessante destacar que, assim como a calcineurina, o bloqueio de GSK-3 no hipocampo de roedores também impede a indução de LTD (Citri e Malenka, 2007; Peineau, Bradley *et al.*, 2008). Em contrapartida, a sua hiperexpressão em camundongos modificados geneticamente reduz a indução e a duração da LTP no hipocampo (Hooper, Markevich *et al.*, 2007).

Ainda existem outras formas de LTD independentes de ativação de NMDAR que foram mais recentemente demonstradas, por exemplo: LTD dependente de mGluR (mGluR-LTD), de endocanabinóide (eCB-LTD) ou LTD muscarínica (LTDm). Cada uma delas possui particularidades adicionais nas cascatas de sinalização envolvidas, variando consideravelmente dependendo do circuito estudado. A maioria dos dados obtidos têm sido de estudos *in vitro* e os seus resultados ainda não trouxeram informações tão sólidas quanto no caso da LTD dependente de NMDAR (Citri e Malenka, 2007).

1.2. Sistema colinérgico e memória

Um acúmulo de evidências, fornecidas por estudos que datam desde antes da própria descoberta da neurotransmissão colinérgica central no começo da década de 1950, sugere que o sistema colinérgico está envolvido no processamento de aprendizado, memória e estados alterados de consciência (Hobson, 1992; Jerusalinsky, Kornisiuk *et al.*, 1997). Contudo, o interesse pelo sistema colinérgico aumentou com a descoberta de que deficiências em seu funcionamento geravam prejuízos cognitivos associados ao envelhecimento e a doenças degenerativas como Alzheimer (Giacobini, 1990; Fibiger, 1991). Concomitantemente, estudos com modelos de epilepsia, utilizando ativação colinérgica do lobo temporal em ratos por meio de administração do agonista muscarínico não-seletivo pilocarpina (PILO), mostraram-se importantes para avanços na compreensão dos mecanismos desencadeadores de morte neuronal após crises convulsivas, além dos conseqüentes prejuízos em aprendizagem e memória (Leite, Bortolotto *et al.*, 1990; Leite, Nakamura *et al.*, 1990; Cavalheiro, Leite *et al.*, 1991; Leite e Cavalheiro, 1995; Leite, Garcia-Cairasco *et al.*, 2002). Um pouco mais tarde, estudos que dosaram acetilcolina (ACh) no sistema nervoso central em ratos em livre movimento indicaram que diversos estados comportamentais, como sono REM (do inglês, *rapid-eye movement*), atenção seletiva, aprendizado, consolidação de memória, surtos psicóticos, estados de consciência, entre outros, estão associados a alterações significativas nos níveis de ativação colinérgica central (Perry, Walker *et al.*, 1999; Power, Vazdarjanova *et al.*, 2003; Hasselmo, 2006).

O sistema colinérgico central de mamíferos é constituído de seis vias, caracterizadas pelo local de origem das diversas aferências colinérgicas. Os dois núcleos mais relacionados à memória são os núcleos do septo e a banda diagonal vertical, que

projetam apenas para o hipocampo, assim como o núcleo basal magnocelular, que projeta para todo o córtex. Contudo, em roedores não há uma delimitação clara desses núcleos, ao contrário de primatas. Assim, eles são conhecidos genericamente como neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal (Van Der Zee e Luiten, 1999; Lucas-Meunier, Fossier *et al.*, 2003).

Os receptores de ACh são classificados em duas grandes famílias: nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos são do tipo ionotrópico, pois formam um canal para passagem de íons, estão presentes no sistema nervoso central e periférico e possuem ação rápida e não duradoura. Já os receptores muscarínicos são classificados em cinco subtipos que diferem em seus efeitos, conservando uma característica básica: ação tardia e duradoura. Ao contrário dos nicotínicos, os receptores muscarínicos são do tipo metabotrópico, pois estão acoplados a proteínas sinalizadoras e também estão presentes tanto no sistema nervoso central quanto periférico. Para esta classe de receptores, cinco genes (m1, m2, m3, m4 e m5) foram clonados e caracterizados como codificadores dos respectivos subtipos de receptores (M1-M5). Cada subtipo de receptor está associado a uma classe distinta de proteína G, que pode modular, diretamente ou por ação de segundos mensageiros, a abertura de canais iônicos, níveis de Ca^{2+} intracelular e a atividade de diversas proteínas. Os receptores M1, M3 e M5 são conhecidos como tipo-M1 e atuam principalmente nos neurônios pós-sinápticos, já os receptores M2 e M4 são conhecidos como tipo-M2 e atuam nos pré-sinápticos. Os receptores tipo-M1 são excitatórios, pois ativam cascatas intracelulares que promovem o fechamento de canais de K^+ e aumentam os níveis intracelulares de Ca^{2+} . Já os receptores tipo-M2 são inibitórios, pois provocam a abertura de canais de K^+ (Caulfield e Birdsall, 1998; Lucas-Meunier, Fossier *et al.*, 2003).

O subtipo de receptor muscarínico M1 é considerado de especial interesse para o estudo da memória por vários motivos: (1) são receptores muscarínicos de atuação pós-sináptica que ativam, por meio de proteína G_q , cascatas de sinalização de inositol trifosfato (IP_3). Essa via de sinalização intracelular é capaz de fechar canais de K^+ e aumentar os níveis intracelulares de Ca^{2+} por meio da abertura de reservatórios intracelulares presentes no retículo endoplasmático, favorecendo, portanto, a despolarização celular (Nathanson, 2000); (2) esses receptores estão presentes principalmente no telencéfalo, particularmente no córtex e hipocampo (Van Der Zee e Luiten, 1999; Sellin, Shad *et al.*, 2008); (3) são os únicos que estão presentes em todas as camadas do córtex (Levey, Kitt *et al.*, 1991). São os mais abundantes no prosencéfalo e no hipocampo (Levey, Kitt *et al.*, 1991; Wei, Walton *et al.*, 1994); (5) estão co-localizados com NMDARs (Marino, Rouse *et al.*, 1998). Os subtipos M3 e M5 também promovem transdução de sinal por meio de proteína G_q e atuam nos terminais pós-sinápticos. Eles se apresentam esparsamente distribuídos pelo sistema nervoso central, concentrando-se um pouco mais na região do hipotálamo e dos neurônios dopaminérgicos dos núcleos basais, respectivamente. (Lucas-Meunier, Fossier *et al.*, 2003; Sellin, Shad *et al.*, 2008). Entretanto, seus papéis sobre aprendizado e memória ainda são pouco conhecidos.

Já o subtipo M2 está presente em maior densidade no prosencéfalo basal, tálamo e tronco cerebral. Atua nos terminais pré-sinápticos por meio de proteína G_i (inibitória) funcionando como auto ou hetero-receptores de neurônios colinérgicos, regulando a liberação de ACh. O subtipo M4 possui distribuição muito parecida com a do subtipo M1: hipocampo, neocórtex e estriado. Este subtipo também tem sido considerado importante na modulação de aprendizado e retenção de memória (Jerusalinsky,

Kornisiuk *et al.*, 1997; Ferreira, Furstenau *et al.*, 2003; Sanchez, Alvares *et al.*, 2009). No hipocampo os receptores M4 se apresentam de forma semelhante aos M2, ou seja, atuando nos terminais pré-sinápticos. Já no neocórtex e estriado os M4 atuam no terminal pós-sináptico, acoplado-se preferencialmente a proteína G_i que inibe a atividade da adenilato ciclase. Em última análise, esta inibição inativa os receptores de Ca^{2+} sensíveis a alteração de voltagem na membrana (Ferreira, Furstenau *et al.*, 2003; Power, Vazdarjanova *et al.*, 2003).

O papel do sistema colinérgico central no aprendizado e memória é bem documentado (Fibiger, 1991; Blokland, 1995; Jerusalinsky, Kornisiuk *et al.*, 1997; Anagnostaras, Murphy *et al.*, 2003; Power, Vazdarjanova *et al.*, 2003). Em muitos dos paradigmas descritos, utilizam-se injeções sistêmicas de inibidores de acetilcolinesterase ou antagonistas colinérgicos não-seletivos (principalmente escopolamina), antes de tarefas de memória (Blokland, Honig *et al.*, 1992; Hasselmo, 2006). Outros estudos indicam que injeções sistêmicas de antagonistas e agonistas colinérgicos não-seletivos logo após os treinamentos, afetam a consolidação de memórias, sem que ocorram interferências atencionais, sensoriais ou motoras (Power, Vazdarjanova *et al.*, 2003).

Estudos utilizando microdiálise em ratos livre-movimento indicam que a simples execução de alguma tarefa cognitiva é capaz de gerar aumento da concentração de ACh central durante e após tarefas cognitivas (Fibiger, 1991; Himmelheber, Sarter *et al.*, 2000; Passetti, Dalley *et al.*, 2000; Dalley, Mcgaughy *et al.*, 2001; Arnold, Burk *et al.*, 2002). Em algumas tarefas cognitivas que exigem atenção seletiva, o aumento dos níveis centrais de ACh apresenta-se diretamente relacionado com a dificuldade do procedimento (Kozak, Bruno *et al.*, 2006). Além disso, o bloqueio de receptores

colinérgicos muscarínicos por escopolamina, em humanos, prejudica a aquisição apenas de novas memórias, não influenciando a evocação daquelas previamente consolidadas (Atri, Sherman *et al.*, 2004). Isso sugere que a atividade colinérgica seja essencial para o processamento de novas memórias declarativas, atuando, principalmente, em circuitarias cortico-hipocampais (Scoville e Milner, 1957; Power, Vazdarjanova *et al.*, 2003; Squire, Stark *et al.*, 2004; Hasselmo, 2006).

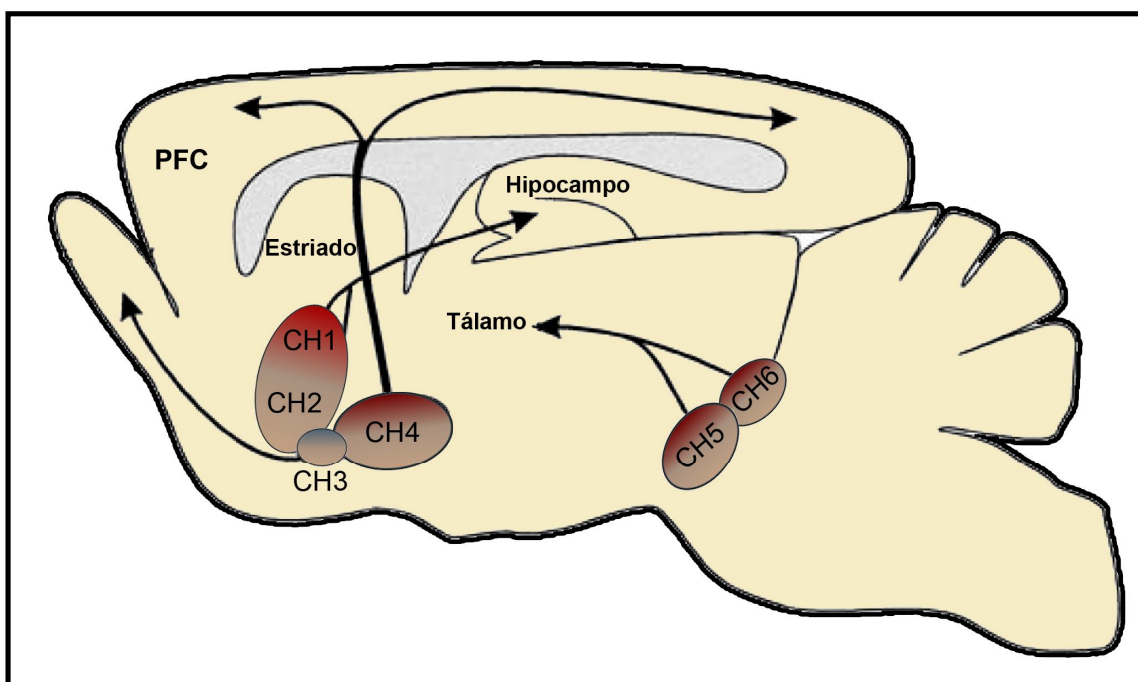


Figura 1. Vias colinérgicas no sistema nervoso central de ratos. Neurônios colinérgicos do septo (Ch1) e da porção horizontal da banda diagonal (Ch2) projetam para o hipocampo, enquanto o núcleo pedunculo-pontino (Ch5) e o núcleo tegmental latero-dorsal (Ch6) projetam para o tálamo. Núcleos colinérgicos provenientes da porção vertical da banda diagonal (Ch3) projetam para o bulbo olfatório. As projeções colinérgicas responsáveis por inervar o córtex são provenientes do núcleo basal magnocelular (Ch4). Figura adaptada de Lucas-Meunier, Fossier *et al* (2003).

1.3. Modulação colinérgica da plasticidade sináptica no hipocampo e córtex

As bases celulares correlacionadas à modulação colinérgica da formação de memórias ainda foram pouco estudadas. A utilização da LTP como um modelo celular

para o estudo da memória tem proporcionado alguns avanços nessa questão. Estudos utilizando preparações *in vitro* de fatias (*slices*) do hipocampo de ratos mostraram que agonistas colinérgicos muscarínicos não seletivos facilitam a indução de LTP no GD (Burgard e Sarvey, 1990) e aumentam a sua magnitude na região CA1 (Blitzer, Gil *et al.*, 1990). Posteriormente foi demonstrado que a atropina suprime a indução de LTP em CA1 (Sokolov e Kleschevnikov, 1995). Dois estudos recentes utilizando LTP do hipocampo *in vitro* apresentaram conclusões muito relevantes para o entendimento do funcionamento da modulação colinérgica na memória: (1) camundongos transgênicos, especificamente deficientes de receptores muscarínicos do tipo M1, possuem menor manutenção da LTP induzida por “*theta burst*” em CA1 (Anagnostaras, Murphy *et al.*, 2003); (2) ativação fisiológica de receptores muscarínicos M1 aumenta LTP em CA1 (Shinoe, Matsui *et al.*, 2005); e (3) bloqueio de receptores M4 por antagonista seletivo (toxina MT3) impede indução de LTP na via CA3-CA1 (Sanchez, Alvares *et al.*, 2009). Estudos com animais *in vivo* mostraram que: (1) ativação colinérgica potencializa a LTP no DG (Abe, Nakata *et al.*, 1994); (2) ativação colinérgica fisiológica aumenta a LTP em CA1, dependendo da atividade oscilatória espontânea de animais em livre-movimento (Leung, Shen *et al.*, 2003); (3) ACh endógena diminui o limiar para indução de LTP em CA1 (Ovsepian, Anwyl *et al.*, 2004). Esses dados em conjunto indicam que, em geral, agonistas muscarínicos não seletivos facilitam a LTP no hipocampo e antagonistas não seletivos prejudicam. Em relação aos subtipos de receptores, parece que M1 esteja envolvido na facilitação da LTP, embora sua atividade não seja essencial. Por outro lado, o funcionamento de M4 parece ter um papel permissivo na expressão de LTP na via CA3-CA1 (Sanchez, Alvares *et al.*, 2009).

Outros grupos de pesquisa focaram seus estudos na modulação colinérgica da LTP no córtex de ratos, corroborando os dados já obtidos pelos estudos com hipocampo. Resultados de estudos *in vitro* mostraram que ativação colinérgica facilita LTP no córtex visual (Brocher, Artola *et al.*, 1992) e córtex piriforme (Hasselmo e Barkai, 1995; Patil, Linster *et al.*, 1998). Já a supressão colinérgica muscarínica por atropina, diminui a LTP no EC (Cheong, Yun *et al.*, 2001). Estudos com animais *in vivo* mostraram que: (1) ativação colinérgica por injeção sistêmica de PILO potencializa LTP no córtex motor primário (Boyd, Trepel *et al.*, 2000); (2) estabilização da LTP tálamo-córtex visual, pelo priming da amígdala, depende de ativação colinérgica (Dringenberg, Kuo *et al.*, 2004) (Dringenberg, Kuo *et al.*, 2004); (3) estimulação do prosencéfalo basal potencializa LTP na via tálamo-córtex visual (Dringenberg, Hamze *et al.*, 2007).

Os estudos da modulação colinérgica da LTD no hipocampo e no córtex são menos abundantes. Huerta e Lisman (1995) demonstraram que a atividade oscilatória em teta no hipocampo gerada por carbacol promove facilitação da conversão da LTP em LTD na via CA3-CA1 *in vitro*. Outros estudos tiveram como foco a modulação colinérgica da LTD no córtex. Kirkwood, Rozas *et al.* (1999) estudaram a modulação colinérgica em *slices* do córtex visual. Seus resultados indicaram que a ativação colinérgica gerada por carbacol facilita a indução de LTD, e que esta facilitação é dependente de ativação de receptores muscarínicos do tipo M1. Um pouco mais tarde Warburton, Koder *et al.*, (2003) demonstraram que bloqueio de receptores muscarínicos por administração de escopolamina impede indução de LTD no córtex perirrinal *in vitro*. Mais recentemente, Kuczewski, Aztiria *et al.* (2005) mostraram que a remoção das aferências colinérgicas, provenientes do prosencéfalo basal, promove indução de

LTD após estimulação denominada *theta burst*, um protocolo de estimulação conhecido por induzir LTP no córtex e hipocampo de animais intactos.

Em resumo, esses dados sugerem que a atividade colinérgica modula a plasticidade sináptica, tanto no hipocampo, quanto no córtex. Contudo, ainda não está claro qual é o papel da ativação colinérgica na plasticidade sináptica de conexões entre o hipocampo e o neocórtex, essenciais para a retenção de memórias de longo-prazo (Huerta e Lisman, 1995; Kirkwood, Rozas *et al.*, 1999; Warburton, Koder *et al.*, 2003; Kuczewski, Aztiria *et al.*, 2005).

1.4. A via CA1-mPFC

O principal elo entre o hipocampo e o neocórtex é o córtex transicional, composto pelos córtices perirrinal, parahipocampal e entorrinal. Os dois primeiros recebem informações dos estágios mais elevados do processamento neocortical em cada uma das principais modalidades sensoriais. Após processar um estímulo, os córtices perirrinal e parahipocampal enviam a informação para a região do córtex entorrinal onde as diferentes modalidades sensoriais podem ser combinadas, formando uma representação polimodal do ambiente. Em seguida, o córtex entorrinal envia essas representações polimodais ao hipocampo, onde são criadas representações ainda mais complexas. Essas representações complexas processadas pelo hipocampo são enviadas de volta ao neocórtex via CA1, completando assim a alça de comunicação córtex – hipocampo – córtex (Squire, Stark *et al.*, 2004). Além de projetar para o córtex entorrinal, a região CA1 projeta, ipsilateralmente, para o mPFC (Vertes, 2006). Diversos estudos clínicos e experimentais indicaram que o mPFC está envolvido no processo de aprendizagem e memória, especialmente de trabalho (Goldman-Rakic, 1995b; a). Além disso, o mPFC contribui para: (1) a ordenação temporal de eventos

espaciais e não espaciais; (2) a organização de informações e planejamento de respostas; (3) o processamento de informações que requerem atenção seletiva; ou ainda (5) o processamento de informações e planejamento de comportamentos relacionados ao medo e ansiedade (Dalley, Cardinal *et al.*, 2004). É bem documentado também o envolvimento do mPFC em transtornos psiquiátricos, tais como: transtorno bipolar, depressão, psicose e transtorno de ansiedade (Drevets, Price *et al.*, 1997; Cerqueira, Mailliet *et al.*, 2007).

Por esses motivos, no final da década de 1980 e início da década de 1990 pesquisadores destacaram a possível importância da comunicação entre CA1 e mPFC em processos cognitivos (Damasio, 1989; Squire, 1992). As primeiras evidências diretas sobre o papel dessa via foram obtidas por experimentos que verificaram os efeitos de lesões unilaterais da região CA1 combinadas a lesões contralaterais do mPFC sobre a memória espacial de trabalho, testada em labirinto radial. Os resultados, em conjunto, sugerem que a transmissão de informação entre o hipocampo e o mPFC é necessária quando uma informação espacial de curta duração (obtida na sessão de treino) é usada para gerar estratégias comportamentais prospectivas (Seamans, Floresco *et al.*, 1995; Floresco, Seamans *et al.*, 1997; Degenetais, Thierry *et al.*, 2003).

No início da década de 1990 alguns pesquisadores forneceram importantes informações sobre a natureza da neurotransmissão da via CA1 – mPFC. Seus resultados indicaram que: (1) a comunicação CA1 – mPFC é excitatória e dependente de glutamato; (2) as respostas evocadas no mPFC por pulsos únicos dados em CA1, são dependentes de ativação de receptores AMPA; (3) a via CA1-mPFC está sujeita a indução de LTP, LTD e conversão entre eles (bidirecionalidade); e (4) o mecanismo de indução de LTP nessa via é dependente de NMDARs (Laroche, Jay *et al.*, 1990; Jay,

Burette *et al.*, 1995; Takita, Izaki *et al.*, 1999; Laroche, Davis *et al.*, 2000). Outros estudos indicaram que ocorre uma rápida ativação intracelular de proteína cinase A (PKA), dependente de ativação de NMDAR, alguns minutos após a indução de LTP na via CA1 – mPFC de ratos *in vivo*; sugerindo o envolvimento de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e PKA em cascatas intracelulares durante as fases iniciais da LTP no mPFC (Jay, Gurden *et al.*, 1998). Outros trabalhos mostraram que a LTP no mPFC pode se modulada por meio de: (1) infusão local de dopamina no mPFC (Jay, 2003); (2) tratamento agudo com clozapina, um anti-psicótico atípico capaz de aumentar ACh no mPFC (Parada, Hernandez *et al.*, 1997; Ichikawa, Dai *et al.*, 2002; Gemperle, Enz *et al.*, 2003); (3) tratamento agudo com fluvoxamina, um inibidor de recaptção de serotonina (Ohashi, Matsumoto *et al.*, 2002) e (4) tratamento crônico com anfetamina, utilizado como modelo experimental de psicose (Ishikawa, Kadota *et al.*, 2005).

Recentemente, foi demonstrado que a manutenção de plasticidade sináptica no hipocampo e na via CA1-mPFC é modulada durante o sono (Romcy-Pereira e Pavlides, 2004). A privação curta (4h) e seletiva de sono REM, logo após aplicação de HFS, reduz a LTP na via entorrinal-DG 48h depois. E, em contrapartida, potencializa a LTP na via CA1- mPFC; tanto imediatamente após a privação quanto 48h após a indução de LTP. Isto sugere que o sono modula distintamente a eficiência sináptica no hipocampo e no mPFC. No hipocampo, o sono promove a manutenção da plasticidade sináptica de longa duração enquanto no mPFC parece permitir ou promover que as sinapses retornem à sua eficiência basal, garantindo a continuidade de plasticidade no próximo ciclo de vigília (Romcy-Pereira e Pavlides, 2004). Um possível substrato biológico para a restauração da eficiência sináptica na via CA1-mPFC são os fenômenos de despoteencialização (volta à eficiência basal) e de bidirecionalidade (conversão entre

LTP em LTD) (Laroche, Davis *et al.*, 2000). Essa flexibilidade da eficácia sináptica já foi observada experimentalmente *in vivo* e é compatível com o papel do mPFC no armazenamento temporário de informações, essencial para o processamento de memórias de trabalho (Goldman-Rakic, 1995b; Izaki, Takita *et al.*, 2003).

O fenômeno de LTD na via CA1-mPFC foi demonstrado há pouco mais de dez anos (Takita, Izaki *et al.*, 1999). Contudo, os mecanismos responsáveis pela expressão da LTD nessa via ainda foram pouco estudados. Por exemplo, ainda não foram publicados estudos verificando se a LTD na via CA1-mPFC é dependente de NMDARs. Também não se sabe se a LTD nesta via poderia ser modulada pelos sistemas aminérgico, colinérgico, histaminérgico etc. Por outro lado, o possível envolvimento da plasticidade sináptica da via CA1-mPFC no aprendizado e memória de roedores têm sido estudado por meio de implantes crônicos de eletrodos de registro e estimulação em ratos em livre movimento submetidos a diferentes tarefas cognitivas (Burette, Jay *et al.*, 2000; Hugues e Garcia, 2007; Koseki, Matsumoto *et al.*, 2009). Resumidamente, estes estudos indicam que os fPSPs da via CA1-mPFC apresentam LTD ou LTP espontânea durante ou após aquisição, retenção, evocação ou extinção de memória emocional ou de trabalho. Este fenômeno está associado diretamente a melhora de desempenho na tarefa. Além disso, em alguns casos, ocorre a conversão da LTD inicial em LTP, mostrando que a bidirecionalidade da eficácia sináptica da via CA1-mPFC descrita em animais anestesiados com uretana (Laroche, Davis *et al.*, 2000; Izaki, Takita *et al.*, 2003) também ocorre em ratos em livre movimento durante tarefas cognitivas. Apesar destes avanços, os mecanismos pelo qual estes processos ocorrem permanecem desconhecidos.

Como vimos, o sistema colinérgico está envolvido nos prejuízos cognitivos presentes em modelos experimentais de epilepsia e transtornos psiquiátricos, além de

desempenhar papel fundamental na aquisição, retenção e evocação de memórias. Considerando que o processo de consolidação de memória declarativa envolve fluxo de informação entre o hipocampo e o córtex, faz-se necessário o estudo dos efeitos da modulação colinérgica na plasticidade sináptica das aferências e eferências que conectam estas áreas. A via CA1-mPFC é uma das saídas informacionais do hipocampo para o córtex. Ela possui neurotransmissão glutamatérgica e expressa LTP dependente de NMDAR. Sugere-se que a via CA1 – mPFC esteja envolvida no processamento e execução de comportamentos prospectivos por possibilitar a integração de diversos tipos de informações que são adquiridas e reprocessadas a cada momento. As primeiras evidências indiretas sobre a modulação colinérgica da via CA1-mPFC vieram com Romcy-Pereira e Pavlides (2004) demonstrando que o sono REM, fase do sono em que ocorre alta reativação colinérgica (Vazquez e Baghdoyan, 2001), é capaz de modular a LTP na via CA1-mPFC de ratos em livre-movimento. Em seguida, dados iniciais coletados em nosso laboratório mostraram, pela primeira vez, que a atividade colinérgica muscarínica modula a plasticidade sináptica na via CA1-mPFC e que esta modulação parece envolver alterações monoaminérgicas (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira *et al.*, 2008). Nossos resultados sugerem que a ativação de receptores muscarínicos colinérgicos por injeção de PILO (15 mg/Kg, i.p.) 20 min antes de indução de LTP, potencializa a manutenção da LTP cerca de 1,5 hora após a sua indução e promove modificações nos níveis de monoaminas no mPFC. Apesar do crescente número de estudos sobre a importância dessa via em transtornos psiquiátricos, epilepsia, aprendizado e memória, bem como, do amplo envolvimento do sistema colinérgico em todos os processos supracitados, ainda não existem estudos reportando os efeitos da atividade colinérgica sobre a LTD na via CA1-mPFC, bem como, sobre o papel dos NMDARs nestes processos.

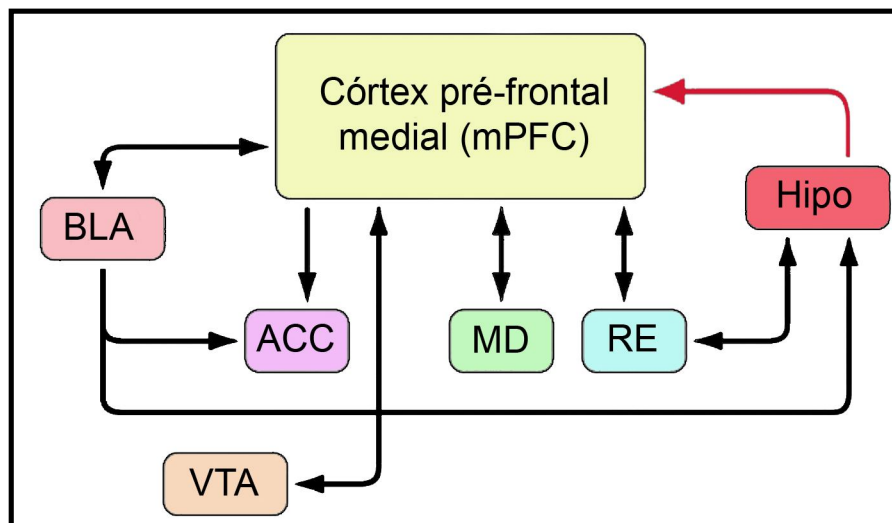


Figura 2. A via CA1-mPFC e outras eferências e aferências relevantes para o estudo da plasticidade sináptica, memória, emoções, epilepsias e transtornos psiquiátricos. O mPFC possui posição anatômica privilegiada, pois recebe projeções de diversas regiões corticais e límbicas, possuindo papel central no processamento de informações emocionais e cognitivas. Além disso, o mPFC é capaz de influenciar a atividade da amígdala basolateral (BLA), *núcleo accumbens* (ACC), área tegmental ventral (VTA) e núcleos médio dorsal (MD) e *reuniens* (RE) do tálamo. Contudo as conexões entre o hipocampo (subcampo CA1) e mPFC são unidirecionais, constituindo uma das principais vias de saída de informação para o córtex. Por isso, a via CA1-mPFC parece desempenhar funções importantes no processamento de memória de trabalho e consolidação de memória em longo-prazo (Figura adaptada de Vertes, 2006).

2. Objetivos Gerais

Investigar os efeitos da modulação colinérgica muscarínica na indução e manutenção da LTD na via CA1 – mPFC de ratos *in vivo*.

2.1. Objetivos específicos

(1) Estudar os efeitos da pré-ativação muscarínica central, por micro-injeção i.c.v. de PILO antes da aplicação de estimulação de baixa frequência (LFS), no processo de indução e manutenção da LTD na via CA1-mPFC;

(2) Estudar os efeitos da pós-ativação muscarínica central, por micro-injeção de PILO após LFS, na manutenção da LTD na via CA1-mPFC;

(3) Estudar o papel de receptores de L-glutamato do tipo NMDA na interação entre PILO e LTD na via CA1-mPFC.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados em torno de 120 ratos Wistar adultos machos com pesos entre 250 e 450 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – USP/RP. Sendo que destes, 75 animais foram aproveitados como sujeitos experimentais. Esta perda de 37,5% está dentro do esperado inicialmente, considerando a taxa de mortalidade dos ratos durante a cirurgia, erros no posicionamento de cânula entre outros fatores capazes de interferir nos resultados.

Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 33 x 18 cm) contendo raspas de madeira (maravalha) sobre o assoalho. Durante todo o período dos experimentos, os animais estiveram alojados em biotério com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) e submetidos a ciclo de 12 h de claro: 12 h de escuro com luzes acesas às 07h00min. Além disso, os ratos tiveram livre acesso à comida e água. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP), nº do processo: 086/2007.

3.2. Cirurgia e implante de eletrodos

Após injeção sistêmica de uretana (1,2 a 1,5 g/Kg i.p. em NaCl 0,15 M), foi feita verificação do grau de anestesia no rato por meio de pinçamento de cauda. O animal foi submetido, então, a tricotomia do escalpo e fixação do crânio em estereotáxico (KOPF; KOPF instruments; EUA). Em seguida, foi feito procedimento de assepsia do escalpo com iodo e água oxigenada. Logo após, foi administrada injeção subcutânea de anestésico (lidocaína a 2% em NaCl 0,15 M) no local da incisão. O rato, então, foi submetido à incisão do escalpo para a exposição e limpeza da superfície do crânio. Tomando-se o bregma como referência ântero-posterior e médio-lateral, foram feitos dois orifícios no crânio segundo as coordenadas: (ântero-posterior: - 5,6 mm; médio-lateral: + 4,5 mm para a região posterior dorsal da área CA1 do hipocampo) e (ântero-posterior: + 3,0 mm; médio-lateral + 0,5 mm; para o mPFC) (Paxinos e Watson, 1998). Dois orifícios adicionais foram feitos: um deles destinado a implante de cânula para micro-injeções de drogas no ventrículo lateral dorsal (ântero-posterior: - 0,5 mm; médio-lateral + 1,3 mm e dorso-ventral: - 2,53mm) e outro para fixação de um microparafuso com fio e conector para servir como terra e referência durante os registros. As coordenadas dorso-ventrais de CA1 e do mPFC variaram de acordo com o rato compreendendo valores entre -2,0 a -3,0mm para CA1 e -3,0 a 3,5mm para o mPFC. Os ratos foram submetidos a controle da temperatura corporal ($37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) desde o início da cirurgia. Dois eletrodos feitos com fios de tungstênio revestidos por teflon (60 μm de diâmetro; A-M Systems, Inc.) foram implantados através dos orifícios: (1) eletrodo monopolar de registro na região do mPFC (alvo: área pré-límbica) e (2) eletrodo bipolar (separação das pontas de 500 μm a 1 mm) de estímulo na região CA1 do hipocampo. Foram aplicados pulsos-teste com intensidade de 150 μA , duração de

200 μ s e frequência de 0,05 Hz (1 pulso a cada 20 s para obtenção de fPSPs no mPFC). As coordenadas dorso-ventrais foram ajustadas de modo que fosse obtida a máxima amplitude dos fPSPs. Com o objetivo de verificar os efeitos do bloqueio de receptores do tipo NMDA no mPFC sobre a interação entre PILO e LTD na via CA1-mPFC, foram feitos experimentos adicionais submetendo ratos aos mesmos implantes de eletrodos e cânula anteriormente descritos, exceto pela presença de um quimiotrodo (eletrodo+cânula) no mPFC ao invés de apenas eletrodo de registro.

Todo aparato experimental foi isolado contra ruídos elétricos por uma gaiola de Faraday metálica (100 x 95 x 50 cm). Os estímulos foram gerados por um estimulador analógico (S88; Grass Instruments; EUA) acoplado a uma unidade isoladora de estímulo corrente constante (PSIU6; Grass Instruments; EUA). O sinal de registro foi amplificado 100 vezes e filtrado na banda de frequência entre 0,3 Hz e 30 kHz (GRASS P55 Pre-amplifier; EUA). O sinal analógico foi digitalizado (10 kHz) por meio de um conversor analógico-digital de 16 bits (Powerlab/16s; ADInstruments, Inc.; EUA), conectado a uma placa SCSI instalada em computador Pentium IV. Para captura dos fPSPs utilizamos um software capaz de emular de osciloscópio digital (Scope 3.6.7; ADInstruments, Inc.; EUA).

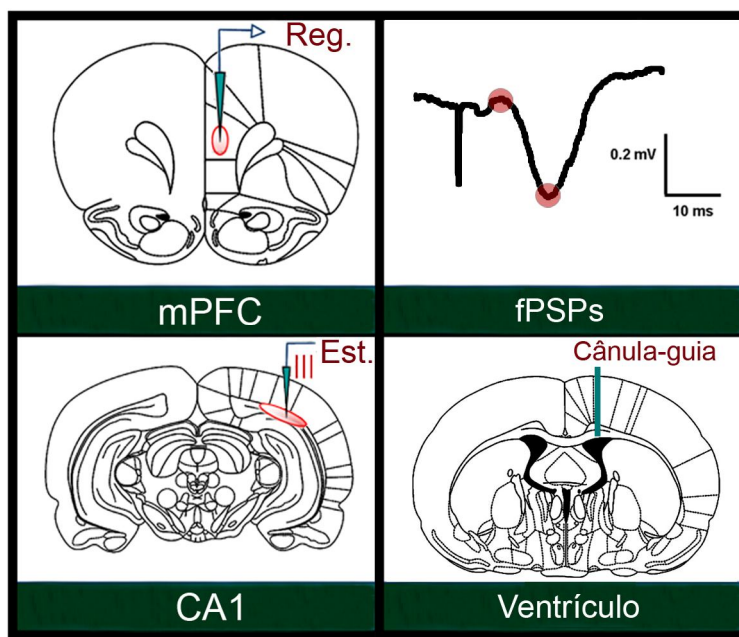


Figura 3. Posicionamento de eletrodos de estímulo no hipocampo e registro no mPFC e de cânula-guia para microinjeção de drogas. Quando os eletrodos eram posicionados corretamente, um único pulso elétrico em CA1 do hipocampo posterior dorsal era capaz de eliciar uma resposta eletrofisiológica característica no mPFC (fPSP). A distância entre o pico e o vale do fPSP foi considerada como a amplitude e a inclinação da reta que conecta esses pontos foi utilizada para quantificação do slope dos fPSPs.

3.3. Registros iniciais dos fPSPs e determinação das curvas E/S

Curvas estímulo-resposta foram construídas com o objetivo de definir a intensidade de estímulo para a aplicação de pulsos-teste e o protocolo de indução de LTD. Para a construção das curvas estímulo-resposta (curvas E/S), foram aplicados estímulos em CA1 com intensidades crescentes. Em cada uma das 9 intensidades (60; 80; 100; 120; 150; 200; 300; 400 e 500 μA) foram registrados e promediados três fPSPs no mPFC. Para cada animal, a intensidade de estímulo escolhida para a indução de LTD foi equivalente a 70% da amplitude necessária para induzir fPSPs máximos registrados na curva E/S.

3.4. Protocolos de indução de LTD

Para a indução de LTD foram aplicados séries de estímulos em baixa frequência (LFS): 900 (LTD forte) ou 600 (LTD fraca) trens liberados a 1Hz (5 pulsos a 250 Hz; duração do pulso de 0,1 ms) (Takita, Izaki *et al.*, 1999). A duração total dos protocolos foi de 15min para 900 séries e 10min para 600 séries de estímulos.

3.5. Registros de potenciais locais de campo (LFPs)

Para monitorar os efeitos centrais das drogas administradas no decorrer do experimento, foram feitos registros de LFPs durante 2min no hipocampo e mPFC antes e após micro-injeção icv. Posteriormente, os registros foram analisados por meio de cálculo dos espectros de potência nas bandas de oscilação delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 10 Hz), sigma (10 – 15 Hz) e gama (25 – 40 Hz).

3.6. Histologia

Com o objetivo de facilitar posteriores observações histológicas do posicionamento final dos eletrodos, as áreas de registro (mPFC) e de estímulo (CA1) foram lesionadas por meio de estímulo eletrolítico (estímulos únicos de 1mA de intensidade e 1s de duração). Após a lesão eletrolítica de CA1 e mPFC, os ratos foram submetidos a sobre-dose anestésica por meio de injeção adicional de uretana (1,2 g/Kg i.p. em NaCl 0,15 M) e decaptados. Em seguida os encéfalos foram removidos e pós-fixados em solução de formalina 10% por um período de 24-72h e, em seguida, colocados em solução crioprotetora de sacarose 20% diluída em salina por um ou dois dias. Após procedimento de crioproteção, os cérebros foram congelados e seccionados em criostato, na espessura de 30 μ m. As secções contendo as áreas de posicionamento dos eletrodos no hipocampo e mPFC, bem como, da cânula no ventrículo lateral dorsal foram montadas em lâminas gelatinizadas. Os tecidos foram corados com cresil-violeta

e as lâminas observadas e documentadas em microscópio (Olympus BX-60) com câmera digital acoplada. As imagens foram transferidas a um computador e analisadas.

3.7. Análise de dados

A amplitude dos fPSPs foi calculada considerando a distância entre o primeiro pico e o primeiro vale do fPSP. Essa medida expressa a magnitude da despolarização pós-sináptica no mPFC após o terminal pré-sináptico ter sido estimulado em CA1. Já a inclinação (slope) dos fPSPs foi calculada como a inclinação da reta que conecta os pontos do primeiro pico ao primeiro vale. Essa medida considera não só a magnitude da resposta eliciado no mPFC, mas também a velocidade com que isso acontece. Estes valores de amplitude e slope dos fPSPs foram normalizados em relação à linha de base (definida como 100%) e divididos em épocas de 10min para comparações entre-grupos.

Para análise estatística dos dados foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois fatores para medidas repetidas, sendo o primeiro fator o tratamento (drogas ou veículos; Veh), e o segundo o fator tempo (linha de base e períodos pós-LTD), consistindo na própria medida repetida. Este teste estatístico permitiu comparações entre grupos, para verificação de possíveis efeitos da modulação muscarínica na indução e/ou manutenção da LTD; e intragrupos, para verificação da estabilidade da linha de base (BL1 vs BL2 vs BL3). As comparações *post-hoc* foram realizadas com o Teste de Bonferroni. Para todos os casos foi estabelecido $p \leq 0,05$ para significância estatística. Para as análises dos padrões oscilatórios os registros de LFPs foram analisados e calculados espectros de potência em 4 frequências de interesse: delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 10 Hz), sigma (10 – 15 Hz) e gama (25 – 40 Hz). Em seguida, foi utilizado o Teste t de *student* pareado para comparar as médias das potências relativas antes e depois de micro-injeção i.c.v (PILO ou Veh).

3.8. Paradigmas experimentais

Experimento I (fig. 2A): Respostas eletrofisiológicas medidas no mPFC (fPSPs) foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após protocolo de indução de LTD fraca (LFS600). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a micro-injeção i.c.v. recebida imediatamente antes de LFS600 (PILO 40nmoles em aCSF: grupo PILO+LFS600 ou aCSF: grupo Veh+LFS600).

Experimento II (fig. 3A): fPSPs foram registrados por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitorados por 240min adicionais após micro-injeção. Neste experimento não houve indução de LTD, apenas monitoramento dos possíveis efeitos da PILO sobre os fPSPs basais. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a micro-injeção i.c.v. (PILO 40nmoles em aCSF: grupo PILO ou aCSF: grupo Veh).

Experimento III (fig. 4A): fPSPs foram registrados por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitorados por 240min adicionais após LFS600. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a micro-injeção i.c.v. recebido 20min após LFS600 (PILO 40nmoles em aCSF: grupo LFS600+PILO ou aCSF: grupo LFS600+Veh).

Experimento IV (fig. 5A): fPSPs foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após protocolo de indução de LTD fraca (LFS600). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com micro-injeção intra-mPFC aos 20min (entre BL2 e BL3) de linha de base (AP7 40nmoles; 0,4 μ L em NaCl 0,15M: grupo AP7+PILO+LFS600; ou NaCl 0,15M: grupo

Veh+PILO+LFS600). Em seguida os animais foram submetidos a micro-injeção i.c.v. imediatamente antes de LFS600 (PILO 40nmoles em aCSF).

Experimento V (fig. 6A): fPSPs foram registrados por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após protocolo de indução de LTD forte (LFS900). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com micro-injeção intra-mPFC aos 20min (entre BL2 e BL3) de linha de base (AP7: grupo AP7+LFS900; ou NaCL 0,15M: grupo Veh+LFS900).

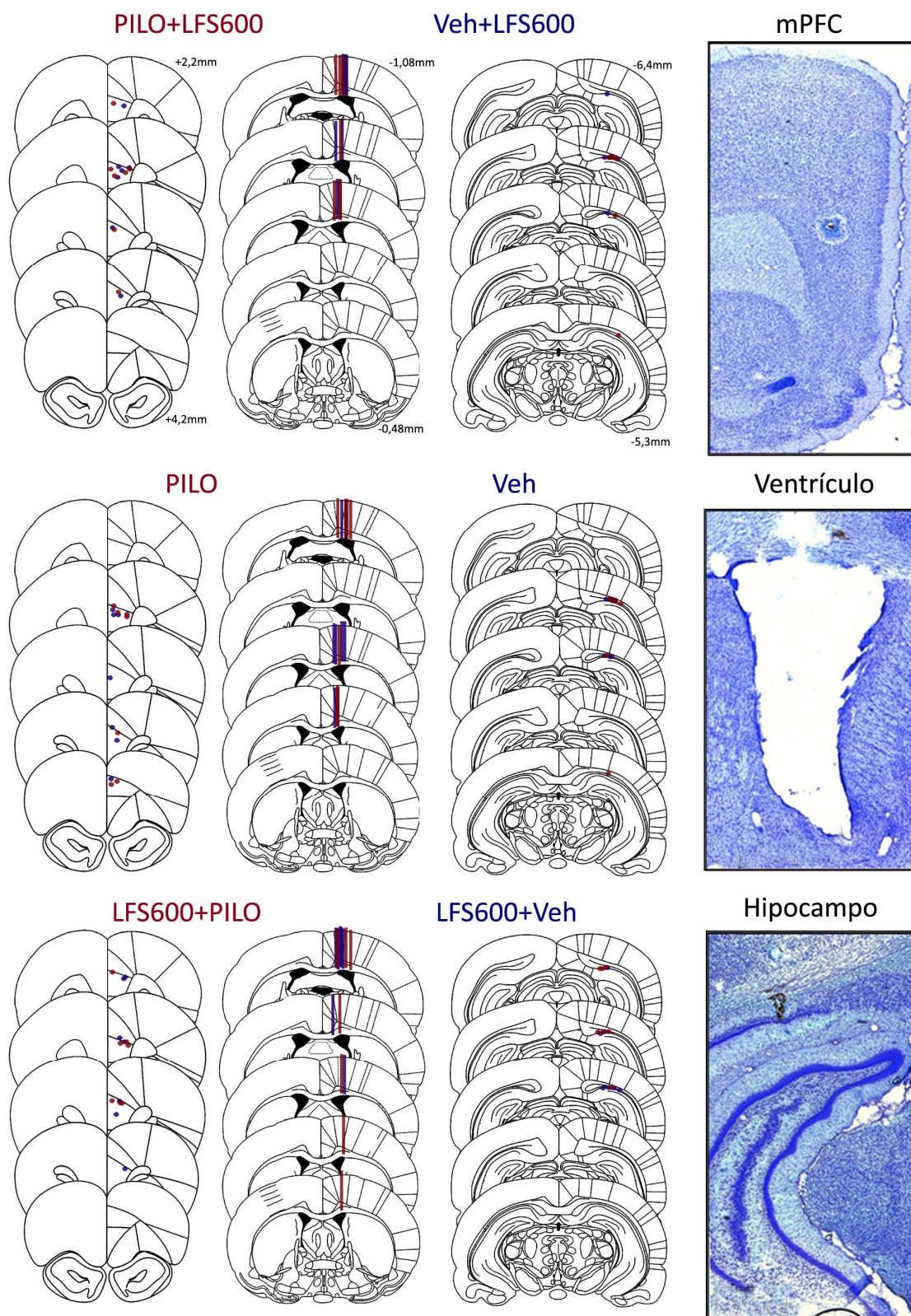
Com o objetivo de checar os efeitos de PILO sobre os padrões oscilatórios de CA1 e mPFC nos experimentos I, II, III e IV foram registrados potenciais de campo locais (LFPs) nessas duas regiões durante 2min antes e após micro-injeção.

4. Resultados

Todos os animais incluídos em nossas análises tiveram um eletrodo de estimulação implantado na sub-região CA1 do hipocampo posterior dorsal e um outro eletrodo de registro na sub-região pré-límbica do mPFC. As cânulas, por sua vez, foram posicionadas cerca de 1mm acima do ventrículo lateral, permitindo que apenas a agulha de micro-injeção o perfurasse (Fig.1). Animais que não tiveram o ventrículo perfurado pela agulha de micro-injeção foram excluídos das análises de dados eletrofisiológicos. Em todos os experimentos foram obtidos fPSPs característicos da via CA1-mPFC com amplitude, slope e latência média do pico negativo de $0,32 \pm 0,01$ mV, $- 56,47 \pm 2,50$ μV/ms e $15,73 \pm 0,21$ ms, respectivamente. A tabela 1 mostra os valores médios de amplitude, slope e latência para cada grupo experimental durante a linha de base. Foram feitas comparações por meio de Teste t entre os grupos experimentais e seus respectivos controles em relação aos parâmetros citados acima. Os resultados

indicam não haver diferenças significativas nas comparações entre grupos para amplitude, slope e latência (Teste t, $p > 0,05$, para todas as comparações entre grupos experimentais e controle).

Como descrito na sessão Materiais e Métodos, a linha de base foi dividida em três blocos de 10min (BL1, BL2 e BL3) para monitoramento de sua estabilidade e verificação dos efeitos de micro-injeção de AP7 ou Veh no mPFC entre BL2 e BL3 nos grupos (AP7+PILO+LFS600; Veh+PILO+LFS600; AP7+LFS900 e Veh+LFS900). Comparações intra-grupos, por meio de análise de variância (ANOVA) de um fator para medidas repetidas, mostraram não haver diferenças significativas para amplitude e slope dos fPSPs entre BL1, BL2 e BL3 em todos os grupos conforme indicado na tabela 2. Estes dados, em conjunto, indicam que os fPSPs eliciados no mPFC após estimulação de CA1 apresentaram-se regulares ao longo do tempo, gerando uma linha de base contínua e sem oscilações significativas em sua amplitude e slope por 30min, mesmo nos grupos que receberam micro-injeção de AP7 ou Veh diretamente no nPFC entre os registros BL2 e BL3. Por este motivo os dados pós-LFS foram divididos em épocas de 10min e normalizados em relação à média de BL1+BL2+BL3 para comparações entre-grupos, como será mostrado a seguir.



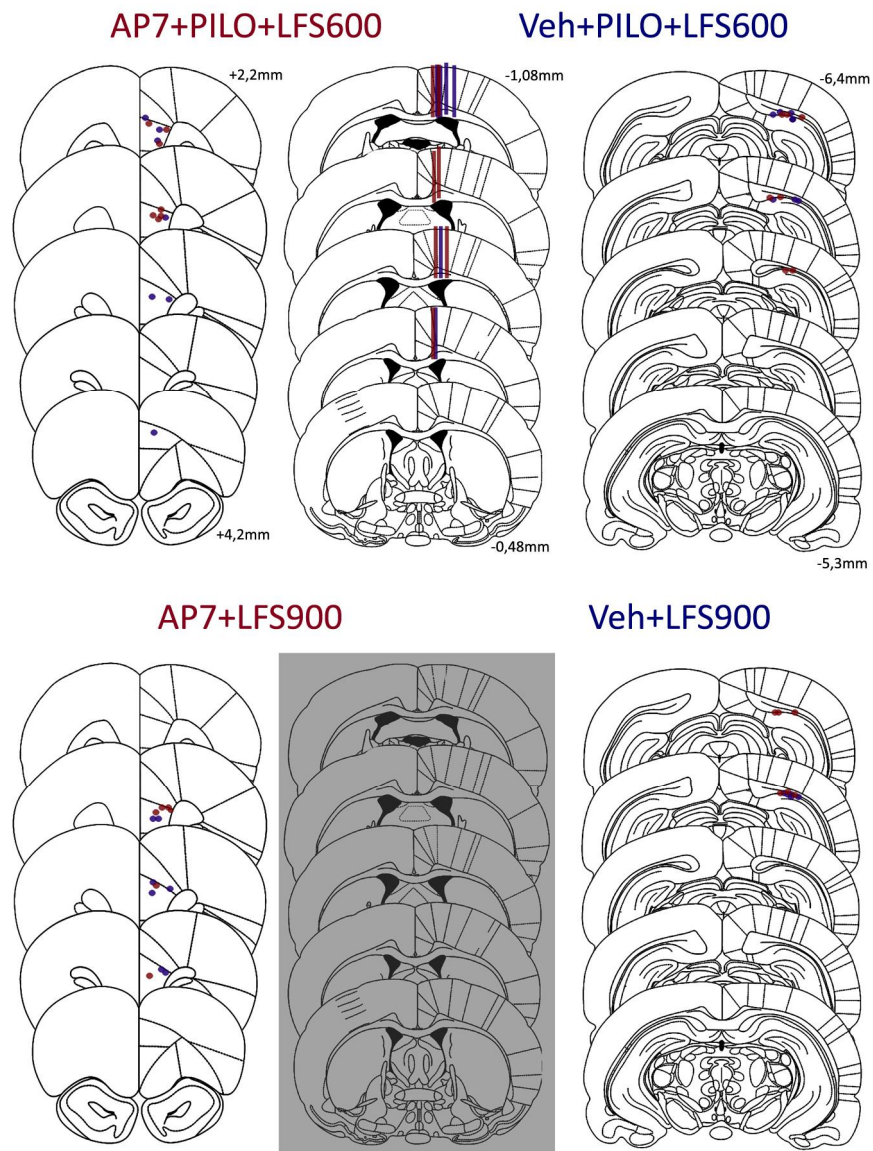


Figura 4. Posicionamento de eletrodos e cânula. À esquerda, secções histológicas coradas com Cresil-Violeta mostrando lesões eletrolíticas típicas feitas no mPFC e em CA1 após o experimento e lesão gerada pela cânula acima do ventrículo. À direita, representação esquemática do posicionamento final dos eletrodos e cânulas implantados durante todos os experimentos.

Grupos	Amplitude (mV)	Slope ($\mu\text{V}/\text{ms}$) x (-1)	Latência (ms)
PILO+LFS600	0,33 \pm 0,03	57,19 \pm 4,80	15,86 \pm 0,44
Veh+LFS600	0,37 \pm 0,04	64,75 \pm 5,23	16,14 \pm 0,32
Teste t de student	($t = -0,78$; $P = 0,45$)	($t = 1,07$; $P = 0,31$)	($t = -0,52$; $P = 0,61$)
Veh	0,29 \pm 0,03	53,9 \pm 5,39	15,63 \pm 0,52
PILO	0,38 \pm 0,03	65,65 \pm 7,02	15,5 \pm 0,34
Teste t de student	($t = 1,98$; $P = 0,07$)	($t = -1,33$; $P = 0,21$)	($t = -0,21$; $P = 0,84$)
LFS+PILO	0,32 \pm 0,01	61,87 \pm 2,66	15,13 \pm 0,23
LFS+Veh	0,36 \pm 0,04	65,77 \pm 6,33	14,99 \pm 0,38
Teste t de student	($t = 0,9$; $P = 0,38$)	($t = -0,57$; $P = 0,58$)	($t = -0,32$; $P = 0,75$)
AP7+PILO+LFS 600	0,26 \pm 0,02	42,73 \pm 3,70	16,54 \pm 0,46
Veh+PILO+LFS 600	0,28 \pm 0,03	47,93 \pm 7,30	17,05 \pm 0,22
Teste t de student	($t = -0,56$; $P = 0,59$)	($t = 0,67$; $P = 0,52$)	($T = 54$; $P = 0,1$)*
AP7+LFS900	0,29 \pm 0,02	56,01 \pm 4,36	15,17 \pm 0,40
Veh+LFS900	0,27 \pm 0,03	48,91 \pm 6,02	15,27 \pm 0,37
Teste t de student	($t = 0,49$; $P = 0,63$)	($T = 36$; $P = 0,45$)*	($t = -0,19$; $P = 0,86$)

* Teste não paramétrico de Mann-Whitney

Tabela 1. Análise dos fPSPs obtidos durante a linha de base em cada grupo. Foram quantificados os valores de amplitude, slope e latência dos fPSPs. Em seguida, foram feitas análises estatísticas por meio de Teste t de student ou Mann-Whitney, dependendo do tipo da distribuição dos dados, com o objetivo de comparar grupos experimentais e seus respectivos controles quanto aos parâmetros citados acima. Não foram encontradas diferenças estatísticas. (PILO+LFS600 vs Veh+LFS600; Veh vs PILO; LFS600+PILO vs LFS600+Veh; AP7+PILO+LFS600 vs Veh+PILO+LFS600; AP7+LFS900 vs Veh+LFS900; $p > 0,05$, Teste t de student). Dados apresentados como Média \pm E.P.

Grupos	BL1 ± EP (%)	BL2 ± EP (%)	BL3 ± EP (%)	F	p
PILO+LFS600 (Amplitude)	99,9 ± 0,9	101,0 ± 0,3	99,0 ± 0,7	$F_{(2,11)} = 0,26$	p>0,05
PILO+LFS600 (Slope)	98,6 ± 0,9	100,8 ± 0,3	98,6 ± 0,6	$F_{(2,11)} = 0,42$	p>0,05
Veh+LFS600 (Amplitude)	96,2 ± 0,8	102,9 ± 0,6	100,9 ± 0,4	$F_{(2,12)} = 2,96$	p>0,05
Veh+LFS600 (Slope)	97,1 ± 0,9	101,7 ± 0,5	101,2 ± 0,5	$F_{(2,12)} = 1,49$	p>0,05
PILO (Amplitude)	100,6 ± 0,6	100,1 ± 0,5	99,3 ± 0,6	$F_{(2,12)} = 0,13$	p>0,05
PILO (Slope)	101,3 ± 0,6	99,0 ± 0,5	99,7 ± 0,9	$F_{(2,12)} = 0,28$	p>0,05
Veh (Amplitude)	102,0 ± 0,6	100,3 ± 0,1	97,7 ± 0,5	$F_{(2,12)} = 2,16$	p>0,05
Veh (Slope)	101,3 ± 0,7	100,6 ± 0,2	98,2 ± 0,6	$F_{(2,12)} = 0,89$	p>0,05
LFS+PILO (Amplitude)	100,2 ± 0,3	98,9 ± 0,3	101 ± 0,2	$F_{(2,12)} = 1,49$	p>0,05
LFS+PILO (Slope)	99,3 ± 0,4	99,7 ± 0,2	101 ± 0,3	$F_{(2,12)} = 0,89$	p>0,05
LFS+Veh (Amplitude)	99,0 ± 0,8	100,9 ± 0,3	100,1 ± 0,6	$F_{(2,10)} = 0,32$	p>0,05
LFS+Veh (Slope)	99,1 ± 0,7	100,5 ± 0,2	100,4 ± 0,6	$F_{(2,10)} = 0,21$	p>0,05
AP7+PILO+LFS600 (Amplitude)	98,0 ± 0,4	100,8 ± 0,4	101,2 ± 0,4	$F_{(2,12)} = 0,68$	p>0,05
AP7+PILO+LFS600 (Slope)	96,7 ± 0,3	101,2 ± 0,5	102,1 ± 0,5	$F_{(2,12)} = 1,50$	p>0,05
Veh+PILO+LFS600 (Amplitude)	101,8 ± 0,6	102,9 ± 0,5	95,2 ± 0,8	$F_{(2,10)} = 2,19$	p>0,05
Veh+PILO+LFS600 (Slope)	102,4 ± 0,8	102,4 ± 0,5	95,2 ± 1,1	$F_{(2,10)} = 2,77$	p>0,05
AP7+LFS900 (Amplitude)	99,1 ± 0,7	100,2 ± 0,2	100,7 ± 0,8	$F_{(2,10)} = 0,43$	p>0,05
AP7+LFS900 (Slope)	98,1 ± 0,9	100,6 ± 0,3	101,3 ± 0,8	$F_{(2,10)} = 1,80$	p>0,05
Veh+LFS900 (Amplitude)	103,3 ± 0,9	101,2 ± 0,8	95,6 ± 1,1	$F_{(2,12)} = 3,59$	p>0,05
Veh+LFS900 (Slope)	101,4 ± 0,9	101,6 ± 0,6	97,0 ± 1,0	$F_{(2,12)} = 0,44$	p>0,05

Tabela 2. Comparação de BL1, BL2 e BL3 intra-grupos para verificação da estabilidade da linha de base ao longo de 30min. A análise estatística foi feita por meio de ANOVA de um fator para medidas repetidas para grupo especificado na tabela (ver valores de F e p). Valores apresentados como Média ± E.P.

Após 30min de linha de base (BL1, BL2, BL3), os animais foram submetidos à aplicação de protocolo para indução de LTD fraca (LFS de 600 trens) e monitorados por 240min adicionais para verificação da manutenção da LTD. As figuras 2B e 2C mostram o efeito da pré-ativação muscarínica por meio de micro-injeção de PILO sobre a LTD fraca na via CA1-mPFC. Os resultados indicam que a micro-injeção de PILO imediatamente antes de aplicação de LFS600 promove um aumento global de aproximadamente 18% na LTD da via CA1-mPFC (PILO+LFS600 vs Veh+LFS600: Amplitude dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 8,643$, $p < 0,05$; Slope dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 5,537$, $p < 0,05$; ANOVA de dois fatores para medidas repetidas). Análises post hoc complementares à ANOVA indicam que embora os dois grupos tenham apresentado níveis de indução de LTD semelhantes (Amplitude dos fPSPs, 10 a 50min, $p > 0,05$; Slope dos fPSPs, 10 a 60min, $p > 0,05$; Teste de Bonferroni) os fPSPs do grupo Veh voltam mais rápido aos níveis de linha de base comparado com o grupo tratado com PILO antes de LFS600. Foram observados efeitos significativos do tratamento com PILO a partir de 60min após LFS600, mantendo-se por mais 100 a 150min (+18 a +27%; Amplitude dos fPSPs, 60 a 210min pós-LFS, $p < 0,05$; Slope dos fPSPs, 70 a 150min pós-LFS, $p < 0,05$; Teste de Bonferroni). Apesar de ser capaz de prolongar a manutenção LTD na via CA1-mPFC, experimentos posteriores (Figs. 3B e C) mostraram que a PILO, por si só, não é capaz de alterar os fPSPs basais (PILO vs Veh: Amplitude dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 0,032$, $p > 0,05$; Slope dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 0,024$, $p > 0,05$). Além disso, a administração de PILO após LFS (Figs. 4B e 4C) também não é capaz de modular significativamente a LTD nem os fPSPs basais na via CA1-mPFC (LFS600+PILO vs LFS600+Veh: Amplitude dos fPSPs, $F_{(1,23)} = 2,350$, $P > 0,05$; Slope dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 2,046$, $p > 0,05$).

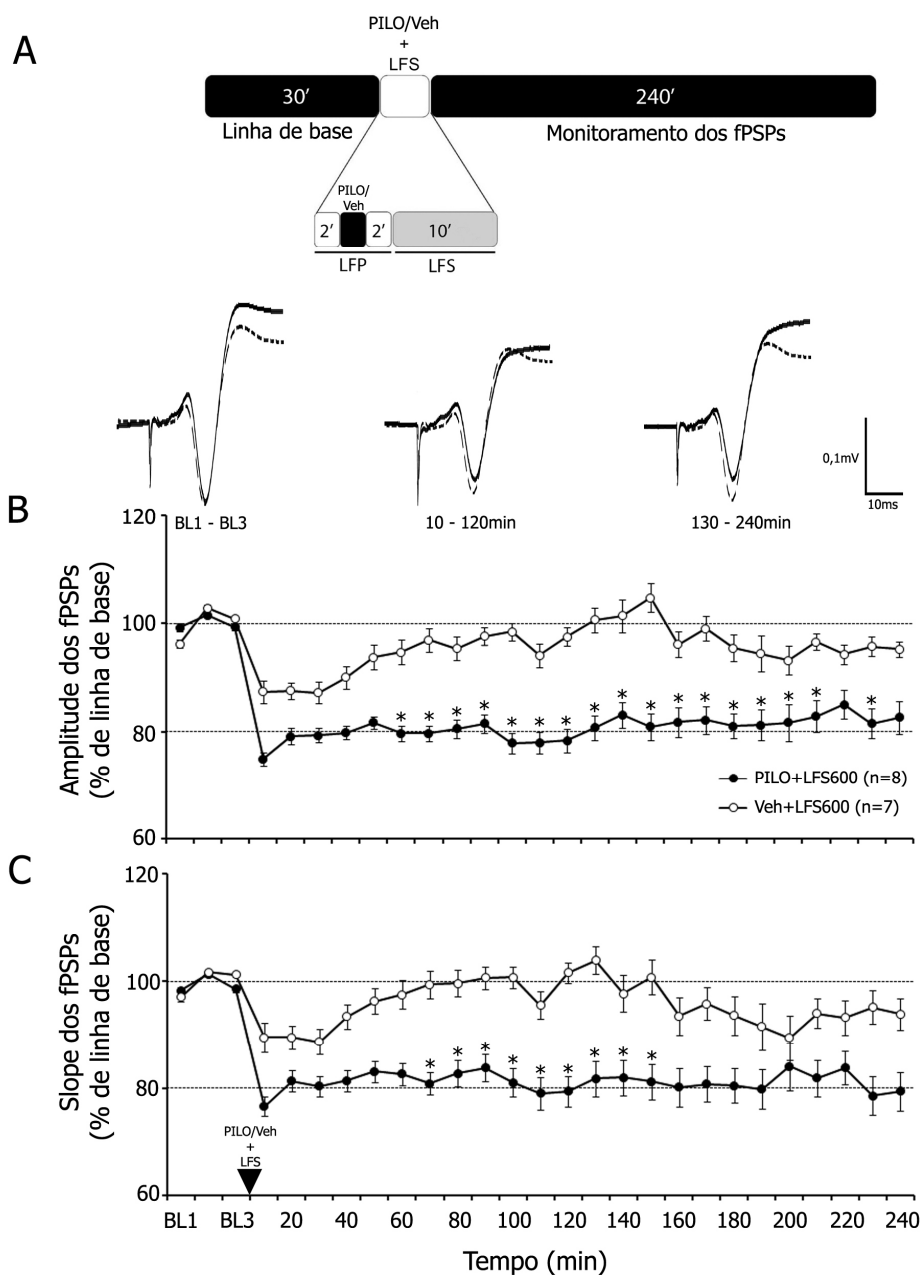


Figura 5. Efeitos da pré-ativação muscarínica sobre a LTD fraca na via CA1-mPFC. (A) Paradigma experimental. Respostas eletrofisiológicas medidas no mPFC (fPSPs) foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após protocolo de indução de LTD fraca (LFS600). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a micro-injeção i.c.v. recebida imediatamente antes de LFS600 (PILO 40nmoles em aCSF: grupo PILO+LFS600 ou aCSF: grupo Veh+LFS600). Com o objetivo de checar os efeitos de PILO sobre os padrões oscilatórios de CA1 e mPFC foram registrados LFPs durante 2min antes e após micro-injeção. (B) Análise da amplitude dos

fPSPs mostra que PILO administrada antes de LFS600 prolonga a manutenção da LTD fraca por cerca de 150min comparado ao grupo controle. (C) Quantificação do Slope dos fPSPs reforça os achados descritos acima, mostrando que PILO é capaz de facilitar a LTD fraca por cerca de 100min adicionais em relação ao grupo controle. Logo acima, entre os gráficos e o paradigma experimental, fPSPs representativos eliciados no mPFC após pulso único em CA1 ilustram os resultados obtidos. fPSPs em negrito representam o grupo PILO+LFS600 e os tracejados o grupo Veh+LFS600. Dados apresentados como Média \pm E.P. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de dois fatores para medidas repetidas seguida de Teste de Bonferroni como análise post hoc. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Veh+LFS600.

Com o objetivo de verificar o papel da ativação de receptores pós-sinápticos de L-glutamato do tipo NMDA no efeito potencializador da PILO sobre a manutenção da LTD na via CA1-mPFC foi feito um experimento adicional utilizando-se o paradigma descrito na figura 5A. As figuras 5B e 5C mostram os efeitos do bloqueio de NMDARs por AP7 intra-mPFC 10min antes de micro-injeção de PILO e aplicação de LFS600. Os resultados indicam que a administração de AP7 intra-mPFC reverte os efeitos da PILO sobre manutenção da LTD fraca na via CA1-mPFC, promovendo uma diminuição de aproximadamente 13% na LTD global (AP7+PILO+LFS600 vs Veh+PILO+LFS600: Amplitude dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 4,834$, $p = 0,05$; Slope dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 6,465$, $p < 0,05$; ANOVA de dois fatores para medidas repetidas). Análises post hoc complementares à ANOVA indicam que os efeitos do AP7 intra-mPFC sejam significativos entre 130 e 170min após LFS, mantendo-se, por pelo menos, 70min adicionais (-16 a -22%; Amplitude dos fPSPs, 170 a 240min, $p < 0,05$; Slope dos fPSPs, 130 a 240min, $p < 0,05$; Teste de Bonferroni). Além disso, nossos dados indicam que a mesma dose de AP7 intra-mPFC também é capaz de bloquear a LTD forte quando administrada 10min antes de protocolo de LFS de 900 trens (figs.6B e 6C; AP7+LFS900 vs Veh+LFS900: Amplitude dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 7,066$, $p < 0,05$; Slope dos fPSPs, $F_{(1, 23)} = 7,098$, $p < 0,05$;

ANOVA de dois fatores para medidas repetidas). A análise post hoc complementar à ANOVA indica que os efeitos do AP7 intra-mPFC sejam significativos desde os 40 ou 50min após LFS, estendendo-se por cerca de 110 a 170min adicionais (-18 a -25%; Amplitude dos fPSPs, 40 a 210min, $p < 0,05$; Slope dos fPSPs, 50 a 160min, $p < 0,05$; Teste de Bonferroni).

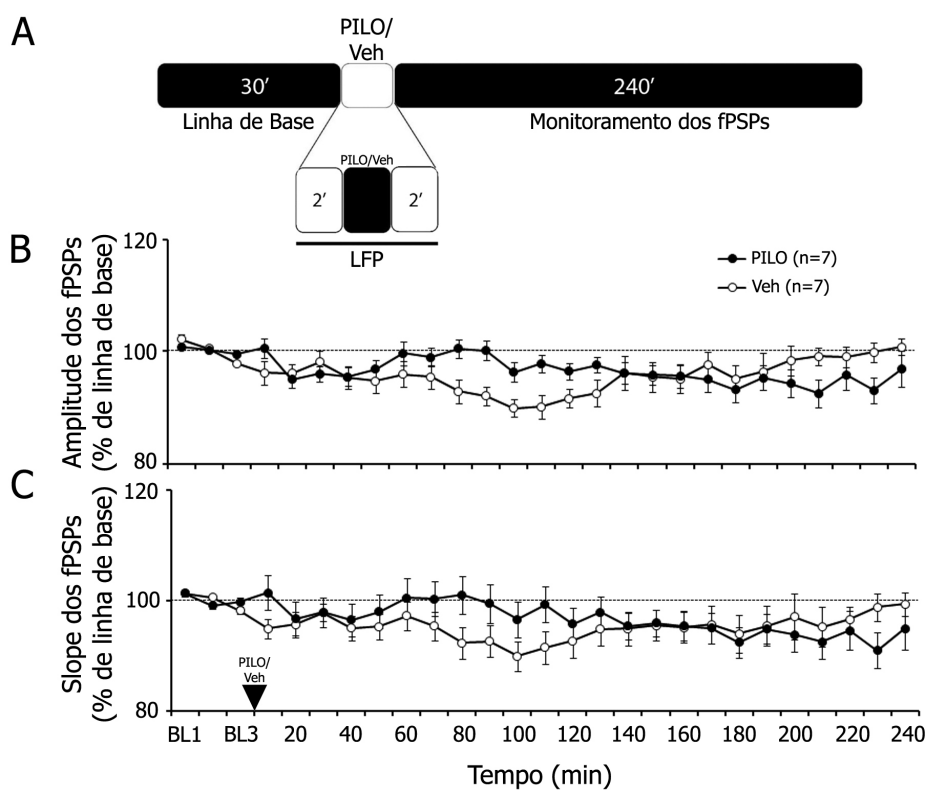


Figura 6. Efeitos da ativação muscarínica sobre os fPSPs basais da via CA1-mPFC. (A) Paradigma experimental. Respostas eletrofisiológicas medidas no mPFC (fPSPs) foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após micro-inejeção. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a micro-inejeção i.c.v. (PILO 40nmol em aCSF: grupo PILO ou aCSF: grupo Veh). Com o objetivo de checar os efeitos de PILO sobre os padrões oscilatórios de CA1 e mPFC foram registrados LFPs durante 2min antes e após micro-inejeção. (B) Análise da amplitude dos fPSPs mostra que PILO não afeta fPSPs basais. (C) Quantificação do Slope dos fPSPs reforça os

achados descritos acima, mostrando que não existe diferenças significativas entre os grupos. Dados apresentados como Média \pm E.P. Teste estatístico: ANOVA de dois fatores para medidas repetidas.

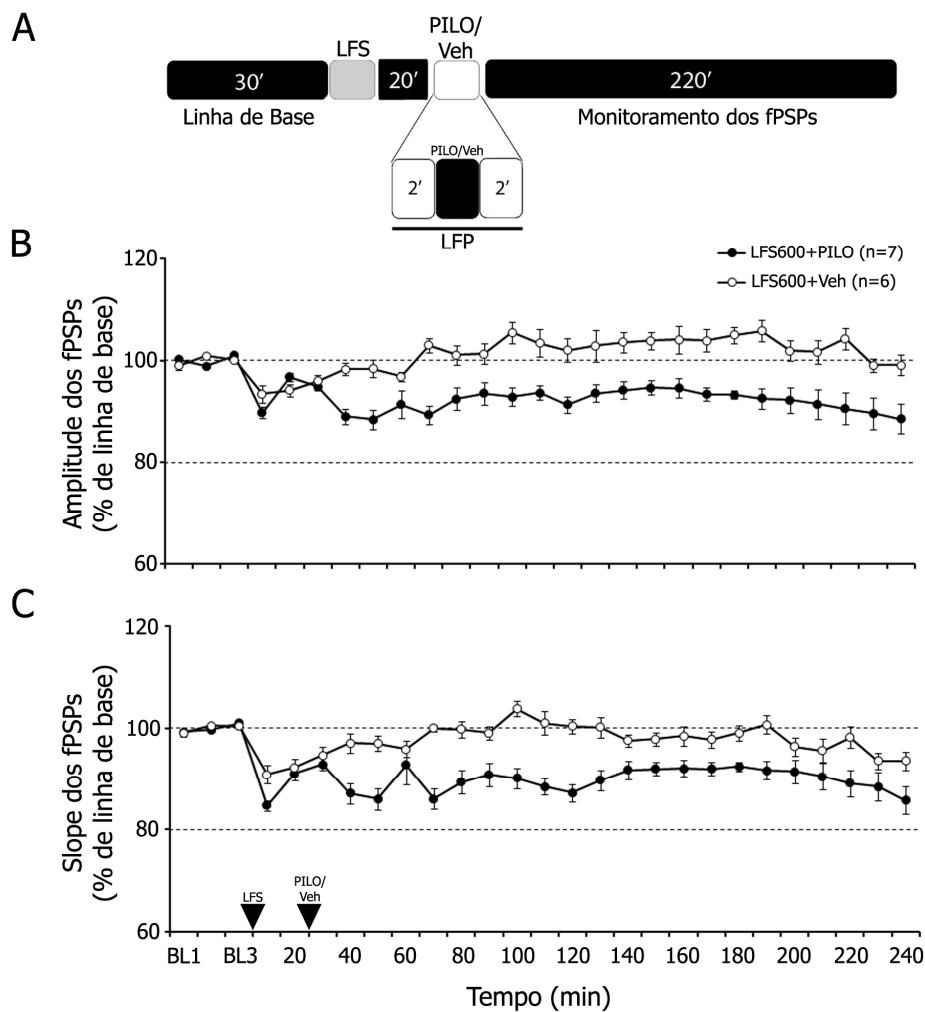


Figura 7. Efeitos da pós-ativação muscarínica sobre a LTD fraca na via CA1-mPFC. (A) Paradigma experimental. Respostas eletrofisiológicas medidas no mPFC (fEPSPs) foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após LFS600. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a micro-injeção i.c.v. recebido 20min após LFS600 (PILO 40nmoles em aCSF: grupo LFS600+PILO ou aCSF: grupo LFS600+Veh). Com o objetivo de checar os efeitos de PILO sobre os padrões oscilatórios de CA1 e mPFC foram registrados LFPs durante 2min antes e após micro-injeção. (B) Análise da amplitude dos fEPSPs mostra que PILO administrada após LFS600

não é capaz de alterar significativamente a LTD fraca na via CA1-mPFC. (C) Quantificação do Slope dos fPSPs reforça os achados descritos acima, mostrando que não existe diferenças significativas entre os grupos. Dados apresentados como Média \pm E.P. Teste estatístico: ANOVA de dois fatores para medidas repetidas.

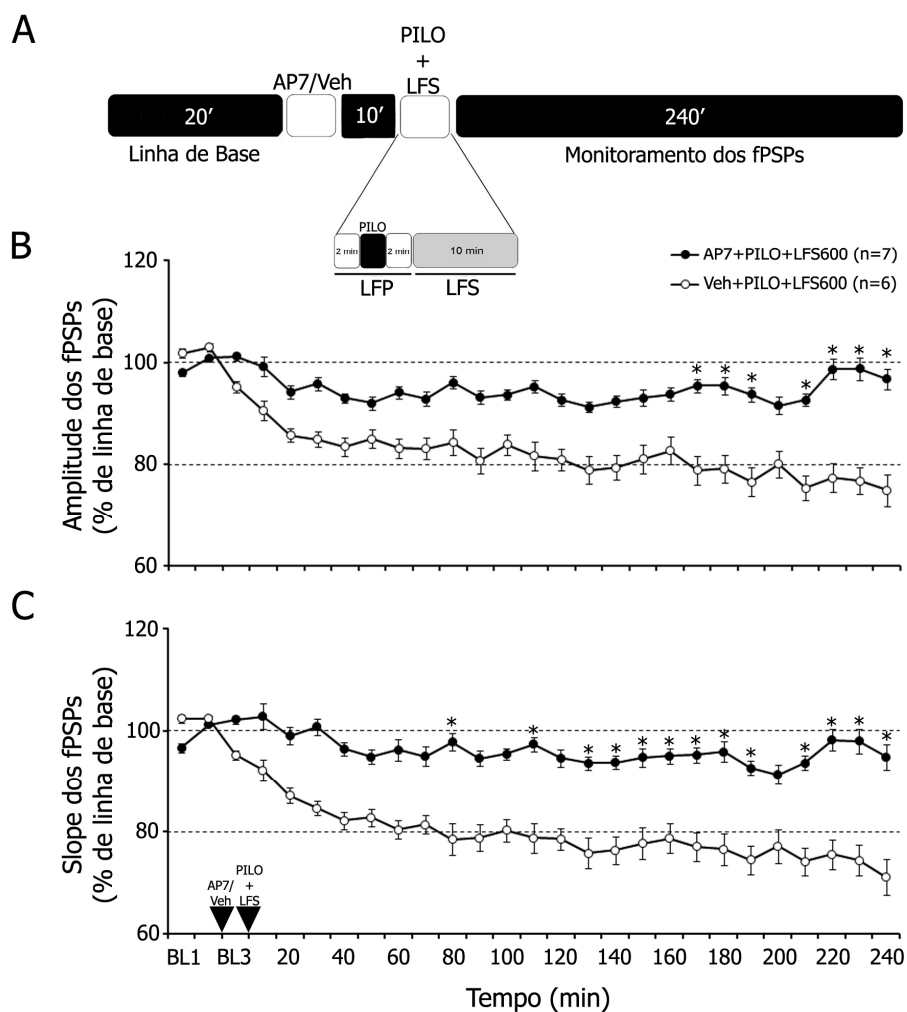


Figura 8. Efeitos do bloqueio de receptores do tipo NMDA sobre a facilitação muscarínica da LTD fraca na via CA1-mPFC. (A) Paradigma experimental. Respostas eletrofisiológicas medidas no mPFC (fPSPs) foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após protocolo de indução de LTD fraca (LFS600). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com micro-injeção intra-mPFC aos 20min (entre BL2 e BL3) de linha de base (AP7: grupo AP7+PILO+LFS600; ou NaCl 0,15M: grupo Veh+PILO+LFS600). Em seguida os animais foram submetidos a micro-injeção i.c.v. imediatamente antes de LFS600 (PILO 40nmoles em aCSF). Com o

objetivo de checar os efeitos de PILO sobre os padrões oscilatórios de CA1 e mPFC foram registrados LFPs durante 2min antes e após micro-injeção. (B) Análise da amplitude dos fPSPs mostra que administração de AP7 impede que ocorra o prolongamento da manutenção da LTD fraca gerada por PILO. (C) Quantificação do Slope dos fPSPs reforça os achados descritos acima, mostrando que AP7 é capaz de diminuir significativamente a manutenção da LTD em relação ao grupo controle que recebeu apenas Veh+PILO. Dados apresentados como Média \pm E.P. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de dois fatores para medidas repetidas seguida de Teste de Bonferroni como análise post hoc. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Veh+PILO+LFS600.

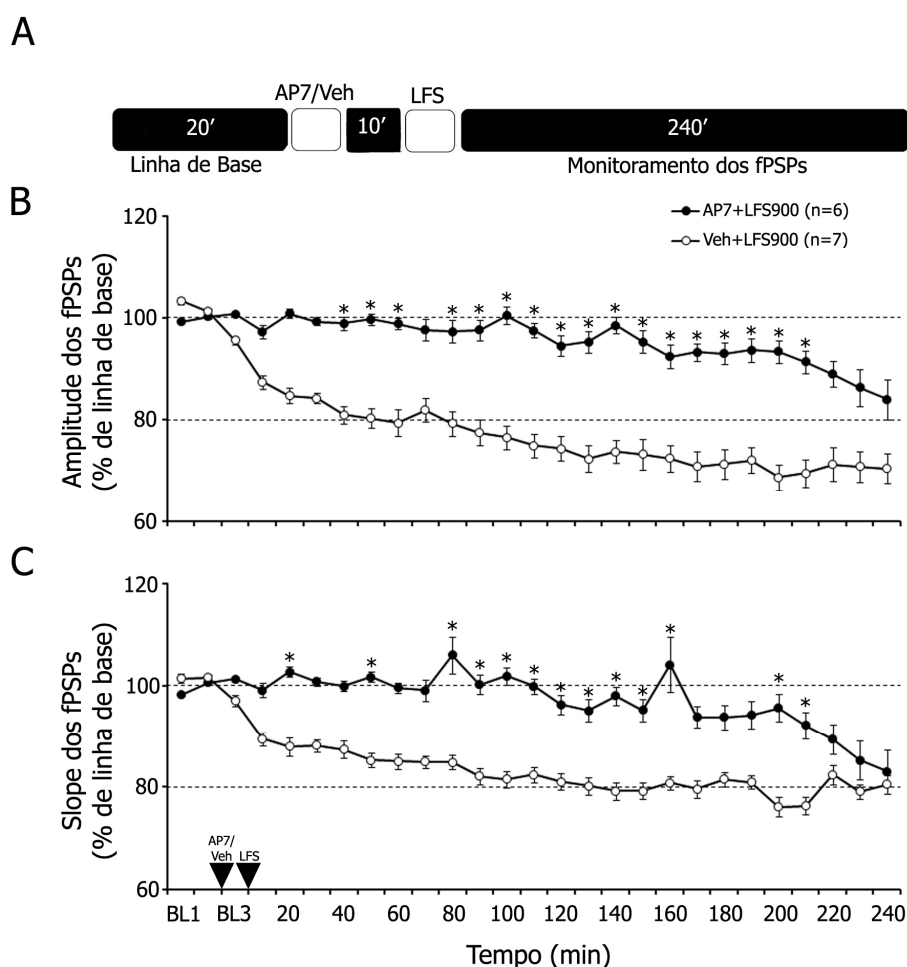


Figura 9. Efeitos do bloqueio de receptores do tipo NMDA sobre a LTD forte na via CA1-mPFC. (A) Paradigma experimental. Respostas eletrofisiológicas medidas no mPFC (fPSPs) foram registradas por 30min durante linha de base (BL1-BL3) e monitoradas por 240min adicionais após protocolo de indução de LTD forte (LFS900). Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com micro-injeção intra-mPFC aos 20min (entre BL2 e BL3) de linha de base (AP7: grupo AP7+LFS900; ou NaCl 0,15M: grupo

Veh+LFS900). (B) Análise da amplitude dos fPSPs mostra que administração de AP7 20min antes de LFS de 900 trens bloqueia indução de LTD forte. (C) Quantificação do Slope dos fPSPs reforça os achados descritos acima, mostrando que AP7 é capaz de diminuir significativamente a indução e manutenção da LTD em relação ao grupo controle tratado apenas com Veh. Dados apresentados como Média \pm E.P. Diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA de dois fatores para medidas repetidas seguida de Teste de Bonferroni como análise post hoc. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Veh+LFS900.

Com o objetivo de checar os efeitos de PILO nos padrões oscilatórios de CA1 e mPFC durante os experimentos de LTD foram registrados LFPs antes e após micro-injeção. Ondas lentas em delta (1-4Hz) foram dominantes nos tratados com Veh (ver figs. 7B, 7D e 8B; comparações intra-grupo: Veh+LFS, Veh, LFS+Veh; $p > 0,05$ nas bandas delta, teta, sigma e gama; Teste t pareado). Por outro lado, a micro-injeção de PILO gerou dessincronização característica dos LFPs com diminuição das oscilações em delta, e concomitante aumento das oscilações mais rápidas em teta, sigma e gama no mPFC e em CA1 (ver figs. 7A, 7C, 8A, 8C e 8D; comparações intra-grupo: PILO+LFS600, PILO, LFS600+PILO, AP7+PILO+LFS600 e Veh+PILO+LFS600; $p < 0,05$ nas bandas delta, teta, sigma e gama; Teste t pareado).

Ainda realizamos um experimento adicional com o objetivo de verificar por quanto tempo permanece a dessincronização dos LFPs promovida pela ação central da PILO. Neste, registramos continuamente as atividades oscilatórias por meio de registros de LFPs em CA1 e no mPFC antes e depois de injeções de PILO (icv) em três diferentes doses (Fig.9). Nossos resultados mostraram, tanto para CA1 quanto para o mPFC, uma queda na banda delta e concomitante aumento nas bandas teta, sigma e gama, após PILO icv. Estas alterações mostraram-se mais acentuadas quando era aumentada a dose de PILO (Fig. 9B; $F_{(2,15)} = 3,79$, $p < 0,05$; ANOVA simples de um

fator). A micro-injeção de 10nmoles de PILO (icv) gera uma dessincronização de $5,8 \pm 1,4$ min de duração com uma latência de $2,2 \pm 1,8$ min para início do efeito. PILO 20nmoles dessincroniza os LFPs durante $10,1 \pm 1,4$ min mantendo a mesma latência anterior para o início. Já PILO 40nmoles promove uma dessincronização que se sustenta por $14,8 \pm 3,2$ min com latência de $0,3 \pm 0,2$ min (Figs. 9A e 9B). Esses dados em conjunto, sugerem que a micro-injeção de PILO (40nmoles) utilizada nos experimentos de LTD foi capaz de atuar por tempo compatível com o protocolo de aplicação de LFS de 600 séries que dura 10min.

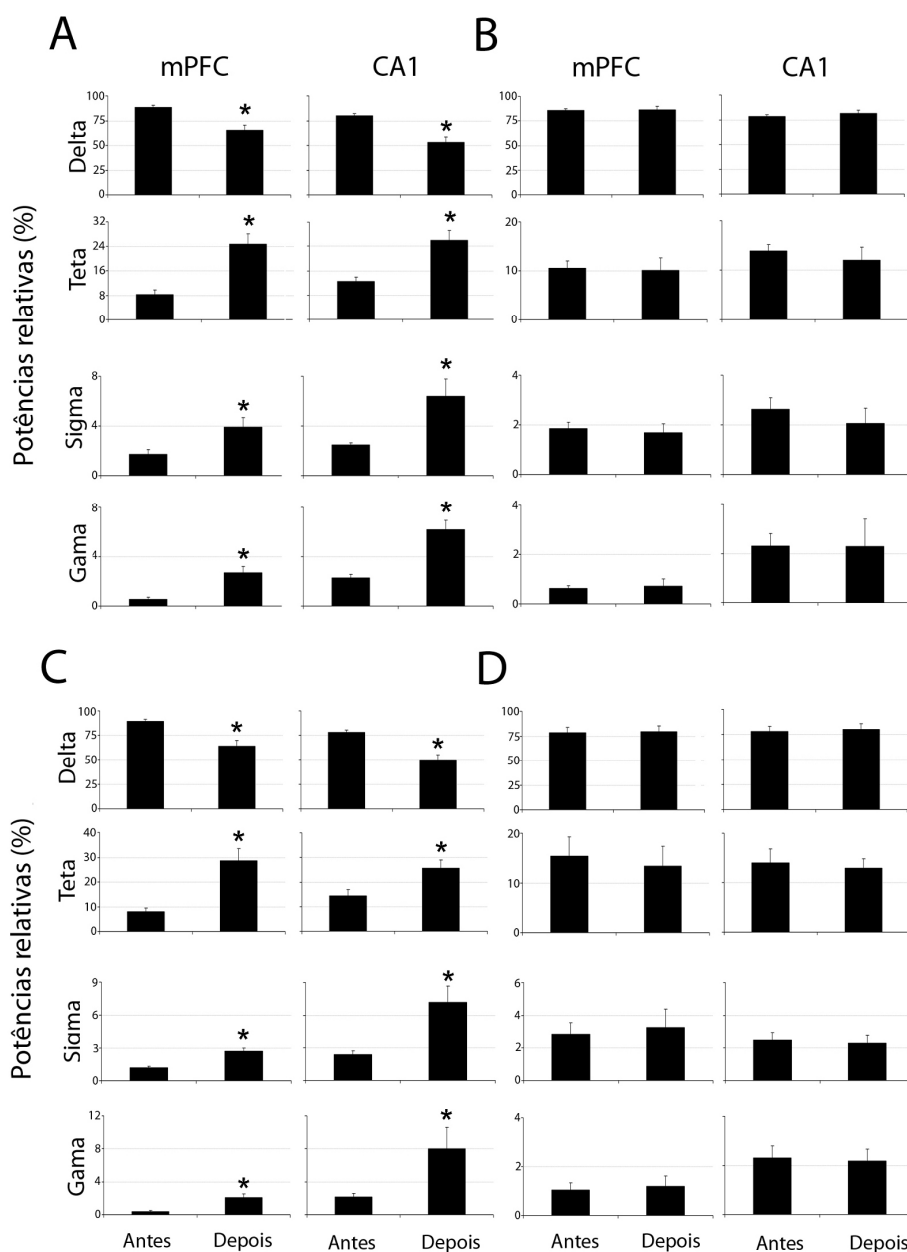


Figura 10. Verificação da atividade oscilatória durante e após micro-injeção i.c.v. nos experimentos de LTD na via CA1-mPFC. (A) grupo PILO+LFS600 apresentou efeito acentuado de dessincronização dos LFPs após PILO com queda significativa da potência em delta e aumento das potências em teta, sigma e gama. (B) grupo controle aCSF+LFS600 apresentou predominância de oscilações delta, não sofrendo alterações após micro-injeção. (C) grupo PILO também apresentou efeito acentuado de dessincronização dos LFPs após PILO com queda significativa da potência em delta e aumento das potências em teta, sigma e gama. (D) grupo controle aCSF apresentou predominância de oscilações delta, não sofrendo alterações após micro-injeção (* diferença significativa em relação à potência relativa de cada banda

antes da micro-injeção; Teste t pareado, $p \leq 0,05$). Dados apresentados como Média \pm EP. Delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 10 Hz), sigma (10 – 15 Hz) e gama (25 – 40 Hz).

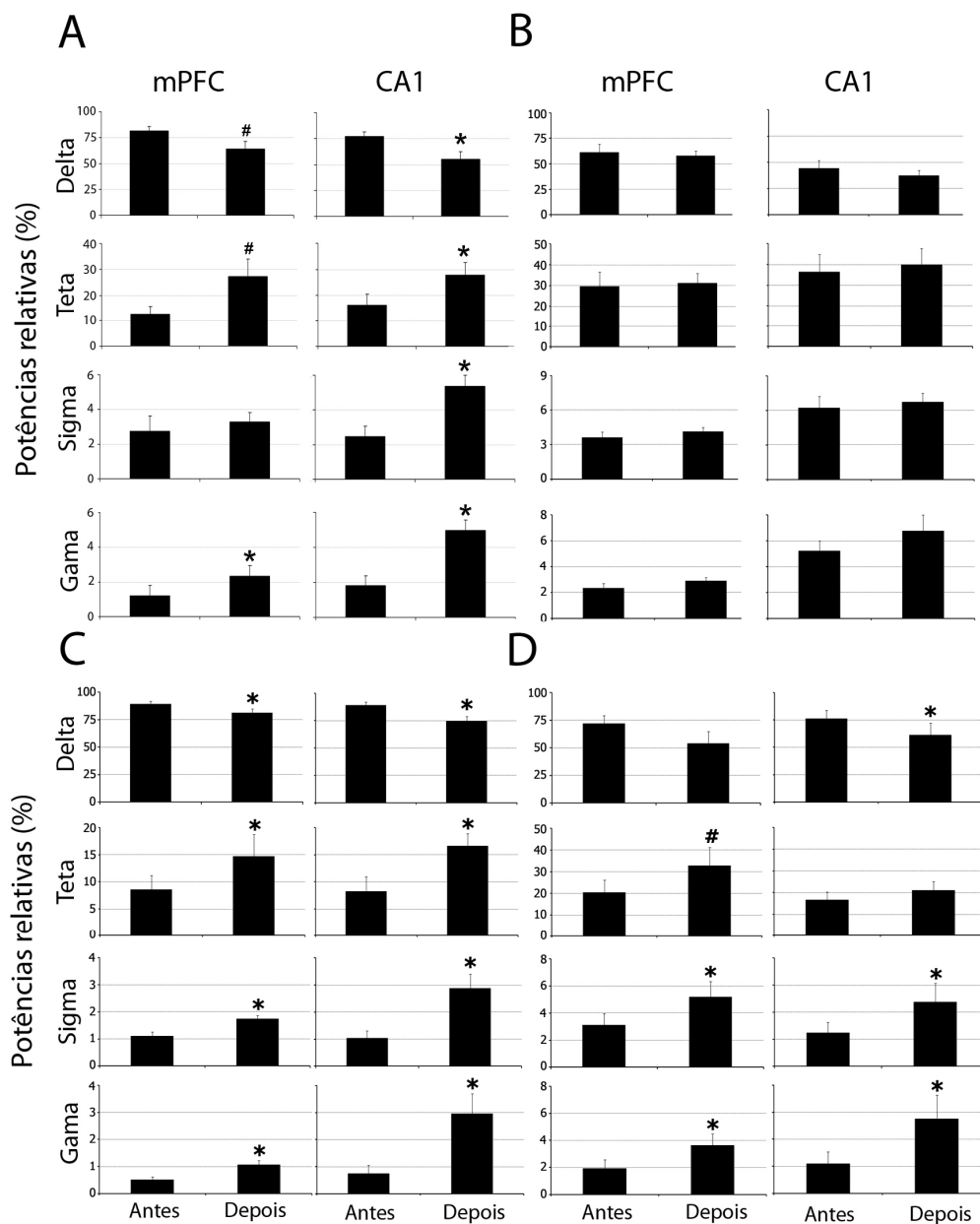


Figura 11. Verificação da atividade oscilatória durante e após micro-injeção i.c.v. nos experimentos de LTD na via CA1-mPFC. (A) grupo LFS600+PILO apresentou dessincronização dos LFPs após PILO com queda significativa da potência em delta e aumento das potências em teta, sigma e gama em CA1 e aumento de gama no mPFC. (B) grupo controle aCSF+LFS600 apresentou predominância de oscilações delta, não sofrendo alterações após micro-injeção. (C) grupo AP7+PILO+LFS600 também apresentou efeito acentuado de dessincronização dos LFPs após PILO com queda significativa da potência em delta e

aumento das potências em teta, sigma e gama. (D) grupo controle Veh+PILO+LFS600 também apresentou efeito acentuado de dessincronização dos LFPs após PILO com queda significativa da potência em delta e aumento das potências em teta, sigma e gama (* diferença significativa em relação à potência relativa de cada banda antes da micro-injeção: $p < 0,05$; # tendência à diferença entre grupos: $0,05 < p < 0,09$). Dados apresentados como Média \pm EP. Delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 10 Hz), sigma (10 – 15 Hz) e gama (25 – 40 Hz).

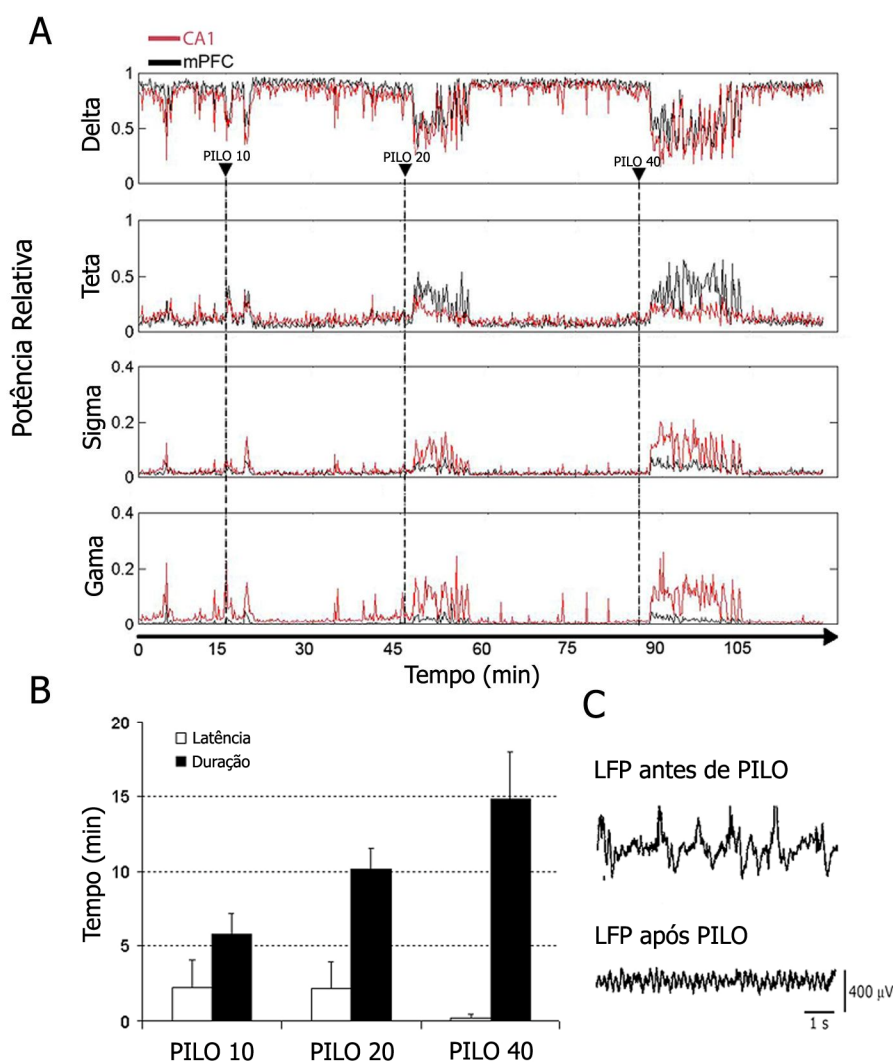


Figura 12. Análise dos efeitos de diferentes doses (10, 20 e 40nmols) de PILO i.c.v. nos padrões oscilatórios de CA1 e do mPFC. (A) Análise espectral de frequências em delta (0,5 – 4 Hz), teta (4 – 10 Hz), sigma (10 – 15 Hz) e gama (25 – 40 Hz) para CA1 e mPFC dos registros de LFPs de um sujeito representativo, mostrando os efeitos de doses crescentes de PILO icv nos seus padrões oscilatórios. (B) Duração e latência dos eventos de dessincronização dos LFPs em CA1 e no mPFC sob diferentes

doses de PILO (dados apresentados como Média±EP, diferenças entre diferentes doses obtida por meio de ANOVA de um fator). (C) Registros representativos de LFPs no mPFC de um rato, antes e após de micro-injeção de PILO, mostrando evento de dessincronização característico de ativação colinérgica central.

5. Discussão

Projeções colinérgicas ascendentes provindas de neurônios do prosencéfalo basal e do septo modulam a atividade de áreas neocorticais e límbicas, importantes para diversos processos cognitivos, atencionais e emocionais (Toumane, Durkin *et al.*, 1988; Gaykema, Gaal *et al.*, 1991; Levey, Kitt *et al.*, 1991; Van Der Zee e Luiten, 1999; Lucas-Meunier, Fossier *et al.*, 2003). Diversos estudos mostram que o sistema colinérgico central desempenha papel fundamental no aprendizado e consolidação de memória (Miyamoto, Kato *et al.*, 1987; Fibiger, 1991; Matsuoka, Maeda *et al.*, 1991; Herremans, Hijzen *et al.*, 1997). Além disso, sabe-se que o sistema colinérgico é capaz de modular LTP no hipocampo (Leung, Shen *et al.*, 2003; Shinoe, Matsui *et al.*, 2005) e córtex (Boyd, Trepel *et al.*, 2000; Anagnostaras, Murphy *et al.*, 2003). Apesar do grande número de estudos reportando o envolvimento da via CA1-mPFC em diversos tipos de comportamento, como aprendizagem e memória, transtornos psiquiátricos e epilepsia (Laroche, Jay *et al.*, 1990; Doyere, Burette *et al.*, 1993; Floresco, Seamans *et al.*, 1997; Izaki, Takita *et al.*, 2000; Laroche, Davis *et al.*, 2000; Aujla e Beninger, 2001; Diamond, Campbell *et al.*, 2004; Fossati, Radtchenko *et al.*, 2004; Romcy-Pereira e Pavlides, 2004; Jodo, Suzuki *et al.*, 2005; Ahmadi-Pajouh, Towhidkhah *et al.*, 2007; Izaki e Akema, 2008; Romcy-Pereira, Erraji-Benchekroun *et al.*, 2009), ainda pouco se sabe sobre como a plasticidade de suas sinapses é modulada por ativação de receptores colinérgicos.

Consistente com dados anatômicos, farmacológicos, comportamentais e eletrofisiológicos, demonstramos recentemente que a ativação colinérgica muscarínica é capaz de modular a LTP na via CA1-mPFC de ratos *in vivo* (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira et al., 2008). Nesse contexto, o presente trabalho fornece as primeiras evidências de que a ativação muscarínica também é capaz de modular a LTD na via CA1-mPFC. Observamos que administração central de PILO (40nmoles, i.c.v.) antes de aplicação de LFS de 600 trens facilita a LTD fraca (com duração de ~30min no grupo controle), prolongando a sua fase tardia por mais de 100min. Esse efeito é dependente de ativação de NMDARs no mPFC e está associado à rápida substituição de oscilações lentas (delta) por oscilações de frequências mais rápidas (teta, sigma e gama). Além disso, nossos dados indicam que: (1) as alterações observadas nos padrões oscilatórios no hipocampo e no mPFC após PILO, perduram durante todo o protocolo de LFS600 (no mínimo 10min); (2) a administração de PILO por si só ou 20min após LFS não é capaz de alterar a eficiência sináptica basal nem a LTD na via CA1-mPFC; e (3) LTD forte induzida por 900 trens também é dependente de ativação de NMDAR. Portanto, o presente trabalho sugere que: (1) a facilitação muscarínica da LTD na via CA1-mPFC ocorre em uma janela temporal limitada, mais especificamente durante o seu protocolo de indução; (2) É necessária a co-ativação de NMDARs e muscarínicos para que ocorra prolongamento da manutenção da LTD fraca; (3) LTD forte é dependente de ativação de NMDARs.

A modulação da LTD na via CA1-mPFC por ativação colinérgica muscarínica observada neste trabalho está de acordo com trabalhos anteriores que reportam os efeitos da facilitação da LTD no hipocampo ou córtex. Huerta e Lisman (1995) demonstraram que a atividade oscilatória em teta no hipocampo gerada por carbacol

(um agonista colinérgico) promove facilitação da conversão da LTP em LTD na via CA3-CA1 *in vitro*. Kirkwood *et al.* (1999) estudaram a modulação colinérgica em *slices* do córtex visual. Seus resultados indicaram que a ativação colinérgica gerada por carbacol facilita a indução de LTD, e que esta facilitação é dependente de ativação de receptores muscarínicos do tipo M1. Warburton *et al.*, (2003) demonstraram que bloqueio de receptores muscarínicos por administração de escopolamina impede indução de LTD, mas não de LTP, no córtex perirrinal *in vitro*.

Em conjunto com dados anteriores de nosso laboratório (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira *et al.*, 2008) o presente trabalho indica que a ativação muscarínica por PILO é capaz de facilitar tanto LTP quanto LTD na via CA1-mPFC. A facilitação desta bidirecionalidade da plasticidade sináptica no mPFC, sob ativação colinérgica muscarínica, está de acordo com a dinâmica de integração, manipulação, armazenamento de informações e planejamento de ações prospectivas que ocorrem durante tarefas de memória de trabalho (Goldman-Rakic, 1995b; Laroche, Davis *et al.*, 2000; Izaki, Maruki *et al.*, 2001; Martin e Morris, 2002; Hasselmo, 2005; Massey e Bashir, 2007; Izaki e Akema, 2008; Izaki, Takita *et al.*, 2008; Yoon, Okada *et al.*, 2008). Consistente com essa idéia, estudos anteriores demonstram que: (1) o bloqueio de receptores muscarínicos por infusão de escopolamina no mPFC prejudica o desempenho do processamento de memórias de curto prazo ou de trabalho (Dunnett, Wareham *et al.*, 1990; Broersen, Heinsbroek *et al.*, 1995; Granon, Poucet *et al.*, 1995; Ragozzino e Kesner, 1998); (2) existe um aumento da liberação de ACh no PFC durante ou após tarefas de memória de trabalho (Giovannini, Bartolini *et al.*, 1998; Hironaka, Tanaka *et al.*, 2001); e (3) alterações oscilatórias do hipocampo ou do mPFC, semelhantes às observadas no presente trabalho, também ocorrem em roedores

submetidos a tarefas de memória de trabalho, com aumento das potências relativas em teta e gama e decréscimo de delta (Bragin, Jando *et al.*, 1995; Hyman, Zilli *et al.*, 2005).

5.1. Possíveis mecanismos envolvidos

Os efeitos significativos da ativação muscarínica sobre a plasticidade sináptica na via CA1-mPFC obtidos por estudo prévio de nosso laboratório (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira *et al.*, 2008) e pelo presente trabalho encontram suporte em uma diversidade de dados mostrando que a atividade colinérgica promove alterações significativas nos padrões de disparos de neurônios piramidais corticais em mamíferos (McCormick e Prince, 1985; 1986; Carr e Surmeier, 2007; Giocomo e Hasselmo, 2007; Gullledge e Kawaguchi, 2007). Por esse motivo, diversos tipos de plasticidade sináptica no neocórtex, hipocampo, amígdala entre outras regiões encefálicas são modulados pela atividade colinérgica (Rasmusson, 2000). Em particular, os receptores muscarínicos são responsáveis por mediar os efeitos prolongados da ACh sobre a despolarização e taxa de disparos de neurônios piramidais (McCormick e Prince, 1986). Basicamente, receptores muscarínicos pós-sinápticos (M1, M3 e M5) inibem canais de K^+ e promovem aumento de Ca^{2+} intracelular, prolongando a despolarização neuronal e ativando cascatas de sinalização intracelulares (Van Koppen e Kaiser, 2003). Já os pré-sinápticos, podem funcionar como autoreceptores ou heteroreceptores, regulando a probabilidade de liberação de ACh ou de L-glutamato (Marchi, Bocchieri *et al.*, 1989). Esta inibição é mediada por proteína G_i capaz de inibir a atividade da adenilato ciclase (Lucas-Meunier, Fossier *et al.*, 2003). Consistente com essas informações, Carr e Surmeier (2007) mostraram que a estimulação de receptores M1 gera uma forte despolarização dos neurônios do mPFC, levando-os a disparar tonicamente. Adicionalmente, os autores observaram que a ativação de M1 leva a significativa diminuição nas correntes

de canais de K^+ constituídos pelas subunidades Kir2, resultando em um proeminente aumento na somação dos potenciais excitatórios pós-sinápticos do mPFC. Esse efeito foi complementado pela ativação de receptores M2 e M4 responsáveis por promover a inibição dos terminais pré-sinápticos do mPFC. Como consequência dessa modulação dual, as respostas pós-sinápticas para um único pulso apresentaram-se reduzidas, ao passo que as respostas à estimulação de alta frequência das aferências por meio de salvas (*bursts*) foram potencializadas, sugerindo facilitação da plasticidade sináptica no mPFC (Carr e Surmeier, 2007).

Para entendermos de que forma a modulação muscarínica da atividade dos neurônios do mPFC é capaz de modular a LTD na via CA1-mPFC, é necessário uma análise (e posterior verificação experimental) de qual tipo de plasticidade sináptica estamos estudando. A princípio nossos dados apontam para mecanismos que recrutem ativação de NMDARs (ver figs. 5 e 6), embora outras possibilidades não sejam mutuamente excludentes, como veremos a seguir.

Tradicionalmente, a LTP e a LTD compartilham algumas características importantes como: (1) dependência de ativação de NMDARs, (2) manutenção dependente de síntese de novas proteínas (Citri e Malenka, 2007) e (3) curso temporal equivalente a processos mnemônicos (Takita, Izaki *et al.*, 1999). Adicionalmente, também podem ser induzidas em diversas outras regiões do cérebro de roedores, como amígdala, cerebelo, córtex perirrinal e mPFC (Takita, Izaki *et al.*, 1999; Malenka e Bear, 2004; Massey e Bashir, 2007). Contudo, LTP e LTD diferem substancialmente quanto às suas cascatas de sinalização intracelulares (Citri e Malenka, 2007). Embora ambos os processos dependam da presença de Ca^{2+} intracelular, esses fenômenos diferem quanto à sua quantidade. Ou seja, a LTP está associada a grandes influxos deste

ção enquanto que a LTD ocorre em níveis mais moderados (Nakano, Yamada *et al.*, 2004). Assim, altas concentrações de Ca^{2+} intracelular ativam preferencialmente uma maior quantidade de proteínas cinases, que possuem o papel de fosforilar outros substratos importantes para a expressão da LTP. Em contrapartida, pequenas concentrações de Ca^{2+} mobilizam, preferencialmente, proteínas fosfatases, que possuem a função de desfosforilar substratos importantes para a expressão da LTD.

Estudos *in vitro* da plasticidade sináptica do hipocampo são mais abundantes e têm fornecido informações consistentes sobre os mecanismos básicos da indução e manutenção da LTD (Bear e Abraham, 1996; Massey e Bashir, 2007). A expressão da LTD hipocampal é dependente de ativação de NMDARs e envolve fosforilação da cauda C-terminal de Ser845 das subunidades GluR1 que compõem os receptores AMPA. Essa fosforilação diminui a probabilidade de abertura do canal iônico, levando a queda da eficiência da transmissão sináptica dependente de AMPA. Adicionalmente, a expressão da LTD envolve fosforilação das subunidades GluR2, que, por sua vez, ativam mecanismos de internalização de receptores AMPA presentes na membrana do terminal pós-sináptico. Particularmente, as atividades de duas fosfatases (calcineurina e PP1) são especialmente importantes para o desencadeamento dos mecanismos de internalização de receptores AMPA. Além disso, a desfosforilação de proteínas cinases, como PKA e proteína cinase C (PKC), também parece estar relacionadas à expressão da LTD hipocampal (Mulkey, Endo *et al.*, 1994; Malenka, 2003; Malenka e Bear, 2004; Citri e Malenka, 2007). Contudo, um estudo recente, demonstrou que, dentre as proteínas cinases, apenas a GSK-3 parece possuir função essencial na expressão da LTD dependente de NMDAR na via CA3-CA1 (Peineau, Nicolas *et al.*, 2009). Os mecanismos subjacentes à manutenção da LTD ainda não estão muito claros, embora

tenha sido demonstrado que ocorra síntese de proteínas e atrofia das espinhas dendríticas decorrente da diminuição dos receptores AMPA disponíveis na membrana (Zhou, Homma *et al.*, 2004). A LTD dependente de NMDAR também é observada em diversas regiões do neocórtex, e.g. córtex visual (V1) e somatossaserial primários (S1) (Feldman, Nicoll *et al.*, 1998; Crozier, Wang *et al.*, 2007), cíngulo anterior, córtex entorrinal e perirrinal (Dodt, Eder *et al.*, 1999; Deng e Lei, 2007; Toyoda, Wu *et al.*, 2007; Griffiths, Scott *et al.*, 2008). Contudo, ainda não está claro se a LTD dependente de NMDAR observada no neocórtex compartilha dos mesmos mecanismos intracelulares da LTD no hipocampo.

Como mencionado anteriormente, a LTD ainda pode ser induzida ou modulada por mecanismos independentes de NMDAR. Várias formas de LTD mGluR têm sido demonstradas, embora o exemplo mais conhecido seja a LTD das sinapses que conectam as fibras paralelas às células de Purkinje no cerebelo, denominada LTD cerebelar (Ito, 1986; 2001; Malenka e Bear, 2004). Sob condições experimentais apropriadas, a LTD pode ser induzida na via CA3-CA1 por ativação de mGluR, independente de ativação de NMDAR (Huber, Roder *et al.*, 2001). No neocórtex destacam-se os estudos da plasticidade sináptica no córtex visual (CV). Estudos com roedores em livre-movimento demonstraram que a eficácia sináptica do CV é alterada espontaneamente de acordo com: (1) ciclo sono-vigília, (2) nível de atenção dirigida; e (3) experiência visual prévia (Kirkwood e Bear, 1995; Kirkwood, Rioult *et al.*, 1996; Tsanov e Manahan-Vaughan, 2008). De uma maneira geral a plasticidade sináptica nesse córtex é regulada pela atividade do receptor mGluR5, embora, dependendo da camada cortical estudada, a LTD possa ser dependente ou independente de NMDAR (Tsanov e Manahan-Vaughan, 2008). Na maioria dos casos, a LTD dependente de

mGluR também necessita de aumento discreto de Ca^{2+} intracelular, ativação de maquinarias para remoção de AMPA da membrana pós-sináptica e síntese de proteína. A principal diferença é o possível papel de mensageiros retrógrados produzidos pelo terminal pós-sináptico em resposta a ativação de mGluR. Este mensageiro retrógrado, e.g. metabólitos do ácido araquidônico, atua no terminal pré-sináptico, diminuindo a probabilidade de liberação de L-glutamato e, conseqüentemente, deprimindo os fPSPs (Zakharenko, Zablow *et al.*, 2002; Feinmark, Begum *et al.*, 2003; Nosyreva e Huber, 2005; Anwyl, 2006).

Uma terceira forma de LTD envolve os receptores endocanabinóides do tipo 1 (CB1) (Chevaleyre e Castillo, 2004). Na LTD-CB1 o aumento de Ca^{2+} intracelular, decorrente de ativação de receptores mGluR, muscarínicos tipo M1 etc., promovem síntese de endocanabinóides. Estes são capazes de atuar como mensageiros retrógrados nos receptores CB1 pré-sinápticos, diminuindo a probabilidade de liberação de neurotransmissores, como L-glutamato (Chevaleyre, Heifets *et al.*, 2007). A LTD-CB1 foi observada em várias sinapses excitatórias neocorticais e parece ser independente de NMDARs pós-sinápticos, embora existam evidências de que estes possam facilitá-la no hipocampo (Ohno-Shosaku, Hashimotodani *et al.*, 2007). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que a LTD-CB1 pareça depender de NMDARs pré-sinápticos, presentes especificamente em neurônios neocorticais (Sjostrom, Turrigiano *et al.*, 2003; Bender, Bender *et al.*, 2006; Nevian e Sakmann, 2006; Crozier, Wang *et al.*, 2007; Lafourcade, Elezgarai *et al.*, 2007).

Por último, é relevante destacar a LTD induzida por ativação muscarínica ou LTDm. Este tipo de plasticidade sináptica é independente de NMDARs, não envolve estimulação elétrica e é quimicamente induzida no hipocampo e neocórtex por

administração de agonista muscarínico não-seletivo denominado carbacol (Auerbach e Segal, 1996; Mccoy e McMahon, 2007). Além disso, foi demonstrado recentemente que a expressão de LTDm requer: (1) ativação de receptores mucarínicos M1, (2) ativação de proteína G_q , (3) produção de fosfolipase C (PLC), (4) fosforilação de PKC, (5) liberação de Ca^{2+} por meio de abertura dos canais de Ca^{2+} sensíveis a IP3 presentes nos reservatórios intracelulares do retículo endoplasmático, (6) ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e (7) subsequente difusão de óxido nítrico (NO) para os terminais pré-sinápticos (Huang e Hsu, 2009). Em outro estudo, Wang e Yuan (2009) estudaram os mecanismos da LTD induzida por carbacol no hipocampo, mPFC e na via CA1-mPFC em um novo tipo de preparação *in vitro* capaz de conservar as fibras que conectam essas duas regiões. Os autores mostraram que em circuitarias locais, ou seja, especificamente no hipocampo ou no mPFC a administração de carbacol gera LTD transiente, com duração de aproximadamente 30min. Entretanto, os efeitos do carbacol na via CA1-mPFC se estendem por mais de 1h após sua administração, caracterizando uma fase tardia da LTD muscarínica ainda não descrita anteriormente (Wang e Yuan, 2009). Resumidamente, os autores mostraram que a depressão imediata nos fPSPs decorrente de administração de carbacol são mediados por múltiplos subtipos de receptores muscarínicos, incluindo, os M1, M2 e M4. Contudo, apenas a aplicação de antagonista seletivo para M2 (AF-DX 116) foi capaz de bloquear completamente a fase tardia da LTD muscarínica na via CA1-mPFC. Esses dados, em conjunto, sugerem que estejam envolvidos mecanismos pós (mediados por M1) e pré-sinápticos (mediados por M2) na LTD muscarínica na via CA1-mPFC (Wang e Yuan, 2009). Embora ainda não esteja claro o papel dos receptores M2, especula-se que estes sejam capazes de gerar diminuição sustentada da probabilidade de liberação de L-glutamato em projeções excitatórias (Marchi, Bocchieri *et al.*, 1989).

Retomando nossos dados nesse contexto, é relevante destacarmos que os fPSPs basais na via CA1-mPFC não foram afetados por microinjeção i.c.v. de PILO 40nmoles, embora os LFPs no hipocampo e mPFC tenham sofrido alterações significativas em seus padrões oscilatórios por cerca de 10min (figs. 7, 8 e 9). Essa dessincronização dos LFPs, característica de ativação colinérgica muscarínica (Tejada, Gonzalez *et al.*, 2009), pôde ser verificada por aumento das oscilações rápidas (teta, sigma e gama; 4 a 40Hz) e diminuição de oscilações lentas (delta; 0,5 a 4Hz). Dessa forma, sugerimos que, na dose de PILO utilizada e nas condições experimentais descritas, o fenômeno de plasticidade sináptica observado na via CA1-mPFC não poderia ser explicado apenas por ativação de receptores muscarínicos, como observado na LTDm induzida por carbacol. Outra questão relevante para o entendimento dos mecanismos subjacentes aos dados obtidos é que a ordem da administração de PILO em relação à aplicação de LFS é importante para a modulação da expressão da LTD na via CA1-mPFC. Como destacado, a administração de PILO imediatamente antes de LFS600 é capaz de facilitar a LTD. No entanto, quando aplicada na mesma dose, 20min após LFS600, não surte nenhum efeito (fig. 4). Vale lembrar que PILO (na dose escolhida) é capaz de proporcionar evento de dessincronização dos LFPs no hipocampo e mPFC por cerca de 10min (fig.9), tempo equivalente ao protocolo de LFS600. Por último, demonstramos que a facilitação da LTD por pré-ativação muscarínica (PILO) depende de ativação de NMDARs no mPFC. E que a mesma dose de AP7 utilizada é capaz de bloquear também a LTD forte gerada por protocolo de LFS900 (figs. 5 e 6).

Portanto, nossos dados podem ser explicados por duas linhas distintas, porém não mutuamente excludentes. A primeira hipótese assume que os NMDARs, necessários para a expressão de LTD forte, bem como, para facilitação muscarínica da

LTD fraca, são pós-sinápticos. Nesse caso, o mecanismo básico envolve aumento modesto de influxo de Ca^{2+} no terminal pós-sináptico por meio de ativação de NMDARs pós-sinápticos durante protocolos de indução de LTD. No caso do protocolo de LFS900, a ativação de NMDARs é suficiente para gerar LTD por mais de 150min (fig. 6). Já no caso do protocolo de LFS600, a LTD dura cerca de 30min, ou seja, não apresenta fase tardia (fig.2). Entretanto, quando PILO é administrada antes de LFS600, ocorre manutenção da LTD por mais de 100min. Portanto, os efeitos da pré-ativação muscarínica sobre a LTD na via CA1-mPFC se dão em mecanismos responsáveis pela manutenção ou fase tardia da LTD. Assim, sugerimos que o aumento de Ca^{2+} intracelular que segue a ativação de receptores do tipo M1 (como vimos anteriormente) promove despolarização sustentada dos terminais pós-sinápticos. Concomitantemente, o protocolo de LFS600 ativa NMDARs pós-sinápticos, gerando influxo modesto de Ca^{2+} intracelular que, somado aos íons Ca^{2+} liberados durante ativação de receptores M1, torna-se suficiente para mobilizar fosfatases capazes de ativar a maquinaria de endocitose de receptores AMPA presentes na membrana. Essa hipótese também poderia explicar o fato da PILO também ser capaz de facilitar a fase tardia da LTP na via CA1-mPFC (Lopes Aguiar *et al*, 2008), já que, possivelmente, o Ca^{2+} também ative cascatas de sinalização intracelulares responsáveis pela manutenção da LTP. Portanto, a bidirecionalidade conferida por ativação muscarínica na via CA1-mPFC poderia ser explicada pelo fato dos dois mecanismos (LTD e LTP) serem mediados pelo mesmo segundo mensageiro (Ca^{2+}).

A segunda hipótese assume que NMDARs pré-sinápticos participam, pelo menos em parte, da expressão de LTD forte e da facilitação muscarínica de LTD fraca. Nesse caso, os NMDARs pré-sinápticos funcionariam como autoreceptores, diminuindo

a probabilidade de liberação de glutamato. A LTD dependente de NMDAR pré-sináptico também está relacionada a: (1) aumento nos níveis de Ca^{2+} intracelular (poderia ser explicado pela ativação de M1 por PILO); (2) ativação de receptores mGluR; (3) síntese de mensageiros retrógrados endocanabinóides; (4) ativação de receptores CB1 no terminal pré-sináptico. Todos esses possíveis passos do mecanismo de LTD dependente de NMDAR pré-sináptico ainda precisam ser testados. Um ponto contraditório em relação a essa hipótese é que o protocolo para a indução de LTD nesse caso é diferente do que utilizamos no presente trabalho. Enquanto utilizamos LFS com 600 ou 900 trens de 5 pulsos a 250Hz a cada 1s (1Hz), o protocolo utilizado para indução de LTD dependente de NMDAR pré-sináptico envolve estimulação pareada dos terminais pré e pós-sináptico em um tempo específico coincidente com a velocidade de neurotransmissão da via estudada. Este protocolo é conhecido como STD-LTD, do inglês, *spiking timing-dependent long-term depression*.

Ainda existe a possibilidade da participação de receptores pré-sinápticos M2 e M4 na modulação da liberação de ACh e glutamato durante e após aplicação de LFS600, a atuação de mensageiros retrógrados produzidos durante aumento de Ca^{2+} intracelular por co-ativação de receptores muscarínicos e NMDA (Ohno-Shosaku, Hashimotodani *et al.*, 2007; Huang e Hsu, 2009) e a participação de outros sistemas de neurotransmissão que porventura tenham sido ativados pela injeção i.c.v. de PILO. Recentemente demonstramos que PILO i.p. é capaz de aumentar a disponibilidade de dopamina especificamente no mPFC (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira *et al.*, 2008). Esse dado é relevante pelo fato de ser bem descrita a modulação do sistema dopaminérgico sobre a LTP na via CA1-mPFC, especialmente mediada pelos receptores D1 no mPFC (Gurden, Tassin *et al.*, 1999; Gurden, Takita *et al.*, 2000; Jay, 2003). Nesse sentido,

estudos mais recentes demonstraram que: (1) aplicação de dopamina no mPFC *in vitro* facilita indução de LTD dependente de mGluR e independente de NMDARs no mPFC (Otani, Daniel *et al.*, 2003) e (2) ativação de receptores D1 potencializa o aumento intracelular de Ca^{2+} mediado por NMDARs no mPFC (Kruse, Premont *et al.*, 2009).

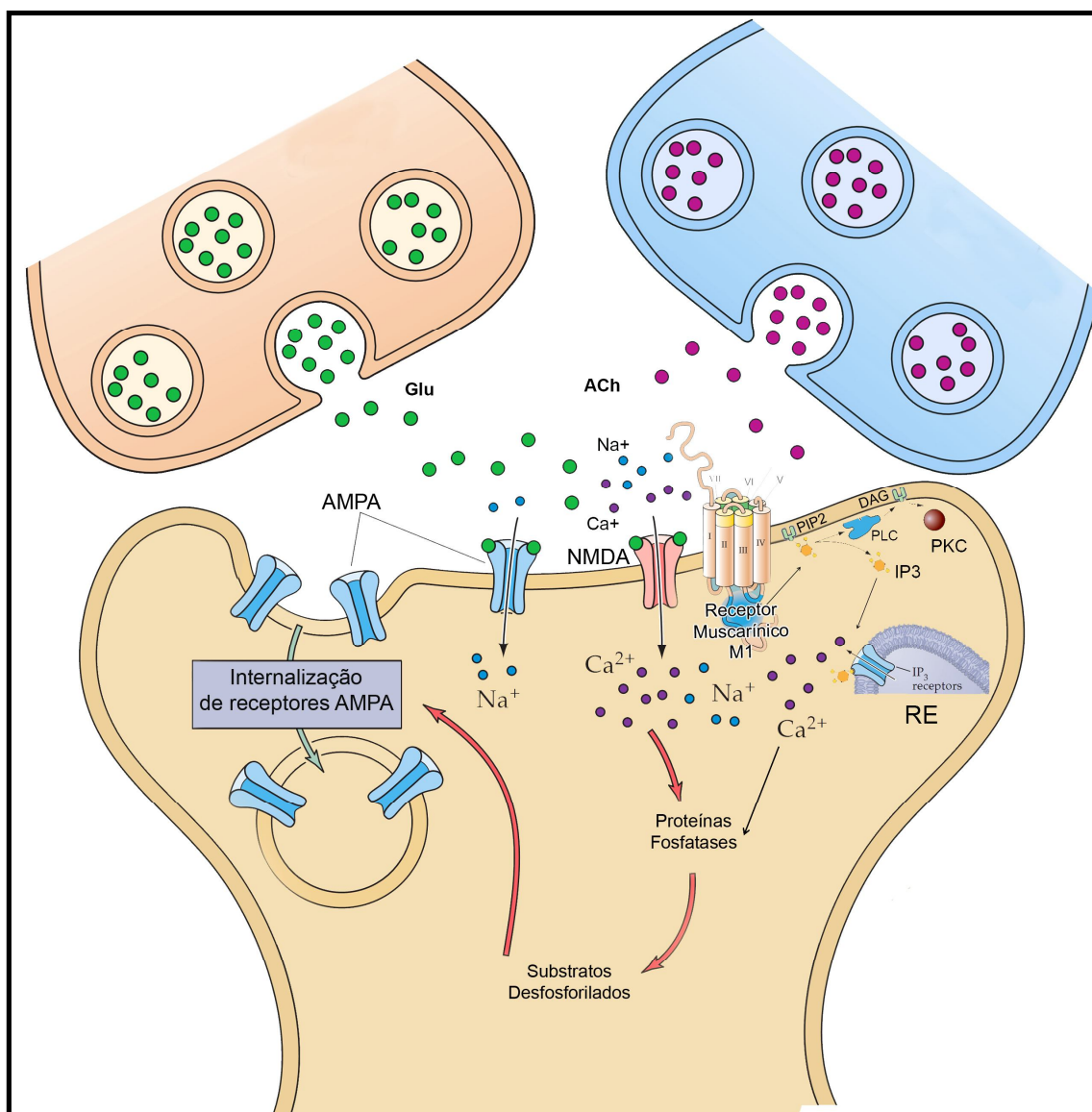


Figura 13. Possível mecanismo pelo qual a ativação colinérgica poderia facilitar a plasticidade sináptica cortical dependente de NMDA (Gu, 2003). Receptores do tipo-M1 são encontrados principalmente no telencéfalo, particularmente no córtex, hipocampo e estriado (Van Der Zee e Luiten, 1999). Eles são os únicos presentes em todas as camadas do córtex (Levey, Kitt *et al.*, 1991) e são os mais abundantes no prosencéfalo e no hipocampo (Levey, Kitt *et al.*, 1991; Wei, Walton *et al.*, 1994). Além disso, estão co-localizados com NMDARs (Marino, Rouse *et al.*, 1998). Quando ativados por ACh ou agonista

muscarínico, as subunidades da proteína G_q , acopladas a eles, mudam de conformação, liberando a fosfolipase C (PLC). Essa, por sua vez, aumenta os níveis citosólicos de diacilglicerol (DAG) e de inositol tri-fosfato (IP3). O IP3 é liberado no citoplasma onde, eventualmente, liga-se a receptores no retículo endoplasmático (RE), promovendo a abertura de canais de Ca^{2+} (Nathanson, 2000). Esse efeito sinérgico entre NMDARs e receptores muscarínicos tipo-M1 poderia promover, em última análise, uma maior ativação da maquinaria intracelular responsável pela endocitose de receptores AMPA na espinhas dendríticas do mPFC, promovendo um prolongamento da manutenção da LTD na via CA1-mPFC. Figura adaptada de Gu (2003).

5.2. Implicações para estudos de memória de trabalho

A idéia de que a LTD é apenas um fenômeno subjacente aos mecanismos de anticonsolidação ou esquecimento de memórias, ou ainda, apenas um fenômeno artificialmente gerado por padrões exógenos de estimulação elétrica, têm sido combatida. Dados recentes têm demonstrado que a LTD também pode ser um modelo útil para explicar a aquisição e retenção de memórias (Warburton, Koder *et al.*, 2003; Kemp e Manahan-Vaughan, 2007; Massey e Bashir, 2007; Griffiths, Scott *et al.*, 2008).

Ainda é pouco conhecida a relação entre LTD na via CA1-mPFC e o processamento de memória. Contudo, diversos estudos de LTD em outras vias neocorticais e no hipocampo, reforçam a idéia de que este seja um mecanismo importante no processamento de aprendizagem e memória (Massey e Bashir, 2007). No hipocampo, postula-se que LTP e LTD participem na formação de um mapa espacial coerente. Novos ambientes costumam facilitar LTP, enquanto novas pistas em um ambiente já conhecido favorecem a LTD (Kemp e Manahan-Vaughan, 2007). No córtex, Warburton *et al.* (2003) demonstraram que bloqueio de receptores muscarínicos por administração de escopolamina impede indução de LTD, mas não de LTP, no córtex perirrinal *in vitro*. Este efeito mostrou-se associado ao prejuízo na retenção de memória

de reconhecimento de objetos, sugerindo que a LTD no córtex entorrinal pode estar subjacente a este comportamento. Consistente com esses dados, outro estudo recente mostrou que a LTD no córtex perirrinal está subjacente a memória de reconhecimento visual (Griffiths, Scott *et al.*, 2008).

Burette *et al* (2000) forneceram evidências diretas de que a LTD na via CA1-mPFC poderia estar relacionada com o processamento de memória. Os autores submeteram ratos a implante de eletrodos de estímulo em CA1 e de registro no mPFC. Após a recuperação cirúrgica, os animais foram submetidos à tarefa de local não coincidente com retardo (DNMTP, do inglês, *delayed non-matching to place*) em labirinto radial de 8 braços. Este experimento consiste em duas fases: Na fase 1 os animais entram livremente em 4 dos 8 braços contendo comida. Na fase 2, após um intervalo da ordem de minutos (dependendo do grupo), os ratos devem entrar nos 4 braços não visitados durante a fase 1. fPSPs na via CA1-mPFC foram registrados durante o intervalo entre-fases e após a tarefa. Seus resultados mostraram uma diminuição significativa da amplitude dos fPSPs na via CA1-mPFC durante o intervalo entre fases. Foi observada ainda, uma correlação entre essa depressão sináptica após o teste e o aumento do desempenho dos animais na tarefa ao longo do tempo (Burette, Jay *et al.*, 2000).

Outros estudos forneceram evidências indiretas sobre o envolvimento da LTD no mPFC. Runyan *et al* (2005), bloqueou seletivamente diversas proteínas intracelulares sensíveis cálcio (Ca^{2+}) no mPFC de ratos antes de testá-los em tarefa de memória de trabalho. Em suma, seus resultados indicaram que o bloqueio da proteína fosfatase, calcineurina, é capaz de prejudicar o desempenho de memória de trabalho, enquanto que o bloqueio de proteína cinase do tipo-II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) e

PKC exerce o efeito oposto (Runyan, Moore *et al.*, 2005). Considerando que a atividade de fosfatases, especialmente calcineurina, é necessária para a indução de LTD cortical e hipocampal (Torii, Kamishita *et al.*, 1995; Citri e Malenka, 2007; Kourrich, Glasgow *et al.*, 2008), é possível que alterações sinápticas semelhantes à LTD participem do processamento de memória de trabalho. Consistente com esses dados foi demonstrado que camundongos mutantes deficientes na expressão de calcineurina no prosencéfalo apresentam um prejuízo severo e específico de memória de trabalho em tarefas de local coincidente com retardo (DMTP) em labirinto aquático de Morris e radial de 8 braços (Zeng, Chattarji *et al.*, 2001).

Segundo Laroche *et al* (2000), a LTD poderia ser interpretada como uma diminuição da influência do hipocampo sobre os neurônios do mPFC. Assim, durante uma tarefa de memória de trabalho, esses neurônios teriam mais capacidade de manipular e/ou manter informações para futura execução de uma saída motora. Outra interpretação seria a de que os registros de campo dos potenciais pós-sinápticos não seriam sensíveis o suficiente para detectar possíveis subgrupos de neurônios que estariam potencializados. Caso isso realmente ocorra, estes neurônios, durante uma tarefa de memória de trabalho, processariam informação sobre um pano de fundo de aumento da relação sinal/ruído, aumentando sua eficiência. Por último, os autores postulam que a LTD da via CA1-mPFC poderia funcionar como um sinal de anti-consolidação das informações processadas durante a tarefa de memória de trabalho, deixando os neurônios do mPFC livres para receber novas informações.

Com base nos dados obtidos, sugerimos que a facilitação da LTD na via CA1-mPFC possa ser um mecanismo plausível para explicar, pelo menos em parte, como a ativação fisiológica de receptores muscarínicos centrais durante comportamentos

associados a alta ativação colinérgica poderia facilitar o processamento de funções executivas, como memória de trabalho, por exemplo. Além disso, o fato de termos mostrado anteriormente que PILO também facilita LTP na mesma via (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira *et al.*, 2008), sugere que o sistema colinérgico muscarínico promove bidirecionalidade da eficiência sináptica no mPFC, de acordo com os padrões de disparo das células de CA1 presentes no hipocampo posterior dorsal. De fato, tanto os padrões de disparos das células da região CA1, quanto os níveis de ativação do sistema colinérgico central, variam consideravelmente durante o ciclo sono-vigília ou de acordo com a demanda cognitiva em tarefas de aprendizado e memória (Marrosu, Portas *et al.*, 1995; Hirase, Leinekugel *et al.*, 2001). Contudo, essas hipóteses ainda precisam ser testadas por meio de estudos multidisciplinares que integrem: bioquímica, biologia molecular, eletrofisiologia e comportamento.

5.3. Implicações para estudos do papel do sono no aprendizado e memória

O papel do sistema colinérgico na plasticidade sináptica do hipocampo e córtex é considerado peça-chave para os estudos sobre o papel do sono no aprendizado e memória. Diversos trabalhos têm fornecido evidências a favor da idéia de que o sono é capaz de modular a retenção de memórias adquiridas durante o estado acordado (Diekelmann e Born, 2010). Estudos utilizando abordagens eletrofisiológicas e moleculares em roedores forneceram evidências de que os estágios do sono possuem funções diferentes, porém complementares, no processamento de memórias adquiridas durante o estado acordado (Sirota, Csicsvari *et al.*, 2003; Ribeiro, Gervasoni *et al.*, 2004; Ji e Wilson, 2007; Ribeiro, Shi *et al.*, 2007). Dados recentes sugerem que o estágio de ondas lentas (SWS, do inglês *slow wave sleep*) forneça condições que facilitem o fluxo de informações entre hipocampo e córtex, essencial para o

armazenamento de memórias declarativas de longo prazo (Ribeiro, Gervasoni *et al.*, 2004; Gais, Albouy *et al.*, 2007; Mehta, 2007). Nessa fase do sono, os neurônios da região CA1 do hipocampo apresentam uma atividade repetitiva, fortemente síncrona e de curta duração (~50 a 100ms), denominada SPWRs, do inglês, *sharp waves/ripples complexes* (Buzsaki, 1986; Wierzynski, Lubenov *et al.*, 2009). O SWS também é caracterizado por apresentar níveis baixos de ativação colinérgica central (Vazquez e Baghdoyan, 2001). Essa combinação de SPWRs e baixo nível de ACh central durante SWS parece ser importante para a consolidação de memórias declarativas em humanos. Isso porque a administração de inibidor de acetilcolinesterase (fisostigmina), conhecido por facilitar a neurotransmissão colinérgica, durante período de sono rico em SWS, bloqueia completamente a consolidação de memória declarativa em teste de pares de palavras (Gais e Born, 2004). Na fase de sono REM, por outro lado, os neurônios disparam em bandas de frequências mais altas como as teta (4 – 10Hz) e gama (25 – 40Hz), principalmente. Associado a este padrão de atividade, ocorre forte reativação colinérgica central, alcançando níveis semelhantes ou até maiores que o estado acordado (Marrosu, Portas *et al.*, 1995; Vazquez e Baghdoyan, 2001). A atividade colinérgica associada a padrões oscilatórios de alta frequência durante sono REM parece ser importante para consolidação de memória espacial em roedores e de procedimento em humanos (Legault, Smith *et al.*, 2004; Rasch, Gais *et al.*, 2009). Além disso, durante o REM ocorre reativação de genes de expressão imediata dependentes de atividade (zif-268 e arc) que regulam a expressão de diversos outros genes importantes para a manutenção da plasticidade sináptica em circuitos locais e consolidação das memórias a longo-prazo (Ribeiro, Mello *et al.*, 2002; Ribeiro, Shi *et al.*, 2007). Desse modo, após diversos ciclos SWS-REM, os circuitos previamente recrutados durante o aprendizado deixam de ser reativados, sendo engajadas novas regiões. No caso de processamento de

memórias declarativas, observa-se um desengajamento do hipocampo e uma maior mobilização de áreas corticais ao longo do tempo (Ribeiro, Shi *et al.*, 2007). Esse fenômeno também é observado em estudos de imageamento por ressonância magnética funcional (fMRI) (Sterpenich, Albouy *et al.*, 2007; Takashima, Nieuwenhuis *et al.*, 2009).

Embora a hipótese de que as conexões cortico-hipocampais sejam moduladas durante o sono, poucos estudos testaram diretamente essa idéia. Romcy-Pereira e Pavlides (2004) demonstraram pela primeira vez que a manutenção da plasticidade sináptica nas vias entorrinal-DG e CA1-mPFC poderiam ser moduladas diferencialmente durante o sono (Romcy-Pereira e Pavlides, 2004). Os autores mostraram que a privação curta (4h) e seletiva de sono REM, logo após aplicação de HFS, reduz a LTP na via entorrinal-DG. Em contrapartida, o mesmo protocolo de privação de sono REM potencializa a LTP na via CA1-mPFC. Isto sugere que o sono modula distintamente a eficiência sináptica no hipocampo e no mPFC. Os autores sugerem que no hipocampo, o sono REM promove a manutenção da plasticidade sináptica de longa duração, enquanto no mPFC parece permitir ou promover que as sinapses retornem à sua eficiência basal, garantindo a continuidade de plasticidade no próximo ciclo de vigília (Romcy-Pereira e Pavlides, 2004). Um pouco depois, o mesmo grupo demonstrou que o sono é capaz de promover uma diminuição da expressão do gene dependente de atividade zif-268 especificamente no mPFC, reforçando os dados anteriormente obtidos (Romcy-Pereira, Erraji-Benchekroun *et al.*, 2009).

Durante a fase de SWS, as SPWRs hipocampais de CA1 correlacionam-se com a reativação de neurônios do mPFC, proporcionando uma repetição dos padrões de disparos que ocorreram durante o processamento de tarefas executivas (Peyrache,

Khamassi *et al.*, 2009). Conseqüentemente, ocorre fortalecimento da comunicação entre mPFC e hipocampo e facilitação do fluxo de informações hipocampo-corticais (Wierzynski, Lubenov *et al.*, 2009). Esses dados, em conjunto com estudos prévios de fMRI (Gais, Albouy *et al.*, 2007; Sterpenich, Albouy *et al.*, 2007), sugerem que a via CA1-mPFC seja especialmente importante para a consolidação de memórias declarativas ou espaciais por ser o principal mediador do fluxo de informações hipocampo-corticais durante SWS (Diekelmann e Born, 2010). É interessante ressaltar que o protocolo de privação de REM utilizado por Romcy-Pereira e Pavlides (2004) não envolvia nenhum mecanismo que acordasse completamente o animal. Conhecido como *gentle handling* esse protocolo é utilizado para tirar o animal do sono REM toda vez que ele apresente LFPs característicos (aumento de bandas teta e gama). Para isso, o experimentador arranhava, movia ou batia sutilmente na caixa de registro, fazendo com que o animal saísse de REM, mas não acordasse, voltando para SWS. Assim, privar o animal de REM significava deixá-lo ter apenas SWS durante o sono. Se seguirmos essa lógica e olharmos novamente para os dados do grupo experimental (privado de sono REM), podemos observar que, no caso da via CA1-mPFC, o sono de ondas lentas contínuo (4h) subsequente a HFS, gera maior manutenção da LTP comparado com o animal que dormiu. Assim, sono de 4h logo após HFS, com ausência de reativação colinérgica (privação de REM), facilita manutenção da LTP. Por outro lado, a presença de reativação colinérgica (sono REM+SWS), promove a despoteencialização das sinapses na via CA1-mPFC. Contudo, essas hipóteses ainda precisam ser testadas, pois o papel da ACh na plasticidade sináptica da via CA1-mPFC ainda não está completamente esclarecido.

Desse modo, assumindo que a LTD na via CA1-mPFC poderia funcionar como restauradora ou reparadora da plasticidade sináptica no mPFC (Laroche, 2000), podemos sugerir que nossos dados fornecem as primeiras evidências de que a ativação de receptores muscarínicos poderia estar subjacente aos mecanismos de restauração da eficiência sináptica na via CA1-mPFC durante o sono por meio da facilitação da LTD. Como vimos, animais-controle anestesiados com uretana apresentaram predominantemente padrões oscilatórios lentos (banda delta). Quando submetidos a LFS600 apresentaram LTD fraca e transiente (~30min). Já os animais tratados com PILO apresentaram clara dessincronização dos LFPs no hipocampo e mPFC por cerca de 10min, com proeminente aumento das bandas teta e gama. Nesse caso, quando LFS600 é aplicado durante esse evento de dessincronização causado por ativação colinérgica muscarínica, observa-se uma facilitação da LTD fraca por mais de 100min, caracterizando o surgimento de uma fase tardia da LTD na via CA1-mPFC. Portanto, concluímos que padrões oscilatórios semelhantes a REM associados à ativação colinérgica muscarínica facilita a manutenção da LTD dependente de NMDARs na via CA1-mPFC.

Curiosamente, parece que a conexão entre animais anestesiados com uretana e animais em livre-movimento durante o sono é mais estreita do que se imaginava (Clement, Richard *et al.*, 2008). Recentemente um estudo sistemático dos efeitos da uretana sobre os LFPs de regiões corticais e do hipocampo mostrou que esse anestésico, diferentemente dos outros, promove flutuações nos padrões oscilatórios ao longo do tempo. Ou seja, animais anestesiados com uretana apresentam espontaneamente ciclos que se alternam entre estados de desativação colinérgica associado a ondas lentas (delta; 0,5-4Hz) e ativação colinérgica associada a ondas mais rápidas (teta; 4-10Hz). Essas

flutuações observadas nos LFPs hipocampais e corticais não ocorrem devido à superficialização do nível de anestesia, pois complementos contínuos de uretana intravenosa não são capazes de suprimir tal característica (Clement, Richard *et al.*, 2008). Além disso, os autores observaram diversas semelhanças entre estes estados de ativação e desativação em animais anestesiados com uretana e SWS e REM em animais em livre movimento. Por exemplo: (1) ambos (estado desativado e SWS) possuem *spindles* (7-10Hz) durante padrões de ondas lentas no córtex frontal; (2) estado ativado e sono REM estão associados a predominância de oscilações em teta no hipocampo e oscilações rápidas e de baixa amplitude no córtex; (3) assim como na transição entre SWS e REM, mudança de estado desativado para estado ativado, necessita do sistema colinérgico intacto; (4) estimulação dos neurônios pedúnculo-pontinos promovem passagem de estado desativado para ativado em animais sob uretana, mimetizando o início de REM após episódio de SWS. Em conclusão, os autores sugerem que animais anestesiados com uretana podem ser úteis para futuros estudos sobre o papel do sono no aprendizado e memória, bem como, nas manifestações de transtornos associados (Clement, Richard *et al.*, 2008). Apesar das óbvias limitações experimentais, como ausência de ciclo sono-vigília, por exemplo, a observação de que o sistema colinérgico apresenta-se funcional e intacto em animais anestesiados com uretana abre um vasto campo para estudos dos efeitos da transição entre estados ativados (alta ACh) e desativados (baixa ACh) na modulação da plasticidade sináptica em conexões hipocampo-corticais, especialmente a via CA1-mPFC. Como vimos, essa têm sido uma das principais questões levantadas pelos grupos de pesquisa de sono e memória.

5.4. Implicações para estudos da esquizofrenia

Dados fornecidos por estudos que inibem a atividade de receptores de L-glutamato do tipo NMDA por meio de antagonistas não-competitivos como a fenciclidina (PCP), cloridrato de cetamina (KET) ou dizocilpina (MK-801) tem replicado importantes aspectos da neuropatofisiologia das psicoses (Bickel e Javitt, 2009). De acordo com esses trabalhos, abordagens moleculares mostram que a maioria dos genes descritos como fatores de susceptibilidade à esquizofrenia é capaz de modular a transdução de sinal intracelular que segue a ativação de NMDARs (Harrison e Owen, 2003; Moghaddam, 2003). Esses dados em conjunto sugerem que a plasticidade sináptica dependente de NMDAR esteja de alguma forma alterada em pacientes e modelos animais de psicose.

Como vimos anteriormente, a via CA1-mPFC integra diversos tipos de informações adquiridas e reprocessadas a cada momento, permitindo assim executar memórias de trabalho, influenciar a consolidação de memórias de longo-prazo, refinar a tomada de decisões e também controlar comportamentos perseverantes (Floresco, Seamans *et al.*, 1997; Laroche, Davis *et al.*, 2000; Vertes, 2006; Floresco, St Onge *et al.*, 2008). Uma das características mais recorrentes em pacientes esquizofrênicos, juntamente com os surtos psicóticos, são os prejuízos em suas funções executivas (Manoach, 2003). Em muitos casos, estas disfunções são persistentes, incapacitantes e resistentes a tratamento. Estudos de neuroimagem por fMRI sugerem que os prejuízos de processamento de memória de trabalho em pacientes esquizofrênicos sejam resultado de uma incapacidade do PFC apresentar bidirecionalidade funcional. Dados recentes indicam que, durante o estágio de repouso que ocorre entre os testes, o PFC de pacientes esquizofrênicos apresenta-se mais ativo quando comparado ao de sujeitos-controle. Por outro lado, quando a demanda cognitiva para processamento de memória de trabalho

torna-se alta, o PFC destes pacientes é menos ativado (Manoach, 2003; Pomarol-Clotet, Salvador *et al.*, 2008; Whitfield-Gabrieli, Thermenos *et al.*, 2009). Estudos *post-mortem* reforçam essa idéia, reportando diminuição na expressão da enzima GSK-3, associada à esquizofrenia em humanos e modelos animais (Ahn, Youn *et al.*, 2003; Kozlovsky, Regenold *et al.*, 2004). Esta enzima regula o estado de fosforilação de várias proteínas e também está amplamente presente no tecido nervoso. Além disso, faz parte de cascatas de sinalização responsáveis por diversos mecanismos de proliferação e adesão celular, além de plasticidade sináptica (Beasley, Cotter *et al.*, 2001; Nadri, Dean *et al.*, 2004). É interessante destacar que, assim como a calcineurina (Mulkey, Endo *et al.*, 1994; Torii, Kamishita *et al.*, 1995), a atividade de GSK-3 é necessária para indução de LTD e está envolvida na conversão de LTP em LTD no hipocampo de roedores (Peineau, Bradley *et al.*, 2008). Ainda não se sabe se a LTD dependente de NMDAR da via CA1-mPFC observada no presente trabalho também requer ativação de GSK-3 e calcineurina. Porém, a demonstração de que estas proteínas podem ser reguladas por antipsicóticos típicos (haloperidol) e atípicos (clozapina) no mPFC, reforça a idéia de que a plasticidade sináptica nesta região possa envolver tais cascatas intracelulares (Roh, Seo *et al.*, 2007; Rushlow, Seah *et al.*, 2009).

Estudos recentes reforçam a hipótese de que alterações na expressão da LTD na via CA1-mPFC estaria envolvida em sintomas positivos e prejuízos cognitivos associados à esquizofrenia. Agonistas muscarínicos como oxotremorina e xanomelina, também possuem propriedades antipsicóticas e pró-cognitivas em pacientes esquizofrênicos e em modelos animais de psicose (Bymaster, Shannon *et al.*, 1999; Gomeza, Shannon *et al.*, 1999; Shannon, Hart *et al.*, 1999; Crook, Tomaskovic-Crook *et al.*, 2001; Lieberman, Javitch *et al.*, 2008). Crook *et al.* (2001) mostrou que pacientes

esquizofrênicos apresentam receptores muscarínicos M1 e M4 menos funcionais, apresentando afinidade diminuída para o agonista pirenzepina na região do PFC. Esses dados foram corroborados mais tarde por estudo que demonstrava que roedores tratados com fenciclidina (modelo de psicose) também possuíam receptores M1 e M4 com afinidade diminuída por pirenzepina (Du Bois, Newell *et al.*, 2009). Assim, considerando que: (1) evidências de estudos comportamentais, moleculares (*post mortem*), de fMRI e de modelos animais apontam que a esquizofrenia está associada à piora do processamento de memória de trabalho e prejuízo na expressão de plasticidade sináptica hipocampal e cortical; (2) o sistema colinérgico muscarínico também se apresenta afetado; (3) a administração de agonistas muscarínicos reverte sintomas psicóticos e prejuízos cognitivos associados à esquizofrenia; (4) o antipsicótico atípico atualmente mais eficiente (clozapina) promove aumento de ACh endógena no mPFC (Ichikawa *et al.*, 2002); e (5) a via CA1-mPFC está intimamente relacionada ao processamento de memórias de curto prazo e de trabalho; o presente trabalho sugere que a facilitação da LTD por ativação muscarínica poderia estar subjacente aos efeitos pró-cognitivos decorrentes da administração de xanomelina, oxotremorina e clozapina em pacientes ou modelos animais, restaurando a capacidade de processamento de funções executivas e flexibilidade comportamental. Essa idéia é reforçada por trabalho recente do nosso laboratório mostrando que a PILO também facilita a LTP na via CA1-mPFC (Lopes Aguiar, Romcy-Pereira *et al.*, 2008), ou seja, promove flexibilidade bidirecional à plasticidade sináptica do mPFC. Estudos futuros são necessários para testar o possível envolvimento de calcineurina, GSK-3 entre outros passos de sinalização intracelular possivelmente relevantes para expressão da LTD e LTP na via CA1-mPFC.

5.5. Implicações para estudos das comorbidades psiquiátricas nas epilepsias

Cerca de 6% dos pacientes epilépticos desenvolvem algum tipo de transtorno psiquiátrico. As comorbidades psiquiátricas mais comuns são os transtornos de humor (especialmente a depressão, 30%); seguidos por transtornos de ansiedade (10-25%); psicoses (2-7%) e transtornos de personalidade (1-2%) (Gaitatzis, Trimble *et al.*, 2004). Além disso, os pacientes acometidos por epilepsia do lobo temporal (ELT) apresentam incidência maior de comorbidades psiquiátricas (10 a 20%) do que nas epilepsias generalizadas (4 a 6%) (Kandratavicius, Hallack *et al.*, 2007). Acredita-se que as alterações seletivas e severas observadas na região CA1 poderiam prejudicar o processamento de funções executivas, que por sinal, são marcadamente afetadas nos transtornos psiquiátricos (Risse, 2006). Considerando que a hiperativação colinérgica hipocampal é utilizada como modelo experimental de ELT e que as conexões entre CA1-mPFC são essenciais no fluxo de informações do hipocampo para o córtex, sugerimos que os estudos da modulação muscarínica da LTP e LTD na via CA1-mPFC feitos em nosso laboratório possam gerar novas hipóteses sobre os mecanismos subjacentes à manifestação de comorbidades psiquiátricas nas ELT.

6. Conclusões

O sistema colinérgico central é diferencialmente ativado de acordo com o ciclo sono-vigília, nível de atenção dirigida e processamento cognitivo. Também é capaz de modular aprendizado, memória e plasticidade sináptica em diversas regiões encefálicas. Além disso, sua disfunção está associada ao desenvolvimento de diversas neuropatologias e transtornos psiquiátricos. O presente estudo traz as primeiras evidências que a LTD, um modelo celular de memória complementar a LTP, é facilitada na via CA1-mPFC por pré-ativação colinérgica muscarínica. Resumidamente nossos dados indicaram que: (1) PILO administrada imediatamente antes de indução de

protocolo de indução de LTD fraca (LFS600) promove facilitação da LTD na via CA1-mPFC, prolongando sua fase tardia; (2) esse efeito é dependente de ativação de NMDARs no mPFC; (3) PILO sozinha não é capaz de afetar os fPSPs basais; (4) PILO administrada 20min após LFS600 não é capaz de afetar a manutenção da LTD fraca; (5) LTD forte induzida por LFS900 é dependente de NMDARs; (6) PILO promove rápida e proeminente alteração dos padrões oscilatórios no hipocampo e mPFC, com aumento das oscilações de alta frequência (teta, sigma e gama) e concomitante diminuição das oscilações lentas (delta). Em conjunto com dados recentemente publicados pelo nosso laboratório, sugerimos que a atividade de receptores muscarínicos seja importante para modular a plasticidade sináptica de maneira bidirecional (LTP e LTD), dependendo dos padrões de disparos da região CA1 do hipocampo. Por ser uma das principais saídas de informação hipocampo-corticais, os estudos da modulação colinérgica da plasticidade sináptica da via CA1-mPFC fornecem novas perspectivas para diversos temas considerados centrais em neurociência, como o papel do sono na consolidação de memória, as bases neuronais do aprendizado e memória, as epilepsias e seus transtornos psiquiátricos associados, os prejuízos cognitivos associados a psicoses, entre outros.


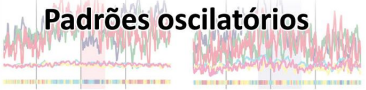


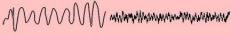


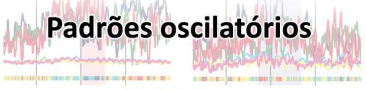


<p>Fisiológico</p> <p>Comportamento</p>  <p>Padrões oscilatórios</p>  <p>Fluxo de informações hipocampo-córtex</p>  <p>Eficácia sináptica</p> 	<p>↑ mAChR</p> <p>Sono REM, atenção dirigida, aquisição de memória visual, processamento de memória de trabalho</p>  <p>Ondas teta e gama</p> <p>Menos favorecido</p> <p>Aumenta em circuitos locais e pode aumentar ou diminuir na via CA1-mPFC</p>	<p>↓ mAChR</p> <p>SWS, repouso, consolidação de memória (reverberação)</p>  <p>Ondas lentas, <i>Spindles</i> e SPWRs</p> <p>Mais favorecido</p> <p>Diminui em circuitos locais e aumenta na via CA1-mPFC (?)</p>
<p>Patológico</p> <p>Comportamento</p>  <p>Padrões oscilatórios</p>  <p>Fluxo de informações hipocampo-córtex</p>  <p>Eficácia sináptica</p> 	<p>↑↑ mAChR</p> <p>Crises epilépticas e surtos psicóticos</p> <p>Sincronização excessiva ou aumento anormal de ondas gama</p> <p>Excessivo no caso de epilepsia e provavelmente prejudicado durante o surto psicótico</p> <p>Diminuição geral da capacidade de modificação da eficiência sináptica hipocampal e cortical (LTP/LTD). Redução da metaplasticidade.</p>	<p>↓↓ mAChR</p> <p>Prejuízos cognitivos e alterações emocionais (Esquizofrenia, Alzheimer e senescência)</p> <p>Aumento anormal de ondas delta</p> <p>Geralmente prejudicado</p>

Tabela 3. Resumo dos principais aspectos comportamentais e neurofisiológicos associados ao aumento ou à diminuição da atividade colinérgica central em condições normais e patológicas. Como discutido anteriormente, o sistema colinérgico central é altamente ativado durante comportamentos de alerta, atenção e sono paradoxal. Além de modular percepção e memória, o sistema colinérgico está envolvido em sintomas ligados a doença de Alzheimer, desordem de hiperatividade, esquizofrenia e epilepsia. Esses estados influenciados estão associados a padrões oscilatórios característicos e influenciam o fluxo de informações entre o hipocampo e o córtex, bem como, a plasticidade sináptica em circuitos importantes para o processamento de informações, memórias e emoções.

7. Bibliografia

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. 847-52, Jul 1994. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7969803 >.

AHMADI-PAJOUH, M. A. et al. Path planning in the hippocampo-prefrontal cortex pathway: an adaptive model based receding horizon planner. **Med Hypotheses**, v. 68, n. 6, p. 1411-5, 2007. ISSN 0306-9877 (Print)

0306-9877 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17337125 >.

AHN, K. H. et al. N-methyl-D-aspartate receptor in working memory impairments in schizophrenia: event-related potential study of late stage of working memory process. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 6, p. 993-9, Sep 2003. ISSN 0278-5846 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14499316 >.

ANAGNOSTARAS, S. G. et al. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. **Nat Neurosci**, v. 6, n. 1, p. 51-8, Jan 2003. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12483218 >.

ANDERSEN, P.; BLACKSTAD, T. W.; LOMO, T. Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. **Exp Brain Res**, v. 1, n. 3, p. 236-48, 1966. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5920551 >.

ANWYL, R. Induction and expression mechanisms of postsynaptic NMDA receptor-independent homosynaptic long-term depression. **Prog Neurobiol**, v. 78, n. 1, p. 17-37, Jan 2006. ISSN 0301-0082 (Print)

0301-0082 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16423442 >.

ARNOLD, H. M. et al. Differential cortical acetylcholine release in rats performing a sustained attention task versus behavioral control tasks that do not explicitly tax attention. **Neuroscience**, v. 114, n. 2, p. 451-60, 2002. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12204214 >.

ATRI, A. et al. Blockade of central cholinergic receptors impairs new learning and increases proactive interference in a word paired-associate memory task. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 1, p. 223-36, Feb 2004. ISSN 0735-7044 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14979800 >.

AUERBACH, J. M.; SEGAL, M. Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. **J Physiol**, v. 492 (Pt 2), p. 479-93, Apr 15 1996. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9019544 >.

AUJLA, H.; BENINGER, R. J. Hippocampal-prefrontocortical circuits: PKA inhibition in the prefrontal cortex impairs delayed nonmatching in the radial maze in rats. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 6, p. 1204-11, Dec 2001. ISSN 0735-7044 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11770052 >.

BEAR, M. F.; ABRAHAM, W. C. Long-term depression in hippocampus. **Annu Rev Neurosci**, v. 19, p. 437-62, 1996. ISSN 0147-006X (Print)

0147-006X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8833450 >.

BEASLEY, C. et al. Glycogen synthase kinase-3beta immunoreactivity is reduced in the prefrontal cortex in schizophrenia. **Neurosci Lett**, v. 302, n. 2-3, p. 117-20, Apr 20 2001. ISSN 0304-3940 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11290401 >.

BENDER, V. A. et al. Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. **J Neurosci**, v. 26, n. 16, p. 4166-77, Apr 19 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16624937 >.

BICKEL, S.; JAVITT, D. C. Neurophysiological and neurochemical animal models of schizophrenia: focus on glutamate. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 2, p. 352-62, Dec 7 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic).

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19433116 >.

BLISS, T. V. A journey from neocortex to hippocampus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, n. 1432, p. 621-3, Apr 29 2003. ISSN 0962-8436 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12740105 >.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31-9, Jan 7 1993. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8421494 >.

BLISS, T. V.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**, v. 232, n. 2, p. 357-74, Jul 1973. ISSN 0022-3751 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4727085 >.

BLISS, T. V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**, v. 232, n. 2, p. 331-56, Jul 1973. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4727084 >.

BLITZER, R. D.; GIL, O.; LANDAU, E. M. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 119, n. 2, p. 207-10, Nov 13 1990. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2280895 >.

BLOKLAND, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, n. 3, p. 285-300, Nov 1995. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8806017 >.

BLOKLAND, A.; HONIG, W.; RAAIJMAKERS, W. G. Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 109, n. 3, p. 373-6, 1992. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1365638 >.

BOYD, T. E.; TREPEL, C.; RACINE, R. J. Cholinergic modulation of neocortical long-term potentiation in the awake, freely moving rat. **Brain Res**, v. 881, n. 1, p. 28-36, Oct 20 2000. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11033090 >.

BRAGIN, A. et al. Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. **J Neurosci**, v. 15, n. 1 Pt 1, p. 47-60, Jan 1995. ISSN 0270-6474 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7823151 >.

BREBNER, K. et al. Nucleus accumbens long-term depression and the expression of behavioral sensitization. **Science**, v. 310, n. 5752, p. 1340-3, Nov 25 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16311338 >.

BROCHER, S.; ARTOLA, A.; SINGER, W. Agonists of cholinergic and noradrenergic receptors facilitate synergistically the induction of long-term potentiation in slices of rat visual cortex. **Brain Res**, v. 573, n. 1, p. 27-36, Feb 21 1992. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1349501 >.

BROERSEN, L. M. et al. The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms.

Brain Res, v. 674, n. 2, p. 221-9, Mar 20 1995. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7796100 >.

BURETTE, F.; JAY, T. M.; LAROCHE, S. Synaptic depression of the hippocampal to prefrontal cortex pathway during a spatial working memory task. **Current Psychology Letters** v. 1, p. 9-23, 2000.

BURGARD, E. C.; SARVEY, J. M. Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. **Neurosci Lett**, v. 116, n. 1-2, p. 34-9, Aug 14 1990.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2259453 >.

BUZSAKI, G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. **Brain Res**, v. 398, n. 2, p. 242-52, Nov 29 1986. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3026567>.

BYMASTER, F. P. et al. Potential role of muscarinic receptors in schizophrenia. **Life Sci**, v. 64, n. 6-7, p. 527-34, 1999. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10069519>.

CAMMAROTA, M. et al. Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 30, p. 10279-84, Jul 29 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18647831>.

CARR, D. B.; SURMEIER, D. J. M1 muscarinic receptor modulation of Kir2 channels enhances temporal summation of excitatory synaptic potentials in prefrontal cortex pyramidal neurons. **J Neurophysiol**, v. 97, n. 5, p. 3432-8, May 2007. ISSN 0022-3077 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17376848>.

CAULFIELD, M. P.; BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 50, n. 2, p. 279-90, Jun 1998. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9647869>.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-82, Nov-Dec 1991. ISSN 0013-9580 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1743148>.

CERQUEIRA, J. J. et al. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. **J Neurosci**, v. 27, n. 11, p. 2781-7, Mar 14 2007. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17360899>.

CHEONG, M. Y. et al. Cholinergic modulation of synaptic physiology in deep layer entorhinal cortex of the rat. **J Neurosci Res**, v. 66, n. 1, p. 117-21, Oct 1 2001. ISSN 0360-4012 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11599008>.

CHEVALEYRE, V.; CASTILLO, P. E. Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. **Neuron**, v. 43, n. 6, p. 871-81, Sep 16 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15363397>.

CHEVALEYRE, V. et al. Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. **Neuron**, v. 54, n. 5, p. 801-12, Jun 7 2007. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17553427 >.

CITRI, A.; MALENKA, R. C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms.

Neuropsychopharmacology, v. 33, n. 1, p. 18-41, Jan 2007. ISSN 0893-133X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17728696 >.

CLEMENT, E. A. et al. Cyclic and sleep-like spontaneous alternations of brain state under urethane anaesthesia. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e2004, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18414674 >.

CROOK, J. M. et al. Low muscarinic receptor binding in prefrontal cortex from subjects with schizophrenia: a study of Brodmann's areas 8, 9, 10, and 46 and the effects of neuroleptic drug treatment. **Am J Psychiatry**, v. 158, n. 6, p. 918-25, Jun 2001. ISSN 0002-953X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11384900 >.

CROZIER, R. A. et al. Deprivation-induced synaptic depression by distinct mechanisms in different layers of mouse visual cortex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 4, p. 1383-8, Jan 23 2007. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17227847 >.

DALLEY, J. W.; CARDINAL, R. N.; ROBBINS, T. W. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 7, p. 771-84, Nov 2004.

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15555683 >.

DALLEY, J. W. et al. Distinct changes in cortical acetylcholine and noradrenaline efflux during contingent and noncontingent performance of a visual attentional task. **J Neurosci**, v. 21, n. 13, p. 4908-14, Jul 1 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11425918 >.

DAMASIO, A. R. Time-locked multiregional retroactivation: a systems-level proposal for the neural substrates of recall and recognition. **Cognition**, v. 33, n. 1-2, p. 25-62, Nov 1989. ISSN 0010-0277 (Print).

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2691184 >.

DEFELIPE, J. Brain plasticity and mental processes: Cajal again. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 10, p. 811-7, Oct 2006. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16988656 >.

DEGENETAIS, E. et al. Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. **Cereb Cortex**, v. 13, n. 7, p. 782-92, Jul 2003. ISSN 1047-3211 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12816894 >.

DENG, P. Y.; LEI, S. Long-term depression in identified stellate neurons of juvenile rat entorhinal cortex. **J Neurophysiol**, v. 97, n. 1, p. 727-37, Jan 2007. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17135466 >.

DIAMOND, D. M. et al. Preclinical research on stress, memory, and the brain in the development of pharmacotherapy for depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14 Suppl 5, p. S491-5, Dec 2004. ISSN 0924-977X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15550347 >.

DIEKELMANN, S.; BORN, J. The memory function of sleep. **Nat Rev Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 114-26, Feb 2010. ISSN 1471-0048 (Electronic)

1471-003X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20046194 >.

DODT, H. et al. Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation.

Science, v. 286, n. 5437, p. 110-3, Oct 1 1999. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10506556 >.

DOYERE, V. et al. Long-term potentiation of hippocampal afferents and efferents to prefrontal cortex: implications for associative learning. **Neuropsychologia**, v. 31, n. 10, p. 1031-53, Oct 1993. ISSN 0028-3932 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8290021 >.

DREVETS, W. C. et al. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. **Nature**, v. 386, n. 6627, p. 824-7, Apr 24 1997. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9126739 >.

DRINGENBERG, H. C. et al. Heterosynaptic facilitation of in vivo thalamocortical long-term potentiation in the adult rat visual cortex by acetylcholine. **Cereb Cortex**, v. 17, n. 4, p. 839-48, Apr 2007. ISSN 1047-3211 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16707735 >.

DRINGENBERG, H. C.; KUO, M. C.; TOMASZEK, S. Stabilization of thalamo-cortical long-term potentiation by the amygdala: cholinergic and transcription-dependent mechanisms. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 557-65, Jul 2004. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15233765 >.

DU BOIS, T. M. et al. Perinatal PCP treatment alters the developmental expression of prefrontal and hippocampal muscarinic receptors. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 1, p. 37-40, Feb 1 2009. ISSN 0278-5846 (Print)

0278-5846 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18940225 >.

DUDEK, S. M.; BEAR, M. F. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 10, p. 4363-7, May 15 1992. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1350090 >.

DUNNETT, S. B.; WAREHAM, A. T.; TORRES, E. M. Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. **Neuroreport**, v. 1, n. 1, p. 61-4, Sep 1990. ISSN 0959-4965 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=129859 >.

FEINMARK, S. J. et al. 12-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid mediate metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression at hippocampal CA3-CA1 synapses. **J Neurosci**, v. 23, n. 36, p. 11427-35, Dec 10 2003. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14673007 >.

FELDMAN, D. E. et al. Long-term depression at thalamocortical synapses in developing rat somatosensory cortex. **Neuron**, v. 21, n. 2, p. 347-57, Aug 1998. ISSN 0896-6273 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9728916 >.

FERREIRA, A. R. et al. Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, n. 2, p. 411-5, Jan 2003. ISSN 0091-3057 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12479962 >.

FIBIGER, H. C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 220-3, Jun 1991. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1716012 >.

FLORESCO, S. B.; SEAMANS, J. K.; PHILLIPS, A. G. Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. **J Neurosci**, v. 17, n. 5, p. 1880-90, Mar 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9030646 >.

FLORESCO, S. B. et al. Cortico-limbic-striatal circuits subserving different forms of cost-benefit decision making. **Cogn Affect Behav Neurosci**, v. 8, n. 4, p. 375-89, Dec 2008. ISSN 1530-7026 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19033236 >.

FOSSATI, P.; RADTCHENKO, A.; BOYER, P. Neuroplasticity: from MRI to depressive symptoms. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14 Suppl 5, p. S503-10, Dec 2004. ISSN 0924-977X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15550349 >.

FREY, U.; HUANG, Y. Y.; KANDEL, E. R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. **Science**, v. 260, n. 5114, p. 1661-4, Jun 11 1993. ISSN 0036-8075 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8389057 >.

GAIS, S. et al. Sleep transforms the cerebral trace of declarative memories. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 47, p. 18778-83, Nov 20 2007. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18000060 >.

GAIS, S.; BORN, J. Low acetylcholine during slow-wave sleep is critical for declarative memory consolidation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 7, p. 2140-4, Feb 17 2004. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14766981 >.

GAITATZIS, A.; TRIMBLE, M. R.; SANDER, J. W. The psychiatric comorbidity of epilepsy. **Acta Neurol Scand**, v. 110, n. 4, p. 207-20, Oct 2004. ISSN 0001-6314 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15355484 >.

GAYKEMA, R. P. et al. The basal forebrain cholinergic system: efferent and afferent connectivity and long-term effects of lesions. **Acta Psychiatr Scand Suppl**, v. 366, p. 14-26, 1991. ISSN 0065-1591 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1680268 >.

GEMPERLE, A. Y. et al. Effects of clozapine, haloperidol and iloperidone on neurotransmission and synaptic plasticity in prefrontal cortex and their accumulation in brain tissue: an in vitro study.

Neuroscience, v. 117, n. 3, p. 681-95, 2003. ISSN 0306-4522 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12617972 >.

GERBER, D. J. et al. Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8993-8, Jul 22 2003. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12851458 >.

GIACOBINI, E. Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer disease. **J Neurosci Res**, v. 27, n. 4, p. 548-60, Dec 1990. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2079716 >.

GIOCOMO, L. M.; HASSELMO, M. E. Neuromodulation by glutamate and acetylcholine can change circuit dynamics by regulating the relative influence of afferent input and excitatory feedback. **Mol Neurobiol**, v. 36, n. 2, p. 184-200, Oct 2007. ISSN 0893-7648 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17952661 >.

GIOVANNINI, M. G. et al. Acetylcholine release from the frontal cortex during exploratory activity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 218-27, Feb 16 1998. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9518622 >.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. **Ann N Y Acad Sci**, v. 769, p. 71-83, Dec 15 1995a. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8595045 >.

_____. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n. 3, p. 477-85, Mar 1995b. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7695894 >.

GOMEZA, J. et al. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 4, p. 1692-7, Feb 16 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9990086 >.

GRANON, S. et al. Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 119, n. 2, p. 139-44, May 1995. ISSN 0033-3158 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7659760 >.

GRIFFITHS, S. et al. Expression of long-term depression underlies visual recognition memory. **Neuron**, v. 58, n. 2, p. 186-94, Apr 24 2008. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18439404 >.

GU, Q. Contribution of acetylcholine to visual cortex plasticity. **Neurobiol Learn Mem**, v. 80, n. 3, p. 291-301, Nov 2003. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14521871 >.

GULLEDGE, A. T.; KAWAGUCHI, Y. Phasic cholinergic signaling in the hippocampus: functional homology with the neocortex? **Hippocampus**, v. 17, n. 5, p. 327-32, 2007. ISSN 1050-9631 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17407133 >.

GURDEN, H.; TAKITA, M.; JAY, T. M. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. **J Neurosci**, v. 20, n. 22, p. RC106, Nov 15 2000. ISSN 1529-2401 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11069975 >.

GURDEN, H.; TASSIN, J. P.; JAY, T. M. Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal-prefrontal cortex long-term potentiation. **Neuroscience**, v. 94, n. 4, p. 1019-27, 1999. ISSN 0306-4522 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10625044 >.

HARRISON, P. J.; OWEN, M. J. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. **Lancet**, v. 361, n. 9355, p. 417-9, Feb 1 2003. ISSN 0140-6736 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12573388 >.

HASSELMO, M. E. A model of prefrontal cortical mechanisms for goal-directed behavior. **J Cogn Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 1115-29, Jul 2005. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16102240 >.

_____. The role of acetylcholine in learning and memory. **Curr Opin Neurobiol**, v. 16, n. 6, p. 710-5, Dec 2006. ISSN 0959-4388 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17011181 >.

HASSELMO, M. E.; BARKAI, E. Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. **J Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 6592-604, Oct 1995. ISSN 0270-6474 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7472421 >.

HEBB, D. **The organization of behavior**. Mahwah: Lawrence Erlbaum Associates, 1949.

HERREMANS, A. H.; HIJZEN, T. H.; OLIVIER, B. Effects of cholinergic drug infusions into the dorsal part of the medial prefrontal cortex on delayed conditional discrimination performance in the rat. **Behav Brain Res**, v. 84, n. 1-2, p. 291-9, Mar 1997. ISSN 0166-4328 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9079794 >.

HIMMELHEBER, A. M.; SARTER, M.; BRUNO, J. P. Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. **Brain Res Cogn Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 313-25, Jun 2000. ISSN 0926-6410 (Print)

0926-6410 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10808142 >.

HIRASE, H. et al. Firing rates of hippocampal neurons are preserved during subsequent sleep episodes and modified by novel awake experience. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 9386-90, Jul 31 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11470910 >.

HIRONAKA, N. et al. Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study. **Brain Res**, v. 901, n. 1-2, p. 143-50, May 18 2001. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11368961 >.

HOBSON, J. A. Sleep and dreaming: induction and mediation of REM sleep by cholinergic mechanisms. **Curr Opin Neurobiol**, v. 2, n. 6, p. 759-63, Dec 1992. ISSN 0959-4388 (Print)

0959-4388 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1477541 >.

HOOPER, C. et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 1, p. 81-6, Jan 2007. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17241269 >.

HUANG, C. C.; HSU, K. S. Activation of Muscarinic Acetylcholine Receptors Induces a Nitric Oxide-Dependent Long-Term Depression in Rat Medial Prefrontal Cortex. **Cereb Cortex**, Aug 7 2009. ISSN 1460-2199 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19666830 >.

HUBER, K. M.; RODER, J. C.; BEAR, M. F. Chemical induction of mGluR5- and protein synthesis--dependent long-term depression in hippocampal area CA1. **J Neurophysiol**, v. 86, n. 1, p. 321-5, Jul 2001. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11431513 >.

HUERTA, P. T.; LISMAN, J. E. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1053-63, Nov 1995. ISSN 0896-6273 (Print).

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7576649 >.

HUGUES, S.; GARCIA, R. Reorganization of learning-associated prefrontal synaptic plasticity between the recall of recent and remote fear extinction memory. **Learn Mem**, v. 14, n. 8, p. 520-4, Aug 2007. ISSN 1549-5485 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17671108 >.

HYMAN, J. M. et al. Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. **Hippocampus**, v. 15, n. 6, p. 739-49, 2005. ISSN 1050-9631 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16015622 >.

ICHIKAWA, J. et al. Atypical, but not typical, antipsychotic drugs increase cortical acetylcholine release without an effect in the nucleus accumbens or striatum. **Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 325-39, Mar 2002. ISSN 0893-133X (Print)

0006-3223 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11850147 >.

ISHIKAWA, A. et al. Essential role of D1 but not D2 receptors in methamphetamine-induced impairment of long-term potentiation in hippocampal-prefrontal cortex pathway. **Eur J Neurosci**, v. 22, n. 7, p. 1713-9, Oct 2005. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16197511 >.

ITO, M. Long-term depression as a memory process in the cerebellum. **Neurosci Res**, v. 3, n. 6, p. 531-9, Sep 1986. ISSN 0168-0102 (Print)

0168-0102 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3534647 >.

_____. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles.

Physiol Rev, v. 81, n. 3, p. 1143-95, Jul 2001. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11427694 >.

IZAKI, Y.; AKEMA, T. Gamma-band power elevation of prefrontal local field potential after posterior dorsal hippocampus-prefrontal long-term potentiation induction in anesthetized rats. **Exp Brain Res**, v. 184, n. 2, p. 249-53, Jan 2008. ISSN 1432-1106 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17828391 >.

IZAKI, Y. et al. Effects of rat medial prefrontal cortex temporal inactivation on a delayed alternation task. **Neurosci Lett**, v. 315, n. 3, p. 129-32, Nov 27 2001. ISSN 0304-3940 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17116980 >.

IZAKI, Y.; TAKITA, M.; AKEMA, T. Compatibility of bidirectional synaptic plasticity on hippocampo-prefrontal cortex pathway in rats. **Neurosci Lett**, v. 345, n. 1, p. 69-71, Jul 10 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12809991 >.

_____. Specific role of the posterior dorsal hippocampus-prefrontal cortex in short-term working memory. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 11, p. 3029-34, Jun 2008. ISSN 1460-9568 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18540879 >.

IZAKI, Y.; TAKITA, M.; NOMURA, M. Comparative induction of long-term depression between dorsal and ventral hippocampal CA1 in the anesthetized rat. **Neurosci Lett**, v. 294, n. 3, p. 171-4, Nov 24 2000. ISSN 0304-3940 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11072142 >.

IZQUIERDO, I. et al. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. **Neurotox Res**, v. 14, n. 2-3, p. 273-94, Oct 2008. ISSN 1029-8428 (Print) 1029-8428 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19073432 >.

_____. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **An Acad Bras Cienc**, v. 80, n. 1, p. 115-27, Mar 2008. ISSN 0001-3765 (Print) 0001-3765 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18345380 >.

JAY, T. M. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. **Prog Neurobiol**, v. 69, n. 6, p. 375-90, Apr 2003. ISSN 0301-0082 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12880632 >.

JAY, T. M.; BURETTE, F.; LAROCHE, S. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 247-50, Feb 1 1995. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7757261 >.

JAY, T. M.; GURDEN, H.; YAMAGUCHI, T. Rapid increase in PKA activity during long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in vivo. **Eur J Neurosci**, v. 10, n. 10, p. 3302-6, Oct 1998. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9786225 >.

JERUSALINSKY, D.; KORNISIUK, E.; IZQUIERDO, I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. **Neurochem Res**, v. 22, n. 4, p. 507-15, Apr 1997. ISSN 0364-3190 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9130263 >.

Ji, D.; WILSON, M. A. Coordinated memory replay in the visual cortex and hippocampus during sleep. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 100-7, Jan 2007. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17173043 >.

JODO, E. et al. Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. **Cereb Cortex**, v. 15, n. 5, p. 663-9, May 2005. ISSN 1047-3211 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15342431 >.

KANDRATAVICIUS, L.; HALLACK, J. E. C.; LEITE, J. P. Psicose e depressão na epilepsia do lobo temporal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 13, n. 4, p. 163-167, 2007.

KEMP, A.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? **Trends Neurosci**, v. 30, n. 3, p. 111-8, Mar 2007. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17234277 >.

KIRKWOOD, A.; BEAR, M. F. Elementary forms of synaptic plasticity in the visual cortex. **Biol Res**, v. 28, n. 1, p. 73-80, 1995. ISSN 0716-9760 (Print) 0716-9760 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8728822 >.

KIRKWOOD, A.; RIOULT, M. C.; BEAR, M. F. Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. **Nature**, v. 381, n. 6582, p. 526-8, Jun 6 1996. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8632826 >.

KIRKWOOD, A. et al. Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine. **J Neurosci**, v. 19, n. 5, p. 1599-609, Mar 1 1999. ISSN 0270-6474 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10024347 >.

KOSEKI, H. et al. Alteration of synaptic transmission in the hippocampal-mPFC pathway during extinction trials of context-dependent fear memory in juvenile rat stress models. **Synapse**, v. 63, n. 9, p. 805-13, Sep 2009. ISSN 1098-2396 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19504621 >.

KOURRICH, S. et al. Postsynaptic signals mediating induction of long-term synaptic depression in the entorhinal cortex. **Neural Plast**, v. 2008, p. 840374, 2008. ISSN 1687-5443 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18670611 >.

KOZAK, R.; BRUNO, J. P.; SARTER, M. Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. **Cereb Cortex**, v. 16, n. 1, p. 9-17, Jan 2006. ISSN 1047-3211 (Print) 1047-3211 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15788700>.

KOZLOVSKY, N. et al. GSK-3beta in cerebrospinal fluid of schizophrenia patients. **J Neural Transm**, v. 111, n. 8, p. 1093-8, Aug 2004. ISSN 0300-9564 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15254796>.

_____. Reduced GSK-3beta mRNA levels in postmortem dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenic patients. **J Neural Transm**, v. 111, n. 12, p. 1583-92, Dec 2004. ISSN 0300-9564 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15565492>.

KRUSE, M. S. et al. Interaction of dopamine D1 with NMDA NR1 receptors in rat prefrontal cortex. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 19, n. 4, p. 296-304, Apr 2009. ISSN 1873-7862 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19186032>.

KUCZEWSKI, N. et al. Selective cholinergic immunolesioning affects synaptic plasticity in developing visual cortex. **Eur J Neurosci**, v. 21, n. 7, p. 1807-14, Apr 2005. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15869476>.

LAFOURCADE, M. et al. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. **PLoS One**, v. 2, n. 1, p. e709, 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17684555>.

LAROCHE, S.; DAVIS, S.; JAY, T. M. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. **Hippocampus**, v. 10, n. 4, p. 438-46, 2000. ISSN 1050-9631 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10985283>.

LAROCHE, S.; JAY, T. M.; THIERRY, A. M. Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. **Neurosci Lett**, v. 114, n. 2, p. 184-90, Jul 3 1990. ISSN 0304-3940 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2395531>.

LEGAULT, G.; SMITH, C. T.; BENINGER, R. J. Scopolamine during the paradoxical sleep window impairs radial arm maze learning in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 79, n. 4, p. 715-21, Dec 2004. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15582679>.

LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 511-7, Winter 1990. ISSN 0149-7634 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2287490>.

LEITE, J. P.; CAVALHEIRO, E. A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Res**, v. 20, n. 2, p. 93-104, Feb 1995. ISSN 0920-1211 (Print).

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7750514 >.

LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 93-103, Jun 2002. ISSN 0920-1211 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12151121 >.

LEITE, J. P. et al. Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. **Braz J Med Biol Res**, v. 23, n. 8, p. 681-3, 1990. ISSN 0100-879X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2101094 >.

LEUNG, L. S. et al. Cholinergic activity enhances hippocampal long-term potentiation in CA1 during walking in rats. **J Neurosci**, v. 23, n. 28, p. 9297-304, Oct 15 2003. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14561856 >.

LEVEY, A. I. et al. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. **J Neurosci**, v. 11, n. 10, p. 3218-26, Oct 1991. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1941081 >.

LIEBERMAN, J. A.; JAVITCH, J. A.; MOORE, H. Cholinergic agonists as novel treatments for schizophrenia: the promise of rational drug development for psychiatry. **Am J Psychiatry**, v. 165, n. 8, p. 931-6, Aug 2008. ISSN 1535-7228 (Electronic)

0002-953X (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18676593 >.

LOMO, T. The discovery of long-term potentiation. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 358, n. 1432, p. 617-20, Apr 29 2003. ISSN 0962-8436 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12740104 >.

LOPES AGUIAR, C. et al. Muscarinic acetylcholine neurotransmission enhances the late-phase of long-term potentiation in the hippocampal-prefrontal cortex pathway of rats in vivo: a possible involvement of monoaminergic systems. **Neuroscience**, v. 153, n. 4, p. 1309-19, Jun 2 2008. ISSN 0306-4522 (Print).

Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18455317 >.

LUCAS-MEUNIER, E. et al. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. **Pflugers Arch**, v. 446, n. 1, p. 17-29, Apr 2003. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12690458 >.

LUSCHER, C. et al. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 6, p. 545-50, Jun 2000. ISSN 1097-6256 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10816309 >.

LYNCH, G.; REX, C. S.; GALL, C. M. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 1, p. 12-23, Jan 2007. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16949110>.

LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 87-136, Jan 2004. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14715912>.

MALENKA, R. C. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1003, p. 1-11, Nov 2003. ISSN 0077-8923 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14684431>.

MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5-21, Sep 30 2004. ISSN 0896-6273 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15450156>.

MANOACH, D. S. Prefrontal cortex dysfunction during working memory performance in schizophrenia: reconciling discrepant findings. **Schizophr Res**, v. 60, n. 2-3, p. 285-98, Apr 1 2003. ISSN 0920-9964 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12591590>.

MARCHI, M. et al. Muscarinic inhibition of endogenous glutamate release from rat hippocampus synaptosomes. **Neurosci Lett**, v. 96, n. 2, p. 229-34, Jan 16 1989. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2564654>.

MARINO, M. J. et al. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 19, p. 11465-70, Sep 15 1998. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9736760>.

MARROSU, F. et al. Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. **Brain Res**, v. 671, n. 2, p. 329-32, Feb 13 1995. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7743225>.

MARTIN, S. J.; MORRIS, R. G. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. **Hippocampus**, v. 12, n. 5, p. 609-36, 2002. ISSN 1050-9631 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12440577>.

MASSEY, P. V.; BASHIR, Z. I. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 4, p. 176-84, Apr 2007. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17335914>.

MATSUOKA, N. et al. Differential effects of physostigmine and pilocarpine on the spatial memory deficits produced by two septo-hippocampal deafferentations in rats. **Brain Res**, v. 559, n. 2, p. 233-40, Sep 20 1991. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1794099 >.

MCCORMICK, D. A.; PRINCE, D. A. Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 18, p. 6344-8, Sep 1985. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3862134 >.

_____. Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro. **J Physiol**, v. 375, p. 169-94, Jun 1986. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2879035 >.

MCCOY, P. A.; MCMAHON, L. L. Muscarinic receptor dependent long-term depression in rat visual cortex is PKC independent but requires ERK1/2 activation and protein synthesis. **J Neurophysiol**, v. 98, n. 4, p. 1862-70, Oct 2007. ISSN 0022-3077 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17634336 >.

MEHTA, M. R. Cortico-hippocampal interaction during up-down states and memory consolidation. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 13-5, Jan 2007. ISSN 1097-6256 (Print) 1097-6256 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17189946 >.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 445-68, Mar 1998. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9539121 >.

MIYAKAWA, T. et al. Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 15, p. 8987-92, Jul 22 2003. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12851457 >.

MIYAMOTO, M. et al. Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats. **Brain Res**, v. 419, n. 1-2, p. 19-31, Sep 1 1987. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3676724 >.

MOGHADDAM, B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. **Neuron**, v. 40, n. 5, p. 881-4, Dec 4 2003. ISSN 0896-6273 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14659087 >.

MULKEY, R. M. et al. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. **Nature**, v. 369, n. 6480, p. 486-8, Jun 9 1994. ISSN 0028-0836 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7515479 >.

NADRI, C. et al. GSK-3 parameters in postmortem frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients. **Schizophr Res**, v. 71, n. 2-3, p. 377-82, Dec 1 2004. ISSN 0920-9964 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15474909 >.

NAKANO, M. et al. Frequency-dependent requirement for calcium store-operated mechanisms in induction of homosynaptic long-term depression at hippocampus CA1 synapses. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 10, p. 2881-7, May 2004. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15147321 >.

NATHANSON, N. M. A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 12, p. 6245-7, Jun 6 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10841527 >.

NEVIAN, T.; SAKMANN, B. Spine Ca²⁺ signaling in spike-timing-dependent plasticity. **J Neurosci**, v. 26, n. 43, p. 11001-13, Oct 25 2006. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17065442 >.

NOSYREVA, E. D.; HUBER, K. M. Developmental switch in synaptic mechanisms of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. **J Neurosci**, v. 25, n. 11, p. 2992-3001, Mar 16 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15772359 >.

OHASHI, S. et al. Changes in synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway induced by repeated treatments with fluvoxamine. **Brain Res**, v. 949, n. 1-2, p. 131-8, Sep 13 2002. ISSN 0006-8993 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12213308 >.

OHNO-SHOSAKU, T. et al. Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. **J Physiol**, v. 584, n. Pt 2, p. 407-18, Oct 15 2007. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17615096 >.

OTANI, S. et al. Dopaminergic modulation of long-term synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. **Cereb Cortex**, v. 13, n. 11, p. 1251-6, Nov 2003. ISSN 1047-3211 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14576216 >.

OVSEPIAN, S. V.; ANWYL, R.; ROWAN, M. J. Endogenous acetylcholine lowers the threshold for long-term potentiation induction in the CA1 area through muscarinic receptor activation: in vivo study. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 5, p. 1267-75, Sep 2004. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15341598 >.

- PARADA, M. A. et al. Selective action of acute systemic clozapine on acetylcholine release in the rat prefrontal cortex by reference to the nucleus accumbens and striatum. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 281, n. 1, p. 582-8, Apr 1997. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9103547 >.
- PASSETTI, F. et al. Increased acetylcholine release in the rat medial prefrontal cortex during performance of a visual attentional task. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 3051-8, Aug 2000. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10971646 >.
- PATIL, M. M. et al. Cholinergic agonist carbachol enables associative long-term potentiation in piriform cortex slices. **J Neurophysiol**, v. 80, n. 5, p. 2467-74, Nov 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9819256 >.
- PEINEAU, S. et al. The role of GSK-3 in synaptic plasticity. **Br J Pharmacol**, v. 153 Suppl 1, p. S428-37, Mar 2008. ISSN 0007-1188 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18311157 >.
- _____. A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor-dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. **Mol Brain**, v. 2, n. 1, p. 22, 2009. ISSN 1756-6606 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19583853 >.
- PERRY, E. et al. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? **Trends Neurosci**, v. 22, n. 6, p. 273-80, Jun 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10354606 >.
- PEYRACHE, A. et al. Replay of rule-learning related neural patterns in the prefrontal cortex during sleep. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 919-26, Jul 2009. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19483687 >.
- POMAROL-CLOTET, E. et al. Failure to deactivate in the prefrontal cortex in schizophrenia: dysfunction of the default mode network? **Psychol Med**, v. 38, n. 8, p. 1185-93, Aug 2008. ISSN 0033-2917 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18507885 >.
- POWER, A. E.; VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J. L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. **Neurobiol Learn Mem**, v. 80, n. 3, p. 178-93, Nov 2003. ISSN 1074-7427 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14521862 >.
- RAGOZZINO, M. E.; KESNER, R. P. The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and Prelimbic/Infralimbic cortices on spatial working memory. **Neurobiol Learn Mem**,

v. 69, n. 3, p. 241-57, May 1998. ISSN 1074-7427 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9707488 >.

RASCH, B.; GAIS, S.; BORN, J. Impaired off-line consolidation of motor memories after combined blockade of cholinergic receptors during REM sleep-rich sleep. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 7, p. 1843-53, Jun 2009. ISSN 1470-634X (Electronic) 0006-3223 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19194375 >.

RASMUSSE, D. D. The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. **Behav Brain Res**, v. 115, n. 2, p. 205-18, Nov 2000. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11000421 >.

RIBEIRO, S. et al. Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. **PLoS Biol**, v. 2, n. 1, p. E24, Jan 2004. ISSN 1545-7885 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14737198 >.

_____. Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. **J Neurosci**, v. 22, n. 24, p. 10914-23, Dec 15 2002. ISSN 1529-2401 (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12486186 >.

_____. Novel Experience Induces Persistent Sleep-Dependent Plasticity in the Cortex but not in the Hippocampus. **Front Neurosci**, v. 1, n. 1, p. 43-55, Nov 2007. ISSN 1662-453X (Electronic). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18982118 >.

RISSE, G. L. Cognitive outcomes in patients with frontal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 47 Suppl 2, p. 87-9, 2006. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17105471 >.

ROH, M. S. et al. Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex. **Exp Mol Med**, v. 39, n. 3, p. 353-60, Jun 30 2007. ISSN 1226-3613 (Print) 1226-3613 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17603289 >.

ROMCY-PEREIRA, R.; PAVLIDES, C. Distinct modulatory effects of sleep on the maintenance of hippocampal and medial prefrontal cortex LTP. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 12, p. 3453-62, Dec 2004. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15610178 >.

ROMCY-PEREIRA, R. N. et al. Sleep-dependent gene expression in the hippocampus and prefrontal cortex following long-term potentiation. **Physiol Behav**, v. 98, n. 1-2, p. 44-52, Aug 4 2009. ISSN 1873-

507X (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19389414 >.

RUNYAN, J. D.; MOORE, A. N.; DASH, P. K. A role for prefrontal calcium-sensitive protein phosphatase and kinase activities in working memory. **Learn Mem**, v. 12, n. 2, p. 103-10, Mar-Apr 2005. ISSN 1072-0502 (Print)

1072-0502 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15805309 >.

RUSHLOW, W. J. et al. Antipsychotics affect multiple calcium calmodulin dependent proteins.

Neuroscience, v. 161, n. 3, p. 877-86, Jul 7 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19289156 >.

RUSNAK, F.; MERTZ, P. Calcineurin: form and function. **Physiol Rev**, v. 80, n. 4, p. 1483-521, Oct 2000.

ISSN 0031-9333 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11015619 >.

SANCHEZ, G. et al. M4 muscarinic receptors are involved in modulation of neurotransmission at synapses of Schaffer collaterals on CA1 hippocampal neurons in rats. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 3, p. 691-700, Feb 15 2009. ISSN 1097-4547 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18816796 >.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J Neurol**

Neurosurg Psychiatry, v. 20, n. 1, p. 11-21, Feb 1957. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13406589 >.

_____. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. **J Neuropsychiatry Clin**

Neurosci, v. 12, n. 1, p. 103-13, Winter 2000. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10678523 >.

SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. **Behav Neurosci**, v. 109, n. 6, p. 1063-73, Dec 1995. ISSN 0735-7044 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8748957 >.

SELLIN, A. K.; SHAD, M.; TAMMINGA, C. Muscarinic agonists for the treatment of cognition in schizophrenia. **CNS Spectr**, v. 13, n. 11, p. 985-96, Nov 2008. ISSN 1092-8529 (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19037177 >.

SHANNON, H. E. et al. Muscarinic receptor agonists, like dopamine receptor antagonist antipsychotics, inhibit conditioned avoidance response in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 290, n. 2, p. 901-7, Aug 1999. ISSN 0022-3565 (Print)

0022-3565 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10411607 >.

SHINOE, T. et al. Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. **J Neurosci**, v. 25, n. 48, p. 11194-200, Nov 30 2005. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16319319 >.

SIROTA, A. et al. Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 2065-9, Feb 18 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12576550 >.

SJOSTROM, P. J.; TURRIGIANO, G. G.; NELSON, S. B. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. **Neuron**, v. 39, n. 4, p. 641-54, Aug 14 2003. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12925278 >.

SOKOLOV, M. V.; KLESCHEVNIKOV, A. M. Atropine suppresses associative LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. **Brain Res**, v. 672, n. 1-2, p. 281-4, Feb 20 1995. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7749748 >.

SQUIRE, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychol Rev**, v. 99, n. 2, p. 195-231, Apr 1992. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1594723 >.

SQUIRE, L. R.; STARK, C. E.; CLARK, R. E. The medial temporal lobe. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 279-306, 2004. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15217334 >.

STERPENICH, V. et al. Sleep-related hippocampo-cortical interplay during emotional memory recollection. **PLoS Biol**, v. 5, n. 11, p. e282, Oct 23 2007. ISSN 1545-7885 (Electronic)

1544-9173 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17958471 >.

TAKASHIMA, A. et al. Shift from hippocampal to neocortical centered retrieval network with consolidation. **J Neurosci**, v. 29, n. 32, p. 10087-93, Aug 12 2009. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19675242 >.

TAKITA, M. et al. Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 11, p. 4145-8, Nov 1999. ISSN 0953-816X (Print). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10583503 >.

TAKUMI, Y. et al. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 7, p. 618-24, Jul 1999. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10409387 >.

TEJADA, S. et al. Electroencephalogram functional connectivity between rat hippocampus and cortex after pilocarpine treatment. **Neuroscience**, Oct 22 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19853646 >.

TORII, N. et al. An inhibitor for calcineurin, FK506, blocks induction of long-term depression in rat visual cortex. **Neurosci Lett**, v. 185, n. 1, p. 1-4, Feb 6 1995. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7537357 >.

TOUMANE, A. et al. Differential hippocampal and cortical cholinergic activation during the acquisition, retention, reversal and extinction of a spatial discrimination in an 8-arm radial maze by mice. **Behav Brain Res**, v. 30, n. 3, p. 225-34, Oct 1988. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3178994 >.

TOYODA, H. et al. Long-term depression requires postsynaptic AMPA GluR2 receptor in adult mouse cingulate cortex. **J Cell Physiol**, v. 211, n. 2, p. 336-43, May 2007. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17149707 >.

TSANOV, M.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Synaptic plasticity from visual cortex to hippocampus: systems integration in spatial information processing. **Neuroscientist**, v. 14, n. 6, p. 584-97, Dec 2008. ISSN 1073-8584 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18612086 >.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Prog Neurobiol**, v. 58, n. 5, p. 409-71, Aug 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10380240 >.

VAN KOPPEN, C. J.; KAISER, B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. **Pharmacol Ther**, v. 98, n. 2, p. 197-220, May 2003. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12725869 >.

VAZQUEZ, J.; BAGHDOYAN, H. A. Basal forebrain acetylcholine release during REM sleep is significantly greater than during waking. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 2, p. R598-601, Feb 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11208592 >.

VERTES, R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 1-20, Sep 29 2006. ISSN 0306-4522 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16887277 >.

WANG, J. H.; KELLY, P. T. The balance between postsynaptic Ca(2+)-dependent protein kinase and phosphatase activities controlling synaptic strength. **Learn Mem**, v. 3, n. 2-3, p. 170-81, Sep-Oct 1996. ISSN 1072-0502 (Print)

1072-0502 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10456087 >.

WANG, L.; YUAN, L. L. Activation of M2 muscarinic receptors leads to sustained suppression of hippocampal transmission in the medial prefrontal cortex. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 21, p. 5139-47, Nov 1 2009. ISSN 1469-7793 (Electronic)

0022-3751 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19752120 >.

WARBURTON, E. C. et al. Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. **Neuron**, v. 38, n. 6, p. 987-96, Jun 19 2003. ISSN 0896-6273 (Print). Disponível em:

<

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12818183 >.

WEI, J. et al. m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. **J Neurochem**, v. 63, n. 3, p. 815-21, Sep 1994. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7519660 >.

WHITFIELD-GABRIELI, S. et al. Hyperactivity and hyperconnectivity of the default network in schizophrenia and in first-degree relatives of persons with schizophrenia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 4, p. 1279-84, Jan 27 2009. ISSN 1091-6490 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19164577 >.

WHITLOCK, J. R. et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1093-7, Aug 25 2006. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16931756 >.

WIERZYNSKI, C. M. et al. State-dependent spike-timing relationships between hippocampal and prefrontal circuits during sleep. **Neuron**, v. 61, n. 4, p. 587-96, Feb 26 2009. ISSN 1097-4199 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19249278 >.

YOON, T. et al. Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. **Learn Mem**, v. 15, n. 3, p. 97-105, Mar 2008. ISSN 1549-5485 (Electronic). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18285468 >.

ZAKHARENKO, S. S.; ZABLOW, L.; SIEGELBAUM, S. A. Altered presynaptic vesicle release and cycling during mGluR-dependent LTD. **Neuron**, v. 35, n. 6, p. 1099-110, Sep 12 2002. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12354399 >.

ZENG, H. et al. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. **Cell**, v. 107, n. 5, p. 617-29, Nov 30 2001. ISSN 0092-8674 (Print)

0092-8674 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1733061>.

ZHOU, Q.; HOMMA, K. J.; POO, M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. **Neuron**, v. 44, n. 5, p. 749-57, Dec 2 2004. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15572107>.

8. ANEXO

MUSCARINIC ACETYLCHOLINE NEUROTRANSMISSION ENHANCES THE LATE-PHASE OF LONG-TERM POTENTIATION IN THE HIPPOCAMPAL–PREFRONTAL CORTEX PATHWAY OF RATS *IN VIVO*: A POSSIBLE INVOLVEMENT OF MONOAMINERGIC SYSTEMS

C. LOPES AGUIAR,^{a1} R. NEVES ROMCY-PEREIRA,^{a1*} R. ESCORSIM SZAWKA,^b O. YINETH GALVIS-ALONSO,^c J. APARECIDA ANSELMO-FRANCI^b AND J. PEREIRA LEITE^a

^aDepartment of Neurology, Psychiatry and Medical Psychology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

^bRibeirão Preto School of Odontology, University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

^cDepartment of Molecular Biology, São José do Rio Preto School of Medicine, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, São José do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil

Abstract—The prefrontal cortex is continuously required for working memory processing during wakefulness, but is particularly hypoactivated during sleep and in psychiatric disorders such as schizophrenia. Ammon's horn CA1 hippocampus subfield (CA1) afferents provide a functional modulatory path that is subjected to synaptic plasticity and a prominent monoaminergic influence. However, little is known about the muscarinic cholinergic effects on prefrontal synapses. Here, we investigated the effects of the muscarinic agonist, pilocarpine (PILO), on the induction and maintenance of CA1-medial prefrontal cortex (mPFC) long-term potentiation (LTP) as well as on brain monoamine levels. Field evoked responses were recorded in urethane-anesthetized rats during baseline (50 min) and after LTP (130 min), and compared with controls. LTP was induced 20 min after PILO administration (15 mg/kg, i.p.) or vehicle (NaCl 0.15 M, i.p.). In a separate group of animals, the hippocampus and mPFC were microdissected 20 min after PILO injection and used to quantify monoamine levels. Our results show that PILO potentiates the late-phase of mPFC LTP without affecting either post-tetanic potentiation or early LTP (20 min). This effect was correlated with a significant decrease in relative delta (1–4 Hz) power and an increase in sigma (10–15 Hz) and gamma (25–40 Hz) powers in CA1. Monoamine levels were specifically altered in the mPFC. We observed a decrease in dopamine, 5-HT, 5-hydroxyindolacetic acid and noradrenaline levels, with no changes in 3,4-hydroxyphenylacetic acid levels. Our data, therefore, suggest that muscarinic activation exerts a boosting effect on mPFC synaptic plasticity and possibly on mPFC-dependent memories, associated to monoaminergic changes. © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

¹ Authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. Tel: +55-16-3602-2556 or +55-16-3602-4535. E-mail address: rnpereira@gmail.com (R. Neves Romcy-Pereira). **Abbreviations:** CA1, Ammon's horn CA1 hippocampus subfield; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; fPSP, field post-synaptic potential; HPLC-ED, high-performance liquid chromatography with electrochemical detection; LFP, local field potential; LTP, long-term potentiation; mEsc, methyl-scopolamine; mPFC, medial prefrontal cortex; PILO, pilocarpine; REM, rapid-eye movement; 5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acetic acid.

0306-4522/08/\$32.00+0.00 © 2008 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.040

Key words: prefrontal cortex, hippocampus, synaptic plasticity, long-term potentiation, acetylcholine, monoamines.

The hippocampus plays an essential role in the establishment of declarative memories encoding context representations of emotional and non-emotional experiences (Scoville and Milner, 1957; Squire, 1992; Fanselow, 2000). Mnemonic information processed in its circuitry has two direct cortical outputs: the entorhinal cortex and the prefrontal cortex (Swanson and Cowan, 1977; Swanson, 1981; Ferino et al., 1987; Jay et al., 1989; Jay and Witter, 1991; Caballero-Bleda and Witter, 1994; Barbas and Blatt, 1995; Witter and Amaral, 2004). The prefrontal cortex, in particular, lies on a privileged position to access online information from the thalamus and primary sensory cortices, body-state inputs from the brainstem and memory traces encoded by the hippocampus (Groenewegen and Uylings, 2000; Dalley et al., 2004; Vertes, 2006). In fact, this particular merging of information in the prefrontal cortex is thought to be essential to the development of adaptive behavioral strategies and prospective plans in rodents, macaques and humans (Fuster, 1973; Funahashi et al., 1989; Goldman-Rakic, 1995, 1996; Vertes, 2006). Moreover, both the hippocampus and the prefrontal cortex are implicated in the expression of several psychiatric disorders such as schizophrenia, bipolar disorder and major depression, in which neurotransmitter unbalances are observed (Goldman-Rakic, 1999; Lyons, 2002).

The cholinergic system is an important modulator of memory performance involving the hippocampus and the prefrontal cortex (Hasselmo, 1999; Gu, 2002; Chudasama et al., 2004; Dalley et al., 2004). Cholinergic neurons from the septum project to the hippocampus, whereas neurons in the basal forebrain and laterodorsal tegmental nucleus project to the medial prefrontal cortex (mPFC) (McKinney et al., 1983; Mayo et al., 1984; Satoh and Fibiger, 1986). The activity of cholinergic neurons is distinctively regulated across the sleep–wake cycle, showing higher levels during rapid-eye movement (REM) sleep, attention-demanding tasks and learning, but reduced levels during slow-wave sleep and quiet wakefulness (Detari et al., 1984). Besides, the cognitive decline observed in Alzheimer's disease, schizophrenia and normal aging is known to be associated with a reduction of cholinergic activity in subcortical and cortical brain regions (Giacobini, 1990; Barnes et al., 2000; Messer, 2002; Dunbar and Kuchibhatla, 2006).

Several studies have shown that monosynaptic projections from both the dorsal and ventral Ammon's horn CA1 hippocampus subfield (CA1) to the mPFC can undergo paired-pulse facilitation, long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Laroche et al., 1990; Jay et al., 1995; Takita et al., 1999; Izaki et al., 2002; Kawashima et al., 2006). A number of reports have also demonstrated that mPFC synaptic plasticity is modulated by glutamatergic, dopaminergic and serotonergic neurotransmission and can be altered by drugs such as cocaine and clozapine (Gurden et al., 1999; Ohashi et al., 2002; Gemperle and Olpe, 2004; Jay et al., 2004; Dupin et al., 2006; Chen et al., 2007; Huang et al., 2007). Although much effort has been focused on the monoaminergic control of CA1-mPFC synaptic plasticity, very little is known about the cholinergic modulation and its implications to psychiatric disorders and learning. Recently, Couey et al. (2007) showed that nicotine increases the threshold for spike-timing-dependent potentiation in layer V pyramidal neurons of the prefrontal cortex. In addition, we have found indirect evidence for the involvement of the cholinergic system in the bimodal regulation of hippocampal and prefrontal cortical synaptic plasticity. We observed that short-term (4 h) REM sleep deprivation impairs the late-phase maintenance of LTP in the hippocampus but prolongs it in the projections from the posterior dorsal CA1 to the prefrontal cortex (Romcy-Pereira and Pavlides, 2004). Such changes could underlie memory impairments after REM sleep deprivation, since both the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex have prominent roles in spatial memory processing. In the present study, therefore, we investigated the effects of the muscarinic cholinergic agonist, pilocarpine (PILO), on the induction and maintenance of LTP in the projections from the posterior dorsal CA1 to the mPFC, as well as its influence on monoamine levels in the hippocampus and prefrontal cortex. In order to monitor the effects of PILO on brain activity before and after LTP, we also analyzed the oscillatory patterns of the hippocampus and mPFC after drug administration. Our results show that PILO prolongs the maintenance of CA1-mPFC plasticity *in vivo* but has no effect on its induction. This modulatory function is accompanied by a clear change in the spectral composition of CA1 and mPFC neuronal oscillations toward high frequencies (>10 Hz). Besides, PILO administration specifically changes monoamine levels in the mPFC, without affecting their levels in the hippocampus.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Subjects

Forty-two male Wistar rats (250–450 g) were housed in standard rodent cages in a vivarium maintained at 24 °C under a 12-h light/dark cycle with lights on at 07:00 h. Food and water were freely available during all phases of the experiment. All procedures were performed according to the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) guidelines for animal research, affiliated with the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), and approved by the Ethical Commission at the University of São Paulo. Experiments were designed to minimize the number of animals used and their suffering.

Electrode implants and LTP

Rats were anesthetized with urethane (1.2–1.5 g/kg, i.p., in NaCl 0.15 M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and placed in a stereotaxic frame for the implant of electrodes with body temperature maintained at 37 ± 0.5 °C by using a heating pad. The level of anesthesia was maintained stable by supplementary doses of anesthetic (30% of the initial dose) after checking the tail pinch reflex, respiratory rate and EEG signals. In brief, the skull was exposed and small holes drilled on it to allow access to the mPFC (3.0 mm anterior to bregma, 0.5 mm lateral to midline and 3.2 mm ventral to dura mater) and CA1 (5.7 mm anterior to bregma, 4.6 mm lateral to midline and 2.5 mm ventral to dura mater), according to Paxinos and Watson (1998). Teflon-insulated tungsten wires (60 μ m diameter; A-M Systems, Carlsborg, WA, USA) were used to prepare electrodes, which were lowered into the brain through holes made on the skull after removing the dura mater. A twisted bipolar electrode (tip separation 500 μ m) was used for constant current stimulation of CA1 and a monopolar electrode was used to record field post-synaptic potentials (fPSP) in the mPFC. A micro-screw was implanted over the parietal cortex and served as the recording ground. The final position of the electrodes was adjusted to obtain the highest negative-going response in the mPFC with latency to the first negative peak around 18 ms and amplitude of at least 250 μ V (Laroche et al., 1990; Jay et al., 1995). Monophasic test pulses of 200 ms were delivered every 20 s at increasing intensities (60–500 μ A) and used to plot input–output curves. Based on input–output curves, we calculated the minimum intensity necessary to produce maximum mPFC responses and used 50% of this intensity to stimulate CA1 during baseline, LTP and post LTP recordings. Baseline was recorded using test pulses (200 μ s duration; every 20 s) for 50 min before LTP induction and was followed by continuous fPSP recordings for additional 130 min (every 20 s). LTP was induced by tetanic stimulation of CA1-mPFC projections with two series of 10 trains (50 pulses at 250 Hz, 200 ms duration) every 10 s, 10 min apart from each other (Romcy-Pereira and Pavlides, 2004). Prefrontal fPSPs were amplified and filtered ($\times 100$, 0.3–10 kHz; P55-AC pre-amplifier, Grass Instruments Co., West Warwick, RI, USA) before digitization at 4 kHz (PowerLab/16S, ADInstruments, Colorado Springs, CO, USA). Constant current square pulses used throughout the experiments were delivered through an S88 stimulator (Grass Instruments Co.).

Experimental paradigm

In order to investigate the cholinergic modulation of mPFC synaptic plasticity, rats were grouped according to drug treatment during baseline recordings. (1) Veh-Veh animals received two injections of vehicle (Veh; NaCl 0.15M, i.p.), one at 10 min and one at 30 min after baseline recording onset; (2) methyl-scopolamine (mEsc) –Veh animals received an injection of the peripherally specific muscarinic antagonist mEsc (15 mg/kg, i.p., in NaCl 0.15 M; Sigma-Aldrich) at 10 min and an injection of vehicle at 30 min after baseline recording onset, and (3) mEsc-PILO animals received an injection of mEsc (15 mg/kg, i.p., in NaCl 0.15 M) at 10 min and an injection of the muscarinic agonist PILO (15 mg/kg, i.p., in NaCl 0.15 M; Sigma-Aldrich) at 30 min after baseline recording onset. Baseline recordings were identified as BL1: 0–10 min; BL2: 10–30 min and BL3: 30–50 min. Since, mEsc is a muscarinic antagonist that does not cross the blood–brain barrier (Hughes, 1982; van Haaren and van Hest, 1989), mEsc pretreatment prevented the peripheral actions of PILO, such as lethal parasympathetic effects even at the low doses (1 mg/kg) during urethane anesthesia. After tetanization, LTP was calculated as percentage of baseline levels measured during the first 50 min for Veh-Veh and mEsc-PILO groups, or during the last 20 min of baseline for mEsc-Veh group. Differences in baseline and LTP decay were evaluated by comparing 10-min segments of aver-

aged fPSP amplitude values across baselines and between different time-points after LTP induction for all groups.

Local field potential (LFP) recordings

In order to monitor the brain activation state associated to the cholinergic modulation, we recorded LFPs (or deep EEG) in CA1 and mPFC throughout the experiment, from the same electrodes used to induce and record LTP. LFPs were amplified and filtered ($\times 100$, 0.3–300 Hz; P55-AC pre-amplifier, Grass Instruments Co.) before digitization at 1 kHz (PowerLab/16S, ADInstruments). They were recorded at several time points during the LTP paradigm: (1) before Veh or mEsc, at BL1; (2) before Veh or PILO, at BL2; (3) before LTP induction, at BL3 and (4) 10 min after LTP induction. For each animal, power spectra were calculated on 10 s-epoch LFPs at all four time-points. Delta (1–4 Hz), theta (4–10 Hz), sigma (10–15 Hz) and gamma (25–40 Hz) relative powers were calculated and compared across the time to evaluate the effect of mEsc and PILO injections on CA1 and mPFC oscillations. After the electrophysiological procedures, a brief current pulse (1 mA/1 s) was delivered through the stimulating and recording electrodes to mark their tip placements.

Brain micro-dissections

Three new groups of animals were prepared for monoamine quantification. Rats were anesthetized with urethane (1.2–1.5 g/kg, i.p., in NaCl 0.15 M) and received an injection of either Veh or mEsc (15 mg/kg, i.p., in NaCl 0.15 M) 1 h later. After 20 min, they received an injection of either Veh or PILO (15 mg/kg, i.p., in NaCl 0.15 M) and were quickly decapitated 20 min later. All rats were treated in a similar way as the animals used for electrophysiology, including urethane anesthesia and the timing for drug injection and decapitation. After decapitation, the brains were removed, immediately frozen on dry ice and labeled as Veh-Veh, mEsc-Veh or mEsc-PILO, according to drug treatment. They were stored at -70°C until sectioning.

Thick coronal brain sections were cut in cryostat set to -10°C with controlled micrometric advance of the specimen (Microm HM 505, Mikron Instruments Inc., San Marcos, CA, USA). According to rat brain atlas, three 1000 μm thick sections were sliced from the frozen brain and mounted onto chilled glass for micro-dissection with a 1.0-mm diameter needle by the punch technique (Palkovits, 1973; Paxinos and Watson, 1998). Hippocampal and mPFC punches were collected from the posterior dorsal CA1 and prelimbic mPFC regions, corresponding to the stimulating and recording sites used in the LTP experiment, respectively. Parietal cortex punches were also obtained and used as a control. The mPFC was dissected from a first section extending from 3.7–2.7 mm anterior to bregma, in two punches vertically placed between 3.0 and 5.0 mm ventral from dura mater. The parietal cortex was dissected from a second section, extending from 1.8–2.8 mm posterior to bregma, in two punches placed laterally at 2.0 and 4.0 mm ventral from dura mater. The dorsal posterior CA1 region was dissected from a third section, extending from 4.8–5.8 posterior to bregma, in two punches placed laterally at 2.6 and 2.8 mm ventral from dura mater. With a micro-ultrasonic cell disrupter, punches were homogenized in a solution containing 0.2 M perchloric acid (Merck, Darmstadt, Germany), 0.1 mM EDTA (Merck) and 8 ng/mL of 3,4-dihydroxybenzylamine (Aldrich, Milwaukee, WI, USA). The homogenates were centrifuged for 20 min at $12,000\times g$. The supernatant was removed, filtered through a 0.22- μm filter (Millex PVDF, Millipore, Belford, MA, USA) and placed into auto-injector vials. Protein content was determined in the remaining pellet by the Bradford method (Bradford, 1976).

High-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED)

Tissue concentrations of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 5-HT, 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) and noradrenaline were measured by HPLC-ED. Fifty microliters of each sample were injected by an auto injector (SIL-10Advp, Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation was performed at 35°C on a $250\times 4\text{-mm}$ reversed-phase C18 column (Purospher Star, 5 μm , Merck), preceded by a $4\times 4\text{-mm}$ C18 guard column (Lichrospher, 5 μm , Merck). The mobile phase consisted of 100 mM sodium dihydrogen phosphate monohydrate, 10 mM sodium chloride, 0.1 mM EDTA, 0.20 mM sodium 1-octanesulfonic acid (Sigma-Aldrich) and 15% methanol (Merck). The pH was adjusted to 3.5 with phosphoric acid. The flow rate was set at 0.6 mL/min, pumped by a dual piston pump (LC-10Advp, Shimadzu). The detector potential was 0.60 V versus *in situ* Ag/AgCl (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden, Netherlands). Chromatographic data were plotted using Class-VP software (Shimadzu). Noradrenaline, dopamine, DOPAC, 5-HT and 5-HIAA were identified by their peak retention time and quantified by the internal standard method based on the area under the peak. Intra and inter-assay coefficients of variation were less than 5% and 8%, respectively, for all measured compounds. Neurotransmitter levels (dopamine, 5-HT and noradrenaline) were considered to estimate neurotransmitter stocks in synaptic vesicles, whereas dopamine and 5-HT metabolites (DOPAC and 5-HIAA, respectively) were considered to reflect the amount of transmitter released in the samples. Metabolite to neurotransmitter ratio (DOPAC/dopamine and 5-HIAA/5-HT) was taken as a measure of neurotransmitter turnover.

Histology for electrode positioning determination

After electrolytic lesions at CA1 and mPFC electrode tip positions, the animals received an additional dose of urethane (0.5 g/kg, i.p. in NaCl 0.15 M) and were transcardiacally perfused with 100 ml of NaCl 0.15 M followed by 250 ml of 10% formaldehyde in NaCl 0.15 M. Their brains were removed, post-fixed in the formaldehyde solution for 14 h at 4°C and cryoprotected for 48 h in 20% sucrose solution. After freezing in dry ice-chilled isopentane, brains were cut in 30 mm slices, mounted on gelatinized slides and processed for Cresyl Violet staining. Electrode tip positions were determined after analysis of the slides under the microscope using bright field (BX-60 Olympus, Center Valley, PA, USA).

Statistical analysis

The analysis of group differences after CA1-mPFC LTP was carried out using a mixed model two-way ANOVA for repeated measures (group: fixed factor vs. time: repeated measures). Baseline fPSP data and power spectrum differences in the mPFC and CA1 were analyzed using one-way ANOVA for repeated measures in each group. Monoamine level differences were evaluated using one-way ANOVA. Newman-Keuls post hoc tests were used following ANOVAs when necessary. The results are expressed as mean \pm S.E.M. (standard error of the mean) and significance level was set to $P < 0.05$.

RESULTS

Effects of PILO on hippocampo–prefrontal cortex LTP and brain oscillations

All animals included in our analysis had the stimulating electrode positioned in the dorsal aspect of the temporal CA1 subfield of the hippocampus and the recording electrode positioned in the medial wall of the prefrontal cortex,

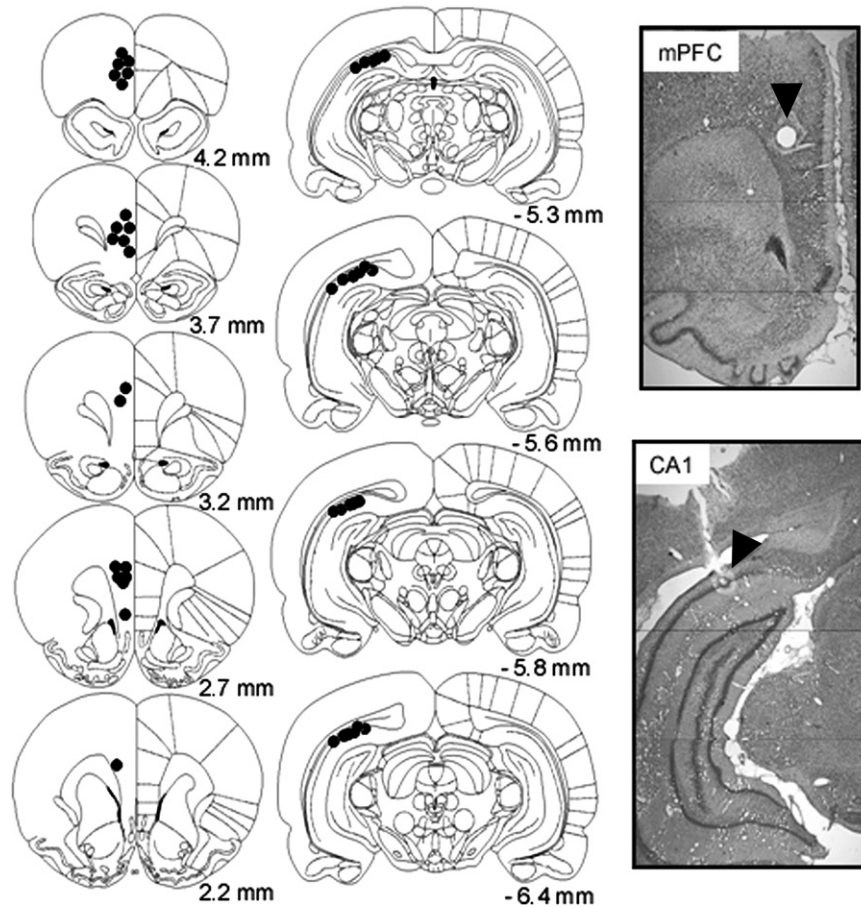


Fig. 1. Electrode placement. Left, schematic representation of final electrode positions in the mPFC and CA1. Right, a typical lesion at electrode tips in the mPFC and hippocampal histological sections. Antero-posterior coordinates are shown in relation to bregma.

most of the time corresponding to the prelimbic area of the mPFC (Fig. 1). Reliable field evoked responses in the mPFC were obtained after CA1 stimulation and consisted of a negative deflection with average latency of 16.8 ± 0.6 ms, amplitude of $250\text{--}400 \mu\text{A}$ and slope of $-37.5 \pm 2.4 \mu\text{V/ms}$. They were consistent with mPFC fPSPs previously reported in the literature and a result of hippocampal monosynaptic projections to the mPFC (Laroche et al., 1990; Degenetais et al., 2003; Romcy-Pereira and Pavlides, 2004).

As shown in the experimental schedule of Fig. 2 (Fig. 2A), baseline fPSPs were recorded during BL1 (before mEsc), BL2 (before PILO) and BL3 (after PILO) and compared within each group in order to monitor mEsc and PILO effects on basal mPFC responses. Veh-Veh and mEsc-PILO animals did not show any difference across baselines (fPSP amplitude: Veh-Veh, $F_{(2,7)}=3.15$, $P>0.05$, mEsc-PILO, $F_{(2,12)}=0.34$, $P>0.05$). However, mEsc-Veh animals showed a slight increase in the amplitude of BL3 fPSPs when compared with BL1 (fPSP amplitude: $14.60 \pm 2.20\%$; $F_{(2,12)}=4.94$, $P<0.05$). For this reason, post-LTP-evoked responses in Veh-Veh and mEsc-PILO groups were normalized against the average of BL1, BL2 and BL3, while mEsc-Veh responses were normalized against BL3 values.

LTP in the mPFC was induced by the application of high frequency trains of stimulation to CA1 and was continuously monitored for 130 min. Fig. 2B shows the effect of PILO treatment on the late-phase of mPFC LTP. A significant group effect was observed in the evoked responses after tetanization (fPSP amplitude: $F_{(2,18)}=3.96$, $P<0.05$). Although similar levels of post-tetanic potentiation (at 0 min) were induced in all three groups (fPSP amplitude, $F_{(2,18)}=1.87$, $P>0.05$), LTP decayed faster in Veh-Veh and mEsc-Veh animals as compared with mEsc-PILO animals. In the mEsc-PILO group, evoked fPSPs were enhanced at 130 min after LTP induction when compared with mEsc-Veh group ($148.59 \pm 1.06\%$, mEsc-PILO vs. $122.42 \pm 3.32\%$, mEsc-Veh; $F_{(2,18)}=4.26$, $P<0.01$). No differences were observed in the fPSP amplitude when we compared Veh-Veh and mEsc-Veh animals, at any time-point after LTP induction.

LFPs were recorded in CA1 and mPFC in order to monitor their oscillatory patterns before and after PILO injection. Slow-wave oscillations in the delta band (1–4 Hz) were dominant throughout the experiment in Veh-Veh and mEsc-Veh animals, but they were reduced after PILO administration, particularly in the hippocampus (Fig. 3A, top panels). Twenty minutes after PILO injection (mEsc-PILO animals), the relative delta power in CA1 decreased

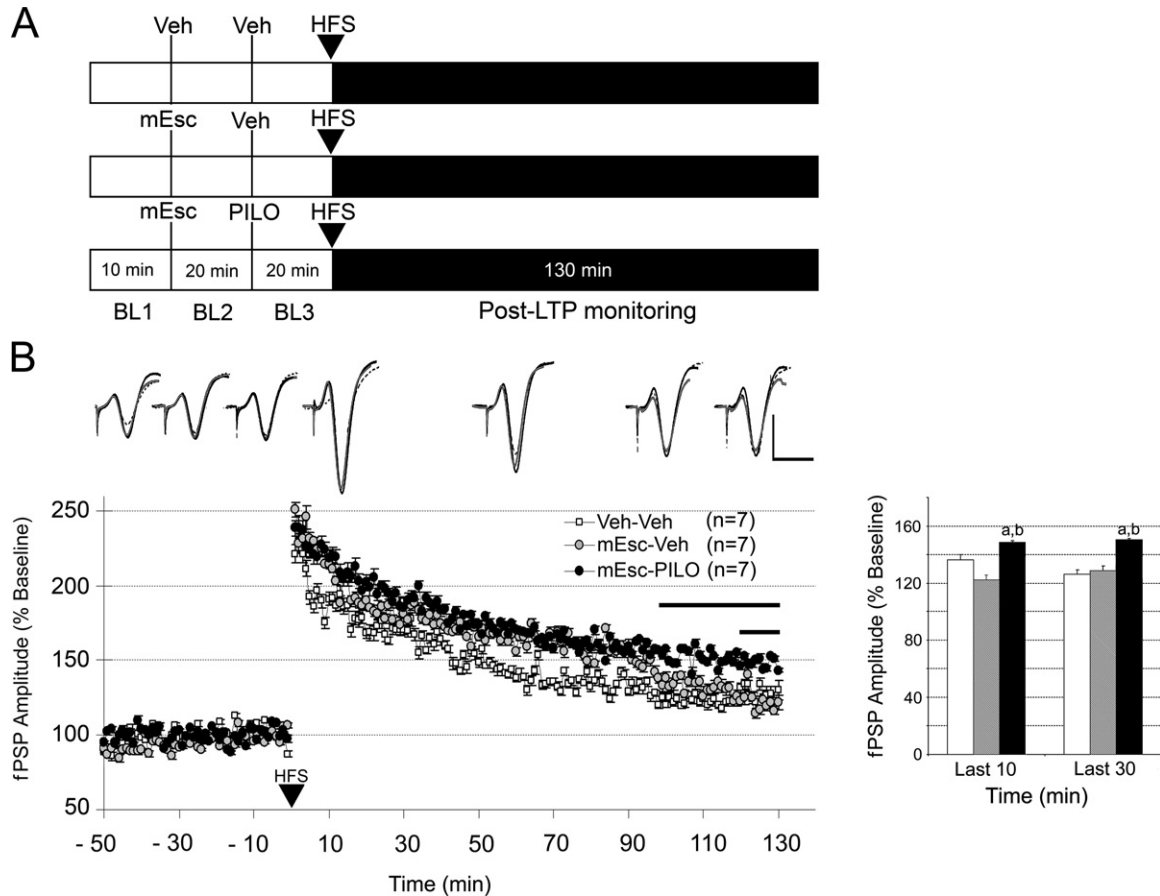


Fig. 2. Experimental paradigm and LTP. (A) Experimental paradigm. Evoked fPSP responses in the mPFC were recorded during baseline (BL1–BL3) and monitored for 130 min after CA1 tetanization (HFS). mEsc-PILO rats received mEsc (15 mg/kg, i.p.) followed by PILO (15 mg/kg, i.p.) before LTP induction. Control rats (Veh-Veh, mEsc-Veh) received sterile saline instead of PILO and mEsc. (B) LTP. PILO treatment did not affect LTP induction but significantly potentiated the late-phase of mPFC evoked fPSP amplitude after HFS. mEsc-PILO rats showed a significant enhancement of the amplitude of mPFC evoked responses 130 min after LTP induction compared with mEsc-Veh animals (see bar graph). Bar graphs show statistical differences in 10 min-epoch (short bar) and 30 min-epoch (long bar) recordings. Top tracings, representative fPSP responses in the mPFC after CA1 stimulation (dashed line, Veh-Veh; gray line, mEsc-Veh; black line, mEsc-PILO). Trace responses are aligned to the time scale in the x axis of the graph. Data shown as mean \pm S.E.M. Differences between experimental groups were determined by two-way ANOVA with repeated measures followed by Neuman-Keuls post hoc test: a $P < 0.05$ compared with mEsc-Veh; b $P < 0.05$ compared with Veh-Veh. Scale bars = 20 ms (horizontal), 250 mV (vertical).

approximately 35% ($74.87 \pm 10.71\%$ before PILO vs. $37.24 \pm 7.28\%$ after PILO; $F_{(3,12)} = 4.84$, $P < 0.05$) from pre-PILO levels. This pattern could still be observed after LTP induction. The desynchronization of CA1 neuronal activity could also be seen by the concurrent increase in theta, sigma and gamma relative powers (Fig. 3A, middle and lower panels). Significant increases in sigma ($\sim 100\%$; $3.36 \pm 1.47\%$ before PILO vs. $6.16 \pm 0.41\%$ after LTP; $F_{(3,12)} = 3.24$, $P < 0.05$) and gamma ($\sim 200\%$; $4.48 \pm 1.95\%$ before PILO vs. $15.70 \pm 1.80\%$ after PILO; $F_{(3,12)} = 7.73$, $P < 0.001$) powers were detected 20 min after PILO, which lasted at least until 10 min after LTP induction. Although less prominent than in CA1, the cholinergic activation of mPFC promoted a decreasing trend in delta power that was associated with an increasing trend in theta and a significant boosting in gamma power ($\sim 400\%$; $1.32 \pm 0.56\%$ before mEsc vs. $6.36 \pm 1.93\%$ after PILO; $F_{(3,12)} = 4.43$, $P < 0.05$) in the mPFC. We also detected small changes in sigma and gamma powers in the Veh-Veh group, which were proba-

bly related to the level of anesthesia at the moment of LFP recording. Importantly, mEsc did not affect EEG spectral composition in any frequency band analyzed. Fig. 3B shows illustrative examples of LFP segments recorded in the CA1 and mPFC of control and PILO-treated rats.

Effects of PILO on monoamine levels in CA1 and mPFC

Fig. 4A shows the experimental paradigm used to prepare animals for monoamine quantification. Dopamine, 5-HT, and their metabolites DOPAC and 5-HIAA, as well as noradrenaline, were quantified by HPLC-ED in mPFC, hippocampus and parietal cortex micro-dissections. Fig. 4B depicts the micro-dissection sites where samples were collected from Veh-Veh, mEsc-Veh and mEsc-PILO groups. Fig. 4C–E shows the results of monoamine quantification. In the mPFC, PILO injection promoted a decrease in dopamine (-43.6% ; $F_{(2,18)} = 3.95$, $P < 0.05$),

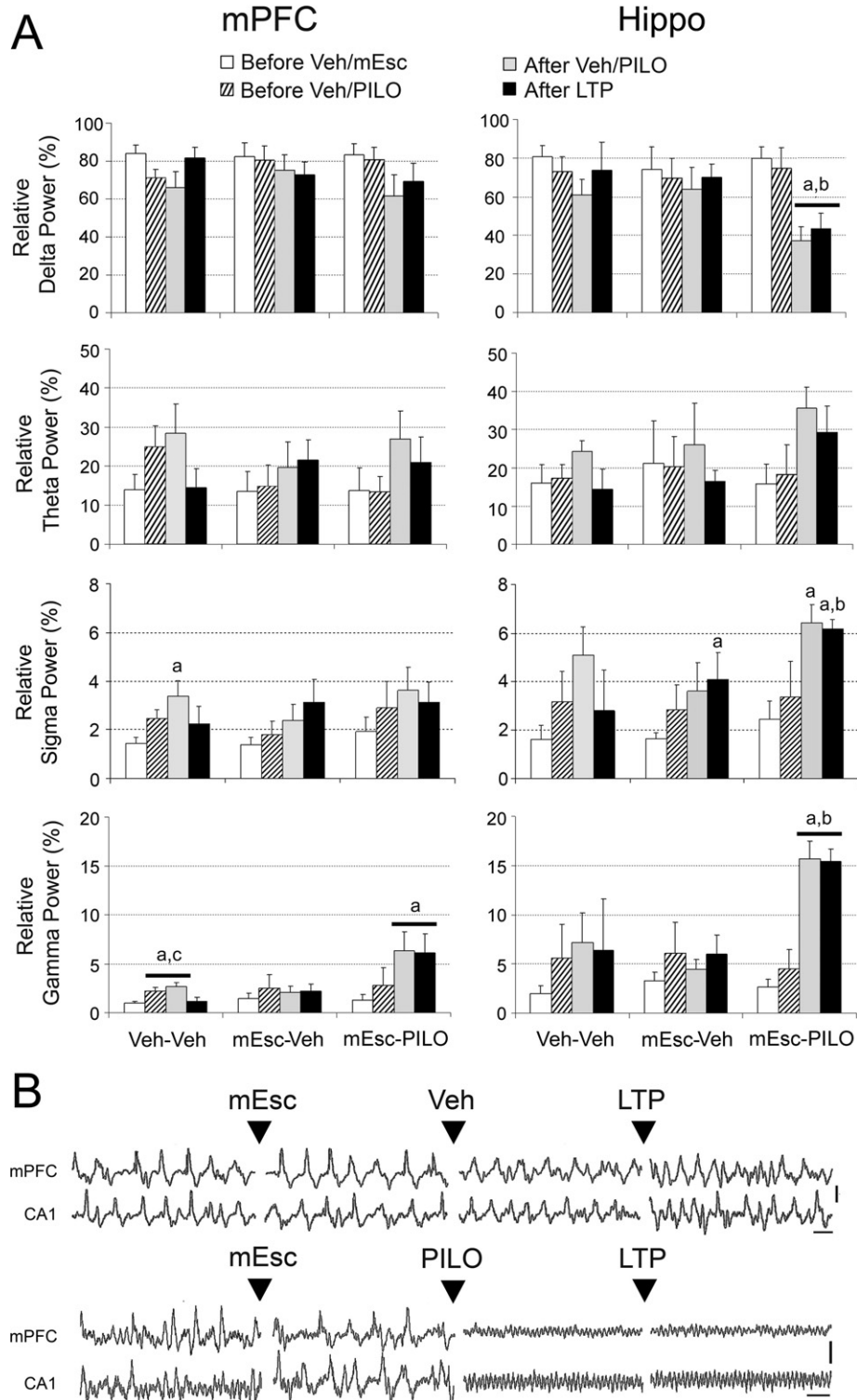


Fig. 3. Oscillatory brain activity after PILO treatment. (A) Relative power spectrum changes in CA1 and mPFC oscillations before and after drug treatment (see also Fig. 2A). Top, PILO injection significantly decreased delta (1–4 Hz) power in CA1 (–35%, $P < 0.05$) and set a trend toward reduction in the mPFC (mEsc-PILO group). mEsc did not affect delta oscillatory activity either in CA1 or mPFC (mEsc-Veh group). Middle-top, PILO produced a non-significant increase in theta (4–10 Hz) power in both areas. Middle-bottom, PILO significantly increased sigma (10–15 Hz) power in CA1, and promoted a similar trend toward augmentation in the mPFC. Drifts in sigma power were seen in the mPFC of Veh-Veh rats, and in CA1 of mEsc-Veh rats. Bottom, PILO strongly increased gamma (25–40 Hz) power in CA1 (+200%, $P < 0.05$) and mPFC (+400%, $P < 0.05$). Importantly, mEsc did not affect gamma oscillatory activity either in CA1 or mPFC. (B) Representative mPFC and CA1 EEG tracings from mEsc-Veh and mEsc-PILO animals. Data shown as mean \pm S.E.M. Differences between time-points were determined by one-way ANOVA with repeated measures followed by Neuman-Keuls post hoc test: a, $P < 0.05$ compared with before Veh/mEsc; b, $P < 0.05$ compared with before Veh-PILO. Scale bars=1 s (horizontal), 400 mV (vertical).

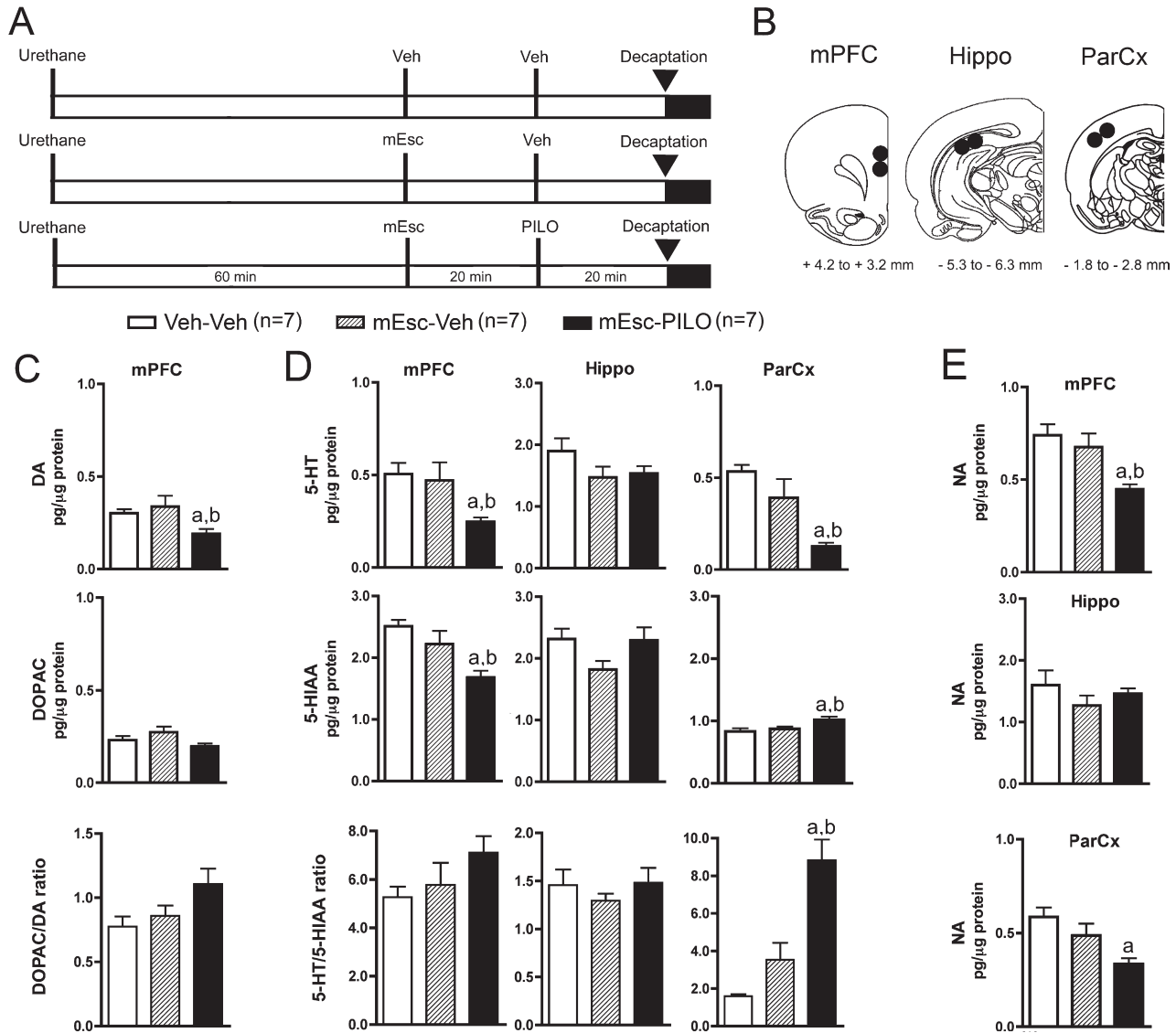


Fig. 4. Monoamine and metabolite levels in the mPFC, hippocampus and parietal cortex (ParCx) 20 min after PILO injection. (A) Rats were anesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p.) and received Veh, mEsc (15 mg/kg, i.p.) or PILO (15 mg/kg, i.p.) injections according to the paradigm. (B) Punch samples (1000 mm thick \times 1.0 mm diameter) from the mPFC, hippocampus and ParCx (control) were obtained and prepared for HPLC-ED quantification of DA, 5-HT, noradrenaline and metabolites. Antero-posterior coordinates are shown in relation to bregma. (C–E) DA, 5-HT and NA quantification results. Metabolite to neurotransmitter ratios for DA and 5-HT are shown in the lower graphs of C and D, respectively. Data are shown as mean \pm S.E.M. Differences between experimental groups were determined by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test. a $P < 0.05$ compared with Veh-Veh group; b $P < 0.05$ compared with mEsc-Veh group. DA levels in the hippocampus and ParCx were not quantified as they were below detection limit (approximately 20 pg). DA, dopamine; NA, noradrenaline.

5-HT (-47.2% ; $F_{(2,18)}=4.34$, $P < 0.05$), 5-HIAA (-24.3% ; $F_{(2,17)}=6.96$, $P < 0.01$) and noradrenaline (-33.6% ; $F_{(2,18)}=7.42$, $P < 0.01$) levels when compared with the control mEsc-Veh group. DOPAC levels were unchanged in the mPFC ($F_{(2,18)}=2.52$, $P=0.11$). As a result, dopamine turnover displayed a trend toward an increase in mEsc-PILO animals ($+27.9\%$ vs. mEsc-Veh; $F_{(2,18)}=3.30$, $P=0.06$) and 5-HT turnover did not change ($F_{(2,17)}=1.73$, $P=0.21$). In the hippocampus, on the other hand, we did not detect any change in 5-HT, 5-HIAA or noradrenaline levels (ANOVA, $P > 0.05$). PILO also did not alter 5-HT turnover in the hippocampus ($F_{(2,18)}=0.56$, $P=0.58$). Do-

pamine and DOPAC levels were below the assay detection limit (approximately 20 pg). In the parietal cortex, however, PILO induced a distinct pattern of neurochemical changes from that observed in the mPFC. There was a reduction in 5-HT (-67.5% ; $F_{(2,17)}=9.13$, $P < 0.01$) and noradrenaline (-31.2% ; $F_{(2,17)}=5.72$, $P < 0.05$) levels, and an increase in 5-HIAA ($+16.9\%$; $F_{(2,17)}=4.54$, $P < 0.05$) as compared with mEsc-Veh animals. PILO also significantly increased 5-HT turnover as compared with controls ($+250.1\%$ vs. mEsc-Veh, $+555.3\%$ vs. Veh-Veh; $F_{(2,17)}=21.00$, $P < 0.001$). Dopamine and DOPAC levels were below detection limit in the parietal cortex.

DISCUSSION

Cholinergic projections from the septum, basal forebrain and laterodorsal tegmental nucleus to limbic and neocortical areas modulate a variety of brain processes including arousal, attention and memory. Despite the importance of hippocampo-prefrontal cortex communication to emotional and cognitive processing, very little has been reported about the cholinergic control of CA1-mPFC synaptic transmission. In this study, we demonstrated that the muscarinic agonist PILO enhances synaptic plasticity in the hippocampal inputs to mPFC in intact animals, which is also associated with cortical monoaminergic changes and fast oscillatory brain rhythms. Our main findings show that (1) PILO strengthened mPFC LTP late-phase without affecting its induction phase. PILO sustained mPFC LTP above control levels at 130 min after LTP induction; (2) the effects of PILO on mPFC LTP were paralleled by a decrease in the relative power spectrum of delta oscillations and an increase of sigma oscillations in CA1, as well as an increase of gamma oscillations in CA1 and mPFC; (3) PILO specifically altered monoamine levels in the mPFC compared with control groups. It decreased dopamine levels without changing the levels of its metabolite, DOPAC; decreased both 5-HT and its metabolite, 5-HIAA tissue levels; and it also decreased noradrenaline levels; but (4) PILO did not affect monoamine levels in the hippocampus.

The cholinergic enhancement of mPFC LTP observed in our study is consistent with previous reports using intact animals showing a muscarinic potentiation of LTP maintenance in the motor (Boyd et al., 2000), somatosensory (Verdier and Dykes, 2001) and visual cortices (Dringenberg et al., 2007), as well as in CA1 (Iga et al., 1996) and dentate gyrus (Frey et al., 2003) of the hippocampus. Although muscarinic agonists were also shown to enhance LTP induction in brain slices of CA1, dentate gyrus (Blitzer et al., 1990; Abe et al., 1994) and, piriform and perirhinal cortices (Hasselmo and Barkai, 1995; Cheong et al., 2001), we did not observe any effect of PILO on mPFC LTP induction. This discrepancy could either reflect a difference in the animal preparation used (brain slice vs. intact animal), a particular response to our LTP protocol or a specific property of the muscarinic modulation of CA1-mPFC synaptic plasticity. On the other hand, we could also consider the possibility that a small amount of mEsc may have leaked across the blood–brain barrier following systemic mEsc pre-treatment, counteracting PILO central effects (Pakarinen and Moerschbaecher, 1993). However, in spite of the small effect of mEsc pre-treatment on baseline mPFC responses in mEsc-Veh animals, it is unlikely that mEsc leakage inhibited a hypothetical PILO-induced increase in LTP induction. In support of this, we found that the dose of mEsc used in our study did not alter LTP levels in mEsc-Veh animals when compared with Veh-Veh animals, as would be expected after mild muscarinic blockade (Dringenberg et al., 2007). Therefore, these findings indicate that PILO promotes strengthening of mPFC LTP by sustaining its late-phase without directly affecting its induction.

Three important findings suggest that mPFC is particularly sensitive to cholinergic inputs and support the effects of PILO on mPFC plasticity. First, mPFC cells have a particularly strong fast-hyperpolarizing response to acetylcholine, which is followed by a long-lasting depolarization (Gulledge et al., 2007). Second, pyramidal prefrontal neurons treated with PILO lack the initial fast-hyperpolarizing response and have a very potent slow depolarization possibly associated to the activation of M1 muscarinic postsynaptic receptors (McCormick and Prince, 1985). Third, M1 receptor activation promotes tonic firing and enhances the temporal integration of dendritic excitatory fPSPs in mPFC neurons, attenuating isolated single fPSPs and potentiating fPSPs generated by spatially and temporally coherent inputs (Carr and Surmeier, 2007).

In addition, we also observed that the PILO-enhancement of mPFC LTP was associated with a desynchronization of LFPs recorded in the hippocampus and cortex. PILO significantly shifted the oscillations from a high-amplitude low-frequency pattern (delta oscillations) to a low-amplitude high-frequency pattern with higher contribution of sigma and gamma oscillations in CA1 and mPFC. These results confirm that PILO affected brain oscillatory state by the time LTP was induced and suggest that the late-phase of mPFC LTP is favored during desynchronized states, as seen in behaving animals during wakefulness and REM sleep (Bramham and Srebro, 1989; Leung et al., 2003). In fact, CA1-mPFC evoked responses are modulated by the behavior state in rats (Romcy-Pereira and Pavlides, unpublished observations). Recent evidence also indicate that mPFC neuronal firing is entrained by the cholinergic-associated theta oscillation of the hippocampus and increases its synchrony with CA1 neurons during working memory tasks (Jones and Wilson, 2005; Siapas et al., 2005). Such hippocampo-cortical interactions may be important mechanisms for gating information flow and promoting plastic changes thought to underlie the storage of information within this network.

It is possible that the muscarinic enhancement of CA1-mPFC LTP may have been influenced by monoaminergic changes induced by PILO at the time of LTP induction, 20 min after injection. The trend toward an increase in DOPAC/dopamine ratio detected in the mPFC suggests that PILO induced an enhancement of dopamine release. This is in agreement with studies showing that systemic and midbrain administration of muscarinic agonists, including PILO, augment the release of dopamine in the mPFC (Gronier et al., 2000; Stanhope et al., 2001; Ichikawa et al., 2002). It is also possible that PILO modulates a supposed dopamine release induced by the electrical stimulation of the hippocampus, since NMDA stimulation of the ventral hippocampus increases DA release in the mPFC (Peleg-Raibstein et al., 2005). It was shown that although dopamine inhibits normal synaptic transmission, it enhances early and late mPFC LTP *in vivo* (Jay et al., 1996; Gurden et al., 1999). In contrast to what we observed in the mPFC, in the hippocampus and parietal cortex, the undetected low levels of dopamine suggest that it does not play a major influence on the PILO-induced mPFC LTP strengthening.

As for 5-HT, the simultaneous decrease in neurotransmitter and metabolite levels observed in the mPFC indicates that PILO may have inhibited raphe neurons. In fact, iontophoretic application of acetylcholine into the dorsal raphe of anesthetized rats inhibits about one-half of its neurons (Koyama and Kayama, 1993), which could indicate a reduction in cortical 5-HT release. Considering that a single dose of fluvoxamine treatment seems to have no effect on CA1-mPFC LTP *in vivo* (Ohashi et al., 2002), we do not believe that the serotonergic changes observed here affected PILO-induced mPFC LTP enhancement. Besides, PILO did not alter 5-HT turnover in the mPFC. In the parietal cortex, however, PILO altered 5-HT and 5-HIAA levels as compared with mPFC and hippocampus. 5-HT turnover was strongly enhanced in the parietal cortex as compared with the other areas. These data suggest that the serotonergic transmission may undergo specific muscarinic modulation, presumably associated to particular distributions of cholinergic receptors in cortical areas. Although we observed specific noradrenaline changes in the mPFC, noradrenaline also tended to be reduced in the parietal cortex.

Considering that LTP is a synaptic correlate of memory storage, our result of muscarinic strengthening of mPFC LTP agrees with reports that prefrontal-dependent memories are enhanced by muscarinic activation. Muscarinic agonists enhance the performance in tasks requiring attentional and working memory capacities in rats, monkeys and humans (Granon et al., 1995; Sarter and Bruno, 1997; Ragozzino and Kesner, 1998; Gill et al., 2000; Chudasama et al., 2004; Hasselmo and Stern, 2006). Besides, working memory tasks induce an increase in acetylcholine efflux in the prefrontal cortex of rats (Hironaka et al., 2001). Our findings also support the idea of an important cholinergic modulation of the synaptic plasticity in prefrontal circuits involved in cognitive and emotional processes underlying normal and psychiatric behaviors (Sarter et al., 2005). In one case, it was recently reported that REM sleep, a cholinergically-driven behavioral state, has an enhancing effect on hippocampal LTP but a dampening effect on mPFC LTP (Romcy-Pereira and Pavlides, 2004). In agreement to that, REM sleep is correlated with a reactivation of temporal lobe structures along with a deactivation of the prefrontal cortex (Maquet et al., 1996). In addition, the muscarinic receptor system seems to be altered in the pathophysiology of schizophrenia (Raedler et al., 2007). The atypical antipsychotic drug clozapine, which possibly exerts its cognitive-enhancing effects by increasing acetylcholine release in the prefrontal cortex (Ago et al., 2006), promotes an enhancement of synaptic plasticity in the mPFC (Gemperle et al., 2003). It has also been shown that acetylcholine levels specifically increase in the hippocampus and prefrontal cortex of rats during an inescapable stress model of depression (Mark et al., 1996). Therefore, the muscarinic neurotransmission has an important modulatory influence on prefrontal cortex functions. Further investigations should address the role of specific muscarinic and nicotinic receptor modulators on synaptic plasticity at connections between the mPFC and other relevant cortical

and subcortical structures involved in cognitive and neuropsychiatric disorders.

Acknowledgments—We would like to thank Renata Scanduzzi and Renato Meirelles for their excellent technical support. We would also like to thank Ana Claudia Zanetti, Graziela Bachiega and Raquel do Val for valuable discussions and advice. The work was supported by grants from CAPES-PRODOC, FAPESP and CNPq.

REFERENCES

- Abe K, Nakata A, Mizutani A, Saito H (1994) 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* 33:847–852.
- Ago Y, Sato M, Nakamura S, Baba A, Matsuda T (2006) Lack of enhanced effect of antipsychotics combined with fluvoxamine on acetylcholine release in rat prefrontal cortex. *J Pharmacol Sci* 102:419–422.
- Barbas H, Blatt GJ (1995) Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5:511–533.
- Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, McGann K, Wenk GL (2000) Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience* 99:17–23.
- Blitzer RD, Gil O, Landau EM (1990) Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 119:207–210.
- Boyd TE, Trepel C, Racine RJ (2000) Cholinergic modulation of neocortical long-term potentiation in the awake, freely moving rat. *Brain Res* 881:28–36.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Bramham CR, Srebro B (1989) Synaptic plasticity in the hippocampus is modulated by behavioral state. *Brain Res* 493:74–86.
- Caballero-Bleda M, Witter MP (1994) Projections from the presubiculum and the parasubiculum to morphologically characterized entorhinal-hippocampal projection neurons in the rat. *Exp Brain Res* 101:93–108.
- Carr DB, Surmeier DJ (2007) M1 muscarinic receptor modulation of Kir2 channels enhances temporal summation of excitatory synaptic potentials in prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 97:3432–3438.
- Chen L, Bohanick JD, Nishihara M, Seamans JK, Yang CR (2007) Dopamine D1/5 receptor-mediated long-term potentiation of intrinsic excitability in rat prefrontal cortical neurons: Ca²⁺-dependent intracellular signaling. *J Neurophysiol* 97:2448–2464.
- Cheong MY, Yun SH, Mook-Jung I, Joo I, Huh K, Jung MW (2001) Cholinergic modulation of synaptic physiology in deep layer entorhinal cortex of the rat. *J Neurosci Res* 66:117–121.
- Chudasama Y, Dalley JW, Nathwani F, Bouger P, Robbins TW (2004) Cholinergic modulation of visual attention and working memory: dissociable effects of basal forebrain 192-IgG-saporin lesions and intraprefrontal infusions of scopolamine. *Learn Mem* 11:78–86.
- Couey JJ, Meredith RM, Spijker S, Poorthuis RB, Smit AB, Brussaard AB, Mansvelder HD (2007) Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron* 54:73–87.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28:771–784.
- Degeetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2003) Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an *in vivo* intracellular recording study. *Cereb Cortex* 13:782–792.

- Detari L, Juhasz G, Kukorelli T (1984) Firing properties of cat basal forebrain neurones during sleep-wakefulness cycle. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 58:362–368.
- Dringenberg HC, Hamze B, Wilson A, Speechley W, Kuo MC (2007) Heterosynaptic facilitation of in vivo thalamocortical long-term potentiation in the adult rat visual cortex by acetylcholine. *Cereb Cortex* 17:839–848.
- Dunbar GC, Kuchibhatla R (2006) Cognitive enhancement in man with ispronicline, a nicotinic partial agonist. *J Mol Neurosci* 30:169–172.
- Dupin N, Mailliet F, Rocher C, Kessal K, Spedding M, Jay TM (2006) Common efficacy of psychotropic drugs in restoring stress-induced impairment of prefrontal plasticity. *Neurotox Res* 10:193–198.
- Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110:73–81.
- Ferino F, Thierry AM, Glowinski J (1987) Anatomical and electrophysiological evidence for a direct projection from Ammon's horn to the medial prefrontal cortex in the rat. *Exp Brain Res* 65:421–426.
- Frey S, Bergado JA, Frey JU (2003) Modulation of late phases of long-term potentiation in rat dentate gyrus by stimulation of the medial septum. *Neuroscience* 118:1055–1062.
- Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS (1989) Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 61:331–349.
- Fuster JM (1973) Unit activity in prefrontal cortex during delayed-response performance: neuronal correlates of transient memory. *J Neurophysiol* 36:61–78.
- Gemperle A, Olpe HR (2004) Effects of subchronic clozapine treatment on long-term potentiation in rat prefrontal cortex. *Eur Neuropharmacol* 14:340–346.
- Gemperle AY, Enz A, Pozza MF, Luthi A, Olpe HR (2003) Effects of clozapine, haloperidol and iloperidone on neurotransmission and synaptic plasticity in prefrontal cortex and their accumulation in brain tissue: an in vitro study. *Neuroscience* 117:681–695.
- Giacobini E (1990) Cholinergic receptors in human brain: effects of aging and Alzheimer disease. *J Neurosci Res* 27:548–560.
- Gill TM, Sarter M, Givens B (2000) Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic modulation. *J Neurosci* 20:4745–4757.
- Goldman-Rakic PS (1995) Cellular basis of working memory. *Neuron* 14:477–485.
- Goldman-Rakic PS (1996) The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351:1445–1453.
- Goldman-Rakic PS (1999) The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46:650–661.
- Granon S, Poucet B, Thinus-Blanc C, Changeux JP, Vidal C (1995) Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology (Berl)* 119:139–144.
- Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3–28.
- Gronier B, Perry KW, Rasmussen K (2000) Activation of the mesocorticolimbic dopaminergic system by stimulation of muscarinic cholinergic receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* 147:347–355.
- Gu Q (2002) Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111:815–835.
- Gulledge AT, Park SB, Kawaguchi Y, Stuart GJ (2007) Heterogeneity of phasic cholinergic signaling in neocortical neurons. *J Neurophysiol* 97:2215–2229.
- Gurden H, Tassin JP, Jay TM (1999) Integrity of the mesocortical dopaminergic system is necessary for complete expression of in vivo hippocampal-prefrontal cortex long-term potentiation. *Neuroscience* 94:1019–1027.
- Hasselmo ME (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 3:351–359.
- Hasselmo ME, Barkai E (1995) Cholinergic modulation of activity-dependent synaptic plasticity in the piriform cortex and associative memory function in a network biophysical simulation. *J Neurosci* 15:6592–6604.
- Hasselmo ME, Stern CE (2006) Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends Cogn Sci* 10:487–493.
- Hironaka N, Tanaka K, Izaki Y, Hori K, Nomura M (2001) Memory-related acetylcholine efflux from rat prefrontal cortex and hippocampus: a microdialysis study. *Brain Res* 901:143–150.
- Huang CC, Lin HJ, Hsu KS (2007) Repeated cocaine administration promotes long-term potentiation induction in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 17:1877–1888.
- Hughes RA (1982) Anticholinergic drugs, blood-brain-barrier and tonic immobility in chickens. *Physiol Behav* 29:67–71.
- Ichikawa J, Chung YC, Li Z, Dai J, Meltzer HY (2002) Cholinergic modulation of basal and amphetamine-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res* 958:176–184.
- Iga Y, Arisawa H, Ise M, Yasuda H, Takeshita Y (1996) Modulation of rhythmical slow activity, long-term potentiation and memory by muscarinic receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 308:13–19.
- Izaki Y, Takita M, Nomura M (2002) Local properties of CA1 region in hippocampo-prefrontal synaptic plasticity in rats. *Neuroreport* 13:469–472.
- Jay TM, Burette F, Laroche S (1995) NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat. *Eur J Neurosci* 7:247–250.
- Jay TM, Burette F, Laroche S (1996) Plasticity of the hippocampal-prefrontal cortex synapses. *J Physiol Paris* 90:361–366.
- Jay TM, Glowinski J, Thierry AM (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prefrontal area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 505:337–340.
- Jay TM, Rocher C, Hotte M, Naudon L, Gurden H, Spedding M (2004) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox Res* 6:233–244.
- Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313:574–586.
- Jones MW, Wilson MA (2005) Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biol* 3:e402.
- Kawashima H, Izaki Y, Grace AA, Takita M (2006) Cooperativity between hippocampal-prefrontal short-term plasticity through associative long-term potentiation. *Brain Res* 1109:37–44.
- Koyama Y, Kayama Y (1993) Mutual interactions among cholinergic, noradrenergic and serotonergic neurons studied by iontophoresis of these transmitters in rat brainstem nuclei. *Neuroscience* 55:1117–1126.
- Laroche S, Jay TM, Thierry AM (1990) Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neurosci Lett* 114:184–190.
- Leung LS, Shen B, Rajakumar N, Ma J (2003) Cholinergic activity enhances hippocampal long-term potentiation in CA1 during walking in rats. *J Neurosci* 23:9297–9304.
- Lyons DM (2002) Stress, depression, and inherited variation in primate hippocampal and prefrontal brain development. *Psychopharmacol Bull* 36:27–43.
- Maquet P, Peters J, Aerts J, Delfiore G, Degueldre C, Luxen A, Franck G (1996) Functional neuroanatomy of human rapid-eye-movement sleep and dreaming. *Nature* 383:163–166.
- Mark GP, Rada PV, Shors TJ (1996) Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala. *Neuroscience* 74:767–774.

- Mayo W, Dubois B, Ploska A, Javoy-Agid F, Agid Y, Le Moal M, Simon H (1984) Cortical cholinergic projections from the basal forebrain of the rat, with special reference to the prefrontal cortex innervation. *Neurosci Lett* 47:149–154.
- McCormick DA, Prince DA (1985) Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6344–6348.
- McKinney M, Coyle JT, Hedreen JC (1983) Topographic analysis of the innervation of the rat neocortex and hippocampus by the basal forebrain cholinergic system. *J Comp Neurol* 217:103–121.
- Messer WS Jr (2002) The utility of muscarinic agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 19:187–193.
- Ohashi S, Matsumoto M, Otani H, Mori K, Togashi H, Ueno K, Kaku A, Yoshioka M (2002) Changes in synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway induced by repeated treatments with fluvoxamine. *Brain Res* 949:131–138.
- Pakarinen ED, Moerschbaecher JM (1993) Comparison of the effects of scopolamine and methylscopolamine on the performance of a fixed-ratio discrimination in squirrel monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 44:815–819.
- Palkovits M (1973) Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* 59:449–450.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Peleg-Raibstein D, Pezze MA, Ferger B, Zhang WN, Murphy CA, Feldon J, Bast T (2005) Activation of dopaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex by N-methyl-D-aspartate stimulation of the ventral hippocampus in rats. *Neuroscience* 132:219–232.
- Raedler TJ, Bymaster FP, Tandon R, Copolov D, Dean B (2007) Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12:232–246.
- Ragozzino ME, Kesner RP (1998) The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and prefrontal cortex on spatial working memory. *Neurobiol Learn Mem* 69:241–257.
- Romcy-Pereira R, Pavlides C (2004) Distinct modulatory effects of sleep on the maintenance of hippocampal and medial prefrontal cortex LTP. *Eur J Neurosci* 20:3453–3462.
- Sarter M, Bruno JP (1997) Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Res Brain Res Rev* 23:28–46.
- Sarter M, Nelson CL, Bruno JP (2005) Cortical cholinergic transmission and cortical information processing in schizophrenia. *Schizophr Bull* 31:117–138.
- Satoh K, Fibiger HC (1986) Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: efferent and afferent connections. *J Comp Neurol* 253:277–302.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11–21.
- Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA (2005) Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. *Neuron* 46:141–151.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195–231.
- Stanhope KJ, Mirza NR, Bickerdike MJ, Bright JL, Harrington NR, Hesselink MB, Kennett GA, Lightowler S, Sheardown MJ, Syed R, Upton RL, Wadsworth G, Weiss SM, Wyatt A (2001) The muscarinic receptor agonist xanomeline has an antipsychotic-like profile in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 299:782–792.
- Swanson LW (1981) A direct projection from Ammon's horn to prefrontal cortex in the rat. *Brain Res* 217:150–154.
- Swanson LW, Cowan WM (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172:49–84.
- Takita M, Izaki Y, Jay TM, Kaneko H, Suzuki SS (1999) Induction of stable long-term depression in vivo in the hippocampal-prefrontal cortex pathway. *Eur J Neurosci* 11:4145–4148.
- van Haaren F, van Hest A (1989) The effects of scopolamine and methylscopolamine on visual and auditory discriminations in male and female Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 32:707–710.
- Verdier D, Dykes RW (2001) Long-term cholinergic enhancement of evoked potentials in rat hindlimb somatosensory cortex displays characteristics of long-term potentiation. *Exp Brain Res* 137:71–82.
- Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1–20.
- Witter MP, Amaral DG (2004) Hippocampal formation. In: *The rat nervous system* (Paxinos G, ed), pp 637–703. San Diego: Elsevier Academic Press.

(Accepted 26 February 2008)
(Available online 29 February 2008)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)