

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Alterações da plasticidade sináptica e da composição de
jangadas lipídicas no hipocampo em diferentes idades e sexos
assim como induzidas *in vitro* por atividade epiletiforme e o
papel neuroprotetor dos recetores VPAC₁ para o VIP**

José Diogo Carvalho Rosa

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Diana Cunha Reis
Doutora Maria Teresa Rebelo

Recomeça... Se puderes, Sem angústia e sem pressa. E os passos que deres, Nesse caminho duro Do futuro, Dá-os em liberdade. Enquanto não alcances Não descanses. De nenhum fruto queiras só metade.

Miguel Torga

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas (BioISI) / Centro de Química e Bioquímica (CQB) / Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (DQB-FCUL) pelo espaço e parte dos equipamentos cedidos, que tornou viável o desenvolver deste meu projeto, com fim à obtenção do grau de Mestre.

Em segundo lugar, os meus agradecimentos irão para as minhas duas professoras orientadoras da Dissertação (do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente): Diana Cunha Reis (PhD) e Maria Teresa Rebelo (PhD). Um agradecimento principal à minha orientadora externa Doutora Diana Cunha Reis, pois, foi a minha integração no seu projeto de investigação e o seguimento das suas diretrizes que tornou possível a génese deste trabalho, inclusive toda a experiência adquirida acumulada, resultado de todas as provas a que me foram submetidas e superadas, sempre da forma o mais irrepreensível. Agradeço também à mesma, a oportunidade de ter podido participar em conferências científicas, algo de novo para mim e que me acabou por enriquecer ainda mais; além da revisão mais técnica das temáticas abordadas nesta Dissertação. E, finalmente, um agradecimento, apesar da sua menor participação/contribuição, à minha orientadora interna Doutora M.^a Teresa Rebelo, pela disponibilidade; diligência acompanhada de boa vontade e refrescante ténpera; disciplina e capacidade de organização.

Em terceiro lugar, um agradecimento à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), à qual se tornou uma casa!

Nestes últimos (difíceis) tempos, infelizmente, desenvolvi uma perturbação depressiva, a qual afetou a minha estabilidade mental profundamente e, conseqüentemente, a minha qualidade de vida; pelo que agradeço, em quarto lugar, a quem contribuiu à síntese de um fármaco inibidor seletivo da recaptção neuronal de catecolaminas [noradrenalina e dopamina (principalmente)] que me ajudou a reequilibrar, permitindo assim a conclusão deste trabalho.

Por fim, gostaria de registar um último agradecimento aos serviços da Ação Social da Universidade de Lisboa (SASULisboa), tanto pela concessão dos Apoios Sociais Diretos – destacando a Bolsa de Estudo, com as quais me foi possível, anualmente, regularizar o pagamento das propinas exigidas, sustentando desse modo a progressão e a conclusão dos meus estudos; como pela concessão de Apoios Sociais Indiretos – notabilizando o acesso à alimentação, em especial à Unidade Alimentar “Cantina Velha – Macrobiótica”, que, para além do espaço físico agradável, proporciona confeitões de grande qualidade a um custo muito acessível; sem descorar a amabilidade dos seus funcionários.

Resumo e palavras-chave

O hipocampo é uma região cerebral altamente suscetível ao envelhecimento e a patologias como a epilepsia do lobo temporal (ELT). A plasticidade sináptica, fundamental na regulação da comunicação sináptica, implica alterações de curta ou longa duração na eficácia da transmissão, por atividade neuronal transitória e pode sofrer alterações na ELT e/ou no envelhecimento, desconhecendo-se largamente a sua evolução na epileptogênese ou a sua contribuição para o dimorfismo sexual durante o envelhecimento. A remodelação da composição de jangadas lipídicas contribui para alterações na plasticidade sináptica, no envelhecimento, como em doenças neurodegenerativas; ao que estudos do nosso laboratório apontam para que ocorra também na ELT. Desconhece-se se estas alterações ocorrem precocemente na epileptogênese ou se contribuem para alterações sexualmente dimórficas da função sináptica no envelhecimento.

Neste trabalho, avaliou-se as alterações em alvos moleculares relevantes para a plasticidade sináptica que ocorreram após a atividade epileptiforme, *in vitro*, sujeitando fatias de hipocampo de ratos saudáveis a atividade intercrítica, induzida pela depleção de Mg^{2+} e a atividade crítica, induzida pelo antagonista dos recetores $GABA_A$, bicuculina. Concomitantemente, testou-se a importância do péptido vasoativo intestinal (VIP) endógeno, nestas alterações, através do bloqueio dos recetores $VPAC_1$ para o VIP. Foram ainda averiguadas as possíveis diferenças nas alterações da integridade pré- e pós-sináptica, com foco nos componentes excitatório e inibitório da neurotransmissão, e nas jangadas lipídicas sinápticas, em machos e fêmeas, ao longo da idade. As alterações moleculares sinápticas foram estudadas por western blot, em sinaptossomas, tendo como alvos: Subunidades GluA1 e 2 dos recetores AMPA; Canais $K_v4.2$; Marcadores pré-sinápticos – Sinaptofisina e SNAP-25; Proteínas pós-sinápticas – Gefirina e PSD-95; Proteínas de jangadas lipídicas – Caveolina-1 e Flotilina-1; E o enzima Hidroxilase de tirosina.

A atividade intercrítica aumentou a expressão de GluA2, contrariamente à de GluA1, como também da razão GluA1/GluA2, junto com os níveis de caveolina-1 e flotilina-1. A prevenção da ação do VIP endógeno nos recetores $VPAC_1$ durante a atividade intercrítica, aumentou os níveis de expressão dos canais $K_v4.2$, bem como a diminuição nos níveis de caveolina-1 e flotilina-1, que foi menos pronunciada. Já quando foi induzida atividade crítica, a expressão sináptica de GluA1, da razão GluA1/GluA2 e dos níveis de caveolina-1 e flotilina-1, diminuíram. Ao prevenir, igualmente, a ação nos recetores $VPAC_1$, durante a atividade crítica, a diminuição da expressão de GluA1 e de caveolina-1 foram mais pronunciadas. Estas observações indicam que a ação do VIP endógeno durante a atividade epileptiforme crítica como a intercrítica regula os efeitos da atividade epileptiforme na função sináptica.

Em sinaptossomas do hipocampo de ratos com 4, 9, 12 e 21 meses (M), quando comparados fêmeas com machos, da mesma idade, não se observam diferenças marcadas na expressão da maioria dos alvos, com exceção de GluA1 e da sinaptofisina aos 4M; da gefirina aos 9M e da caveolina-1 aos 12M. A expressão de GluA1, sinaptofisina e dos canais $K_v4.2$ foi algo distinta entre sexos. Os níveis de GluA1, em machos, diminuíram com a idade. A sinaptofisina aumentou aos 21M.

Estas observações sugerem que os recetores AMPA bem como marcadores da integridade sináptica, nomeadamente a inibitória, e as jangadas lipídicas sinápticas são os alvos preferenciais da remodelação sináptica tanto no contexto da resposta aguda à atividade epileptiforme como no envelhecimento. O VIP endógeno tem um papel importante na regulação da resposta aguda.

Palavras-chave: Plasticidade sináptica; Recetores $VPAC_1$ para o VIP; Jangadas lipídicas; Atividade epileptiforme; Envelhecimento.

Abstract and keywords

The hippocampus is a brain region highly susceptible to aging and pathologies such as temporal lobe epilepsy (TLE). Synaptic plasticity is fundamental in the regulation of synaptic communication and implies short- or long-term changes in the efficiency of transmission caused by transient neuronal activity. It can undergo changes in the TLE and/or aging, its evolution in epileptogenesis or its contribution to sexual dimorphism during aging remains largely unknown. The remodelling of the composition of lipid rafts contributes to alterations in synaptic plasticity in aging, as in neurodegenerative diseases. Preliminary studies in our laboratory indicate that such changes also occur in TLE. It is not known whether these changes occur early in epileptogenesis or whether they contribute to sexually dimorphic changes in synaptic function in aging.

In this work, it was evaluated whether changes in molecular targets relevant to synaptic plasticity occurred after epileptiform activity, *in vitro*, by subjecting healthy rat hippocampal slices to interictal-like activity, induced by the absence of Mg^{2+} or ictal-like activity, induced by the GABA_A receptor antagonist, bicuculline. Concomitantly, the importance of the endogenous vasoactive intestinal peptide (VIP) in these alterations was tested by blocking VIP VPAC₁ receptors. Possible differences in pre- and postsynaptic integrity alterations in males and females during natural aging were also investigated, focusing on the excitatory and inhibitory components of neurotransmission, and on synaptic lipid rafts. The synaptic molecular alterations were studied by western blot, in synaptosomes, having as targets: GluA1 and 2 subunits of the AMPA receptors; K_v4.2 channels; Presynaptic markers – Synaptophysin and SNAP-25; Post-synaptic proteins – Gephyrin and PSD-95; Lipid raft proteins – Caveolin-1 and Flotilin-1; And the Tyrosine Hydroxylase enzyme.

Interictal-like activity increased the expression of GluA2, while decreasing that of GluA1, as well as the GluA1/GluA2 ratio, and levels of caveolin-1 and flotilin-1. The prevention of endogenous VIP action on VPAC₁ receptors during interictal activity increased the expression levels of K_v4.2 channels and attenuated the decrease in caveolin-1 and flotilin-1 levels. When ictal-like activity was induced, the synaptic expression of GluA1, the GluA1/GluA2 ratio and the levels of caveolin-1 and flotilin-1 decreased. Preventing the action of VIP on VPAC₁ receptors during ictal activity, aggravated the decrease in the expression of GluA1 and caveolin-1. These observations indicate that the action of endogenous VIP during ictal- epileptiform activity such as interictal-like regulates the effects of epileptiform activity on synaptic function.

In hippocampal synaptosomes of rats at 4, 9, 12 and 21 months (M), when females and males of the same age were compared, no marked differences were observed in the expression of most targets, except for GluA1 and synaptophysin at 4M; gephyrin at 9M and caveolin-1 at 12M. The expression of GluA1, synaptophysin and K_v4.2 channels was somewhat different between sexes. GluA1 levels in males decreased with age. Synaptophysin levels increased at 21M (aged rats).

These observations suggest that AMPA receptors together with markers of synaptic integrity, namely inhibitory, and synaptic lipid rafts are the preferred targets of synaptic remodelling both in the context of the acute response to epileptiform activity and upon aging.

Keywords: Synaptic plasticity; VIP VPAC₁ receptors; Lipid rafts; Epileptiform activity; Aging

Intervenção em comunicações científicas

Parte dos dados integrantes desta Dissertação de Mestrado resultaram em três comunicações científicas, duas delas internacionais e outra nacional, na área das Neurociências, a citar:

- Resumos publicados, a partir de:
 - **Poster** | *Carvalho-Rosa, J. D. & Cunha-Reis D. (2019). *Endogenous VIP VPAC₁ receptor activation during ictal and interictal-like activity induced in vitro by bicuculline and 0-Mg²⁺ modulates subsequent LTP expression in the rat hippocampus*. Apresentado na Conferência “XVI Meeting of the Portuguese Society for Neuroscience (SPN2019)”, na cidade de Lisboa, em 31 de maio de 2019. Resumo publicado na revista *Frontiers in Cellular Neuroscience*, em: doi: 10.3389/conf.fncel.2019.01.00028.
 - **Comunicação oral** | Carvalho-Rosa, J. D.; Rodrigues, N.C.; Silva-Cruz, A.; and *Cunha-Reis, D. (2021). *Metaplasticity following brain hyperactivity and brief hypoxia: significance for endogenous neuroprotection*. Apresentado no 56º Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia – On-Line, em 13 de outubro de 2021. Resumo publicado na revista *Biomedical and Biopharmaceutical Research*.
- Apresentação em reunião internacional:
 - **Poster** | *Carvalho-Rosa JD, Rodrigues NC and Diana Cunha-Reis (2020). *VPAC₁ receptor activation by endogenous VIP during interictal-like activity induced in vitro by 0-Mg²⁺ influences subsequent LTP expression in the rat hippocampus*. Apresentado no Congresso “12 FENS Forum of Neuroscience – Virtual Forum”; evento online, de 11-15 de julho de 2020.

Índice

| | |
|---|-------|
| Agradecimentos..... | IV |
| Resumo e palavras-chave..... | V |
| Abstract and keywords..... | VI |
| Intervenção em comunicações científicas..... | VII |
| Índice..... | VIII |
| Lista de figuras..... | XII |
| Lista de tabelas..... | XXII |
| Lista de abreviaturas, siglas e símbolos, etc..... | XXIII |
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Anatomia do hipocampo..... | 1 |
| 1.1.1. Células e camadas – A organização citoarquitetónica do hipocampo..... | 3 |
| 1.2. Plasticidade neuronal e hipocampo..... | 5 |
| 1.3. A vulnerabilidade regional do hipocampo..... | 6 |
| 1.3.1. Lesões agudas no hipocampo..... | 6 |
| 1.3.2. Hipocampo na epileptogénese..... | 6 |
| 1.3.3. Envelhecimento e hipocampo..... | 7 |
| 1.4. Maquinaria neuronal..... | 7 |
| 1.4.1. A sinapse..... | 7 |
| 1.4.2. Estrutura e função do componente pré-sináptico..... | 8 |
| 1.4.3. O componente pós-sináptico excitatório e inibitório..... | 8 |
| 1.5. Transmissão sináptica glutamatérgica e GABAérgica..... | 10 |
| 1.6. As principais moléculas estruturais nas sinapses..... | 10 |
| 1.7. Sinapses excitatórias e inibitórias em equilíbrio – Redimensionamento sináptico..... | 11 |
| 1.8. Plasticidade sináptica..... | 12 |
| 1.8.1. Relação entre a plasticidade sináptica e a memória no hipocampo..... | 14 |
| 1.8.2. Modelos de plasticidade sináptica no hipocampo..... | 14 |
| 1.8.3. Mecanismos celulares de indução e expressão de LTP..... | 15 |
| 1.8.3.1. O papel da PSD-95 na regulação da plasticidade sináptica..... | 16 |
| 1.8.4. Mecanismos celulares de indução e expressão da LTD..... | 17 |
| 1.8.5. Tráfego de recetores glutamatérgicos..... | 17 |
| 1.8.5.1. Mecanismos básicos da função pós-sináptica excitatória..... | 17 |
| 1.8.5.2. Tráfego irregular dos recetores AMPA como mecanismo de disfunção neuronal..... | 18 |
| 1.8.5.3. Os recetores AMPA na renovação da sinapse por difusão de monómeros..... | 19 |
| 1.8.6. Regulação de proteínas sinápticas nos fenómenos de plasticidade sináptica..... | 19 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 1.8.6.1. | A sinaptofisina..... | 19 |
| 1.8.6.2. | A SNAP-25..... | 20 |
| 1.8.6.3. | A gefirina..... | 20 |
| 1.9. | Jangadas lipídicas | 20 |
| 1.10. | Mecanismos de plasticidade neuronal | 21 |
| 1.10.1. | Mecanismos da plasticidade induzida por lesões – Efeitos potenciados do tipo LTP... .. | 22 |
| 1.10.2. | Alterações na excitabilidade..... | 22 |
| 1.10.2.1. | Canais Kv4.2 na regulação da excitabilidade dendrítica e na LTP..... | 22 |
| 1.10.3. | Homeostasia sináptica e metaplasticidade..... | 23 |
| 1.11. | Diversidade neuronal e dinâmica temporal | 23 |
| 1.11.1. | Interneurónios GABAérgicos | 24 |
| 1.12. | Inervação monoaminérgica do hipocampo..... | 25 |
| 1.13. | Epilepsia | 26 |
| 1.13.1. | Epileptogénese..... | 27 |
| 1.13.2. | Atividade crítica e intercrítica | 27 |
| 1.13.3. | Epilepsia do lobo temporal mesial – MTLE..... | 27 |
| 1.13.4. | Alterações iónicas durante a atividade intercrítica <i>in vivo</i> | 28 |
| 1.13.4.1. | Efeitos das alterações iónicas | 28 |
| 1.13.4.1.1. | Concentração extracelular do magnésio | 28 |
| 1.13.4.1.2. | Elevação do potássio extracelular | 29 |
| 1.13.5. | Inibição GABAérgica..... | 29 |
| 1.14. | O péptido vasoativo intestinal – VIP..... | 30 |
| 1.14.1. | VIP e os seus recetores | 30 |
| 1.14.2. | VIP e MTLE..... | 30 |
| 1.14.3. | VIP, plasticidade sináptica e neuroproteção..... | 31 |
| 1.15. | Envelhecimento | 33 |
| 1.15.1. | Alterações no hipocampo com o envelhecimento | 33 |
| 1.15.1.1. | Diminuição da LTP com o envelhecimento | 33 |
| 1.15.1.2. | Modulação da LTD ao longo da vida..... | 34 |
| 1.15.2. | Alterações nos recetores AMPA com o envelhecimento: Razão GluA1/GluA2 | 34 |
| 1.15.3. | Envelhecimento e sinapses inibitórias: Mecanismos compensatórios..... | 35 |
| 1.15.4. | Envelhecimento sexualmente dimórfico | 36 |
| 1.15.5. | O papel da proteína de jangada lipídica – Caveolina-1 | 36 |
| 1.16. | Aprendizagem sexualmente dimórfica | 37 |
| 2. | Objetivos | 39 |
| 3. | Materiais e métodos..... | 40 |

| | | |
|----------|---|----|
| 3.1. | Animais | 40 |
| 3.1.1. | Aspetos éticos da investigação | 40 |
| 3.2. | Fatias de hipocampo isoladas | 40 |
| 3.3. | Isolamento de sinaptossomas de hipocampo | 41 |
| 3.4. | Determinação da concentração de proteína | 42 |
| 3.5. | Identificação/Quantificação das proteínas pelo método de western blot..... | 42 |
| 3.5.1. | Preparação do gel (SDS-PAGE)..... | 42 |
| 3.5.2. | Preparação das amostras para eletroforese | 43 |
| 3.5.3. | Eletroforese (SDS-PAGE)..... | 43 |
| 3.5.4. | Eletrotransferência das proteínas para membrana de PVDF | 44 |
| 3.5.5. | Bloqueio | 45 |
| 3.5.6. | Anticorpos primários e imunodeteção das proteínas | 46 |
| 3.5.7. | Anticorpos secundários | 47 |
| 3.5.8. | Deteção e revelação das proteínas | 48 |
| 3.6. | <i>Stripping</i> das membranas para nova imunodeteção | 49 |
| 3.7. | Análise..... | 49 |
| 3.8. | Normalização da abundância das proteínas-alvo..... | 50 |
| 3.9. | Dados e análise estatística | 50 |
| 3.10. | Reagentes, fármacos e soluções | 51 |
| 4. | Resultados | 52 |
| 4.1. | Atividade epileptiforme induzida por Krebs Mg ²⁺ 0 mM | 52 |
| 4.1.1. | Proteínas envolvidas na plasticidade sináptica..... | 52 |
| 4.1.1.1. | Subunidades recetores AMPA: GluA1 e GluA2 | 52 |
| 4.1.1.2. | Proteínas marcadoras do componente pós-sináptico: Gefirina e PDS-95 | 52 |
| 4.1.1.3. | Canais K _v 4.2 | 54 |
| 4.1.1.4. | Proteínas pré-sinápticas: Sinaptofisina..... | 54 |
| 4.1.2. | Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas: Caveolina-1 e flotilina-1..... | 55 |
| 4.2. | Atividade epileptiforme induzida por bicuculina | 56 |
| 4.2.1. | Proteínas envolvidas na plasticidade sináptica..... | 57 |
| 4.2.1.1. | Subunidades dos recetores AMPA: GluA1 e GluA2..... | 57 |
| 4.2.1.2. | Proteínas-marcador pós-sinápticas: Gefirina e PDS-95 | 57 |
| 4.2.1.3. | Canais K _v 4.2 | 58 |
| 4.2.1.4. | Proteínas-marcador pré-sinápticas: Sinaptofisina | 60 |
| 4.2.2. | Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas: Caveolina-1 e flotilina-1..... | 60 |
| 4.3. | Envelhecimento | 61 |
| 4.3.1. | Proteínas envolvidas na plasticidade sináptica..... | 61 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 4.3.1.1. | Subunidades dos recetores AMPA: GluA1 e GluA2..... | 61 |
| 4.3.1.2. | Proteínas-marcador pós-sinápticas: Gefirina e PSD-95 | 63 |
| 4.3.1.3. | Canais Kv4.2 | 64 |
| 4.3.1.4. | Proteínas-marcador pré-sinápticas: Sinaptofisina e SNAP-25 | 64 |
| 4.3.2. | Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas: Caveolina-1 | 65 |
| 4.3.3. | Proteínas-marcador de terminais catecolaminérgicos: Hidroxilase de tirosina | 65 |
| 5. | Discussão..... | 67 |
| 5.1. | Alterações moleculares após a indução da atividade epileptiforme <i>in vitro</i> | 67 |
| 5.1.1. | Subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA..... | 67 |
| 5.1.2. | Proteínas estruturais pós-sinápticas | 69 |
| 5.1.2.1. | PSD-95 | 69 |
| 5.1.2.2. | Gefirina..... | 70 |
| 5.1.3. | Canais Kv4.2 | 71 |
| 5.1.4. | Proteínas pré-sinápticas: Sinaptofisina..... | 72 |
| 5.1.5. | Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas | 73 |
| 5.1.5.1. | Caveolina-1 | 73 |
| 5.1.5.2. | Flotilina-1 | 74 |
| 5.2. | Envelhecimento e dimorfismo sexual | 75 |
| 5.2.1. | Subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA..... | 75 |
| 5.2.2. | Canais Kv4.2 | 77 |
| 5.2.3. | Proteínas estruturais pré-sinápticas: Sinaptofisina e SNAP-25 | 78 |
| 5.2.4. | Proteínas estruturais pós-sinápticas: PSD-95 e gefirina | 79 |
| 5.2.5. | Proteínas estruturais de jangadas lipídicas: Caveolina-1..... | 80 |
| 5.2.6. | Hidroxilase de tirosina..... | 81 |
| 6. | Conclusão..... | 83 |
| 7. | Referências | 84 |
| 8. | Anexos..... | 127 |
| 8.1. | Breves histórias | 127 |
| 8.1.1. | A origem do termo ‘hipocampo’ | 127 |
| 8.1.2. | A LTP e a sua relevância para a neurociência..... | 129 |
| 8.2. | A plasticidade neuronal e o hipocampo..... | 135 |
| 8.3. | Exposição das fatias de hipocampo a diversos tipos de atividade epileptiforme | 136 |
| 8.4. | Método de Bradford | 137 |
| 8.4.1. | Ensaio padrão | 137 |
| 8.4.2. | Leitura espectralfotométrica..... | 137 |

Lista de figuras

- Figura 1.1 (A) Visão ventral de um cérebro humano (canto superior esquerdo), cérebro de macaco (canto superior direito) e visão lateral de um cérebro de rato (centro inferior).** Os principais componentes corticais do lobo temporal medial (MTL) estão destacados e delineados. O hipocampo não é visível da superfície e, no ser humano, fica abaixo do córtex do MTL. A sua extensão anterior encontra-se abaixo dos córtices entorrinal posterior (vermelho) e perirrinal (roxo), e o corpo principal do hipocampo fica abaixo do córtex para-hipocampal. No rato, o córtex para-hipocampal é denominado córtex pós-rinal. Abreviaturas: EC, córtex entorrinal; PH, córtex para-hipocampal (amarelo-escuro); Por - córtex pós-rinal; PR - córtex perirrinal. Figura adaptada de Squire & Wixted (2011)²¹. **(B) Anatomia principal dos sistemas de memória do hipocampo e as regiões do cérebro envolvidas na aprendizagem e memória.** Adaptado de Bartsch & Wulff (2015)²². **(C) Mapa da conectividade das estruturas críticas da memória do sistema do lobo temporal, núcleos diencefálicos e das áreas de associação neocorticais, com destaque para o fluxo recíproco de informações.** Adaptado de Bartsch & Wulff (2015)²². **(D) Diagrama da rede do hipocampo de rato mostrando o circuito trissináptico,** cuja principal aferência é a via perfurante, que transmitem informações sensoriais polimodais dos neurónios na camada II do córtex entorrinal para as células granulosas do giro dentado. As células granulares projetam-se, através dos seus axónios (as fibras musgosas), para as dendrites apicais proximais das células piramidais CA3 que, por sua vez, se projetam para as células piramidais CA1 ipsilaterais através dos colaterais de Schaffer e para as células piramidais contralaterais CA3 e CA1 através de conexões comissurais. Além do circuito trissináptico sequencial, há também uma densa rede associativa que interconecta as células CA3 do mesmo lado. As células piramidais da CA3 são também inervadas por uma aferência direta das células da camada II do córtex entorrinal (não mostrado) e as dendrites apicais distais dos neurónios piramidais CA1 recebem uma aferência direta das células da camada III do córtex entorrinal. Os três principais subcampos têm uma organização laminar disposta em forma de C intertravado, com fibras aferentes a terminar em regiões seletivas da árvore dendrítica. Para uma descrição completa da anatomia do hipocampo, ver Amaral et al., in *The hippocampus book* (2007)²³. Adaptado de Neves, Cooke & Bliss (2008)²⁴. **(E) Visão esquemática do sistema de memória do MTL para a memória declarativa, que é composta pelo hipocampo e pelos córtices perirrinal, entorrinal e para-hipocampal.** Abreviaturas: Ant, núcleos talâmicos anteriores; CA, cornu Ammonis; DG, giro dentado; EC, córtex entorrinal; MB, corpos mamilares; Med, núcleos talâmicos mediais; MTT, trato mamilotalâmico (feixe de Vicq d’Azyr); SN, núcleos septais. Figura adaptada de Squire & Wixted (2011)²¹..... 2
- Figura 1.2 Composição molecular modular da sinapse de vertebrados. (A) Sinapse glutamatérgica. (B) Componente pós-sináptico colinérgico. (C) Componente pós-sináptico GABAérgico.** O código de cores representa os diferentes módulos neuronais e submódulos funcionais que não são discutidos no texto. Retirado de Arendt (2020)⁸¹. 9
- Figura 1.3 Transmissão sináptica com os recetores pós-sinápticos em precisa aposição aos locais de libertação pré-sináptica.** Nas sinapses inibitórias, a proteína pós-sináptica gefirina forma uma estrutura multimérica responsável pela ancoragem dos recetores GABA_A (ou glicina) ao citoesqueleto, garantindo assim o acúmulo preciso de recetores pós-sináptico no lugar certo, geralmente na haste dendrítica, mas também encontrados em espinhas. Em contraste, a localização da sua congénere nas sinapses glutamatérgicas PSD-95, maioritariamente localizada nas espinhas dendríticas. Figura retirada de Pizzarelli et al. (2020)⁸⁸. 9
- Figura 1.4 Recetores NMDA ativados pela atividade pré- e pós-sináptica em simultâneo. (a) A ativação pré-sináptica causa a libertação de glutamato, que atua nos recetores pós-sinápticos AMPA e NMDA. Quando a despolarização é curta a ligação do glutamato aos recetores NMDA dá-se antes da despolarização pós-sináptica e os recetores NMDA não são ativados, devido ao bloqueio com o ião**

Mg²⁺. **(b)** Quando a libertação de glutamato é continuada a ligação aos recetores NMDA coincide com uma despolarização pós-sináptica suficiente para deslocar o Mg²⁺ e ativar os recetores, então o Ca²⁺ entra no neurónio pós-sináptico através do recetor NMDA. (Fonte: Adaptado de Bear & Malenka, 1994, Fig. 1.)¹¹². 10

Figura 1.5 Mecanismos de redimensionamento sináptico para manter o equilíbrio excitação/inibição. Os recetores de neurotransmissores excitatórios são localizados nas espinhas dendríticas, enquanto os recetores de neurotransmissores inibitórios se encontram maioritariamente (70%) presentes em locais pós-sinápticos na haste dendrítica, e cerca de 30%¹⁰⁷ nas espinhas dendríticas. **(A)** Ajuste no número de recetores de neurotransmissores presentes em sinapses específicas para equilibrar alterações na força sináptica de uma sinapse vizinha. **(B)** Ajuste no número de moléculas que compõem o esqueleto estrutural de moléculas de adesão celular em contactos excitatórios e inibitórios. **(C)** Regulação do número de proteínas de ancoragem em sinapses excitatórias (PSD-95, stargazina) ou inibitórias (gefirina), regulando a retenção dos recetores AMPA nas sinapses excitatórias e recetores GABA_A nas sinapses inibitórias. Retirado de Keith & El-Husseini (2008)⁹⁴. Abreviaturas: CAM, moléculas de adesão celular (do inglês, cell-adhesion molecules)..... 13

Figura 1.6 Potenciação de longa duração (LTP) in vitro e in vivo. a | Registos extracelulares de LTP induzida por estimulação tetânica da projeção das fibras colaterais de Schaffer (Sch) para as células piramidais CA1 numa fatia transversal de hipocampo (**a. topo**). O painel central esquerdo mostra o registo das respostas sinápticas típicas na região dendrítica apical da CA1 após a estimulação dos colaterais de Schaffer. Estimulação tetânica (uma breve rajada de estímulos elétricos de alta frequência) pode ser usado para induzir LTP com duração de muitas horas na via tetanizada (**a. painel inferior**, círculos fechados); a segunda, via de controlo (círculos abertos) recebe apenas estimulação de basal e não é potenciada (especificidade de entrada). **b** | Indução da LTP in vivo, pela aprendizagem¹⁹⁹. As respostas sinápticas em vários locais são registadas na CA1 de animais em movimento livre, pelo uso de uma matriz de eléctrodos de registo e um único eléctrodo estimulador (**b. painel do meio**). Os ratos foram treinados para uma tarefa de esquiva inibitória (do inglês: Inhibitory avoidance, IA), por tentativa única, uma forma de aprendizagem dependente do hipocampo em que um roedor evita entrar numa arena escura onde recebeu um choque nas patas (**b. painel superior**). O treino IA leva a um aumento rápido, com duração de horas, na amplitude das respostas evocadas em algumas das vias registadas (círculos verdes em **b.**, painel inferior), mas não em outras (círculos vermelhos). A potenciação sináptica depende do treino (**b.**, painel inferior; seta “IA”) e oclui a LTP induzida pela estimulação tetânica (Tet): Compare-se o grau de potenciação induzido pela estimulação tetânica (seta “Tet”) nas vias que foram aumentadas pelo treino (círculos verdes) com as vias que não foram alteradas (círculos vermelhos). Os números 1, 2 e 3 indicam os momentos em que as respostas no painel central (**b.**) se obtiveram a partir das aferências que foram aumentadas (a verde) ou inalteradas (a vermelho). As respostas sobrepostas no painel do meio mostram os efeitos da aprendizagem (1+2) e os efeitos subsequentes da aplicação de três episódios de estimulação tetânica (2+3) mostrando que o aumento da atividade sináptica dependente da experiência usa os mesmos mecanismos moleculares da expressão da LTP induzida por tétano. DG, giro dentado; EC, córtex entorrinal; pp, via perfurante. Figura retirada de Neves, Cooke & Bliss (2008)²⁴. 15

Figura 1.7 Vias para a expressão da LTP. A entrada de Ca²⁺ através do recetor NMDA ativa cinases de proteínas, possibilitando a LTP pela ① alteração da eficácia dos recetores pós-sinápticos AMPA existentes ou ② pela estimulação para a inserção de novos recetores AMPA. (Fonte: Adaptado de Bear & Malenka, 1994, Fig. 1.)¹¹². 16

Figura 1.8 Um modelo de como o Ca²⁺ pode desencadear tanto a LTP como a LTD no hipocampo. A estimulação de alta frequência (EAF) gera LTP por intermédio de uma grande elevação da [Ca²⁺]_i pós-sináptica. A estimulação de baixa frequência (EBF) produz LTD por uma elevação menor da [Ca²⁺]_i. (Fonte: Adaptada de Bear & Malenka, 1994, Fig. 1.)¹¹². 17

| | |
|--|----|
| Figura 1.9 Tráfego de recetores AMPA em condições basais e durante a indução de LTP e LTD. | |
| No estado basal, a exocitose e endocitose de recetores AMPA não só está em equilíbrio com o número de recetores na sinapse e com os mecanismos envolvidos no recrutamento e desmobilização dos recetores AMPA por difusão lateral na membrana. Durante a indução de LTP, o aumento da exocitose de recetores AMPA e do recrutamento sináptica de recetores AMPA difusos levam ao acúmulo elevado de recetores AMPA sinápticos. Durante a indução de LTD, um aumento na desmobilização por difusão lateral e endocitose de recetores AMPA resulta numa redução de recetores AMPA pós-sinápticos. Figura retirada de Hastings & Man (2018) ²⁴⁵ . | 18 |
| Figura 1.10 Três tipos de células piramidais fazem-se acompanhar por pelo menos 21 classes de interneurónios na CA1. | |
| Indicado à esquerda, a terminação principal de cinco aferências glutamatérgicas. Os somas e as dendrites dos interneurónios que inervam as células piramidais (representadas em tons de azul) são cor-de-laranja, e aqueles que inervam principalmente outros interneurónios são cor-de-rosa. Os axónios estão a roxo; e as principais terminações sinápticas a amarelo. Observa-se a associação dos eferentes sinápticos dos diferentes tipos de interneurónio com a região perissomática (à esquerda) e as zonas de terminação da via colateral de Schaffer / comissural ou via entorrinal (à direita), respetivamente. VIP, polipéptido vasoativo intestinal; VGLUT, transportador vesicular de glutamato; O-LM, oriens lacunosum-moleculare. Retirado de Klausberger & Somogyi (2008) ³¹³ . | 24 |
| Figura 1.11 Inibição da LTP induzida por estimulação θ-burst pela ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno. | |
| (A) Evolução temporal dos valores dos declives dos fEPSPs antes e após a estimulação θ -burst na presença do antagonista dos recetores VPAC ₁ , PG 97-269, 100 nM. (B) Potenciação obtida 50-60 min após estimulação θ -burst na ausência e na presença do antagonista de VPAC ₁ , PG 97-269 (100 nM). Abreviaturas: fEPSP, potencial pós-sináptico excitatório de campo (do inglês, field excitatory postsynaptic potential). Retirado de Rodrigues et al. (2021) ⁴⁰² . | 32 |
| Figura 1.12 O VIP endógeno, através da ativação do recetor VPAC₁, previne as alterações na LTP após IEDs in vitro. | |
| Influência do bloqueio do recetor VPAC ₁ para o VIP durante as IEDs provocadas pela superfusão com aCSF contendo 0 mM Mg ²⁺ e 6 mM K ⁺ na expressão de LTP no hipocampo, induzida por estimulação θ -burst aos 30 e aos 60 min após IEDs. ★ Valor-p <0,05 (teste t de Student). Abreviaturas: IEDs, descargas epiletiformes do tipo intercrítico (do inglês, interictal epileptiform discharges). Retirado de Carvalho-Rosa & Cunha-Reis (2019) ⁴⁰⁴ . | 32 |
| Figura 1.13 O efeito da idade na LTD no hipocampo. | |
| Relação entre a idade e a magnitude da LTD na CA1, induzida por um protocolo padrão de EBF (900 × 1 Hz) em rato. Os gradientes de cores refletem as faixas etárias assim definidas de animais jovens (até ao P40), adultos (do P40 ao P200) e idosos (a partir do P200). Retirado de Pinar et al. (2017) ⁴³⁸ . Abreviaturas: LTD, depressão de longa duração; EBF, estimulação de baixa frequência; P, dia pós-natal. | 35 |
| Figura 3.1 Métodos de western blot⁵²¹. | 44 |
| Figura 3.2 Visão geral da imunodeteção. | |
| O western blot é bloqueado, incubado com anticorpos e tratado com um substrato que torne a proteína-alvo visível. As etapas de lavagem são realizadas entre as incubações para remover o excesso de material não ligado e minimizar o sinal não específico no imunoblot ⁵²⁷ . | 46 |
| Figura 3.3 [A] Deteção por anticorpo indireta. | |
| A deteção indireta usa um anticorpo primário não marcado seguido por anticorpos secundários marcados ⁵³¹ . [B] Deteção de sinal do anticorpo. O marcador do anticorpo é exposto ao substrato, criando uma banda visível na superfície do blot (substrato colorimétrico) ou como emissão de luz (substrato ECL) capturada por dispositivos adequados ⁵³² . | 48 |
| Figura 4.1 A atividade intercrítica induz um aumento marcado na expressão sinaptossomal da subunidade GluA2; uma diminuição marcada da subunidade GluA1; e uma diminuição marcada na razão GluA1/GluA2; e essas alterações não dependem da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. | |
| As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias | |

de hipocampo, estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM, ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme descrito no capítulo 3. As subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-F] representam a média ± SEM de 3-5 experiências (n=3-5). Os níveis de GluA1 [A], GluA2 [C] e da razão GluA1/GluA2 [E] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-p <0,05. Os níveis de GluA1 [B] e GluA2 [D] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal. Os níveis da razão GluA1/GluA2 [F] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student independente unicaudal com correção de Welch. As diferenças não foram estatisticamente significativas (P <0,05)..... 53

Figura 4.2 A atividade intercristica não induz alterações na expressão sinaptossomal da proteína pós-sináptica PSD-95, mas aumenta fortemente a expressão da proteína gefirina; sendo que ambas as alterações não se mostram depender da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo de ratos saudáveis, estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM; ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. As gefirina e PSD-95 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média ± SEM de 2-5 experiências (n=2-5). Os níveis de gefirina [A] e PSD-95 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-p <0,05. Os níveis de gefirina [B] e PSD-95 [D] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (P <0,05). 54

Figura 4.3 A atividade intercristica não induz alterações na expressão sinaptossomal dos canais de potássio dependentes de voltagem do subtipo 4.2; A ação tónica do VIP nos recetores VPAC₁, contribui para esta ausência de alterações. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM, ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. Os canais K_v4.2 foram detetados com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média ± SEM de 3-4 experiências (n=3-4). Os níveis de K_v4.2 [A] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-p <0,05. Os níveis de K_v4.2 [B] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se um aumento dos canais K_v4.2 (*P <0,05)..... 55

Figura 4.4 A atividade intercristica não induz alterações na expressão sinaptossomal da sinaptofisina, que não é influenciada pela ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM, ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. A proteína pré-sináptica sinaptofisina foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média ± SEM de 3-4 experiências (n=3-4). Os níveis de sinaptofisina [A] obtidos na ausência de estimulação química ou

farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-p <0,05. Os níveis de sinaptofisina [B] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (P <0,05)..... 55

Figura 4.5 A atividade intercrítica induz uma diminuição marcada na expressão sinaptossomal de caveolina-1 e flotilina-1 e a ação do VIP endógeno, nos recetores VPAC₁, parece potenciar uma atenuação na perda de ambas estas proteínas de jangadas lipídicas. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a Mg^{2+} 0 mM; ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM); e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme descrito no capítulo 3. As proteínas de jangadas lipídicas caveolina-1 e flotilina-1 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média ± SEM de 3-7 experiências (n=3-7). Os níveis de caveolina-1 [A] e flotilina-1 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-p <0,05. Os níveis de caveolina-1 [B] e flotilina-1 [D] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se um aumento da caveolina-1 e da flotilina-1 (*P <0,05)..... 56

Figura 4.6 A atividade crítica diminui a expressão sinaptossomal da subunidade GluA1, não alterando a expressão da subunidade GluA2, o que resulta numa diminuição marcada na razão GluA1/GluA2. Este efeito parece ser agravado pela ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a Bic (10 μM), ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Bic + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. As subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-F] representam a média ± SEM de 3-6 experiências (n=3-6). Os níveis de GluA1 [A], GluA2 [C] e da razão GluA1/GluA2 [E] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-p <0,05. Os níveis de GluA1 [B] e GluA2 [D] obtidos após tratamento com Bic (10 μM) na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se uma diminuição da subunidade GluA1 (*P <0,05), sem se observar diferenças estatisticamente significativas da subunidade GluA2 (P <0,05). Os níveis da razão GluA1/GluA2 [F] obtidos após tratamento com Bic (10 μM) na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student independente unicaudal com correção de Welch e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (P <0,05)..... 58

Figura 4.7 A atividade crítica não induz alterações na expressão sinaptossomal da proteína pós-sináptica PSD-95, mas aumenta fortemente a expressão da proteína gefirina; ambas de forma independente da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a Bic (10 μM); ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Bic + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. As proteínas pós-sinápticas gefirina e PSD-95 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média ± SEM de 2-5 experiências (n=2-5). Os níveis de gefirina [A] e PSD-95 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Bic ou PG 97-269 usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-p <0,05. Os níveis de gefirina [B] e PSD-95 [D]

obtidos após tratamento com **Bic** (10 μ M) na ausência e na presença de **PG 97-269** (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). 59

Figura 4.8 A atividade crítica não induz alterações na expressão sinaptossomal dos canais $K_v4.2$ observações que não dependem da ação do VIP endógeno nos recetores $VPAC_1$. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a **Bic** (10 μ M); ao antagonista dos recetores $VPAC_1$ para o VIP **PG 97-269** (100 nM) e **Bic + PG 97-269**, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (**CTR**), conforme o descrito no capítulo 3. Os canais $K_v4.2$ foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos **[A-B]** representam a média \pm SEM de 3-4 experiências ($n=3-4$). Os níveis dos canais $K_v4.2$ **[A]** obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (**CTR**) foram comparados com os obtidos na presença de **Bic** ou **PG 97-269** usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-p $< 0,05$. Os níveis dos canais $K_v4.2$ **[B]** obtidos após tratamento com **Bic** (10 μ M) na ausência e na presença de **PG 97-269** (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, e não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). 59

Figura 4.9 A atividade crítica não induz alterações na expressão sinaptossomal da sinaptofisina, que não é influenciada pela ação do VIP endógeno nos recetores $VPAC_1$. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a **Bic** (10 μ M); ao antagonista dos recetores $VPAC_1$ para o VIP **PG 97-269** (100 nM) e **Bic + PG 97-269**, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (**CTR**), conforme o descrito no capítulo 3. A proteína pré-sináptica sinaptofisina foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos **[A-B]** representam a média \pm SEM de 3-4 experiências ($n=3-4$). Os níveis de sinaptofisina **[A]** obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (**CTR**) foram comparados com os obtidos na presença de **Bic** ou **PG 97-269** usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-p $< 0,05$. Os níveis de sinaptofisina **[B]** obtidos após tratamento com **Bic** (10 μ M) na ausência e na presença de **PG 97-269** (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$). 60

Figura 4.10 A atividade crítica induz uma diminuição marcada na expressão sinaptossomal de caveolina-1 e de flotilina-1 e a ação do VIP endógeno, nos recetores $VPAC_1$, o VIP protege a perda acentuada de caveolina-1, mas não de flotilina-1. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a **Bic** (10 μ M); ao antagonista dos recetores $VPAC_1$ para o VIP **PG 97-269** (100 nM) e **Bic + PG 97-269**, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (**CTR**), conforme descrito no capítulo 3. As proteínas de jangadas lipídicas caveolina-1 e flotilina-1 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos **[A-D]** representam a média \pm SEM de 3-5 experiências ($n=3-5$). Os níveis de caveolina-1 **[A]** e flotilina-1 **[C]** obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (**CTR**) foram comparados com os obtidos na presença de **Bic** ou **PG 97-269** usando uma one-way ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-p $< 0,05$. Os níveis de caveolina-1 **[B]** e flotilina-1 **[D]** obtidos após tratamento com **Bic** (10 μ M) na ausência e na presença de **PG 97-269** (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se uma diminuição da caveolina-1 (* $P < 0,05$), sem se observar diferenças estatisticamente significativas da flotilina-1 ($P < 0,05$). 61

Figura 4.11 Comparação da expressão sinaptossomal de GluA1, GluA2 e da razão GluA1/GluA2 ao longo da idade em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. As subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos **[A-F]** representam a média \pm SEM de 4 experiências ($n=4$). Os níveis de

GluA1 [A], GluA2 [B] e da razão GluA1/GluA2 [E] dos machos foram normalizados a 100% e foram comparados com os valores das fêmeas, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor-p <0,05. Os níveis de GluA1 [C], GluA2 [D] e da razão GluA1/GluA2 [F], obtidos em comparação com o valor dos machos e das fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma one-way ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey (P <0,05); a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma two-way ANOVA simples (P <0,05). 62

Figura 4.12 Comparação da expressão sinaptossomal das proteínas de ancoragem pós-sináptica gefirina e PSD-95 ao longo da idade em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 8, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. As proteínas pró-sinápticas gefirina e PSD-95 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média ± SEM de 2-5 experiências (n=2-5). Os níveis de gefirina [A] e PSD-95 [B] dos machos foram normalizados a 100% para todas as idades e foram comparados os valores das fêmeas da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor-p <0,05. Os níveis de gefirina [C] e PSD-95 [D], obtidos em comparação com o valor dos machos e das fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma one-way ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey (P <0,05); e a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma two-way ANOVA simples (P <0,05)..... 63

Figura 4.13 Comparação da expressão sinaptossomal dos canais Kv4.2 ao longo da idade em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. Os canais Kv4.2 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média ± SEM de 2-3 experiências (n=2-3). Os níveis de Kv4.2 [A], com os valores dos machos normalizados a 100%, foram comparados os valores das fêmeas da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; valor-p <0,05. Os níveis de Kv4.2 [B], obtidos em comparação com o valor dos machos e fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma one-way ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey (P <0,05); e a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma two-way ANOVA simples (P <0,05). 64

Figura 4.14 Comparação da expressão sinaptossomal das proteínas pré-sinápticas sinaptofisina e SNAP-25, ao longo da idade, em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. As proteínas pré-sinápticas sinaptofisina e SNAP-25 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média ± SEM de 4 experiências (n=4). Os níveis de sinaptofisina [A] e SNAP-25 [B] dos machos foram normalizados a 100% e foram comparados com os valores das fêmeas, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor-p <0,05. Os níveis de sinaptofisina [C] e SNAP-25 [D], obtidos em comparação com o valor dos machos e das fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma one-way ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey (P <0,05); a diferença entre machos e fêmeas foi avaliada usando uma two-way ANOVA simples (P <0,05). 65

Figura 4.15 Comparação da expressão sinaptossomal da proteína de caveolae caveolina-1, ao longo da idade, em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. A proteína de jangadas lipídicas caveolina-1 foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média ± SEM de 6 experiências (n=6). Os níveis de caveolina-1 [A], com os valores dos machos normalizados a 100%, foram comparados os valores das fêmeas com os dos machos da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor-p <0,05. Os níveis de caveolina-1 [B], obtidos em comparação com o valor dos machos e fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma one-way ANOVA simples com aplicação

do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$); a diferença entre machos e fêmeas foi avaliada usando uma two-way ANOVA simples ($P < 0,05$)..... 66

Figura 4.16 Comparação da expressão sinaptossomal do enzima marcador de terminais monoaminérgicos hidroxilase de tirosina (TH), ao longo da idade, em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. A TH foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média \pm SEM de 3-5 experiências ($n=3-5$). Os níveis de TH [A], com os valores dos machos normalizados a 100%, foram comparados os valores das fêmeas com os dos machos da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; valor-p $< 0,05$. Os níveis de TH [B], obtidos com referência ao valor dos machos e fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma one-way ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$); a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma two-way ANOVA simples ($P < 0,05$). 66

Figura 8.1 [A] Ilustração da criatura mitológica – Hipocampo: “Uma criatura fantástica sobre a qual os antigos pagãos sentariam Neptuno, o seu Deus do mar”, Conrad Gessner in *Nomenclator Aquatiliu Animantium* (1560; página 182). Digitalização cedida pelo Museu de História: Museum für medizinhistorische Bücher Muri, em Muri, Suíça⁷¹⁷. **[B]** Ampliação da parte superior da imagem (A) desta mesma figura, evidenciando apenas o desenho ilustrativo. **[C]** Preparação de hipocampo e fórnix humanos (à esquerda) em comparação com um cavalo-marinho (à direita); (Preparação pelo professor emérito László Seress, da Universidade de Pécs, Pécs, Hungria, em 1980). Imagem obtida da pesquisa de Domínio Público do Wikimedia Commons⁷¹⁸. **[D]** Secção coronal através do hipocampo dorsal de um rato Wistar macho adulto, corado com Nissl e apresentando as regiões e camadas nas quais as densidades médias dos recetores AMPA, cainato e NMDA foram medidas. CA1-3: Sub-regiões do cornu Ammonis; DG: Giro dentado; Stratum or: oriens, pyr: pyramidale, rad: radiatum, l-m: lacunosum-moleculare, e l: lucidum do cornu Ammonis; Stratum mol: moleculare e gr: granulosum do giro dentado. Barra de escala = 1 mm. Imagem retirada de Palomero-Gallagher, Bidmon & Zilles (2003)²⁶. **[E]** Secção histológica coronal do cérebro inteiro de um macaco adulto (*Macaca mulatta*) com coloração de Nissl, com o hipocampo destacado dentro de uma área circulada delimitada, no canto inferior direito. Imagem obtida na pesquisa de Domínio Público do Wikimedia Commons⁷¹⁹. **[F]** Ampliação do canto inferior direito da imagem (E) desta mesma figura, evidenciando a área circular correspondente ao hipocampo. **[G]** Anatomia transversal do hipocampo humano denotando uma relação de intertravamento do giro dentado (DG) e o cornu Ammonis (CA) formando dois anéis em forma de C que se interligam. Desenho de um hipocampo, pelo patologista italiano Camillo Golgi, corado pelo método de nitrato de prata. Imagem originalmente retirada de Golgi (1886)⁷²⁰. Ilustração obtida em Gross et al. (2019)²⁵. **[H]** Organização da formação do hipocampo originalmente desenhada pelo neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal com uma representação esquemática da organização das camadas, usando o método de Golgi-Cox. O circuito trissináptico no hipocampo é organizado em três regiões principais: O giro dentado e os campos das CA3 e CA1. A via perfurante conecta o córtex entorrinal com o giro dentado e foi o local original de estudo para a potenciação de longa duração (LTP). As fibras musgosas do giro dentado projetam-se para o campo da CA3. Dos campos da CA3, as fibras podem sair pelo fórnix (canto superior direito) ou continuar para a CA1 pela via colateral de Schaffer. Os neurónios da CA1 então projetam-se noutros neurónios no córtex entorrinal e subículo. EC = córtex entorrinal; CA = cornu Ammonis; DG = giro dentado; Sub = subículo⁷²¹. Imagem modificada do circuito neural do hipocampo de rato, [retirada originalmente de Ramón y Cajal in *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme & des Vertebretes*; Paris, França: Maloine (1911)¹⁹]; imagem girada, legendada de novo e com diagrama adicional criado em Gi; obtida da pesquisa de Domínio Público do Wikimedia Commons⁷²²..... 129

Figura 8.2 O hipocampo; a configuração de estimulação e registo utilizada por Bliss & Lomo (1973)¹⁷⁷, em que a via perfurante (PP) é estimulada (Stim) com uma rajada de alta frequência, e

| | |
|--|-----|
| o elétrodo de registo (Rec) na área dentada (AD) revela um fortalecimento nas sinapses de conexão que persiste durante horas. ab = Feixe angular (do inglês, angular bundle); CA = Áreas cornu Ammonis; Hipp fiss = Fissura do hipocampo; mf = Fibras musgosas; sub = Subículo. Diagrama retirado de Bliss & Lømo (1973) ¹⁷⁷ | 130 |
| Figura 8.3 Representação simplificada de uma experiência em que se induziu LTP na CA1, revelando o fortalecimento sináptico prolongado após um trem de alta frequência (estimulação tetânica). Os estímulos de teste antes e depois do tétano são de baixa frequência, todavia capazes de acionar um disparo elevado dos neurónios dentados por horas após o pulso de alta frequência. EPSP = Potencial pós-sináptico excitatório; PTP = Potenciação pós-tetânica; Rec = elétrodo de registo; Stim = elétrodo de estímulo. Atribuição do diagrama: CC BY-SA 3.0; Ficheiro, “LTP exemplar.jpg”; Criado a 15 de agosto de 2005; Consultado em, Wikimedia Commons, Category: Long-term potentiation, a 13 de janeiro de 2021, em https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Long-term_potentiation ; Figura adaptada..... | 130 |
| Figura 8.4 Contagem anual de publicações por pesquisa por tópico escrevendo as palavras “long-term potentiation” em Web of Science (consultado a 14 de janeiro de 2021, em https://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do?product=WOS&SID=D1RjaGaKomSQVpra4bk&field=PY_PublicationYear_PublicationYear_en&yearSort=true). Com base neste gráfico, é feito notar-se uma clara subida no número de publicações anuais a contar a partir de 1990 (com 171 artigos publicados) até de 2011 (com 1609 artigos publicados), por exemplo. No ano de 2006, foi ultrapassada a marca dos 1400 artigos (com 1405 artigos publicados), seguindo-se então uma estabilização a um nível médio de 1547 artigos por ano desde 2006 até 2020. Os balões-rótulo de chamada de dados apresentados neste gráfico representam: [Ano, Número de publicações]..... | 132 |
| Figura 8.5 Marcos importantes na descoberta da LTP como um mecanismo de memória. Linha temporal dos principais marcos da investigação que avaliam a ligação entre a LTP e a aprendizagem e o armazenamento de memória. Observe-se o atraso de várias décadas desde a primeira descrição da LTP até à emergência de evidências que suportem um papel da LTP na memória. Consultar a secção de Referências para as citações dos artigos incluídos aqui: Lømo (1966) ⁷¹⁴ ; Bliss & Lømo (1973) ¹⁷⁷ ; Bliss & Gardner-Medwin (1973) ⁷²³ ; Barnes (1979) ⁷³⁹ ; Barnes & McNaughton (1985) ⁷⁴⁰ ; Morris et al. (1986) ¹⁸⁵ ; McNaughton et al. (1986) ⁷⁴¹ ; Castro et al. (1989) ⁷⁴² ; Saucier & Cain (1995) ⁷⁴³ ; Rogan, Staubli & LeDoux (1997) ⁷⁴⁴ ; McKernan & Shinnick-Gallagher (1997) ⁷⁴⁵ ; Rioult-Pedotti et al. (1998) ⁷⁴⁶ ; Rioult-Pedotti, Friedman & Donoghue (2000) ⁷⁴⁷ ; Whitlock et al. (2006) ¹⁹⁹ ; Pastalkova et al. (2006) ¹⁰ ; Nabavi et al. (2014) ⁷⁴⁸ | 133 |
| Figura 8.6 Visão geral e esquemática dos vários fatores contribuintes, diferentes escalas e níveis metodológicos e conceituais que determinam a plasticidade neuronal no hipocampo. Figura retirada de Bartsch & Wulff (2015) ²² | 135 |
| Figura 8.7 Exposição das fatias de hipocampo a atividade epileptiforme. Montagens experimentais utilizadas para obtenção de registos eletrofisiológicos em fatias de hipocampo [A e B] e para obtenção de tecido para análise por western blot. [A] Vista geral da gaiola de Faraday com câmara de registo, micromanipuladores, estereomicroscópio. [B] Plano aproximado da câmara de registo, banho de aquecimento, eléctrodos de estimulação e elétrodo de registo. [C] Sistema de quatro câmaras paralelas utilizado na estimulação das fatias de hipocampo, mostrando o sistema de perfusão e os estimuladores. | 136 |
| Figura 8.8 Reta-padrão de calibração para o método de Bradford⁵⁰⁸, para a determinação da concentração de proteínas nas amostras CTR; PG 97-269; Mg²⁺ 0 mM; Mg²⁺ 0 mM + PG 97-269; Bic & Bic + PG 97-269. A linha contínua representa o ajuste linear da razão das absorvências lidas a 590 nm e a 450 nm obtidas para cada concentração de proteína. O R ² é o coeficiente de determinação, cujo reflete a qualidade da regressão linear, quer dizer, quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste. 138 | 138 |

Figura 8.9 Reta-padrão de calibração para o método de Bradford⁵⁰⁸, para determinação da concentração de proteínas nas amostras ♂ (4M, 9M, 12M, 21M) e ♀ (4M, 9M, 12M, 21M). A linha contínua representa o ajuste linear da razão das absorvências lidas a 590 nm e a 450 nm obtidas para cada concentração de proteína. O R^2 é o coeficiente de determinação. 138

Lista de tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 3.1 Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados e respectivo agente bloqueador. | 47 |
| Tabela 5.1 Principais alterações sinápticas induzidas por atividade intercrítica e a sua dependência da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. Os alvos para os quais os efeitos da atividade intercrítica foram diferentes quando bloqueada a ação do VIP endógeno nos recetores VPAC ₁ (Mg²⁺ 0 mM + PG 97-269) estão destacados a azul. Abreviaturas: Gef, gefirina; Sinap, sinaptofisina; Cav-1, caveolina-1; Flot-1, flotilina-1..... | 67 |
| Tabela 5.2 Principais alterações sinápticas induzidas por atividade crítica e a sua dependência da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. Os alvos para os quais os efeitos da atividade crítica foram diferentes quando bloqueada a ação do VIP endógeno nos recetores VPAC ₁ (Bic + PG 97-269) estão destacados a azul. Abreviaturas: Gef, gefirina; Sinap, sinaptofisina; Cav-1, caveolina-1; Flot-1, flotilina-1..... | 67 |
| Tabela 5.3 Principais alterações nos níveis de expressão sinaptossomal de proteínas sinápticas observadas durante o envelhecimento e nos diferentes sexos. Abreviaturas: Gef, gefirina; Sinap, sinaptofisina; Cav-1, caveolina-1; TH, hidroxilase de tirosina. | 75 |
| Tabela 8.1 Semelhanças entre as características da potenciação de longa duração (LTP), aprendizagem e formação de memória dependente do hipocampo. | 134 |

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos, etc.

| | |
|----------------------------------|--|
| [Ca ²⁺] _i | Concentração de cálcio intracelular |
| [K ⁺] | Concentração de K ⁺ |
| [K ⁺] _o | Concentração extracelular de potássio |
| [Mg ²⁺] _o | Concentração extracelular de magnésio |
| 1-Ab | Anticorpos primários |
| 2-Ab | Anticorpos secundários |
| 2-ME | 2-Mercaptoetanol |
| 5HT3aR | Recetor 3a de serotonina |
| Ab | Anticorpos |
| aCSF | Líquido cefalorraquidiano artificial |
| ADC | Coeficiente de difusão aparente |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| APS | Persulfato de amónio |
| AVC | Acidente vascular cerebral |
| A β | β -amiloide |
| <i>Background</i> | Marcação de fundo não específica |
| <i>Bic</i> | Bicuculina |
| BSA | Seroalbumina bovina |
| CA | <i>Cornu Ammonis</i> ou corno de Ámon |
| CA1 | Área 1 do <i>cornu Ammonis</i> |
| CA2 | Área 2 do <i>cornu Ammonis</i> |
| Ca ²⁺ | Iões de cálcio |
| CA3 | Área 3 do <i>cornu Ammonis</i> |
| CA4 | Área 4 do <i>cornu Ammonis</i> |
| CaMKII | Cinase II de proteínas dependentes de cálcio/calmodulina |
| cAMP | Monofosfato cíclico de adenosina |
| Ca _v | Canais de cálcio dependentes de voltagem |
| CCK | Colecistocinina |
| CH ₃ COOH | Ácido acético |
| Cl ⁻ | Iões de cloro |
| CREB | <i>cAMP response element-binding protein</i> |
| CTR | Controlo |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DG | Giro dentado |
| E. g. | Por exemplo |
| E/I | Excitatórios vs. inibitórios |
| EAF | Estimulação de alta frequência |
| EBF | Estimulação de baixa frequência |
| EC | Córtex entorrinal |
| ECL | Quimioluminescência aumentada |
| EDTA | ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EEG | Eletroencefalografia ou eletroencefalograma |
| EPSP | Potencial pós-sináptico excitatório |
| ERs | Recetores de estrogénios |
| ER α | Recetor de estrogénio alfa |
| ER β | Recetor de estrogénio beta |

| | |
|-----------------------------|---|
| E-S | Ocorrência dos impulsos de potenciais pós-sinápticos excitatórios |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GABA_A | Ácido γ -aminobutírico do tipo A |
| GABA_B | Ácido γ -aminobutírico do tipo B |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| GluA1 | Subunidade 1 do recetor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| GluA2 | Subunidade 2 do recetor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| GluA3 | Subunidade 3 do recetor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| GluA4 | Subunidade 4 do recetor do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HEPES | Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil]-etanossulfónico |
| HKP | Proteínas de manutenção |
| HRP | Peroxidase de <i>Azadirachta indica</i> |
| HS | Esclerose do hipocampo |
| IEDs | Descargas epiletiformes do tipo intercrítico |
| IF | Inibidores das fosfatases |
| iGluRs | Recetores ionotrópicos de glutamato |
| IP | Inibidores das proteases |
| IS | Específico de interneurónios |
| ISM | Microelétrodos seletivos de iões |
| K⁺ | Iões de potássio |
| KA | Ácido caínico |
| KCC2 | Isoforma 2 do co-transportador de K ⁺ -Cl ⁻ |
| KChIP | Proteína que interage com o canal de potássio dependente de voltagem |
| kDa | Quilodalton |
| KO | Inativações moleculares |
| K_v | Canais de potássio dependentes de voltagem |
| K_v4.2 | Canais de potássio dependentes de voltagem do subtipo 4.2 |
| Li²⁺-Pilo | Lítio-pilocarpina |
| L-LTP | LTP tardia |
| LSB | Tampão de amostra Laemmli |
| LTD | Depressão de longa duração |
| LTP | Potenciação de longa duração |
| M | Meses |
| Mg²⁺ | Iões de magnésio |
| mGluRs | Recetores metabotrópicos de glutamato |
| miR-182 | MicroRNA-182 |
| MJLs | Membranas/ jangadas lipídicas |
| MRI | Imagem por ressonância magnética |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| MTL | Lobo temporal medial |
| MTLE | Epilepsia do lobo temporal mesial |
| Na⁺ | Iões de sódio |
| NaN₃ | Azida de sódio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| Na_v | Canais de sódio dependentes de voltagem |
| NKCC1 | Isoforma 1 do co-transportador de Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ |
| NMDA | <i>N</i> -Metil-D-aspartato |

| | |
|-------------------------|--|
| NO | Óxido nítrico |
| O-LM | <i>Oriens lacunosum-moleculare</i> |
| ON | <i>Overnight</i> |
| P | Dia pós-natal |
| PACAP | Polipéptido ativador do adenilato ciclase da pituitária |
| PH | Córtex para-hipocampal |
| PKA | Cinase A de proteínas |
| PKC | Cinase C de proteínas |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonilo |
| PP1 | Fosfatase 1 de proteínas |
| PP2A | Fosfatase 2 de proteínas |
| PR | Córtex perirrinal |
| PSD | Densidade pós-sináptica |
| PSD-95 | Densidade pós-sináptica de 95 quilodalton |
| PV | Parvalbumina |
| PVDF | Difluoreto de polivinilideno |
| QR2 | Redutase de quinona do tipo 2 |
| RPM | Rotações por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| SE | <i>Status epilepticus</i> |
| SEM | Erro padrão da média |
| Ser | Resíduo de serina |
| SNAP-25 | Proteína associada ao sinaptossoma, 25 quilodalton |
| SNARE | <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SRSs | Crises epiléticas espontâneas recorrentes |
| SST | Somatostatina |
| STDP | Plasticidade em função do tempo de ocorrência dos impulsos |
| Str. l | <i>Stratum lucidum</i> |
| Str. l-m | <i>Stratum lacunosum-moleculare</i> |
| Str. mol | <i>Stratum moleculare</i> |
| Str. or | <i>Stratum oriens</i> |
| Str. pyr | <i>Stratum pyramidale</i> |
| Str. rad | <i>Stratum radiatum</i> |
| TBS | Tampão Tris-salino |
| TBST | Tampão Tris-salino com <i>Tween 20</i> |
| TEMED | Tetrametiletilenodiamina |
| TH | Hidroxilase de tirosina |
| TLE | Epilepsia do lobo temporal |
| Tris | Tris(hidroximetil)aminometano |
| TrkB | Cinase do tipo B do recetor ligado a tropomiosina |
| VIP | Péptido vasoativo intestinal |
| VPAC₁ | Recetores do tipo 1 do péptido vasoativo intestinal |
| WB | Western blot |

1. Introdução

O hipocampo é em grande parte considerado como o centro de uma rede neuronal de suporte à codificação, consolidação e à recuperação de memória – uma estrutura do cérebro crucial para o estudo da memória humana – que tem sido implicado na memória episódica e semântica de longa duração; na deteção de novidade; consolidação da memória dependente do sono; na distinção de padrões; na navegação espacial e à ligação de representações distribuídas temporal e espacialmente¹. Além dessas funções cognitivas, o hipocampo também está envolvido na regulação da emoção, medo, ansiedade e do stress. O hipocampo tem uma arquitetura celular e rede de comunicação intrigante e é sugerido que essa harmonia particular dos circuitos do hipocampo, em diferentes sub-regiões, atenda a operações mnemónicas distintas². De facto, nas últimas décadas, tem sido revelado que a anatomia e a função do hipocampo têm uma organização modular complexa e diferenciada³. Além disso, tem sido cada vez mais estudado, em humanos, o conceito de especialização regional e organização das funções do hipocampo, demonstrando que, por certo, as operações mnemónicas podem ser atribuídas a sub-redes e sub-regiões do hipocampo⁴⁻⁶.

O hipocampo é considerado um exemplo clássico no estudo da plasticidade neuronal funcional. A plasticidade neuronal é a capacidade de adaptar e reorganizar a estrutura ou função em resposta a estímulos internos ou externos e ocorre quer a nível sináptico como a nível celular, populacional, de rede ou comportamental⁷. A plasticidade neuronal reflete-se na arquitetura celular e na rede de comunicação e espelha-se nas propriedades intrínsecas dos neurónios e dos circuitos do hipocampo. A plasticidade estrutural dos neurónios e os circuitos do hipocampo, inclui modificações do tamanho da árvore dendrítica e das espinhas; do número de sinapses, bem como a formação de novos neurónios⁸. Observam-se nos circuitos do hipocampo muitos fenómenos de plasticidade sináptica, como a potenciação de longa duração (LTP, do inglês, *long-term potentiation*); a depressão de longa duração (LTD, do inglês, *long-term depression*) e a plasticidade em função do tempo de ocorrência dos impulsos (STDP, do inglês, *spike-timing-dependent plasticity*) que se acredita serem fundamentais para a aprendizagem e memória^{9,10}. A plasticidade neuronal celular não se limita a alterações fisiológicas, mas também está presente no contexto da patologia progressiva, como a neurodegeneração na doença de Alzheimer, em humanos, que é cada vez mais estudada¹¹; ou também no processo de epileptogénese, capaz de gerar crises epiléticas recorrentes espontâneas (SRSs, do inglês, *spontaneous recurrent seizures*), que caracterizam a epilepsia¹². Ao nível das redes de comunicação, a plasticidade neuronal, nos circuitos do hipocampo, impulsiona alterações na conectividade e modificações estruturais que têm, em última análise, impacto no comportamento do indivíduo^{13,14}.

Este elevado grau de plasticidade do hipocampo é, no entanto, acompanhado pela sua pronunciada vulnerabilidade a condições deletérias, tais como a isquémia, crises epiléticas, neuroinflamação, stress crónico, neurodegeneração e o envelhecimento, sugerindo que as propriedades intrínsecas dos neurónios e dos circuitos do hipocampo são críticas para a plasticidade neuronal. Por exemplo (e. g., do latim, *exempli gratia*), a excitabilidade glutamatérgica pode predispor lesões metabólicas, excitotoxicidade e stress oxidativo, que ocorrem no processo de várias doenças neurológicas e psiquiátricas¹⁵. Essa visão reflete-se na observação de Bruce McEwen (1994)¹⁶ de que “a plasticidade do hipocampo é a razão da sua vulnerabilidade”.

1.1. Anatomia do hipocampo

Inicialmente descoberto pelo italiano Arantius (1587)¹⁷, ao qual, por achar semelhante a um cavalo-marinho, lhe deu o nome de “*hippocampus*” – foi extensamente estudado pelo histologista Golgi (1883)¹⁸ e mais tarde pelo neuroanatomista Ramón y Cajal (1911)¹⁹ (ver secção 8.1.1 para uma breve perspetiva etimológica e histórica do termo «hipocampo»). A codificação, consolidação, assim como a recuperação de informações mnemónicas, dependem criticamente de uma grande rede reciprocamente

conectada que interligue regiões de associação neocorticais e núcleos subcorticais com o lobo temporal medial (MTL, do inglês, *medial temporal lobe*), que inclui o córtex temporal, áreas para-hipocampais e o hipocampo (**Figura 1.1**). Considera-se que o hipocampo seja o nó central deste circuito, sendo uma estrutura alocortical de três camadas, que recebe informações de quase todas as áreas de associação neocortical via córtex perirrinal (PR, do inglês, *perirhinal cortex*), córtex para-hipocampal (PH, do inglês, *parahippocampal cortex*) e, por fim, do córtex entorrinal (EC, do inglês, *entorhinal cortex*)²⁰.

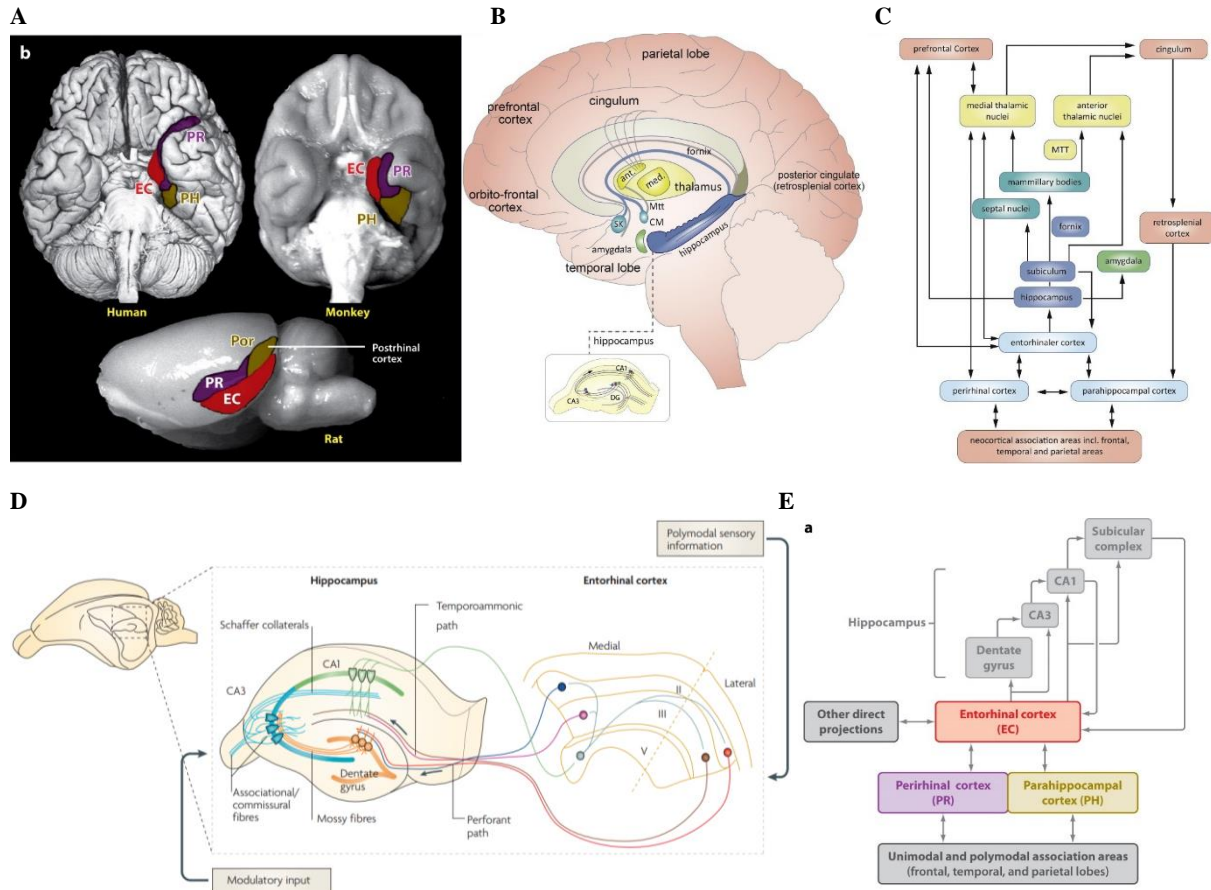


Figura 1.1 (A) Visão ventral de um cérebro humano (canto superior esquerdo), cérebro de macaco (canto superior direito) e visão lateral de um cérebro de rato (centro inferior). Os principais componentes corticais do lobo temporal medial (MTL) estão destacados e delineados. O hipocampo não é visível da superfície e, no ser humano, fica abaixo do córtex do MTL. A sua extensão anterior encontra-se abaixo dos córtex entorrinal posterior (vermelho) e perirrinal (roxo), e o corpo principal do hipocampo fica abaixo do córtex para-hipocampal. No rato, o córtex para-hipocampal é denominado córtex pós-rinal. Abreviaturas: EC, córtex entorrinal; PH, córtex para-hipocampal (amarelo-escuro); Por - córtex pós-rinal; PR - córtex perirrinal. Figura adaptada de Squire & Wixted (2011)²¹. (B) **Anatomia principal dos sistemas de memória do hipocampo e as regiões do cérebro envolvidas na aprendizagem e memória.** Adaptado de Bartsch & Wulff (2015)²². (C) **Mapa da conectividade das estruturas críticas da memória do sistema do lobo temporal, núcleos diencefálicos e das áreas de associação neocorticais, com destaque para o fluxo recíproco de informações.** Adaptado de Bartsch & Wulff (2015)²². (D) **Diagrama da rede do hipocampo de rato mostrando o circuito trissináptico**, cuja principal aferência é a via perfurante, que transmitem informações sensoriais polimodais dos neurónios na camada II do córtex entorrinal para as células granulosas do giro dentado. As células granulares projetam-se, através dos seus axónios (as fibras musgosas), para as dendrites apicais proximais das células piramidais CA3 que, por sua vez, se projetam para as células piramidais CA1 ipsilaterais através dos colaterais de Schaffer e para as células piramidais contralaterais CA3 e CA1 através de conexões comissurais. Além do circuito trissináptico sequencial, há também uma densa rede associativa que interconecta as células CA3 do mesmo lado. As células piramidais da CA3 são também inervadas por uma aferência direta das células da camada II do córtex entorrinal (não mostrado) e as dendrites apicais distais dos neurónios piramidais CA1 recebem uma aferência direta das células da camada III do córtex entorrinal. Os três principais subcampos têm uma organização laminar disposta em forma de C intertravado, com fibras aferentes a terminar em regiões seletivas da árvore dendrítica. Para uma descrição completa da anatomia do hipocampo, ver Amaral *et al.*, in *The hippocampus book* (2007)²³. Adaptado de Neves, Cooke & Bliss (2008)²⁴. (E) **Visão esquemática do sistema de memória do MTL para a memória declarativa, que é composta pelo hipocampo e pelos córtex perirrinal, entorrinal e para-hipocampal.** Abreviaturas: Ant, núcleos talâmicos anteriores; CA, *cornu Ammonis*; DG, giro dentado; EC,

córtex entorrinal; MB, corpos mamilares; Med, núcleos talâmicos mediais; MTT, trato mamilotalâmico (feixe de Vicq d'Azyr); SN, núcleos septais. Figura adaptada de Squire & Wixted (2011)²¹.

Visto em seção transversal através de sua porção média, o hipocampo demonstra um perfil de “dois ‘C’s interligados” formado pelas principais camadas celulares do *cornu Ammonis* (CA; – hipocampo propriamente dito) e giro dentado (DG, do inglês, *dentate gyrus*), uma característica notavelmente consistente no hipocampo de todos os mamíferos^{25,26} (ver **Figura 8.1**). A região CA é ainda dividida em quatro sub-regiões ou áreas: Área 1 do *cornu Ammonis* (CA1), CA2, CA3 e CA4 ou “camada polimórfica profunda do DG”²³, todas funcionalmente e estruturalmente distintas e, como tal, indissociavelmente vulneráveis a diferentes patologias²⁷. As regiões CA1-3 são constituídas por quatro a cinco camadas [*stratum oriens* (str. or), *stratum pyramidale* (str. pyr), *stratum radiatum* (str. rad), *stratum lacunosum-moleculare* (str. l-m) e *stratum lucidum* (str. l); ver **Figura 8.1**].

Os neurónios principais do hipocampo estão organizados em camadas e recebem aferências polimodais unidirecionais do EC, onde os neurónios da camada II se projetam através da via perforante para as células granulares no DG³. O principal circuito de alimentação direta envolvido no processamento de informações através do hipocampo é o circuito trissináptico²⁸, que se inicia nos axónios das células piramidais no EC, que formam a via perforante, para as células granulares do DG; adiante, para a CA3, por via das fibras musgosas; e, avante, para a CA1, pela via dos colaterais de Schaffer (**Figura 1.1**). Além disso, os neurónios da camada III do EC projetam-se diretamente para as dendrites distais dos neurónios da CA1, pela via temporoamónica. As células piramidais da CA1 – os neurónios principais responsáveis pela informação de saída do hipocampo – projetam-se através do complexo subicular de volta às camadas profundas do EC e a várias áreas subcorticais e corticais²⁹. A estrutura deste circuito de alimentação direta com a sua redundância limitada pode ser crítica para a aprendizagem e para a memória, mas também pode contribuir para a sua vulnerabilidade durante vários estímulos fisiológicos³⁰. Tal como noutras zonas do córtex cerebral, o circuito principal do hipocampo é composto por neurónios de projeção excitatória glutamatérgica e interneurónios locais inibitórios, sendo os neurónios inibitórios responsáveis pela regulação do equilíbrio geral das atividades neuronais excitatórias e inibitórias e pela coordenação funcional de várias áreas cerebrais, fundamentalmente através do neurotransmissor inibitório – ácido γ -aminobutírico (GABA, do inglês, *gamma-aminobutyric acid*)³¹. Os interneurónios GABAérgicos representam 10-20% dos neurónios no córtex cerebral e são uma classe de neurónios muitíssimo heterogénea, com características morfológicas, eletrofisiológicas e neuroquímicas distintas³²⁻³⁴ (ver secção 1.11.1).

Os neurónios piramidais, localizados no córtex e no hipocampo dos mamíferos, bem como os neurónios do mesencéfalo, hipotálamo e do cerebelo, produzem glutamato, que é fundamental para as vias de sinalização excitatórias³⁵. Por sua vez, o GABA é produzido em interneurónios, que modulam os circuitos corticais e tálamo-corticais que transmitem informações sensoriais e desempenham um papel na coordenação das funções motoras, atenção e memória^{36,37}.

Os processos de aprendizagem e memória dentro dos circuitos do hipocampo são regulados por mecanismos de plasticidade sináptica, que requerem ativação de cascatas moleculares específicas³⁸. E. g., a indução da LTP na região da CA1 envolve a entrada pós-sináptica do ião de cálcio (Ca^{2+}) através dos recetores NMDA, com a subsequente ativação de cinases de proteínas³⁸ (ver secção 1.8.3).

1.1.1. Células e camadas – A organização citoarquitetónica do hipocampo

Em roedores, o hipocampo está posicionado de forma a que, aproximadamente, uma extremidade esteja próxima ao topo da cabeça (a extremidade dorsal ou septal) e a outra próxima à parte inferior da cabeça (a extremidade ventral ou temporal)²³. Conforme mostrado na **Figura 1.1**, a própria estrutura é curva e os subcampos ou regiões são definidos ao longo da curva, da CA4 à CA1 (apenas a CA3 e a CA1 estão identificadas). As regiões CA também são estruturadas em profundidade, em estratos (do

latim, *strata*; ou camadas) bem definidos: O **str. or** é a camada – superficial a seguir ao *alveus*, que se caracteriza pela presença de interneurónios *oriens lacunosum-moleculare* (O-LM) e *oriens-oriens* e também alguns corpos celulares das células em cesto (ou *basket cells*) inibitórias e das células trilaminares horizontais, caracterizadas por inervar três camadas – str. or, str. pyr e str. rad. Encontram-se aqui também as dendrites basais dos neurónios piramidais (embora a sua localização principal seja no str. rad), onde recebem informações de outras células piramidais, fibras septais e fibras comissurais do hipocampo contralateral (geralmente conexões recorrentes, especialmente na CA3 e na CA2). Em roedores, os dois hipocampos estão altamente conectados, mas em primatas essa conexão comissural é muito mais esparsa. O **str. pyr**, facilmente detetável a olho nu, contém os corpos celulares dos neurónios piramidais, que são os principais neurónios excitatórios do hipocampo. Estão também presentes os corpos celulares de muitos interneurónios, incluindo células axo-axónicas, células bistratificadas e células trilaminares radiais. Na região CA3 estão as sinapses das fibras musgosas que percorrem o str. l. O **str. l**, um dos *strata* mais finos do hipocampo, só é encontrado na região CA3. As fibras musgosas das células granulares do DG percorrem este estrato na CA3. O **str. rad** contém (além de fibras septais e comissurais, tal como o str. or) principalmente as fibras colaterais de Schaffer, que são a projeção da CA3 para a CA1. Alguns interneurónios que podem ser encontrados em camadas mais superficiais também podem ser encontrados aqui, incluindo as *basket cells*, células bistratificadas e as células trilaminares radiais. O *stratum lacunosum* é um *stratum* fino que também contém fibras colaterais de Schaffer, mas também contém fibras da via temporoamónica das camadas superficiais do EC. Devido ao seu pequeno tamanho, é frequentemente agrupado junto com o *stratum moleculare* (str. mol) num único *stratum* denominado str. l-m. O **str. mol** é o *stratum* mais interno, onde as fibras da via temporoamónica direta formam a maioria das sinapses nas dendrites apicais distais das células piramidais. O **sulco do hipocampo** ou **fissura do hipocampo** é uma região ausente células, que separa o campo da CA1 do DG²³.

De modo semelhante, o DG é composto também por uma série de *strata*: A **camada polimórfica**, a camada mais superficial (ventral) do DG, frequentemente considerada um subcampo separado (como o hilo), contendo muitos interneurónios, e que é atravessada pelos axónios das células granulares dentadas a caminho da CA3; O *stratum granulosum*, que contém os corpos celulares das células granulares dentadas; E o **str. mol**, o mais profundo, onde ambas as fibras comissurais do DG contralateral acorrem e formam sinapses e também onde as aferências do septo medial terminam, ambas nas dendrites proximais das células granulares. As fibras da via perfurante percorrem estes estratos e criam sinapses excitatórias nas dendrites apicais distais das células granulares³⁹.

O hipocampo recebe uma grande quantidade de informação sensorial de estruturas neocorticais, que são integradas em várias sub-redes recorrentes com um processamento distinto²⁰. O DG, com as suas três camadas, é consistido principalmente por células granulares e recebe aferências polimodais do EC. Os axónios das células granulares do DG formam o sistema de fibras musgosas, que se projetam para a CA3⁴⁰. As fibras musgosas também se projetam de volta para as células granulares, formando assim uma rede recorrente. Além disso, o DG recebe informações do hipocampo contralateral via projeções comissurais⁴⁰. Os axónios colaterais dos neurónios piramidais da CA3 fazem sinapse com outros neurónios da CA3, formando desse modo outra rede de informação auto-associativa recorrente, enquanto os neurónios da CA3, que se projetam de volta para a rede de informação dentada, formam uma rede de informação heteroassociativa⁴¹. Os neurónios piramidais da CA1 recebem informações que foram pré-processadas nas sub-redes de informação do DG e da CA3, mas também recebem projeções diretas do EC, sugerindo que a função dos neurónios da CA1 inclui a comparação de novas informações do EC com as informações armazenadas via CA3, em termos de incompatibilidade, erro e deteção de novidade⁴².

Além do plano estrutural da conectividade destes circuitos do hipocampo, acredita-se que a informação mnemónica seja representada e processada por padrões espaço-temporais de disparo em grupos de neurónios que envolvem uma dinâmica oscilatória rápida em várias bandas de frequência [e. g., ondas θ (do inglês, *theta waves*); oscilações de ondas agudas (do inglês, *sharp-wave ripples*); oscilações de ondas baixas (do inglês, *slow oscillations*); e oscilações γ (do inglês, *gamma oscillations*)] que são sincronizadas e temporalmente coordenadas dentro e através das regiões corticais⁴³⁻⁴⁵. Os interneurónios GABAérgicos das várias zonas do cérebro desempenham um papel fundamental na coordenação destas oscilações cerebrais.

1.2. Plasticidade neuronal e hipocampo

A plasticidade neuronal é a capacidade do cérebro, ou das estruturas cerebrais, de se adaptarem em resposta a estímulos intrínsecos ou extrínsecos, como alterações no ambiente, desenvolvimento ou lesões, consistindo, em princípio, numa interação recíproca entre a estrutura e função neural⁴⁶. A plasticidade neuronal pode ocorrer a vários níveis funcionais e estruturais, desde alterações na excitabilidade da membrana, ou na plasticidade, à conectividade sináptica, ou até na estrutura dendrítica e axonal⁴⁷. Podem também manifestar-se pela remodelação sináptica, que está associada tanto a estados patológicos como a fenótipos comportamentais⁴⁸, por alterações na transmissão sináptica, designadamente, na libertação e reciclagem de vesículas sinápticas; tráfego de recetores de transmissão; ou na adesão celular. A plasticidade neuronal também pode cursar com adaptações estruturais e funcionais, como na reorganização de populações neuronais, de forma dependente da experiência, o que se reflete em modificações de recrutamento e força de conectividade de circuitos e de redes de informação. Finalmente, a plasticidade neuronal pode ocorrer num nível fenomenológico, espelhado nas alterações e modificações de estratégias cognitivas e comportamentais⁷ (ver secção 8.2, **Figura 8.6**). A plasticidade neuronal pode, igualmente, mostrar uma dependência do tempo e da idade, podendo resultar em efeitos adaptativos que podem ser fisiológicos ou inadaptados (*maladaptive*)⁴⁷.

Como já mencionado acima, o hipocampo é considerado um exemplo clássico no estudo da plasticidade sináptica, pois foram identificados e demonstrados, nos circuitos do hipocampo, fenómenos como a LTP e a LTD; potenciação de ocorrência dos impulsos EPSP (E-S, do inglês, *EPSP-spike*); e a STDP, que se pensa constituírem a base celular dos mecanismos de aprendizagem e memória. Da mesma forma, foram demonstrados, no hipocampo, outros tipos de plasticidade estrutural em resposta à estimulação externa, como, por e. g., modificações no tamanho da árvore dendrítica; no número de espinhas dendríticas; e no número de sinapses, bem como a formação de novos neurónios⁸. Os mecanismos de plasticidade no hipocampo estão também afetados durante os estágios iniciais de doenças neurológicas, como a doença de Alzheimer, antes da observação das alterações neurodegenerativas, como a deposição do péptido β -amiloide ($A\beta$, do inglês, *amyloid-beta*) extracelular ou a formação intracelular de novos neurofibrilares (do inglês, *neurofibrillary tangle*), que são responsáveis pela remodelação sináptica molecular e intraneuronal¹¹. Em estágios mais tardios, a doença de Alzheimer é caracterizada pela reorganização da conectividade e perda de sinapses. Assim, a remodelação sináptica está associada a estados patológicos e a fenótipos comportamentais⁴⁸.

Outro exemplo de plasticidade estrutural, após lesão, são as alterações na ramificação axonal, que podem resultar numa reorganização desajustada dos circuitos do hipocampo. Por e. g., na epileptogénese é-se observado uma excessiva ramificação das fibras musgosas para a CA3. Sob condições patológicas, também se observam alterações no número de sinapses causadas pela retração de processos pré-sinápticos ou atrofia neuronal. Na depressão, há evidência de atrofia nos neurónios piramidais no hipocampo e no córtex pré-frontal medial⁴⁸.

Ao nível molecular, as alterações na plasticidade sináptica podem ser impulsionadas, quer pela alteração da função, como pela expressão aumentada de genes relacionados à plasticidade, tais como a

cinase II de proteínas dependentes de cálcio/calmodulina (CaMKII, do inglês, *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*) ou a *cAMP response element-binding protein (CREB)*, bem como o recrutamento membranar de recetores glutamatérgicos AMPA e NMDA. Os mecanismos de plasticidade dependentes de atividade no hipocampo, como a LTP¹⁰, podem ainda ser condicionados pela atividade sináptica anterior. Este tipo de mecanismo regulador da própria plasticidade, por atividade antecedente, é denominado de metaplasticidade; e tem sido implicado, não apenas na regulação fisiológica da plasticidade sináptica, mas também na sua desregulação no envelhecimento e por mecanismos de doença^{49,50}. Também foi demonstrado, em pacientes com lesões no hipocampo, que alterações plásticas no sistema da memória do hipocampo levam a uma reorganização da rede de informação, que permite um recrutamento de uma rede de informação hipocampo-neocortical alargada, de forma a compensar a disfunção do hipocampo¹³.

1.3. A vulnerabilidade regional do hipocampo

1.3.1. Lesões agudas no hipocampo

Há mais de um século que é sabido que as condições patológicas agudas, como a isquémia, hipoglicemia, crises epiléticas ou outras condições neurológicas, podem causar danos ao hipocampo⁵¹. Estes danos são mais evidentes nos neurónios da CA1 e são um reflexo de uma vulnerabilidade seletiva do hipocampo a condições agudas, que prejudicam a homeostase metabólica dos neurónios piramidais da mesma área por mecanismos de citotoxicidade neuronal dependentes de excitotoxicidade por glutamato e mediados por Ca^{2+} ⁵²⁻⁵⁴. Um breve episódio de isquémia cerebral resulta na morte celular seletiva dos neurónios da CA1, enquanto sobrevivem os do DG, os da CA3 e a maioria dos neurónios corticais. As alterações estruturais na CA1, que se seguem à lesão isquémica, são mais proeminentes após 3-4 dias e, devido a isso, foram designadas por morte neuronal retardada^{52,55,56}. O fenótipo, evolução e o padrão das lesões na região CA1, em perturbações neurológicas, quando estudado por imagem por ressonância magnética (MRI, do inglês, *magnetic resonance imaging*) de alta resolução¹⁵ em pacientes com isquémia do hipocampo, neuroinflamação, pós *status epilepticus* (SE, em português, estado de epilepsia ou crise epilética) ou com amnésia global transitória (do inglês, *transient global amnesia*), revela que a região CA1 é seletivamente afetada em comparação com as outras regiões do hipocampo. O comprometimento máximo do metabolismo celular da CA1, medido pelo coeficiente de difusão aparente (ADC, do inglês, *apparent diffusion coefficient*) em MRI, foi observado 48-72 h após lesão, independentemente da sua natureza. Os danos hipóxico-isquémicos levaram a uma redução mais significativa do ADC, sugerindo que a lesão isquémica resulta num comprometimento maior do metabolismo da CA1 em comparação com a inflamação ou a epilepsia¹⁵, sugerindo, mais além, que a lesão aguda do hipocampo afeta seletivamente a sub-região CA1 (altamente plástica), enquanto a CA3 e o DG são poupados. Os mecanismos celulares que levam a esta vulnerabilidade regional e à excitotoxicidade mediada por glutamato e Ca^{2+} são possivelmente um reflexo de diferenças de expressão de recetores glutamatérgicos NMDA, nos neurónios da CA1, que expressam densidades consideravelmente maiores de subunidades NR2 de NMDA do que os neurónios da CA3 ou do DG, observado em roedores⁵⁷⁻⁶¹, assim como nos níveis de enzimas antioxidantes ou reações inflamatórias^{51,62}. Curiosamente, acredita-se que os interneurónios do hipocampo sejam mais resistentes ao impacto da isquémia transitória do que os neurónios piramidais^{63,64}.

1.3.2. Hipocampo na epileptogénese

A epilepsia é uma perturbação neurológica caracterizada por crises epiléticas recorrentes. As crises epiléticas constituem uma atividade neuronal anormal, excessiva e síncrona no sistema nervoso central (SNC). O hipocampo humano, em particular, é capaz de gerar crises epiléticas e de facilitar um aumento crónico da excitabilidade celular que, por sua vez, se considera estar correlacionado com a epilepsia do lobo temporal (TLE, do inglês, *temporal lobe epilepsy*), uma epilepsia focal que envolve principalmente

as estruturas do lobo temporal, incluindo o hipocampo^{65,66}, amígdala e a região do hipocampo circundante, que integra as regiões neocorticais do PR, PH e EC. O decurso patológico da TLE está correlacionado tipicamente com a esclerose do hipocampo (HS, do inglês, *hippocampal sclerosis*; sinónimo de: Esclerose do corno de Ámon), que se manifesta pela perda de neurónios na camada das células piramidais das áreas CA1,4 e pela astrogliose reativa^{67,68}. Pensa-se que esse decurso patológico esteja intimamente relacionado com a elevada plasticidade neuronal dos neurónios da CA1, assim como a sua grande vulnerabilidade a lesões; embora, as causas e as consequências da epileptogénese, nos circuitos do hipocampo, sejam difíceis de desenredar. A morte neuronal não é uma condição necessária para o desencadear dos mecanismos de epileptogénese. E o conceito de TLE, na atualidade, favorece complexos mecanismos e influências multifatoriais em diferentes escalas temporais.

1.3.3. Envelhecimento e hipocampo

Os mecanismos de plasticidade neuronal associados às funções cognitivas do hipocampo são também particularmente vulneráveis ao envelhecimento⁶⁹. Curiosamente, o número de células principais, a ramificação dendrítica e a densidade de espinhas dendríticas não são substancialmente reduzidos durante o processo de envelhecimento^{70,71}. Em humanos, estudos histopatológicos confirmam que a região CA1 não mostra nenhuma perda pronunciada de células durante o envelhecimento, uma observação que foi confirmada em imagens de alta resolução da região CA1⁷², enquanto outros estudos de imagem mostraram um efeito do envelhecimento no volume dessa mesma região^{22,73-75}. Além disso, as propriedades biofísicas dos neurónios do hipocampo, tal como o potencial de membrana em repouso; constante de tempo de membrana; resistência de entrada; e o limiar do potencial de ação, são altamente preservadas ao longo da vida⁷⁶. No entanto, existem observações de perda sináptica no *input* do EC da camada II para as células granulares no DG⁷⁶, que pode afetar a função das sub-redes de informação do hipocampo, e. g., durante a separação de padrões⁷⁶. Estão também alterados no envelhecimento, os fenómenos de plasticidade sináptica, como a indução e a manutenção da LTP, em linha com as alterações na homeostasia do Ca²⁺ e as alterações específicas de cada subárea na expressão de genes envolvidos na regulação da plasticidade sináptica^{71,77}. Ademais, as alterações cognitivas durante o envelhecimento podem também ser atribuídas a mudanças na dinâmica neuronal dos circuitos do hipocampo, e. g., na manutenção e na estabilidade e plasticidade em células de lugar (do inglês, *place cells*)⁷⁶. A neurogénese no DG, também diminui com a idade, o que pode contribuir para as alterações da plasticidade neuronal ao longo da vida⁷⁸.

1.4. Maquinaria neuronal

A arquitetura de um neurónio, como a de qualquer célula, é bastante modular; sendo composta por organelos e montagens de proteínas em domínios com funções individuais, a um nível de complexidade menos elevado. Ao nível da arquitetura bruta da célula são distinguidos axónios e dendrites; espinhas dendríticas e ramificações axonais. Ao nível dos organelos, a sinapse química é a unidade funcional mais característica, que converte a excitação elétrica em sinais químicos e vice-versa, passando desta forma informações de um neurónio para o outro. A sinapse é composta por diferentes organelos, como os componentes pré- e pós-sinápticos (que pertencem a neurónios distintos), sendo eles próprios compostos por subestruturas distintas, como complexos de sinalização (formados por múltiplas proteínas) ou a matriz pré- e pós-sináptica⁷⁹⁻⁸¹.

1.4.1. A sinapse

A sinapse – estrutura altamente especializada responsável pelo fluxo de informações entre os neurónios – distingue-se do ponto de vista funcional como excitatória ou inibitória; sendo a transmissão sináptica excitatória, no cérebro, predominantemente mediada pelo neurotransmissor **glutamato** e a transmissão inibitória mediada principalmente pelo **GABA**. Os neurotransmissores libertados das terminações nervosas pré-sinápticas ligam-se a recetores pós-sinápticos seletivos, que traduzem sinais

bioquímicos em sinais elétrico-metabólicos no neurónio pós-sináptico. A velocidade, confiabilidade e a especificidade da transmissão sináptica são garantidos, não só por recetores específicos, mas também por proteínas-esqueleto – itens essenciais do componente pós-sináptico que, ao interagirem com o citoesqueleto e moléculas de adesão, garantem o acúmulo preciso de recetores pós-sinápticos, no lugar certo, ancorando-os numa aposição precisa aos locais de libertação pré-sinápticos. Esta interação proporciona as restrições físicas necessárias, não apenas para manter os recetores nas sinapses, mas também para regular a troca constante de recetores e elementos estruturais para dentro e fora dos locais pós-sinápticos⁸²⁻⁸⁸.

1.4.2. Estrutura e função do componente pré-sináptico

No componente pré-sináptico, a chegada do potencial de ação evoca a libertação de neurotransmissores, ao promover a fusão de vesículas sinápticas com a membrana pré-sináptica – um mecanismo dependente da entrada de Ca^{2+} , no componente pré-sináptico, pela ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav)⁸⁹. A presença de determinados neurotransmissores depende não unicamente da presença de enzimas específicos da sua via de síntese, mas também de transportadores vesiculares que carreguem os transmissores para as vesículas sinápticas. À parte disso, o mecanismo geral de libertação de neurotransmissores é essencialmente o mesmo nos neurónios excitatórios e inibitórios⁷⁹, envolvendo várias etapas de preparação e mobilização das vesículas, que culminam na sua ancoragem na zona ativa, onde ficam a postos à libertação. Estas etapas envolvem proteínas da membrana vesicular e do citoesqueleto pré-sináptico, como a rab3A, sinaptofisina, as **proteínas do complexo SNARE** (do inglês, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*): A **sinaptobrevina**, **sintaxina** e a proteína associada ao sinaptossoma, 25 quilodalton (**SNAP-25**, do inglês, *Synaptosomal-Associated Protein, 25 kDa*); assim como a proteína sensível a Ca^{2+} , sinaptotagmina – todas importantes componentes da maquinaria responsável pelo processo de fusão vesicular^{79,90}.

1.4.3. O componente pós-sináptico excitatório e inibitório

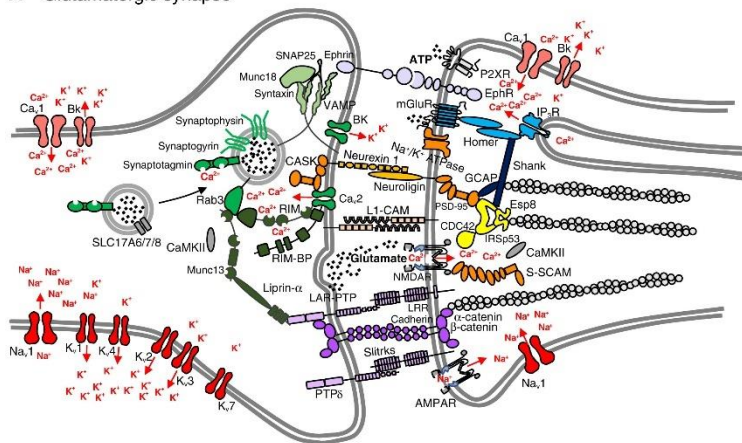
Diferente do componente pré-sináptico, a estrutura modular do componente pós-sináptico é mais variável. De relevar, o componente pós-sináptico glutamatérgico (**Figura 1.2.A**) é mais elaborado do que o componente pós-sináptico colinérgico (**Figura 1.2.B**), que também diferem ambos profundamente do componente pós-sináptico GABAérgico (**Figura 1.2.C**).

O compartimento pós-sináptico das sinapses excitatórias é caracterizado por uma região com aparência densa em microscopia eletrónica (do inglês, *electron-dense*), conhecida como densidade pós-sináptica (PSD, do inglês, *postsynaptic density*), atribuível pela alta densidade de recetores de neurotransmissores e de moléculas estruturais e de sinalização associadas a esses locais. Assim, a membrana pós-sináptica dos neurónios excitatórios glutamatérgicos abriga recetores para o glutamato metabotrópicos (mGluRs) ou ionotrópicos (iGluRs) que se ligam a proteínas de ancoragem e a complexos de sinalização da PSD⁹¹. Estes organizam-se em torno de proteínas estruturais que são específicas da PSD, nas sinapses excitatórias, como a **proteína de densidade pós-sináptica de 95 kDa (PSD-95)**, do inglês, *postsynaptic density protein, 95 kDa*, Shank, Homer ou IRSp53⁹² que não estão presentes nas sinapses inibitórias⁹³.

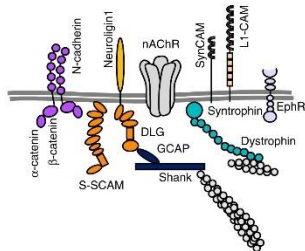
O componente pós-sináptico das sinapses inibitórias GABAérgicas e glicinérgicas não apresenta PSD, embora possua um esqueleto estrutural com uma matriz complexa de proteínas⁹⁴; que é caracterizado por possuir recetores do ácido γ -aminobutírico do tipo A (GABA_A), para o GABA, ou recetores ionotrópicos de glicina, na devida ordem, ancorados pós-sinápticamente pela gefirina^{95,96} e colibistina^{97,98}, em vez das proteínas da PSD (**Figura 1.2.C**). A gefirina forma uma rede submembranar no componente pós-sináptico inibitório^{81,97,98}.

Existem ainda diferenças na morfologia celular das sinapses excitatórias e inibitórias^{94,99,100}. A maioria das sinapses glutamatérgicas são encontradas em protrusões bulbosas, conhecidas como *espinhas dendríticas*, enquanto a maioria das sinapses GABAérgicas são formadas na haste dendrítica, bem como no soma e nas regiões axonais proximais¹⁰¹⁻¹⁰³. Contudo, também já foram descritas sinapses inibitórias que colidem diretamente com as espinhas dendríticas¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Mais recentemente, a capacidade de visualizar diretamente, *in vivo*, revelou que aproximadamente 30% das sinapses inibitórias residem nas espinhas, em vez de na haste dendrítica^{107,108}. Ver **Figura 1.3**. As sinapses inibitórias, nas espinhas dendríticas, estão sempre adjacentes a uma sinapse excitatória na mesma espinha e podem dissuadir diretamente a excitação para essa sinapse^{106,107}. A gefirina regula dinamicamente a plasticidade e a força sináptica, por meio da troca constante de elementos estruturais de suporte e de recetores para dentro e fora destas sinapses⁸⁸.

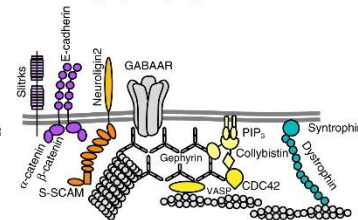
A Glutamatergic synapse



B Cholinergic postsynapse



C GABAergic postsynapse



| Presynapse | Synaptic junction | Postsynapse | Electrical conduction |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
| Active zone | MAGUK scaffold | PSD-shank | Action potential |
| Ca ²⁺ nanoenvironment | Neurexin-neuroigin | PSD mGluR-Homer | Kca-module |
| SNARE complex | Ig-GAMs | PSD-IRSp53 | |
| | | Collystsin-CDC42 | |
| | | Dystrophin complex | |

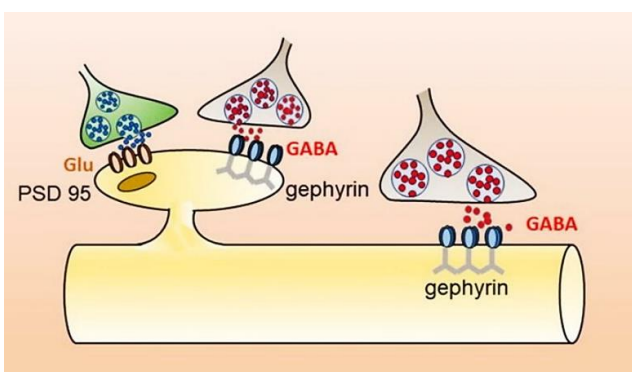


Figura 1.2 Composição molecular modular da sinapse de vertebrados. (A) Sinapse glutamatérgica. (B) Componente pós-sináptico colinérgico. (C) Componente pós-sináptico GABAérgico. O código de cores representa os diferentes módulos neuronais e submódulos funcionais que não são discutidos no texto. Retirado de Arendt (2020)⁸¹.

Figura 1.3 Transmissão sináptica com os recetores pós-sinápticos em precisa posição aos locais de libertação pré-sináptica. Nas sinapses inibitórias, a proteína pós-sináptica gefirina forma uma estrutura multimérica responsável pela ancoragem dos recetores GABA_A (ou glicina) ao citoesqueleto, garantindo assim o acúmulo preciso de recetores pós-sináptico no lugar certo, geralmente na haste dendrítica, mas também encontrados em espinhas. Em contraste, a localização da sua congénere nas sinapses glutamatérgicas PSD-95, maioritariamente localizada nas espinhas dendríticas. Figura retirada de Pizzarelli *et al.* (2020)⁸⁸.

1.5. Transmissão sináptica glutamatérgica e GABAérgica

A transmissão sináptica excitatória no hipocampo é fundamentalmente mediada por glutamato e iGluRs¹⁰⁹. Os iGluRs são ainda subdivididos, com base nas suas propriedades biofísicas e farmacológicas, em: Recetores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA); Recetores do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA); E recetores de cainato^{110,111}. Os iões de sódio (Na^+) que passam através dos iGluRs da subclasse AMPA e cainato, causam despolarização ou um potencial pós-sináptico excitatório (EPSP, do inglês, *excitatory postsynaptic potential*). Porém, existem também iGluRs NMDA no componente pós-sináptico dos neurónios, que têm a propriedade de conduzir não só iões Na^+ , mas também iões Ca^{2+} . Estes somente são ativados quando a ligação de glutamato é coincidente com uma despolarização da membrana pós-sináptica por tempo suficiente para deslocar os iões de magnésio (Mg^{2+}) que bloqueiam o canal (**Figura 1.4**). Assim, a entrada de Ca^{2+} , através de recetores NMDA, permite uma sinalização específica, quando os elementos pré- e pós-sinápticos ficam ativos ao mesmo tempo¹¹², que é essencial a expressão de LTP no hipocampo.

Como já foi referido, a transmissão sináptica excitatória glutamatérgica pode também ativar os mGluRs, que são oito, pertencentes a três classes distintas. Estes podem ser pré- ou pós-sinápticos e, pela ativação de múltiplos mecanismos de transdução de sinal, podem atuar como auto-recetores, regulando, tanto a libertação de neurotransmissor e a disponibilidade de glutamato na sinapse, como a participação em processos de plasticidade sináptica, como a LTP ou a LTD; ou ainda, ter um papel fundamental na neuroproteção^{113–115}.

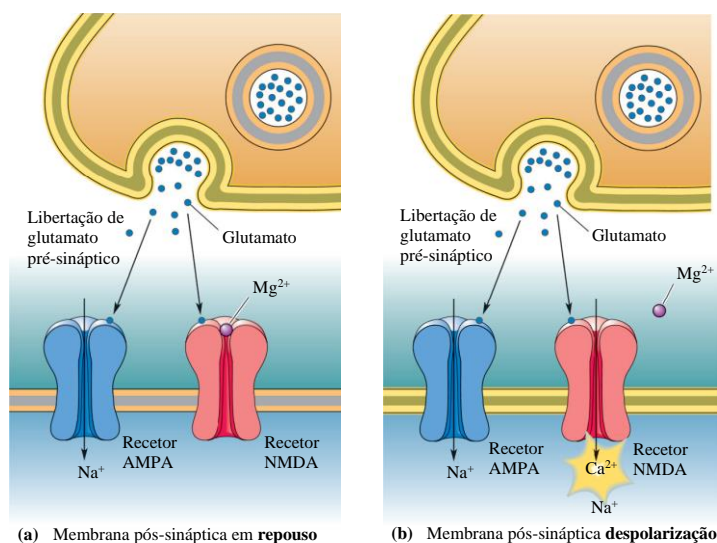


Figura 1.4 Recetores NMDA ativados pela atividade pré- e pós-sináptica em simultâneo. (a) A ativação pré-sináptica causa a libertação de glutamato, que atua nos recetores pós-sinápticos AMPA e NMDA. Quando a despolarização é curta a ligação do glutamato aos recetores NMDA dá-se antes da despolarização pós-sináptica e os recetores NMDA não são ativados, devido ao bloqueio com o íon Mg^{2+} . (b) Quando a libertação de glutamato é continuada a ligação aos recetores NMDA coincide com uma despolarização pós-sináptica suficiente para deslocar o Mg^{2+} e ativar os recetores, então o Ca^{2+} entra no neurónio pós-sináptico através do recetor NMDA. (Fonte: Adaptado de Bear & Malenka, 1994, Fig. 1.)¹¹².

A transmissão sináptica GABAérgica, envolvendo menos intervenientes moleculares, é mediada por recetores ionotrópicos GABA_A , maioritariamente pós-sinápticos, que formam um canal permeável a iões de cloro (Cl^-), mediando a hiperpolarização pós-sináptica; e recetores metabotrópicos do ácido γ -aminobutírico do tipo B (GABA_B), localizados pré- e pós-sinápticamente. Os recetores GABA_B , pré-sinápticos, são auto-recetores que controlam a libertação de neurotransmissor e os níveis de GABA, na sinapse. Os recetores GABA_B , pós-sinápticos, medeiam uma hiperpolarização mais lenta, através do controlo de canais de iões de potássio (K^+) do tipo GIRK (do inglês, *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*) por um mecanismo dependente de proteínas G_i .

1.6. As principais moléculas estruturais nas sinapses

Como mencionado anteriormente, o agrupamento de moléculas-esqueleto, em locais de contacto sináptico, desempenha uma função importante na retenção de recetores de neurotransmissores específicos, num determinado tipo de sinapse, assim como no seu acoplamento aos mecanismos

intracelulares de sinalização, através da associação de recetores de neurotransmissores; proteínas de transdução de sinal; proteínas do citoesqueleto e de moléculas de adesão⁹⁴.

A principal molécula de suporte localizada na PSD das sinapses glutamatérgicas é a PSD-95 (**Figura 1.2**), inicialmente identificada como um parceiro de ligação da subunidade NR2 dos recetores NMDA¹¹⁶, o que sugeria o envolvimento da PSD-95 no agrupamento dos recetores NMDA. No entanto, evidências mais recentes apontam adicionalmente para um papel importante da PSD-95 na regulação da atividade e sinalização pelos recetores NMDA¹¹⁶, assim como na regulação da sua expressão membranar e da sua dessensibilização¹¹⁷⁻¹²¹. Estes estudos defendem uma função para a interação dos recetores NMDA com a PSD-95 nos processos de sinalização mediados por glutamato. Por outro lado, a PSD-95 está envolvida na regulação da inserção e retenção membranar dos recetores AMPA e cainato¹²², mediando ainda, especificamente, a localização sináptica de apenas dos recetores AMPA¹²³. A sobre-expressão de PSD-95, em neurónios do hipocampo, induz a maturação das sinapses excitatórias, levando a um aumento seletivo dos recetores AMPA na PSD¹²⁴. Em culturas de fatias de hipocampo, a PSD-95 aumenta as respostas sinápticas mediadas pelo recetor AMPA, sem alteração nas respostas dos recetores NMDA^{125,126}.

Curiosamente, o agrupamento dos recetores nas sinapses inibitórias parece ser regulado por um conjunto diferente de moléculas-esqueleto. Um componente-chave da estrutura pós-sináptica das sinapses inibitórias é a proteína de ancoragem gefirina⁹⁴, inicialmente descoberta como uma proteína de associação à tubulina. Não sendo uma proteína específica de neurónios¹²⁷, desempenha um papel significativo no desenvolvimento e funcionamento das sinapses de GABAérgicas e glicinérgicas nos neurónios⁹⁴. Os recetores GABA_A são importantes no agrupamento pós-sináptico da gefirina e na estabilização das sinapses¹²⁸⁻¹³⁴. Reciprocamente, o seu nível de expressão pode servir como um indicador da quantidade total de recetores GABA_A, na membrana¹³⁵, uma vez que serve de proteína de ancoragem a esses, tal como outras moléculas na sinapse. A gefirina está associada à formação de uma complexa rede submembranar, pela sua polimerização e associação supramolecular, sendo a sua atividade regulada por fosforilação. A gefirina pode também ser adicionada ou removida desta rede pós-sináptica¹³⁶. Embora a gefirina não seja necessária para a formação de sinapses GABAérgicas¹³⁷, a sua sobre-expressão induziu a formação de sinapses inibitórias, enquanto reduzia a formação de sinapses excitatórias, diminuindo desse modo o rácio excitação/inibição¹³⁸. Em suma, o recrutamento diferencial da PSD-95, em sinapses excitatórias, e de gefirina, em contactos inibitórios, são etapas potencialmente críticas na regulação do agrupamento de recetores de neurotransmissores e na estabilidade dos contactos sinápticos que, por sua parte, condicionam a força sináptica⁹⁴.

1.7. Sinapses excitatórias e inibitórias em equilíbrio – Redimensionamento sináptico

O equilíbrio do tónus glutamatérgico e GABAérgico é crucial para a normal função neurológica. O papel da sinalização do glutamato na patofisiologia da lesão cerebral traumática é duplo. Por um lado, a libertação aguda de glutamato pós-traumático é responsável pela excitotoxicidade após lesão cerebral, que leva a lesão neuronal, morte celular e disfunção dos neurónios sobreviventes; por outro lado, a interrupção tardia dos circuitos excitatórios do glutamato, leva a *deficits* na função cognitiva e motora e na plasticidade dependente da experiência¹³⁹.

O GABA modula as vias excitatórias no cérebro e, no seguimento de uma lesão, a perda de células GABAérgicas perturba o equilíbrio de excitação/inibição, levando a uma maior lesão celular e apoptose. A lesão cerebral traumática leve¹⁴⁰ a grave, bem como o SE, isquémia e as doenças neurodegenerativas¹⁴¹ partilham elementos comuns de excitotoxicidade por glutamato.

A excitabilidade neuronal depende do somatório dos sinais excitatórios e inibitórios¹⁴²⁻¹⁴⁴, um processo regulado pelo número de contactos excitatórios vs. inibitórios (E/I) recebidos por um único neurónio. Este pode ser regulado de forma a que os neurónios sejam ativados e transmitam sinais sinápticos discretos, evitando a excitação excessiva. Ainda assim, esse equilíbrio pode ser perturbado por pequenas alterações ao nível da inibição¹⁴⁵, que pode ser uma das causas de atividade epileptiforme¹⁴⁶. A contribuição relativa dos componentes moleculares e celulares para o equilíbrio E/I de cada região do cérebro pode variar. E. g., níveis elevados de inibição intrínseca em circuitos cerebelares são equilibrados principalmente por aferentes excitatórios de várias regiões do cérebro¹⁴⁷, enquanto os *loops* de *feedback* excitatório intrínsecos no hipocampo são modulados por interneurónios de modo a evitar a hipersincronia e a atividade epileptiforme^{148,149}. Além disso, os astrócitos têm sido implicados na modulação da excitação de células neuronais glutamatérgicas e GABAérgicas, sequestrando e libertando glutamato¹⁵⁰.

A excitabilidade neuronal pode também ser alvo de regulação homeostática permitindo manter a função do sistema com um *output* dentro de limites controláveis após alterações significativas nos seus *inputs* sinápticos, por meio da modulação da eficácia sináptica, da força sináptica e da excitabilidade da membrana¹⁵¹⁻¹⁶⁰. Este processo compensatório ocorre geralmente numa escala de tempo de 2-3 dias e garante que as alterações sinápticas discretas (como a LTP ou a LTD) não só sejam perdidas, como o “ponto de ajuste” do sistema seja redefinido, sendo a força de cada sinapse modulada para compensar as alterações noutras sinapses, no mesmo neurónio. Este fenómeno referido como redimensionamento sináptico (do inglês, *synaptic scaling*; ver **Figura 1.5**), permite manter as diferenças relativas nas sinapses individuais, produzidas por alterações duradouras na plasticidade sináptica [ver Turrigiano & Nelson (2004)¹⁵⁸ para revisão].

Estes processo pode influenciar tanto a transmissão sináptica excitatória¹⁵⁹ como a inibitória¹⁶¹⁻¹⁶⁴ e estão descritas alterações globais nas quantidades de múltiplas proteínas pós-sinápticas após ativação ou inibição crónica da atividade neuronal¹⁶⁵⁻¹⁶⁸. As alterações na atividade sináptica produzem uma alteração coordenada na composição do componente pós-sináptico/PSD, incluindo alterações dos níveis de recetores, proteínas de ancoragem e proteínas de sinalização. Assim, é provável que um aumento compensatório na atividade sináptica seja modulado pela remoção dos recetores de glutamato ou GABA em conjunto com as proteínas associadas, controlando assim, em geral, a excitabilidade neuronal⁹⁴.

1.8. Plasticidade sináptica

A plasticidade sináptica consiste num conjunto de processo celulares que levam a alterações bidirecionais de curta ou longa duração e dependentes da atividade, na força da comunicação sináptica, podendo conduzir tanto à LTP como à LTD^{169,170}. Estas são amplamente aceites como os mecanismos celulares subjacente ao armazenamento da memória¹⁷¹ e à sua reformulação, podendo também alterar a seletividade neuronal. A LTP pode ser desencadeada por um único episódio de estimulação de alta frequência (EAF), tal como por uma estimulação tetânica ou um *θ-burst*¹⁷¹⁻¹⁷³, mimetizando assim o padrão de disparo de diferentes células principais do hipocampo, observado durante exercícios de aprendizagem. Este foi o primeiro modo de plasticidade sináptica a ser associado à formação de memória dependente do hipocampo¹⁷¹. A LTD pode ser induzida por estimulação de baixa frequência (EBF), mimetizando a atividade do hipocampo, mediante ondas delta. A LTD está envolvida em processos de memória dependente do hipocampo, associados à flexibilidade comportamental, como à extinção da memória; reversão da aprendizagem; reformulação de memórias previamente formadas; cessação/mudança de atenção; e à estabilização dos efeitos da aprendizagem¹⁷³⁻¹⁷⁶. Tanto a LTP como algumas formas de LTD, na região CA1, requerem a ativação dos recetores NMDA e a sua estabilidade e expressão duradoura, dependem da ativação subsequente de múltiplas cascatas intracelulares^{171,174}.

Originalmente descoberta por Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷, no hipocampo (uma região do encéfalo crítica para a formação da memória), começou por se discutir como ocorreria o fenómeno da plasticidade sináptica com a LTP¹¹² (ver secção 8.1.2). Nos seus estudos iniciais Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ observaram que a EBF da via perfurante induzia um nível basal constante de transmissão sináptica na área dentada do hipocampo, mas que após uma EAF transiente da via perfurante (estimulação tetânica, 1 segundo), os estímulos de baixa frequência subsequentes induziam uma resposta sináptica aumentada, persistente durante várias horas; evidenciando assim um aumento da eficiência da comunicação sináptica, em comparação com o observado antes da EAF¹⁷⁸. Hoje, não há dúvida de que a descoberta e a subsequente caracterização da LTP (ver secção 8.1.2), juntamente com a sua contraparte, a LTD, constituem grandes avanços nos campos da neurociência e das ciências biológicas de forma mais geral¹⁷⁹. Encontram-se disponíveis na literatura, em atualidade, descrições altamente detalhadas dos mecanismos de indução e manutenção da LTP, em todos os níveis de análise, abrangendo desde circuitos cerebrais em grande escala à maquinaria sináptica, celular, molecular e genética que medeia o fenómeno da LTP^{172,179-181}.

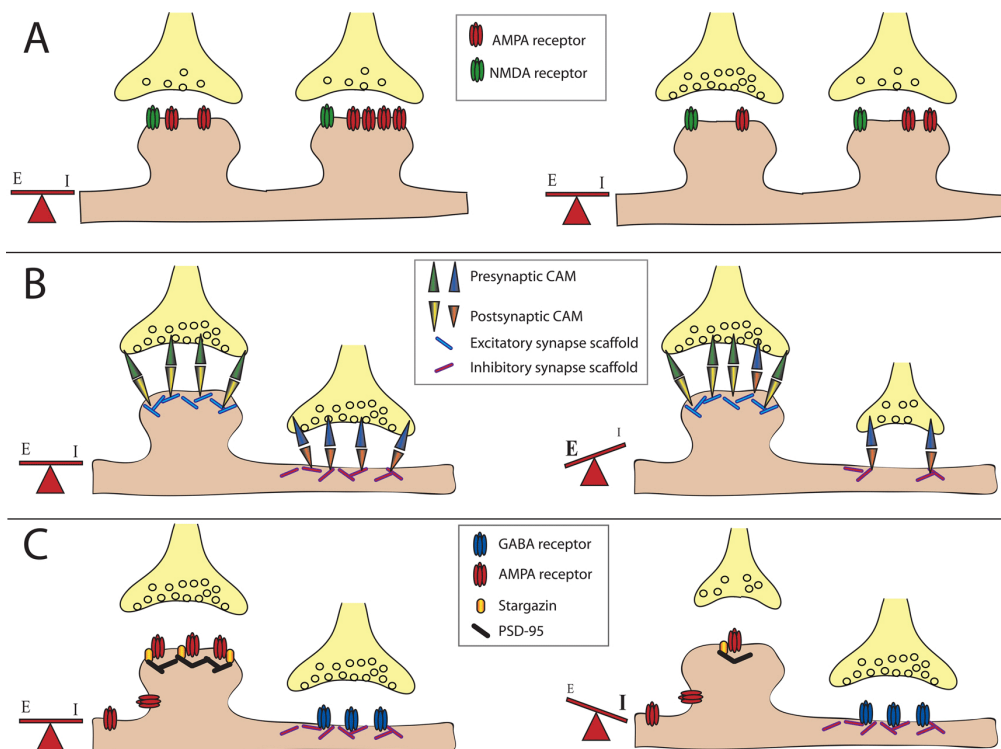


Figura 1.5 Mecanismos de redimensionamento sináptico para manter o equilíbrio excitação/inibição. Os recetores de neurotransmissores excitatórios são localizados nas espinhas dendríticas, enquanto os recetores de neurotransmissores inibitórios se encontram maioritariamente (70%) presentes em locais pós-sinápticos na haste dendrítica, e cerca de 30%¹⁰⁷ nas espinhas dendríticas. (A) Ajuste no número de recetores de neurotransmissores presentes em sinapses específicas para equilibrar alterações na força sináptica de uma sinapse vizinha. (B) Ajuste no número de moléculas que compõem o esqueleto estrutural de moléculas de adesão celular em contactos excitatórios e inibitórios. (C) Regulação do número de proteínas de ancoragem em sinapses excitatórias (PSD-95, stargazina) ou inibitórias (gefirina), regulando a retenção dos recetores AMPA nas sinapses excitatórias e recetores GABA_A nas sinapses inibitórias. Retirado de Keith & El-Husseini (2008)⁹⁴. Abreviaturas: CAM, moléculas de adesão celular (do inglês, *cell-adhesion molecules*).

Este fenómeno, que se apurou, mais tarde, que se podia manter por vários dias, *in vivo*, foi rapidamente proposto como o fenómeno celular que poderia ajudar a explicar os processos mais longos de memória, como a consolidação e o armazenamento de informações a longo prazo (ver secção 8.1.2). Ao longo dos desenvolvimentos dos trabalhos nascentes com relação à LTP, foram-se estabelecendo múltiplos paralelos com a aprendizagem comportamental dependente do hipocampo e a aquisição de memória (ver **Tabela 8.1**).

1.8.1. Relação entre a plasticidade sináptica e a memória no hipocampo

Várias linhas de evidência prenunciam uma função relevante do hipocampo na memória episódica em animais não humanos e humanos. O mais notável entre os pacientes humanos foi H.M., que quando jovem sofreu de epilepsia intratável e foi submetido a uma cirurgia experimental envolvendo a remoção bilateral do MTL, incluindo grandes partes de ambos os hipocampos. O procedimento deixou H.M. com uma incapacidade de formar novas memórias episódicas (amnésia anterógrada), juntamente com uma perda substancial, mas não total, de velhas memórias (amnésia retrógrada)¹⁸². Outros casos desde H.M. confirmaram que o hipocampo é essencial para a formação de novas memórias episódicas e que pode também ter uma participação no seu armazenamento a longo prazo. Estudos em animais revelam que lesões controladas; inativação farmacológica ou inativações moleculares (KO, do inglês, *knockouts*) limitados ao hipocampo resultam em falhas na aprendizagem ou perda de memória espacial^{10,183–185}. Registos eletrofisiológicos¹⁸⁶ e estudos de imagem molecular em animais^{187,188}, bem como estudos de MRI em humanos^{189–191}, permitiram correlacionar a aprendizagem episódica e a memória com a atividade do hipocampo²⁴.

O trabalho com H.M. é por vezes citado, embora não muito corretamente, como a evidência da importância do hipocampo para a memória; contudo, este ponto particular não poderia ser estabelecido apenas por uma grande lesão que incluísse o hipocampo, mas também em conjunto com a amígdala e com o giro para-hipocampal adjacente²¹. As estruturas mais importantes para a memória, dentro da lesão de H.M., só foram compreendidas gradualmente durante a década de 1980, após o desenvolvimento bem-sucedido de um modelo animal de amnésia humana em primatas não humanos [*Macaca mulatta*; Mishkin (1978)¹⁹²]. Os estudos cumulativos seguintes, em macaco^{193–195}, conseguiram esclareceram consideravelmente esta questão. Provou-se então fazer parte dessas estruturas mais importantes o hipocampo e o EC, PR e o PH adjacentes²¹ (**Figura 1.1**).

1.8.2. Modelos de plasticidade sináptica no hipocampo

O hipocampo tem sido um importante sistema experimental para estudos de plasticidade sináptica no contexto dos presumíveis mecanismos de armazenamento de informação no cérebro²⁴. O seu padrão laminar simples de neurónios e vias neurais (**Figura 1.1**) permite o uso de técnicas de registo extracelular para registar eventos sinápticos por períodos virtualmente ilimitados *in vivo*¹⁹⁶ (**Figura 1.6**). A LTP, sendo o modelo mais estudado de plasticidade sináptica¹⁹⁷, foi associada a alterações sinápticas observadas no hipocampo^{198,199} e na amígdala²⁰⁰ no seguimento de um evento de aprendizagem. Têm também sido estudadas, neste sistema, outros modelos de plasticidade dependente de atividade, incluindo a LTD²⁰¹, E-S^{202,203}, STDP²⁰⁴, despotenciação^{205–207} e a desdepressão^{207,208}.

A preparação de fatias transversais de hipocampo²⁰⁹ (**Figura 1.6**) tem sido crucial nestes estudos, permitindo a realização de registos extra- e intracelulares e de *patch-clamp*, bem como agentes farmacológicos que sejam rapidamente administrados, lavados e removidos. Além disso, os neurónios do hipocampo podem mantidos em cultura^{210,211} como fatias transversais “organotípicas” ou como populações de neurónios dissociados, por períodos de meses, facilitando manipulações moleculares, como a sobre-expressão, subexpressão ou o KO de proteínas específicas. Estas técnicas *in vitro* melhoraram muito a compreensão dos mecanismos moleculares que fundamentam a plasticidade sináptica^{197,212}.

No hipocampo, foi possível avaliar questões tão complexas como a extensão e o impacto de mecanismos, tais como a fosforilação de uma proteína num resíduo específico, usando diversas abordagens experimentais, desde a quantificação dos níveis de fosforilação em membranas sinápticas isoladas até à avaliação do seu impacto na função celular por técnicas eletrofisiológicas ou à análise comportamental de animais com alterações genéticas que impeçam a fosforilação desse resíduo específico²¹³. Mesmo assim, ainda não está totalmente esclarecido o panorama geral de como a

plasticidade sináptica, em extensas redes de células, leva ao armazenamento e ao recordar de informações²⁴. Foi aí que o psicólogo Donald Hebb propôs um papel para estas redes/grupos de neurónios como engramas (em psicologia, um “traço ou marca no comportamento por influência de uma experiência física”)²¹⁴ ou traços de memória²¹⁵. No seu célebre “postulado neurofisiológico” propõe que as conexões entre neurónios ativos em simultâneo são fortalecidas através de mecanismos de plasticidade sináptica, de modo a que a ativação subsequente pela estimulação de entrada de apenas um subcomponente desse conjunto, levará à ativação de todos os neurónios do conjunto, recapitulando assim a atividade provocada pelo evento original²⁴. A LTP é um processo cuja indução requer atividade coincidente dos neurónios pré- e pós-sinápticos²⁴. O enigma está em identificar esses conjuntos de células na codificação da memória no hipocampo²⁴.

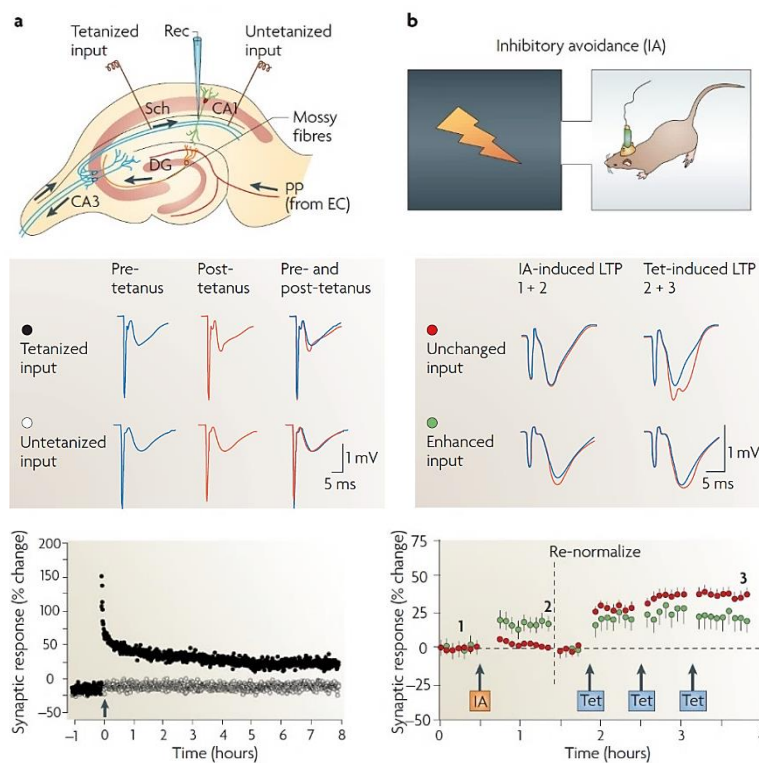


Figura 1.6 Potenciación de longa duração (LTP) *in vitro* e *in vivo*. a | Registos extracelulares de LTP induzida por estimulação tetânica da projeção das fibras colaterais de Schaffer (Sch) para as células piramidais CA1 numa fatia transversal de hipocampo (a. topo). O painel central esquerdo mostra o registo das respostas sinápticas típicas na região dendrítica apical da CA1 após a estimulação dos colaterais de Schaffer. Estimulação tetânica (uma breve rajada de estímulos elétricos de alta frequência) pode ser usado para induzir LTP com duração de muitas horas na via tetanizada (a. painel inferior, círculos fechados); a segunda, via de controlo (círculos abertos) recebe apenas estimulação de basal e não é potenciada (especificidade de entrada). b | Indução da LTP *in vivo*, pela aprendizagem¹⁹⁹. As respostas sinápticas em vários locais são registadas na CA1 de animais em movimento livre, pelo uso de uma matriz de elétrodos de registo e um único elétrodo estimulador (b. painel do meio). Os ratos foram treinados para uma tarefa de esquiva inibitória (do inglês:

Inhibitory avoidance, IA), por tentativa única, uma forma de aprendizagem dependente do hipocampo em que um roedor evita entrar numa arena escura onde recebeu um choque nas patas (b. painel superior). O treino IA leva a um aumento rápido, com duração de horas, na amplitude das respostas evocadas em algumas das vias registadas (círculos verdes em b., painel inferior), mas não em outras (círculos vermelhos). A potenciação sináptica depende do treino (b., painel inferior; seta “IA”) e oclui a LTP induzida pela estimulação tetânica (Tet): Compare-se o grau de potenciação induzido pela estimulação tetânica (seta “Tet”) nas vias que foram aumentadas pelo treino (círculos verdes) com as vias que não foram alteradas (círculos vermelhos). Os números 1, 2 e 3 indicam os momentos em que as respostas no painel central (b.) se obtiveram a partir das aferências que foram aumentadas (a verde) ou inalteradas (a vermelho). As respostas sobrepostas no painel do meio mostram os efeitos da aprendizagem (1+2) e os efeitos subsequentes da aplicação de três episódios de estimulação tetânica (2+3) mostrando que o aumento da atividade sináptica dependente da experiência usa os mesmos mecanismos moleculares da expressão da LTP induzida por tétano. DG, giro dentado; EC, córtex entorrinal; pp, via perfurante. Figura retirada de Neves, Cooke & Bliss (2008)²⁴.

1.8.3. Mecanismos celulares de indução e expressão de LTP

Como já referido, a transmissão sináptica excitatória rápida no hipocampo é mediada por recetores AMPA e NMDA para o glutamato, em que a ativação dos recetores NMDA por despolarização prolongada leva à entrada de Ca^{2+} no componente pós-sináptico. Evidências consideráveis vinculam este aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) no componente pós-sináptico à indução de LTP. A indução de LTP, e. g., é impedida se os recetores NMDA forem farmacologicamente inibidos ou se a elevação da $[Ca^{2+}]_i$ pós-sináptica for prevenida pela injeção de um quelante de Ca^{2+} no neurónio pós-

sináptico. O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ativa duas cinases de proteínas: A cinase C de proteínas (PKC, do inglês, *protein kinase C*) e a CaMKII¹¹².

O mecanismo molecular envolvido na potenciação da transmissão sináptica via ativação de cinases pela elevação da $[Ca^{2+}]_i$ pós-sináptica é mais difícil de seguir. Estudos recentes sugerem que essa via se pode ramificar (**Figura 1.7**). Uma via que leva ao aumento da eficácia dos recetores pós-sinápticos AMPA é a sua fosforilação pela PKC ou pela CaMKII, que leva a um aumento da condutividade iónica do canal. Outra via, é a inserção de mais recetores AMPA na membrana pós-sináptica. De acordo com um modelo atual, nas imediações da membrana pós-sináptica estão presentes organelos vesiculares repletos de recetores AMPA, que aguardam em latência. Em resposta à ativação da CaMKII, ocorre a fusão dessas vesículas com a membrana pós-sináptica e novos recetores AMPA são deste modo concedidos à sinapse. Esta adição de nova membrana faz com que haja uma tumefação das espinhas¹¹². Em Borgdorff & Choquet (2002)²¹⁶ foi demonstrado que os recetores AMPA também se podiam difundir lateralmente na membrana e estabilizar-se perto das sinapses.

Há também evidência que a estrutura da sinapse é alterada após a LTP. Em particular, há formação de novas espinhas dendríticas pós-sinápticas, formando-se novos contactos sinápticos com axónios. Desta forma, após a LTP, um único axónio pode estabelecer múltiplas sinapses próximas com o mesmo neurónio pós-sináptico. Esse brotamento de sinapses não aumenta apenas a superfície de resposta pós-sináptica, mas aumenta também a probabilidade de um potencial de ação, no axónio, acionar a libertação pré-sináptica de glutamato¹¹².

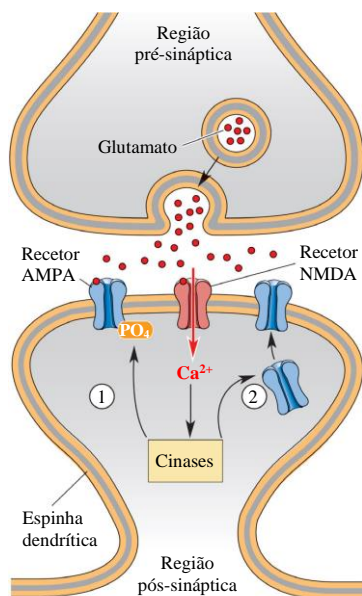


Figura 1.7 Vias para a expressão da LTP. A entrada de Ca^{2+} através do recetor NMDA ativa cinases de proteínas, possibilitando a LTP pela ① alteração da eficácia dos recetores pós-sinápticos AMPA existentes ou ② pela estimulação para a inserção de novos recetores AMPA. (Fonte: Adaptado de Bear & Malenka, 1994, Fig. 1.)¹¹².

1.8.3.1. O papel da PSD-95 na regulação da plasticidade sináptica

As alterações na expressão de PSD-95 influenciam o recrutamento dos recetores AMPA na sinapse, modulando dessa forma a força sináptica^{124,125}. Isto sugere que a PSD-95, por meio da modulação da retenção dos recetores AMPA na sinapse, possa também regular a plasticidade sináptica. De facto, a sobre-expressão de PSD-95 oclui a LTP, possivelmente devido à saturação da sinalização do recetor, aumentando a LTD, talvez pelo resultado do aumento do número de recetores AMPA disponíveis para internalização^{126,217}. Em ratinhos que não expressam PSD-95 há uma diminuição das correntes AMPA e um aumento da LTP²¹⁸⁻²²⁰. Deste modo, os níveis de PSD-95, assim como a sua associação com os recetores AMPA, não modulam apenas a transmissão sináptica, mas modulam também a sua plasticidade⁹⁴. Contudo, a sobre-expressão de PSD-95 não afeta o recrutamento, para a sinapse, dos

recetores NMDA¹²⁴, apesar de haver um acoplamento direto da PSD-95 aos NMDA. O acoplamento da PSD-95 influencia o tráfego e o recrutamento sináptico dos recetores AMPA, por meio da associação com a stargazina e proteínas relacionadas conhecidas como proteínas transmembranares reguladoras dos recetores AMPA (do inglês: *Transmembrane AMPA receptor regulatory proteins*, TARPs)^{125,221–223}. A manipulação dos níveis de expressão de PSD-95 por curtos períodos de tempo ou longos, também influencia a difusão do complexo **stargazina – recetor AMPA** nas membranas sinápticas^{125,224}. Consistentemente com essas observações, em ratinhos com *knockout* de PSD-95 (PSD-95^{KO}), observou-se uma diminuição do recrutamento sináptico e uma função anormal dos recetores AMPA, mas não dos recetores NMDA^{218–220,225}.

1.8.4. Mecanismos celulares de indução e expressão da LTD

Foram descritas dois modelos distintos de LTD homossináptico, um dependente da ativação do recetor NMDA e o outro requerendo a ativação de mGluRs acoplados a proteínas G¹¹². Na LTD dependente de recetores NMDA, à semelhança do que acontece na LTP, o sinal pós-sináptico que desencadeia a LTD é justamente o aumento da $[Ca^{2+}]_i$. No entanto, quando o neurónio pós-sináptico está apenas fracamente despolarizado, o bloqueio parcial do recetor NMDA pelo Mg^{2+} impede quase todo o Ca^{2+} de entrar para o neurónio pós-sináptico. Por outro lado, quando o neurónio pós-sináptico está fortemente despolarizado, o recetor NMDA fica totalmente desbloqueado, havendo uma afluência massiva de Ca^{2+} para o neurónio pós-sináptico. Estes diferentes tipos de resposta na elevação do Ca^{2+} ativam seletivamente diferentes tipos de enzimas. Em vez de cinases, que são ativadas por níveis elevados de $[Ca^{2+}]_i$ na LTP, elevações modestas e prolongadas da $[Ca^{2+}]_i$ ativam fosfatases de proteínas [fosfatase 1 de proteínas (PP1, do inglês, *protein phosphatase 1*) e fosfatase 2 de proteínas (PP2A, do inglês, *protein phosphatase 2*)], provendo a desfosforilação dos recetores AMPA, induzindo-se por consequência a LTD (**Figura 1.8**). Além disto, a LTD, no hipocampo, pode também estar associada à internalização dos recetores AMPA. As PP1 e PP2A também induzem uma desfosforilação do fator de transcrição CREB²²⁶, modulando desse modo a expressão génica e a síntese e degradação de proteínas^{115,227,228}. Isso levará à eliminação das sinapses^{229,230} e ao encolhimento das espinhas²³¹. Deste jeito, a LTP e a LTD parecem refletir a regulação bidirecional da fosforilação e do número de recetores AMPA pós-sinápticos¹¹². Por fim, ensaios comportamentais sugerem que a LTD contribui para o esquecimento e para a flexibilidade comportamental em ratinhos¹¹³.

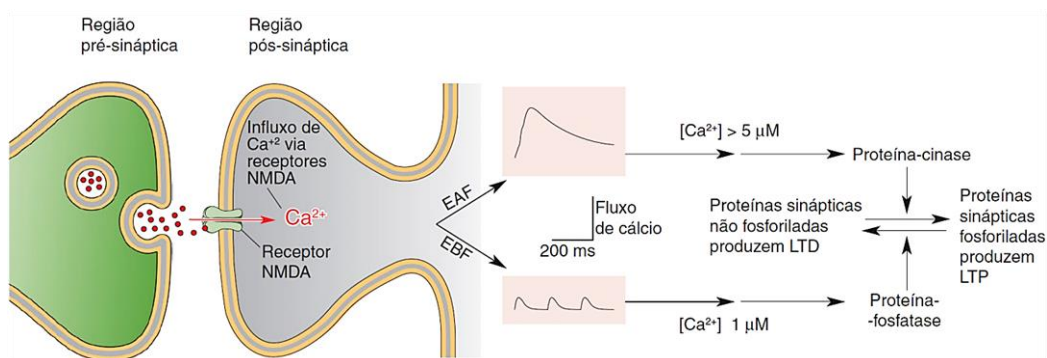


Figura 1.8 Um modelo de como o Ca^{2+} pode desencadear tanto a LTP como a LTD no hipocampo. A estimulação de alta frequência (EAF) gera LTP por intermédio de uma grande elevação da $[Ca^{2+}]_i$ pós-sináptica. A estimulação de baixa frequência (EBF) produz LTD por uma elevação menor da $[Ca^{2+}]_i$. (Fonte: Adaptada de Bear & Malenka, 1994, Fig. 1.)¹¹².

1.8.5. Tráfego de recetores glutamatérgicos

1.8.5.1. Mecanismos básicos da função pós-sináptica excitatória

Como já referido, os iGluRs são os principais mediadores da transmissão sináptica excitatória no hipocampo¹⁰⁹ e são ainda subdivididos em recetores NMDA, AMPA e cainato^{110,111}. Cada uma destas classes de recetores possui uma localização e contribuições distintas para a função sináptica normal,

podendo também ser encontrados em locais não sinápticos. O controlo adequado da transmissão sináptica e da força sináptica é essencial para a função normal do SNC, incluindo a formação e manutenção da memória.

A expressão e localização dos iGluRs pós-sinápticos é altamente dinâmica^{123,232-234}. Destes, são os recetores AMPA que predominam no componente pós-sináptico, onde mediam uma transmissão sináptica excitatória rápida¹⁰⁹. Os recetores NMDA²³⁵ e os recetores de cainato²³⁶ também são mobilizados dinamicamente, afetando a função sináptica¹⁰⁹. As alterações na capacidade de resposta pós-sináptica ao glutamato podem ser mediadas por alterações na condutância de recetores preexistentes ou por uma alteração do seu número na membrana pós-sináptica¹⁰⁹. Embora as alterações na condutância do canal, em resultado da fosforilação direta de diferentes subunidades dos iGluRs, sejam relevantes²³⁷, a expressão e a mobilidade superficial de recetores AMPA é altamente regulável, sendo diretamente relevante para a eficácia sináptica^{233,238}, havendo também uma rotatividade contínua dos recetores AMPA na membrana sináptica mediada por exocitose e endocitose²³⁹. O tráfego e subsequente ativação do recetor AMPA é também regulado pela atividade sináptica²³⁹⁻²⁴³, estando associado à modulação da força sináptica, que ocorre durante algumas formas de LTP²⁴⁴ e LTD²³² (**Figura 1.9**).

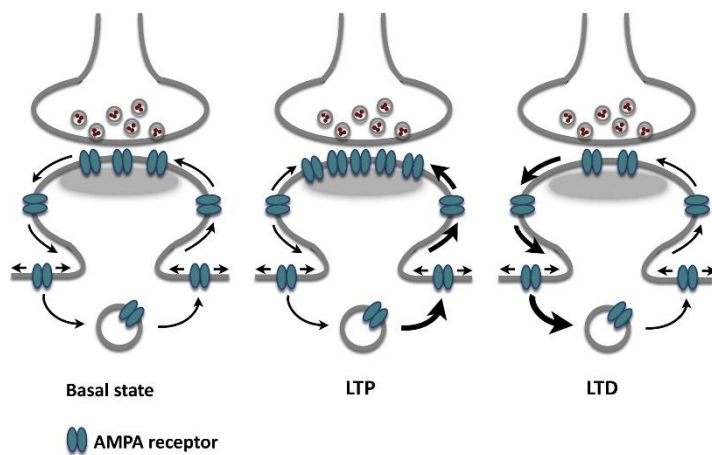


Figura 1.9 Tráfego de recetores AMPA em condições basais e durante a indução de LTP e LTD. No estado basal, a exocitose e endocitose de recetores AMPA não só está em equilíbrio com o número de recetores na sinapse e com os mecanismos envolvidos no recrutamento e desmobilização dos recetores AMPA por difusão lateral na membrana. Durante a indução de LTP, o aumento da exocitose de recetores AMPA e do recrutamento sináptico de recetores AMPA difusos levam ao acúmulo elevado de recetores AMPA sinápticos. Durante a indução de LTD, um aumento na desmobilização por difusão lateral e endocitose de recetores AMPA resulta numa redução de recetores AMPA pós-sinápticos. Figura retirada de Hastings & Man (2018)²⁴⁵.

O glutamato²⁴⁶ ativa predominantemente os iGluRs do tipo AMPA²⁴⁷. Estes são constituídos por quatro subunidades homólogas – subunidades 1-4 do recetor AMPA (GluA1-4) – que se agrupam principalmente em heterómeros²⁴⁸. Na CA1, e. g., os heterómeros GluA1/GluA2 representam ~80% da resposta dos recetores AMPA pós-sináptica, em condições basais, enquanto os restantes ~20% são representados por heterómeros GluA2/GluA3^{247,249}. A GluA1 é crítica para certas formas de aprendizagem e memória e desempenha um papel na epileptogénese. Em estudos anteriores, a plasticidade da GluA1 foi também relacionada à hiperexcitabilidade induzida por hipóxia²⁵⁰.

1.8.5.2. Tráfego irregular dos recetores AMPA como mecanismo de disfunção neuronal

O controlo preciso da eficácia sináptica é importante para o funcionamento normal do SNC e irregularidades na função sináptica, como tal, podem levar a perturbações neurológicas e toxicidade¹⁰⁹. A hiperativação de iGluRs pode levar à neurotoxicidade, principalmente através do influxo excessivo de Ca^{2+} , que leva à indução de processos apoptóticos²⁵¹⁻²⁵⁵, geralmente associados à ativação de recetores NMDA. Essa neurotoxicidade está relacionada com a perda neuronal associada a trauma agudo no SNC e a perturbações como a epilepsia, doença de Alzheimer ou o parkinsonismo. A ativação excessiva dos iGluRs pode também levar a crises, como ocorre na epilepsia, sem levar à neurotoxicidade¹⁰⁹. Por outro lado, a atividade subótima dos iGluRs pode contribuir para doenças como a esquizofrenia^{256,257}. O comportamento aditivo envolve também uma plasticidade inadaptada das vias glutamatérgicas²⁵⁸. Perturbações no tráfego dos recetores AMPA de e para a membrana pós-sináptica podem levar a disfunção neuronal¹⁰⁹. Além disso, embora a maioria dos recetores AMPA não sejam

permeáveis ao Ca^{2+} (o principal mediador intracelular da morte celular), uma subpopulação destes recetores sinápticos, quando não presente a subunidade GluA2, é permeável a esse íão²⁵⁹. Mais ainda, é necessária a ativação dos recetores AMPA para desobstruir os canais/recetores NMDA, os principais mediadores da entrada de Ca^{2+} nos neurónios, do bloqueio dependente de voltagem promovido pelo Mg^{2+} ²⁶⁰. Portanto, o tráfego disfuncional dos recetores AMPA pode, direta- ou indiretamente, levar à excitotoxicidade¹⁰⁹.

1.8.5.3. *Os recetores AMPA na renovação da sinapse por difusão de monómeros*

De entre os principais atores da plasticidade sináptica estão os recetores AMPA (GluA1-4); recetores esses que podem ainda ser organizados em domínios pós-sinápticos em nanoescala²⁶¹⁻²⁶³. O número e a composições de subunidades de recetores AMPA na sinapse são cuidadosamente ajustados para sustentar a atividade sináptica basal, assim como a expressão de fenómenos de plasticidade sináptica^{247,264,265}. Estudos anteriores mostraram que isso é alcançado pela rotatividade dinâmica dos recetores AMPA na sinapse, tanto pela sua difusão lateral, como pelo seu tráfego vesicular^{245,266,267} dos tetrâmeros, que são montados de forma completa e estável no retículo endoplasmático^{268,269}, sendo depois transportados para o *pool* vesicular próximo à membrana plasmática e daí para diversos pontos da membrana plasmática^{86,180,245}. Para ajustar o número e as subunidades que compõem os recetores AMPA na membrana pós-sináptica, os tetrâmeros, com diferentes composições de subunidades, devem estar reunidos no retículo endoplasmático ou na membrana plasmática e transportados para a membrana pós-sináptica^{245,265}.

Entretanto, num estudo de super-resolução descreveu que o *pool* extra-sináptico de recetores AMPA é pequeno²⁷⁰. Investigações recentes revelaram que, embora as moléculas de GluA1 e GluA2 expressas na membrana plasmática formem homo- ou heterotetrâmeros, elas são meta-estáveis e podem se dividir instantaneamente em monómeros, dímeros ou trímeros com capacidade de formar novamente oligómeros maiores, incluindo tetrâmeros. Os monómeros e os dímeros de GluA1 e GluA2 entram e saem facilmente das regiões sinápticas, ao contrário dos tetrâmeros, concluindo-se portanto que a rotatividade dos recetores AMPA, por difusão lateral entre a membrana pós-sináptica e o eixo dendrítico da membrana plasmática sustentando atividade sináptica basal, é conduzida por monómeros (e dímeros) em vez de tetrâmeros estáveis pré-formados. A difusão de monómeros permite aumentar o número de recetores AMPA e alterar rapidamente as composições dos tetrâmeros na sinapse na fase inicial da LTP, sugerindo um novo mecanismo para a plasticidade sináptica²⁷¹.

1.8.6. Regulação de proteínas sinápticas nos fenómenos de plasticidade sináptica

1.8.6.1. *A sinaptofisina*

Apesar de ser a proteína de membrana mais abundante das vesículas pré-sinápticas (~10% da proteína total)²⁷², a função da sinaptofisina permanece ainda enigmática. A sinaptofisina é uma glicoproteína de ligação ao Ca^{2+} , de 38 kDa, essencial para a neurotransmissão, em neurónios do hipocampo. Acredita-se que a sua expressão, no hipocampo, seja um fator elementar para a plasticidade sináptica, no cérebro de rato^{273,274}. Como está localizada exclusivamente nas vesículas sinápticas, ela é amplamente usada como um marcador para terminais pré-sinápticos²⁷⁵, servindo como referência para a estrutura e função sináptica e também para a deteção da densidade e distribuição das sinapses, que é uma das principais formas de plasticidade neuronal^{273,274}. A perda desta proteína, no hipocampo, está correlacionada com o declínio cognitivo na doença de Alzheimer²⁷⁶.

Num rastreio genético em seres humanos²⁷⁷ e em estudos comportamentais em ratinhos²⁷⁸, a perda ou truncamento da sinaptofisina foi implicado em atrasos no desenvolvimento mental e/ou *deficit* de aprendizagem. Estes resultados sugerem que esta proteína de membrana pré-sináptica possa

desempenhar um papel subtil, porém importante, na regulação da transmissão sináptica em circuitos neuronais envolvidos na aprendizagem e memória.

1.8.6.2. A SNAP-25

A SNAP-25 é uma das três proteínas principais do complexo SNARE que participam na fusão das vesículas de neurotransmissores com a membrana plasmática²⁷⁹. Estas três proteínas SNARE interagem para formar um complexo molecular trimérico e superam, nesse processo, a barreira energética para a fusão com a membrana plasmática²⁸⁰. Contrariamente às outras proteínas principais do SNARE, a SNAP-25 ancora-se à membrana por palmitoilação, um processo reversível e dinâmico²⁸¹⁻²⁸³ e que participa da formação de complexos SNARE quaternários espiralados, em que as hélices alfa das três proteínas se enrolam. No sistema nervoso, a SNAP-25 desempenha um papel importante na libertação de neurotransmissores²⁸⁴ e foi sugerido que, durante o desenvolvimento, a SNAP-25 desempenha um papel na promoção do crescimento de neurites^{285,286}.

Embora a SNAP-25 esteja bem documentada como uma reguladora da exocitose de vesículas pré-sinápticas^{287,288}, evidências crescentes sugerem que esta proteína desempenha um papel no tráfego pós-sináptico de recetores de glutamato e também na LTP²⁸⁹⁻²⁹², tendo sido localizada em espinhas dendríticas²⁹³, mais precisamente na PSD; na membrana lateral pós-sináptica; e contida em pequenas vesículas no citoplasma pós-sináptico²⁹³. O mesmo estudo sugere ainda que a SNAP-25 não está significativamente aumentada 1 hora após a LTP do hipocampo, sugerindo então que o tráfego local de SNAP-25 não tem um papel nas fases iniciais da LTP. Contudo, a forte expressão de SNAP-25 nas membranas plasmáticas pós-sinápticas indicia uma função da proteína na exocitose de vesículas pós-sinápticas e um possível papel na plasticidade sináptica do hipocampo²⁹³. Além disso, durante as primeiras 2 semanas de desenvolvimento, a SNAP-25a (a isoforma predominante no cérebro de roedores) faz exibir predominante- ou inteiramente formas de LTD dependentes de mGluR, não expressando LTP. A SNAP-25b é predominantemente expressa em animais mais velhos, acompanhando a regulação positiva dos recetores NMDA ao longo do desenvolvimento, sugerindo que esta isoforma é importante para a expressão da LTD e LTP dependentes de recetores NMDA em animais adultos²⁹⁴.

1.8.6.3. A gefirina

A gefirina é uma proteína estruturadora pós-sináptica que participa na agregação e ancoragem dos recetores GABA_A em sinapses inibitórias, tendo uma função análoga à da PSD-95 nas sinapses glutamatérgicas. Diversos estudos implicaram alterações na expressão e dinâmica da gefirina nas sinapses inibitórias durante a LTP inibitória (isto é, a LTP da transmissão em sinapses inibitórias). A gefirina parece regular especificamente a presença dos recetores GABA_A em nanodomínios específicos, nomeadamente o seu recrutamento de nanodomínios subsinápticos para nanodomínios sinápticos^{88,295,296}.

Foi sugerido que a gefirina possa estar também envolvida no desenvolvimento da TLE. Tem a sua expressão aumentada, principalmente na membrana e no citoplasma de neurónios, nos focos epilépticos do lobo temporal, em humanos e em cérebro de ratos experimentais modelo de TLE. A expressão de gefirina é significativamente menor no neocórtex temporal em pacientes com TLE e é reprimida em grupos epilépticos, em experiências com ratos²⁹⁷.

1.9. Jangadas lipídicas

As jangadas lipídicas são domínios lipídicos ordenados altamente dinâmicos e de dimensões submicroscópicas (25-100 nm de diâmetro), ricos em colesterol e em esfingolípido, que se inserem na bicamada lipídica líquido-desordenada nas membranas celulares. Atribuem-se numerosos papéis a este tipo de nanodomínios membranares, como a organização e compartimentação de componentes de regulação da sinalização por neurotransmissores na membrana neuronal. Estão descritos dois tipos de

jangadas lipídicas associadas sinalização por neurotransmissores: As jangadas lipídicas planares (também chamadas de jangadas não caveolares ou glicolipídicas) e as cavéolas (pequenas cavernas), ambas estimadas entre 25-100 nm de diâmetro. Estes microdomínios em jangada são frequentemente definidos pela sua natureza rica em colesterol e esfingomielina; enriquecimento em proteínas ancoradas em glicosilfosfatidilinositol ou GPI (em abreviação); e associação ao citoesqueleto e resistência à extração por detergentes. As cavéolas caracterizam-se por pequenas invaginações da membrana em forma de frasco que contêm proteínas da família das caveolinas, servindo estas também como um marcador proteico das cavéolas. Estas proteínas são amplamente expressas no sistema nervoso em microvasos cerebrais; células endoteliais; astrócitos e oligodendrócitos; células de Schwann; gânglios da raiz dorsal e neurónios do hipocampo. Porém, as caveolinas e as cavéolas estão ausentes da maioria dos neurónios e neuroblastomas. Os neurónios possuem também jangadas lipídicas planares associadas à flotilina, uma proteína com função análoga, mas não homóloga, à da caveolina. As jangadas lipídicas planares possuem muitas das características das cavéolas (associação ao citoesqueleto; ricas em colesterol e em esfingomielina), mas não são invaginadas. Embora as cavéolas sejam as estruturas mais prontamente observadas e associadas às jangadas lipídicas, a sua presença não é necessária para atribuir “raftness”²⁹⁸.

O presumível envolvimento das jangadas lipídicas na função sináptica leva à questão de como será estabelecido e mantido este fenótipo singular encontrado nas membranas das sinapses neuronais. Uma potencial explicação é-nos fornecida por observações prévias de uma associação direta entre as jangadas lipídicas sinápticas e a PSD. Essa conexão física entre a membrana pós-sináptica e a subjacente PSD é mediada em grande parte pela proteína PSD-95. Sendo uma das proteínas mais abundantes na PSD, a PSD-95 interatua com a membrana através de duas modificações pós-traducionais por palmitoilação no N-terminal, que servem como âncoras hidrofóbicas para a fixação à membrana. Esta palmitoilação é um importante regulador da localização e atividade da PSD-95, bem como de muitas outras proteínas sinápticas envolvidas na função e desenvolvimento neuronal²⁹⁹. Acredita-se que as jangadas lipídicas regulem a transdução de sinal sináptico pelo recrutamento e regulação de recetores de neurotransmissores; inclusive foi descrito que tanto os recetores AMPA como os NMDA (que fazem parte da transmissão de sinal a nível pós-sináptico em sinapses excitatórias) se localizem em domínios de jangada. A residência destes domínios parece ser importante para a expressão superficial de recetores e, por conseguinte, da sua atividade e capacidade de sustentarem uma sinapse funcional²⁹⁹. Até à data, parece não haver nenhuma explicação robusta de como esta peculiar composição lipídica na sinapse seja estabelecida e mantida, ou de como as perturbações da mesma levem à disfunção sináptica²⁹⁹. No entanto, há evidência de alterações nas jangadas lipídicas em doenças neurológicas e psiquiátricas, como as doenças neurodegenerativas, em que as jangadas podem funcionar até como plataformas para a produção de proteínas neurotóxicas, como a A β (na doença de Alzheimer) ou a proteína priónica (na encefalopatia espongiforme transmissível), que poderiam estar preparadas para modular cascatas de sinalização associadas a jangadas²⁹⁸.

1.10. Mecanismos de plasticidade neuronal

A plasticidade neuronal, está presente ao longo da vida e é essencial ao desenvolvimento normal dos circuitos necessários para aprender e adaptar adequadamente o comportamento assim como para regular o funcionamento interno em resposta aos ambientes internos e externos⁴⁸, que podem ser demandas normais de desenvolvimento ou lesões patológicas no sentido mais lato – estrutural, bioquímico ou genético – levando a comprometimento funcional. A atividade neuronal pode moldar a conectividade estrutural e a eficiência da comunicação sináptica e em resposta a lesões, na idade adulta, alguns mecanismos celulares podem eventualmente ser regulados positivamente para permitir de novo uma plasticidade neuronal mais extensa. Aqui, a plasticidade neuronal é a resposta do sistema na

tentativa de reparar ou compensar a perda de função. No desenvolvimento, assim como na plasticidade cortical em adulto, a atividade neuronal pode alterar as conexões funcionais; no entanto, a eficácia da plasticidade neuronal é geralmente reduzida após o desenvolvimento pós-natal e períodos críticos. No caso da plasticidade cortical adulta, as adaptações funcionais e estruturais permanecem, por regra, espacialmente localizadas e restritas ao nível dos terminais dos axónios e das sinapses por fenómenos de plasticidade sináptica (ver secção 1.8). A formação de novas conexões funcionais pode levar a um aumento da eficácia sináptica numa rede preexistente³⁰⁰.

1.10.1. Mecanismos da plasticidade induzida por lesões – Efeitos potenciados do tipo LTP

Estudos farmacológicos em fatias cerebrais mostraram que a inibição reduzida e/ou o aumento da excitação facilitam a expressão de LTP. Registos eletrofisiológicos em fatias de ratos com lesões corticais, revelaram um nível significativamente elevado de LTP nas sinapses de neurónios localizados a uma distância definida entre 1-4 mm da orla lesiva e até após 1 semana passada da indução da lesão³⁰⁰.

Esta plasticidade sináptica aumentada é acompanhada por alterações na $[Ca^{2+}]_i$ em repouso, como o influxo de Ca^{2+} evocado por estímulo que estão moderadamente aumentados na margem da lesão. A origem deste aumento foi investigada por intermédio do bloqueio dos recetores NMDA e AMPA, revelando um aumento do influxo de Ca^{2+} mediado por ambos os tipos de iGluRs após lesão. Enquanto uma permeabilidade de Ca^{2+} anteriormente presente é apenas aumentada, no caso dos recetores NMDA, há uma alteração induzida pela lesão fundamental nas propriedades funcionais dos iGluRs AMPA. Sabe-se que os recetores AMPA são impermeáveis ao Ca^{2+} em condições fisiológicas normais em neurónios de rato após o 15º dia pós-natal (P15). Todavia, após lesões corticais em animais com mais de 23 dias de idade, foi medido um influxo de Ca^{2+} neuronal na presença de bloqueadores farmacológicos de todas as fontes conhecidas de influxo de Ca^{2+} neuronal. Esse influxo de Ca^{2+} foi bloqueado por um antagonista dos recetores AMPA, sendo mediada por recetores AMPA com alteração na composição específica das suas subunidades proteicas, nomeadamente, uma redução na expressão de GluA2, característica dos cérebros pós-natais jovens, é também observada em adultos após lesões³⁰⁰.

1.10.2. Alterações na excitabilidade

A excitabilidade intrínseca dos neurónios é determinada pela sua ativação em resposta a um sinal elétrico ou químico. A regulação da excitabilidade intrínseca pode, então, controlar a escala dinâmica de resposta ao estímulo ao nível celular. A condutância controlada por voltagem pode alterar as propriedades do disparo neuronal, tal como, o limiar de disparo (que pode variar espontaneamente de ativo para inativo até altas concentrações de estímulo), frequência (que pode variar de um único disparo a disparos em salvas – *bursts*) ou a taxa de repolarização (isto é, a rapidez com que uma célula pode voltar a disparar após a sua ativação). Estas propriedades neuronais podem mudar rapidamente, de minutos a horas ou dias. Da mesma forma, a mudança de expressão dos recetores nos terminais tem impacto na força da resposta. Por isso, a alteração da excitabilidade de um neurónio, seja pela alteração da sua condutância quer pela expressão de recetores em condições fisiológicas, pode rapidamente afetar o comportamento⁴⁸.

1.10.2.1. Canais $K_v4.2$ na regulação da excitabilidade dendrítica e na LTP

Os canais de potássio dependentes de voltagem do subtipo 4.2 ($K_v4.2$) são responsáveis pelas correntes transitórias do tipo A no cérebro, importantes no controlo da excitabilidade neuronal³⁰¹, estando maioritariamente expressos em dendrites de neurónios piramidais da CA1, apresentando uma diminuição gradativa das dendrites distais para as dendrites proximais³⁰². O papel do $K_v4.2$ no controlo da excitabilidade dendrítica afeta a plasticidade sináptica e neuronal e contribui para a aprendizagem e para a memória³⁰³⁻³⁰⁵. A atividade do canal $K_v4.2$ regula a estequiometria das subunidades que compõem os recetores NMDA sinápticos reduzindo a razão GluN2B/GluN2A nas sinapses do hipocampo³⁰⁶ e a

ablação de $K_v4.2$ em ratinhos abole a redução gradual na razão GluN2B/GluN2A que se observa durante o desenvolvimento pós-natal, resultando numa proporção maior de sinapses silenciosas (isto é, com recetores NMDA funcionais, mas sem correntes mediadas por recetores AMPA) na idade adulta³⁰⁷. A atividade aberrante de $K_v4.2$ também está implicada, de entre outras perturbações, como patologia neuronal associada à TLE³⁰⁸.

O KO de canais $K_v4.2$ ou das suas subunidades auxiliares DPP6 (por extenso: Proteína 6 do tipo dipeptidil-peptidase) e KChIP2 (por extenso: Proteína 2 que interage com o canal de potássio dependente de voltagem), em ratinhos, reduz as correntes do tipo A, aumenta a excitabilidade dendrítica e aumenta a suscetibilidade a crises epiléticas provocadas. Foram também encontradas mutações no gene que codifica o $K_v4.2$ – *KCND2* – em humanos com epilepsia, sugerindo-se ainda que o comprometimento da função de $K_v4.2$ aumente a vulnerabilidade do cérebro ao desenvolvimento de crises epiléticas³⁰⁹. A expressão reduzida e a função comprometida de $K_v4.2$ foram observadas em pelo menos três modelos diferentes de roedores com epilepsia adquirida (TLE induzida por pilocarpina, lesão cerebral traumática e isquémia) e em ratos após evocada uma crise epilética aguda. A redução da expressão de $K_v4.2$ pode, portanto, ser um mecanismo patológico que contribui para a epileptogénese; contudo, são desconhecidos os mecanismos moleculares que regulam a expressão de $K_v4.2$ durante a hiperatividade neuronal e ainda não está claro se a regulação negativa da expressão de $K_v4.2$ contribui para o início das crises epiléticas³⁰⁹.

1.10.3. Homeostasia sináptica e metaplasticidade

A metaplasticidade foi proposta por Abraham & Bear em 1996³¹⁰. Refere-se à “plasticidade da plasticidade sináptica”³¹¹. Em animais expostos a enriquecimento ambiental apresentam mais tarde uma maior facilidade na indução de LTP, e. g., enquanto estímulos stressantes de alta intensidade causam inibição a longo termo (até 24 h) da LTP no hipocampo e facilitação da LTD³¹². Como uma forma avançada de plasticidade sináptica, a metaplasticidade modula o peso sináptico, introduzindo um estímulo primário antes dos eventos subsequentes de indução de plasticidade, demonstrando característica dependente da atividade. O estímulo iniciador pode ativar fisiologicamente recetores de neurotransmissores específicos e induzir estimulação elétrica das atividades neurais. Embora o estímulo iniciador cause uma alteração nas funções neurais, ele não altera abertamente a força sináptica, alterando apenas a prontidão das sinapses para expressar subsequentemente a LTP ou LTD. A metaplasticidade pode facilitar a LTP por ativação de mGluRs e pode facilitar a LTD ativando os recetores NMDA. Além disso, pode também inibir a LTP, ajustando os recetores NMDA. Assim, sob a modulação da metaplasticidade, previne-se que as sinapses se tornem demasiado fracas ou fortes e evitando a ativação excessiva ou insuficiente³¹¹.

1.11. Diversidade neuronal e dinâmica temporal

O córtex cerebral dos mamíferos possui uma grande diversidade de células que operam em intrincados circuitos. Essa diversidade celular dota o córtex cerebral com a capacidade de realizar processos biológicos complexos, como a representação subjetiva e interpretação do mundo; codificação e recuperação de memórias emocionalmente coloridas; compreensão e empatia com outros indivíduos e investigação científica do universo (incluindo a mente)³¹³.

Ainda hoje, não temos o conhecimento básico de quantos tipos de neurónios existem e de como as células estão interconectadas³¹³. A CA1 constitui uma das áreas corticais mais simples e mais estudadas, onde o recente progresso se fez na base da explicação da diversidade neuronal e da atividade temporal das distintas células³¹³. Aqui, as células piramidais excitatórias codificam representações de memórias espaciais³¹⁴ e outras memórias episódicas³¹⁵ e fornecem eferências glutamatérgicas e GABAérgicas para outras áreas corticais, bem como subcorticais. Embora poucas diferenças tenham sido notadas nas

células piramidais da CA1, elas (**Figura 1.10**, representadas em tons de azul) configuram pelo menos três tipos distintos, visando mais de 10 áreas do cérebro extra-hipocampais³¹⁶.

Até hoje, permanece largamente desconhecido, a forma como são gerados os diversos padrões de disparo dos diferentes neurónios GABAérgicos³¹³. A ativação de interneurónios é mediada a inervação glutamatérgica e subcortical diferencial^{317,318}; acoplamento GABAérgico e elétrico seletivo entre interneurónios; regulação modulatória específica do tipo de célula³¹⁹; expressão específica em cada tipo de célula de distintos recetores e canais³²⁰⁻³²³ ou aferência diferencial de interneurónios, que aparentemente inervam exclusivamente outros interneurónios (**Figura 1.10**, tipos 19 a 21)^{324,325}. Pouco se sabe sobre a atividade destes últimos tipos de células *in vivo*³¹³.

A visão geral é então a de que os neurónios piramidais transmitem os sinais excitatórios para os neurónios a jusante em diferentes áreas do cérebro e para os neurónios nas proximidades no circuito local, enquanto os interneurónios GABAérgicos modulam o fluxo do sinal inibindo localmente os neurónios nas proximidades³²⁶.

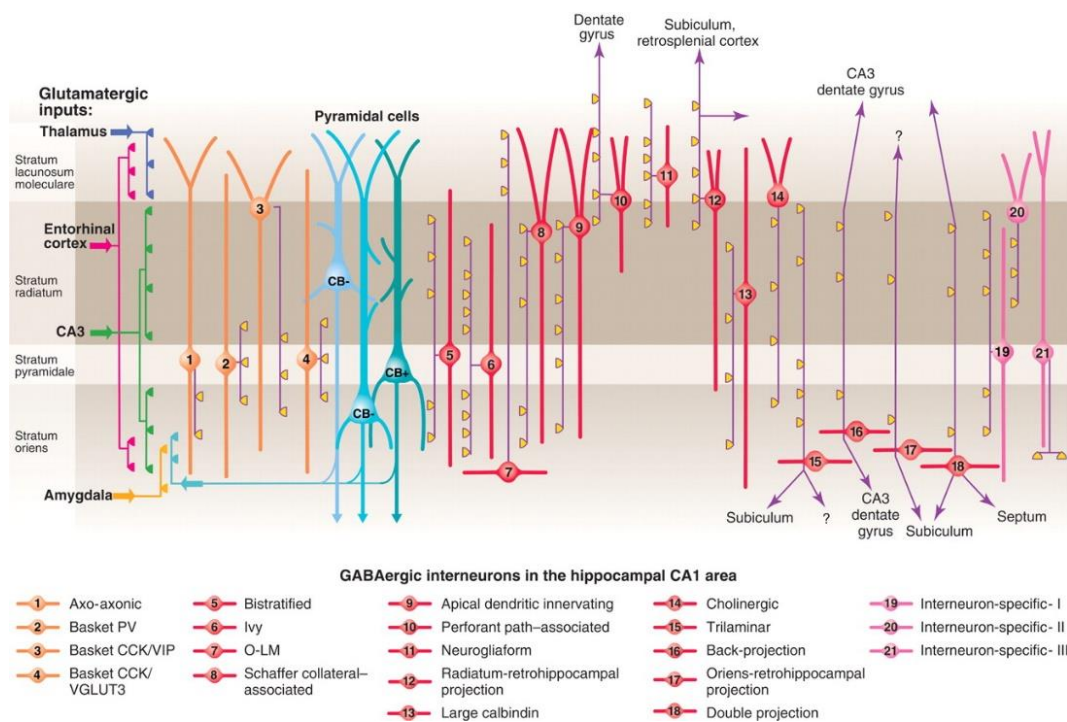


Figura 1.10 Três tipos de células piramidais fazem-se acompanhar por pelo menos 21 classes de interneurónios na CA1. Indicado à esquerda, a terminação principal de cinco aferências glutamatérgicas. Os somas e as dendrites dos interneurónios que inervam as células piramidais (representadas em tons de azul) são cor-de-laranja, e aqueles que inervam principalmente outros interneurónios são cor-de-rosa. Os axónios estão a roxo; e as principais terminações sinápticas a amarelo. Observa-se a associação dos eferentes sinápticos dos diferentes tipos de interneurónio com a região perissomática (à esquerda) e as zonas de terminação da via colateral de Schaffer / comissural ou via entorrinal (à direita), respetivamente. VIP, polipéptido vasoativo intestinal; VGLUT, transportador vesicular de glutamato; O-LM, *oriens lacunosum-moleculare*. Retirado de Klausberger & Somogyi (2008)³¹³.

1.11.1. Interneurónios GABAérgicos

Embora os interneurónios GABAérgicos sejam uma população altamente heterogénea, com uma variedade de morfologias e propriedades eletrofisiológicas intrínsecas, eles podem ser divididos em três classes principais não sobrepostas, os interneurónios positivos para: A parvalbumina (PV); somatostatina (SST); e o recetor ionotrópico 3a de serotonina (5HT3aR). Juntos, estes interneurónios formam quase a totalidade dos interneurónios no córtex. Os neurónios 5HT3aR ainda são classificados em interneurónios positivos para o péptido vasoativo intestinal (VIP, do inglês, *vasoactive intestinal peptide*) e não VIP. Basicamente, cada subtipo de interneurónio inibe todos os outros subtipos de

interneurónios e os neurónios piramidais. Embora cada uma dessas forças inibitórias de conexão possa variar dependendo das áreas corticais, evidências acumuladas sugerem que existem algumas generalidades nos padrões de conectividade específicos ao subtipo³²⁶.

A diversidade dos interneurónio atinge muitos aspetos da sua função, tal como a sua conectividade; propriedades de disparo; morfologia e conteúdo neuroquímico. Muitas das tentativas de correlacionar a função dos interneurónios às suas características neuroquímicas e morfológicas³²⁷, foram infrutíferas^{328,329}. Os marcadores neuroquímicos para os interneurónios são o GABA, GAD65 e o GAD67 (as isoformas 65 e 67 da descarboxilase do ácido glutâmico), evidenciando a natureza inibitória dessas células. Além disso, verificou-se que os interneurónios contêm diferentes péptidos [e. g., a SST, colecistocinina (CCK), VIP, neuropéptido Y e a substância P] ou proteínas de ligação a Ca^{2+} (e. g., a calbindina, calretinina e a PV), permitindo a classificação de subpopulações de interneurónios. No entanto, células com conteúdo neuroquímico idêntico demonstraram estar associadas a diferentes morfologias e a diferentes funções. De acordo com a classificação morfológica, foram descritos pelo menos 21 tipos diferentes de interneurónios, sendo reportada uma grande variedade de formas; distribuição pelas camadas e extensão de arborização^{313,329}. Na **Figura 1.10** encontra-se uma descrição resumida dos principais subtipos de interneurónios presentes na CA1. Entre os subtipos de interneurónios do hipocampo descritos, alguns serão mencionados com mais detalhe, uma vez que são particularmente relevantes para o trabalho descrito nesta tese. As células específicas de interneurónios (IS, do inglês, *interneuron-specific*) são interneurónios inibitórios especializados em visar outros interneurónios³³⁰; identificados pela sua expressão de VIP³³¹ e/ou calretinina³³². Importante notar que algumas células VIP⁺, como as *basket cells* (responsáveis pela inibição perissomática) que co-expressam a CCK⁺, alvejam principalmente as células excitatórias, embora constituam uma fração aparentemente menor de células VIP⁺ em comparação com as células IS. As células IS são descritas geralmente como células que inibem preferencialmente outros interneurónios GABAérgicos. A caracterização de interneurónios na CA1³³⁰ destacou nuances em diferentes formas de controle inibitório sobre neurónios inibitórios além das células IS³³³. Com base na análise de densidade sináptica, os interneurónios recebem uma quantidade substancial de inibição em relação à excitação³³⁴, semelhante às células piramidais³³⁵. Como tal, a inibição da inibição pode surgir através de vários tipos de circuitos, um dos quais é simplesmente dos neurónios inibitórios que têm como alvo outros interneurónios inibitórios, além de alvejar células piramidais³³³. No hipocampo, a maioria das células IS (19,4% da população de interneurónios) expressa VIP, embora algumas *basket cells* CCK⁺ (9,4% da população de interneurónios) também expressem VIP – calculado em Bezaire & Soltesz (2013)³³⁶ de acordo com Fuentealba *et al.* (2010)³³⁷. Na CA1, as células IS podem ser subdivididas em três grupos (IS-I, IS-II e IS-III), de acordo com a camada para a qual projetam o seu conteúdo neuroquímico (**Figura 1.10**, tipos 19 a 21). As células IS-I geralmente não expressão VIP^{313,333,338}. Os interneurónios IS-II e IS-III, que expressam VIP, consistem em interneurónios do **str. or – str. l-m** (células O-LM) que recebem a maioria (cerca de 70%) das suas aferências excitatórias das projeções posteriores das células piramidais CA1 e parecem fornecer um *loop* inibitório de *feedback* para as dendrites de células piramidais no str. l-m, embora também inervem interneurónios nesta camada^{313,329}. Estas células também são um dos principais alvos dos interneurónios IS-III, que contêm VIP (inervando seletivamente outros interneurónios)^{329,339}.

1.12. Inervação monoaminérgica do hipocampo

O hipocampo também recebe informação de aferentes subcorticais maioritariamente com origem no *locus caeruleus* da formação reticular e nos núcleos da rafe e septais por projeções noradrenérgicas, serotoninérgicas e colinérgicas e GABAérgicas, respetivamente^{340,341}. Recebem também inervação dopaminérgica da área ventral tegmental de Tsai e da substância nigra³⁴². Estas vias veiculam ao

hipocampo contexto sobre situações de stress, emoções, motivação e ainda o estado autonómico do organismo que são essenciais ao estabelecimento (ou não) de traços de memória.

A inervação noradrenérgica do hipocampo é mais abundante no DG e na CA3, mas também tem como alvo o **str. I-m** da região CA1. Os neurónios noradrenérgicos são preferencialmente ativados durante estados de vigília e excitação e estimulam o ritmo θ nos neurónios do hipocampo^{341,342}. Pensa-se que a inervação noradrenérgica do hipocampo forneça um sinal de “reset” que favorece a perceção de estímulos novos ou salientes de grande importância durante a exploração. A inervação dopaminérgica do hipocampo parece ser também de grande importância na atividade exploratória e na aprendizagem relacionada com esses estímulos na atribuição do seu valor compensatório³⁴³. A ativação dos *inputs* dopaminérgicos e da via noradrenérgica para o hipocampo reduz o limiar para indução da LTP e estabiliza a expressão da LTP por períodos superiores a 24 h^{341,343}. Está descrito uma perda da modulação da LTP, pelas catecolaminas, no decurso do envelhecimento³⁴⁴.

Tanto os neurónios noradrenérgicos, como os dopaminérgicos, expressam a enzima hidroxilase de tirosina (TH, do inglês, *tyrosine hydroxylase*), já que este é comum e limitante da taxa de biossíntese das catecolaminas. Nas células dopaminérgicas do cérebro, a L-tirosina é convertida em L-3,4-dihidroxifenilalanina (ou L-DOPA), pela TH, sendo posteriormente convertida, pela descarboxilase da L-DOPA, em 3,4-dihidroxi-feniletanamina (também conhecido por **dopamina**). Nos neurónios noradrenérgicos, a dopamina é ainda convertida em noradrenalina, pelo β -hidroxilase de dopamina, que se pode converter ainda em adrenalina, nas células da medula adrenal³⁴⁵. Isto pode significar que a diminuição da expressão de TH possa estar associada a níveis reduzidos de dopamina e/ou outras catecolaminas³⁴⁶, que foram implicadas na patologia de diversas doenças neurológicas, como também no envelhecimento^{344,347-349}.

1.13. Epilepsia

A epilepsia é a perturbação neurológica crónica mais prevalente, afetando cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo e é uma das mais antigas doenças reconhecidas do mundo, com registos escritos que datam de há 400 antes de Cristo (a.C.). É caracterizada por SRSs, que se caracterizam por hiperatividade elétrica neuronal síncrona e descontrolada, que pode ocorrer em zonas restritas do cérebro (parcial) ou ser generalizada. Dependendo das zonas do cérebro ativadas pelas crises epiléticas, estas podem ou não ter manifestações motoras, que incluem desde tremores a convulsões (episódios de movimento involuntário que podem envolver uma parte ou todo o corpo). Podem também perturbar a consciência, causando desde pequenos lapsos de atenção a perda total de consciência, ou perturbar o controlo das funções autonómicas como o da função intestinal ou da bexiga, ou podem ainda causar o aparecimento de auras e alucinações pela ativação anómala das vias associadas à perceção sensorial³⁵⁰. As crises epiléticas podem ter duração muito variável (de segundos a vários minutos)³⁵¹ e a sua frequência varia com o estado de progressão da doença³⁵⁰. Ainda assim, uma crise epilética não significa epilepsia já que o diagnóstico da epilepsia exige a observação de pelo menos 2 ou mais crises epiléticas não provocadas.

Até à data, foram identificadas mais de 40 síndromes epiléticas distintas³⁵². No entanto, cerca de 60% dos casos de epilepsia não têm causa identificável (epilepsia idiopática). Os restantes casos, com causa conhecida, são classificados como epilepsia secundária ou sintomática e podem resultar de danos cerebrais causados por lesões pré-natais ou perinatais (e. g., perda de oxigénio ou trauma durante o parto); de anomalias congénitas ou condições genéticas com malformações cerebrais associadas; de uma lesão traumática; de um acidente vascular cerebral (AVC); de uma infeção cerebral (e. g., meningite) ou de um tumor cerebral³⁵⁰.

Não existe atualmente nenhuma prevenção ou cura efetiva para a epilepsia. O tratamento atual é apenas sintomático, exceto em casos menos comuns, quando o tratamento cirúrgico é possível. Enquanto

os medicamentos anticonvulsivos disponíveis têm como alvo os canais iônicos, como o recetor GABA_A e os canais de sódio dependentes de voltagem (Nav), a atual investigação procura elucidar os mecanismos celulares e moleculares pelos quais um cérebro normal se torna epilético³⁵².

1.13.1. Epileptogénese

A epileptogénese é definida como o do processo gradual pelo qual as redes cerebrais normais desenvolvem uma suscetibilidade aumentada para gerar SRSs, que resultam no desenvolvimento e/ou progressão da epilepsia^{353,354}. Era tradicionalmente associado ao “período epilético latente” compreendendo o período de tempo entre a lesão/foco epileptogénico inicial e a emergência da primeira crise epilética clínica. Cada vez mais evidências demonstram que a frequência e a gravidade das SRSs continuam a aumentar após a primeira crise não convulsiva e, portanto, a epileptogénese agora é percebida como um processo contínuo e progressivo. Os mecanismos patofisiológicos envolvidos na epileptogénese permanecem na sua maioria ainda desconhecidos e, por conseguinte, a defrontação deste fenómeno continua, até agora, uma necessidade clínica por atender³⁵⁴.

1.13.2. Atividade crítica e intercrítica

A atividade elétrica anómala registada por eletroencefalografia (EEG) na epilepsia estende-se muito para além das crises epiléticas. O termo *crítico* refere-se a um estado ou evento fisiológico, como uma crise epilética, AVC ou uma dor de cabeça. No EEG, é considerada *crítica* ou *ictal*, a atividade neuronal registada durante uma crise epilética e denomina-se *intercrítica* ou *interictal*, a atividade registada no período entre as crises³⁵⁵. Esta é também característica da epilepsia e ocorre com uma frequência muito maior do que as crises epiléticas. Caracteriza-se por sinais transitórios de curta duração (<100 ms), grande amplitude e que podem ser classificados como espículas ou ser multifásicos, geralmente uma espícula seguida por uma onda mais lenta. A função desta atividade é altamente debatida e tem sido proposta tanto como um fenómeno protetor contra o surgimento de crises ou, contrariamente, como um prelúdio para as mesmas. Semelhante às crises epiléticas, a atividade intercrítica pode ter origem em múltiplos focos, e na TLE, tem frequentemente origem em múltiplos subconjuntos de estruturas do lobo temporal, e, algumas vezes, fora da zona epileptogénica³⁵⁶. De facto, a atividade intercrítica é o resultado inicial direto das modificações da rede morfofuncional das estruturas límbicas, surgindo antes da atividade crítica na epileptogénese, podendo constituir uma assinatura do período latente³⁵⁷.

O estudo da atividade intercrítica é de especial interesse visto que pouco se sabe acerca dos microcircuitos específicos recrutados durante a sua propagação. Dado o duplo papel dos circuitos GABAérgicos em atenuar a excitação e coordenar as oscilações da rede que suportam a função cognitiva, torna-se essencial examinar, em microescala, especificamente, padrões espaço-temporais da função de inibição³⁵⁶ e a sua contribuição para as alterações da plasticidade sináptica na epileptogénese³⁵⁸.

1.13.3. Epilepsia do lobo temporal mesial – MTLE

A epilepsia do lobo temporal mesial (MTLE, do inglês, *mesial temporal lobe epilepsy*) é um tipo de epilepsia em que as crises epiléticas têm origem nas estruturas mesiais do hipocampo, amígdala e EC, também denominada epilepsia límbica (porque tem origem nas estruturas límbicas do lobo temporal)³⁵⁹. É a síndrome epilética mais prevalente, representando cerca de 60% dos casos das perturbações epiléticas focais³⁶⁰.

A MTLE, frequentemente associada à HS, resulta frequentemente um dano cerebral inicial (traumatismo craniano, meningite, convulsões febris, etc.) seguido por um período latente (sem crises) que pode durar vários anos antes da ocorrência das SRSs que se observam durante a fase crónica. Estas SRSs são originárias do hipocampo, EC ou amígdala e são frequentemente refratárias à medicação, fazendo com que a ressecção cirúrgica do tecido epilético seja a única alternativa terapêutica³⁶⁰. O

processo que leva à epilepsia (isto é, epileptogênese) envolve modificações estruturais e funcionais dentro das redes neuronais, que são imediatas ou retardadas em relação ao dano inicial, e que por fim levam ao surgimento da primeira crise espontânea. O desenvolvimento de tratamentos farmacológicos preventivos exige de uma melhor compreensão de quando e onde modificações plásticas críticas ocorrem em redes neuronais durante o período latente, questão que só pode ser abordada experimentalmente ao nível celular em modelos animais de TLE^{357,361}. Apesar da extensa pesquisa, os mecanismos subjacentes à patofisiologia da epileptogênese ainda não são totalmente compreendidos³⁶².

As redes neuronais na epilepsia caracterizam-se pelo desequilíbrio entre os *inputs* glutamatérgicos e GABAérgicos, pode estar causalmente relacionado à gênese e/ou propagação de crises epiléticas^{363,364}. A perda de populações IS GABAérgicos é uma das primeiras consequências do dano inicial³⁶¹. A transmissão GABAérgica já se encontra assim diminuída nas células granulosas dentadas durante o período latente³⁶¹. Observa-se também uma alteração considerável nos mecanismos de plasticidade sináptica que ocorre nas vias glutamatérgicas e GABAérgicas no sentido de uma maior contribuição de *inputs* excitatórios para transmissão sináptica geral³⁶¹. Para além da lesão inicial, estas alterações desenvolvem-se durante o período latente e continuam a agravar-se no período crônico. A atividade neuronal intercrítica resulta das modificações da rede morfofuncional das estruturas límbicas, podendo constituir uma assinatura do período latente e parece constituir um processo chave da epileptogênese, como e. g., possibilitando mais modificações plásticas nas estruturas temporais a fim de produzir um foco epilético³⁵⁷, contudo, as suas consequências funcionais ainda precisam de ser investigadas mais profundamente.

1.13.4. Alterações iônicas durante a atividade intercrítica *in vivo*

Registos *in vivo* com microelétrodos seletivos de iões (ISMs, do inglês, *ion-selective microelectrodes*) revelaram alterações na concentração de iões extracelulares durante a estimulação repetitiva e crises epiléticas^{365,366}. Isto foi mostrado pela primeira vez para a concentração de K^+ ($[K^+]_o$) pela observação de pós-hiperpolarização dependente de K^+ em axónios por Frankenhaeuser & Hodgkin (1956)³⁶⁷. Os seus trabalhos sugeriram que há uma acumulação considerável de K^+ durante séries de potenciais de ação no espaço extracelular e foram corroborados por estudos posteriores em células gliais de invertebrados³⁶⁸. Estudos *in vivo* da despolarização glial durante a atividade intercrítica^{369,370} reforçaram ainda mais a ideia de que tanto as crises epiléticas focais como as generalizadas são acompanhadas pela acumulação de K^+ no meio extracelular. Isto levou à questão de saber se a aplicação de K^+ nos ventrículos ou no hipocampo poderia evocar crises epiléticas, o que acabou por ser confirmado no hipocampo³⁷¹. E com base nessas observações, propôs-se que há uma quantidade crítica de K^+ que leva à indução de crises epiléticas. Com registos com ISMs confirmou-se que as crises epiléticas estão associadas a aumentos da concentração extracelular de K^+ ($[K^+]_o$) em diferentes espécies e nessas espécies em diferentes estruturas cerebrais³⁷². Enquanto no hipocampo parecia haver um limiar da $[K^+]_o$, levando prontamente à atividade epilética; no córtex, não era possível definir uma $[K^+]_o$ no qual as crises epiléticas emergissem³⁶⁵.

1.13.4.1. Efeitos das alterações iônicas

1.13.4.1.1. Concentração extracelular do magnésio

Em fatias de hipocampo provenientes de animais adultos, a redução da concentração extracelular de Mg^{2+} ($[Mg^{2+}]_o$) induz descargas curtas recorrentes que se originam na CA3 e que se propagam para a CA1 e subículo. É possível usar soluções extracelulares com concentrações baixas, ou total ausência, de Mg^{2+} para induzir atividade neuronal semelhante à atividade intercrítica *in vitro*. Embora o mecanismo subjacente à hiperexcitabilidade dos neurónios não esteja ainda completamente esclarecido, crê-se que a diminuição da $[Mg^{2+}]_o$ cria hiperexcitabilidade predominantemente pelo desbloqueio dos recetores NMDA^{365,373}. Além disso, mostrou-se que a diminuição do Mg^{2+} aumenta a amplitude e a frequência das correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (do inglês: *Spontaneous excitatory postsynaptic*

currents, sEPSCs)³⁷³, sugerindo que aumenta a libertação de neurotransmissores, visto que o Mg^{2+} atua como um antagonista do Ca^{2+} nos terminais pré-sinápticos³⁶⁵. A atividade dos Nav fica também mais sensível à regulação pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina em neurónios quando há escassez de Mg^{2+} ³⁷⁴.

A cultura de neurónios de hipocampo em meio com baixo teor de Mg^{2+} , resulta também numa indução de atividade intercrítica contínua, semelhante à indução da epilepsia sintomática, por SE, tanto em humanos como animais experimentais, sugerindo que o Mg^{2+} seja essencial para a manutenção da excitabilidade elétrica nos neurónios. Estes modelos *in vitro* de atividade epilética intercrítica são bem adequados a investigações bioquímicas e eletrofisiológicas para elucidar quais os mecanismos celulares subjacentes à epileptogénese e à atividade de descarga epiletiforme associada à epilepsia³⁶⁵.

1.13.4.1.2. Elevação do potássio extracelular

A elevação da $[K^+]_o$ tem múltiplos efeitos. Geralmente, os neurónios e as células da glia despolarizam quando a $[K^+]_o$ aumenta³⁶⁵.

A acumulação de K^+ no espaço extracelular reduz a força motriz das correntes de K^+ através dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), prolongando assim a duração do potencial de ação. A elevação da $[K^+]_o$ causa também um grande aumento na libertação de neurotransmissores, como o GABA, glutamato ou a acetilcolina. No hipocampo, isso resulta num grande aumento da condutância da membrana³⁶⁵. Mais ainda, o gradiente transmembranar de K^+ fornece a força motriz para a extrusão de Cl^- , mediada pela isoforma 2 do co-transportador de K^+-Cl^- (KCC2; exclusivamente expressos na membrana plasmática de somas e dendrites em neurónios piramidais e interneurónios do hipocampo e neocórtex)^{365,375,376} e para a acumulação de Cl^- , através da isoforma 1 do co-transportador de $Na^+-K^+-2Cl^-$ (NKCC1; abundantemente expressos em neurónios centrais e periféricos, como em células da glia)^{376,377}. O KCC2 e o NKCC1 são os dois principais co-transportadores catião-cloreto que têm sido implicados na epilepsia em humanos³⁷⁶. Esta alteração no transporte de Cl^- leva a uma mudança despolarizante do potencial de equilíbrio de cloreto e, de facto, o potencial de equilíbrio de GABA é mais positivo quando a $[K^+]_o$ é elevada. Os potenciais de equilíbrio das correntes através de recetores de glutamato também estão deslocados para a valores mais positivos, potenciando a ação excitatória do glutamato. Por último, a elevação da $[K^+]_o$ pode também levar a um disparo em *burst* nos neurónios³⁶⁵.

A despolarização dos astrócitos afeta a força motriz não apenas para a captação de GABA e glutamato, mas também para a captação de glicose³⁶⁵. A captação de K^+ em células gliais durante o tamponamento espacial de K^+ está relacionada com a geração de potenciais negativos lentos em locais de acumulação máxima de K^+ e representa uma das causas das variações de potencial negativo relacionadas com as crises epiléticas^{365,378}. O outro componente é devido ao glutamato e à captação de Na^+ dependente de potenciais de ação. Estes potenciais negativos lentos contribuem para sustentar o desenvolvimento e disseminação das crises epiléticas^{365,379}.

1.13.5. Inibição GABAérgica

A inibição GABAérgica controla a excitabilidade neuronal. Compostos que aumentem ou reduzam a inibição GABAérgica são usados, respetivamente, como drogas antiepiléticas ou pró-convulsivas para muitas formas de epilepsia humana ou experimental. O destino da inibição na epilepsia tem sido particularmente estudado no hipocampo de pacientes com TLE e em animais experimentais modelo de TLE. Foram relatadas várias alterações morfofuncionais importantes na TLE: Primeiro, uma perda de subpopulações de interneurónios GABAérgicos em TLE experimental e humana; segundo, um aumento nas respostas mediadas pelo recetor $GABA_A$ em células granulares dentadas e uma diminuição nas células piramidais CA1, sugerindo uma reorganização dependente da área do recetor $GABA_A$; terceiro, uma alteração na libertação de GABA e uma modificação do seu controlo. Aliás, as consequências destas alterações na inibição de células piramidais são ainda mal conhecidas. As células principais

recebem um *input* inibitório contínuo de uma população heterogénea de neurónios GABAérgicos, que controlam as propriedades integrativas da rede. Com base nas suas propriedades morfológicas e funcionais, podem ser distinguidas duas classes principais de neurónios GABAérgicos: Interneurónios de projeção dendrítica, que controlam o *input* das células principais e a propagação de correntes de Ca^{2+} da dendrite para o soma; e interneurónios que inervam seletivamente o soma das células piramidais, controlando assim a geração de potenciais de ação e, conseqüentemente, o *output* das células principais. Para a avaliação do destino da inibição na TLE, é necessário determinar as mudanças que ocorrem nas duas grandes classes de interneurónios, e o impacto dessas mudanças no *input* inibitório espontâneo nos compartimentos dendríticos e somáticos dos neurónios piramidais. É particularmente importante medir o *input* inibitório espontâneo, devido ao seu forte efeito de frear o disparo das células principais³⁶³.

1.14. O péptido vasoativo intestinal – VIP

O VIP é um péptido linear altamente básico composto por 28 aminoácidos originalmente isolado a partir de duodeno de porco, por Mutt & Said (1974)³⁸⁰ que atua como um modulador da transmissão sináptica no SNC³⁸¹. Presente em populações de interneurónios específicas do hipocampo, é um importante regulador da transmissão de GABAérgica no hipocampo, atuando pré-sinápticamente como facilitador da libertação de GABA³⁸² e pós-sinápticamente na regulação das correntes GABAérgicas. Recentemente demonstrou-se que inibe tanto a LTP na CA1 de rato, através da ativação dos recetores do tipo 1 do péptido vasoativo intestinal (VPAC₁)³⁸³, quanto a LTD, por ativação deste mesmo recetor³⁸⁴. A libertação de VIP, como de outros neuropéptidos, é fundamentalmente desencadeada pela atividade elétrica repetida (ou disparo neuronal recorrente). Estudos *post-mortem* em pacientes com TLE mostram um aumento do número de recetores VIP no hipocampo³⁸⁵, desconhecendo-se até hoje qual o subtipo de recetores que está aumentado. Foi também observado que o VIP promove a sobrevivência dos neurónios na ausência de atividade elétrica³⁸⁶, uma situação comum durante eventos isquémicos como o AVC. Não é ainda claro como é desencadeada e de que forma está alterada, tanto a libertação de VIP como a expressão dos seus recetores nas primeiras horas a dias após um AVC ou uma crise epilética.

1.14.1. VIP e os seus recetores

As ações de VIP são mediadas pela ativação de dois recetores metabotrópicos de alta afinidade, os recetores VPAC₁ e os VPAC₂, que ligam o VIP a uma constante de dissociação de equilíbrio – K_d – na ordem dos nanomolar^{381,387,388}. Estes recetores apresentam uma afinidade similar pelo polipéptido ativador do adenilato ciclase da pituitária (PACAP, do inglês, *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), razão pela qual os recetores de VIP são chamados de VPAC, um acrónimo da contração entre VIP e PACAP³⁸⁹.

Notavelmente, os padrões de expressão dos subtipos de recetores VIP no SNC são muito distintos. O recetor VPAC₁ é expresso predominantemente no hipocampo e no córtex cerebral, enquanto o recetor VPAC₂ é mais abundante no tálamo e no núcleo supraquiasmático, e em níveis mais moderados, no hipocampo, medula espinal, gânglios da raiz dorsal e no tronco cerebral^{388,390–392}. Ao considerar a sua distribuição no cérebro, não é surpreendente que o VIP, via ativação dos seus recetores, possa estar putativamente envolvido em processos de aprendizagem e memória^{387,393}, bem como na epilepsia do tipo MTLE³⁹⁴.

1.14.2. VIP e MTLE

Foi o grupo de de Lanerolle *et al.* (1995)³⁸⁵ que descreveu pela primeira vez, em pacientes com MTLE, que os recetores VIP estavam sobre-expressos nos focos epiléticos no hipocampo, apesar da perda dos neurónios principais (ou seja, células granulares e neurónios piramidais) e da ausência de alterações significativas no padrão e distribuição dos interneurónios imunorreativos a VIP. Dados os efeitos tróficos conhecidos de VIP e as suas conhecidas ações anti-inflamatórias no SNC, pode-se

admitir que a sobre-expressão dos recetores VIP pode contribuir para aumentar a sobrevivência neuronal e ajudar a controlar os danos neuronais pela astrogliose reativa^{385,395,396}. Outra possibilidade é a de que o VIP estimule a glicogenólise nos astrócitos para lidar com o aumento das demandas energéticas das crises epiléticas no hipocampo³⁹⁵. Além do mais, o VIP é um importante modulador da atividade neuronal do hipocampo quer por via do aumento direto da excitabilidade das células piramidais, quer modulando a transmissão sináptica e a plasticidade nas dendrites das células piramidais por desinibição de diferentes segmentos dendríticos de células piramidais^{397,398}. O VIP foi também implicado na TLE experimental observando-se uma diminuição transitória da sua expressão após indução da epilepsia, que é observada conjuntamente com uma perda seletiva dos circuitos inibitórios intrínsecos de *feedback* (interneurónios O-LM) que expressam calretinina^{361,363}. Como tal, a sobre-expressão dos recetores de VIP pode proteger os neurónios contra a hiperexcitabilidade e fenómenos de plasticidade sináptica aberrante que ocorrem após o início das crises epiléticas^{381,383,384}. Esta característica pode ser proporcionada pelo esgotamento secundário de grânulos contendo VIP no curso da MTLE crónica ou pela perda seletiva de interneurónios O-LM alvos de VIP³⁹⁴.

A utilização de ligandos específicos dos recetores para o VIP, como um antagonista do recetor VPAC₁, poderá ser útil, para promover o recrutamento de certos interneurónios capazes de suprimir a atividade de crise epilética e a plasticidade sináptica induzida por crise epilética, com o propósito de reduzir drasticamente os efeitos adversos dos efeitos de fármacos GABAérgicos de largo espectro³⁹⁹. Contudo, serão necessários mais estudos para compreender melhor o papel de VIP e dos recetores VPAC₁ no controlo da libertação de GABA; plasticidade sináptica e excitabilidade neuronal após estabelecimento de crises epiléticas agudas e SRSs, com a intenção de alcançar integralmente o seu préstimo na terapia da MTLE com HS.

Outro aspeto importante é que as ações do VIP endógeno podem ter um grande impacto na manutenção da aprendizagem e memória dependentes do hipocampo⁴⁰⁰ e em evitar o declínio cognitivo frequentemente associado à epilepsia³⁸¹, nesse caso.

Apesar dos efeitos já bem conhecidos de VIP e do seu impacto na excitabilidade do hipocampo; plasticidade sináptica e na aprendizagem e memória, o papel de VIP no contexto da epilepsia continua a ser pouco entendido. A lacuna do nosso conhecimento acerca de quais os subtipos de recetores VIP, afetados principalmente na MTLE com HS, tem impedido o desenvolvimento de ligandos dos recetores VPAC com aplicação terapêutica na epileptogénese e progressão das crises epiléticas. O período latente que ocorre após o evento precipitante inicial, pode constituir uma janela terapêutica importante, na infância como na idade adulta. É, contudo, difícil de delinear uma estratégia universal para esta abordagem, dada a diversidade dos presumíveis (e, talvez, cumulativos) eventos epileptogénicos que levam à apresentação clínica da MTLE. O uso de fármacos “modificadores da doença”, tendo como alvo os recetores de VIP, poderá constituir uma abordagem menos ambiciosa para prevenir os mecanismos epileptogénicos de auto-fortalecimento, sempre que seja observada a primeira crise epilética espontânea³⁹⁴.

1.14.3. VIP, plasticidade sináptica e neuroproteção

Foi recentemente, sugerido que a desinibição desempenha um papel fundamental na regulação da plasticidade sináptica do hipocampo³³⁹. Após a descoberta de que a aplicação exógena de VIP aumentava correntes de NMDA nas células piramidais da CA1, um efeito mimetizado por agonistas seletivos de VPAC₂⁴⁰¹, foi sugerido que tanto o VIP endógeno quanto o PACAP, os dois agonistas naturais desses recetores, poderiam modular a LTP e a LTD dependentes de NMDA no hipocampo. Mais recentemente mostrou-se que a ativação tónica dos recetores VPAC₁ por VIP endógeno modula a LTD dependente dos recetores NMDA e a despotenciação na CA1³⁸⁴. Por outro lado, prevenindo a ativação do recetor VPAC₁ por VIP endógeno há também um aumento da LTP induzida por estimulação

θ -burst no hipocampo, de forma dependente da transmissão GABAérgica e provavelmente pela modulação da desinibição⁴⁰². Este efeito envolve a fosforilação da GluA1 pela CaMKII, um mecanismo que é crucial para o recrutamento sináptico dos recetores AMPA⁴⁰². Estas descobertas, juntamente com o conhecimento de que o VIP é um importante regulador da aprendizagem e da formação da memória dependente do hipocampo associada à recompensa⁴⁰⁰, levam a sugerir que os ligandos dos recetores para o VIP também podem ser um alvo interessante para o tratamento do declínio cognitivo associado à epilepsia³⁸¹, como já foi descrito para outras doenças neurodegenerativas⁴⁰³.

Como acima mencionado, foi demonstrado, em estudos anteriores, que o VIP é um inibidor endógeno da LTP induzida por estimulação θ -burst na CA1, uma vez que se evidenciou um aumento da LTP quando bloqueados, pelo fármaco antagonista seletivo PG 97-269, os recetores de VPAC₁ para o VIP (Figura 1.11).

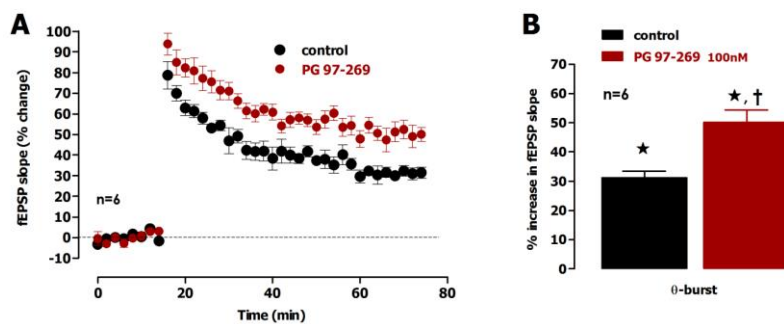


Figura 1.11 Inibição da LTP induzida por estimulação θ -burst pela ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno. (A) Evolução temporal dos valores dos declives dos fEPSPs antes e após a estimulação θ -burst na presença do antagonista dos recetores VPAC₁, PG 97-269, 100 nM. (B) Potenciação obtida 50-60 min após estimulação θ -burst na ausência e na presença do antagonista de VPAC₁, PG 97-269 (100 nM). Abreviaturas: fEPSP, potencial pós-sináptico excitatório de campo (do inglês, *field excitatory postsynaptic potential*). Retirado de Rodrigues *et al.* (2021)⁴⁰².

Também já foi demonstrado que o VIP endógeno, através da ativação do recetor VPAC₁, evita que ocorram alterações na plasticidade sináptica após atividade epiletiforme do tipo intercrítico, *in vitro* (Figura 1.12)⁴⁰⁴, sugerindo um papel deste neuropéptido na neuroproteção.

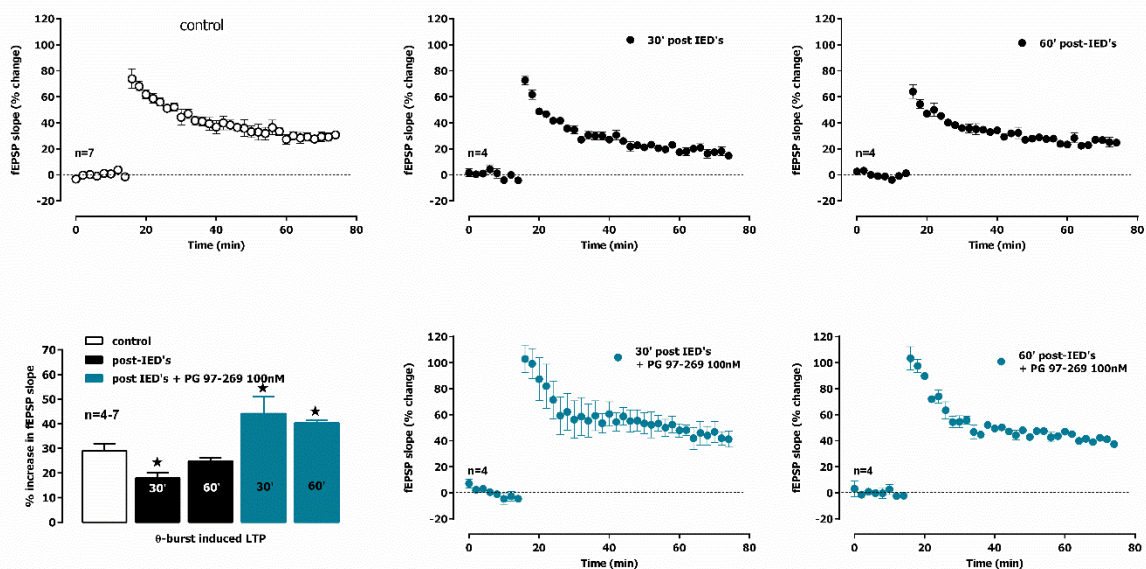


Figura 1.12 O VIP endógeno, através da ativação do recetor VPAC₁, previne as alterações na LTP após IEDs *in vitro*. Influência do bloqueio do recetor VPAC₁ para o VIP durante as IEDs provocadas pela superfusão com aCSF contendo 0 mM

Mg²⁺ e 6 mM K⁺ na expressão de LTP no hipocampo, induzida por estimulação θ -burst aos 30 e aos 60 min após IEDs. ★ Valor- $p < 0,05$ (teste t de Student). Abreviaturas: IEDs, descargas epiletiformes do tipo intercrítico (do inglês, *interictal epileptiform discharges*). Retirado de Carvalho-Rosa & Cunha-Reis (2019)⁴⁰⁴.

1.15. Envelhecimento

O envelhecimento é um processo fisiológico natural associado ao declínio funcional do cérebro⁴⁰⁵, do qual resultam alterações comportamentais e cognitivas⁴⁰⁶, com impacto na aprendizagem, atenção, memória de trabalho e funções executivas^{69,407}. Estas mudanças dependem de muitos fatores e estão relacionadas a processos estruturais, neuroquímicos e fisiológicos no cérebro^{69,408}.

O declínio cognitivo é uma consequência de alterações moleculares e bioquímicas que resultam em desregulação metabólica, hormonal e imunológica; aumento do stresse oxidativo e inflamação; alterações na neurotransmissão e eficiência sináptica; e redução do suporte neurotrófico das células neurais⁴⁰⁹. As alterações na neurogênese também contribuem para este cenário, uma vez que o número de neurónios recém-nascidos, na zona subgranular do hipocampo, diminui com a idade⁷⁸. As alterações na expressão génica podem também ser consideradas como um marcador do envelhecimento ao nível molecular, na medida em que influenciam os níveis de proteínas em muitas vias biológicas. As alterações na composição bioquímica das células neuronais, que afetam a eficiência das suas sinapses e circuitos, debilitam a plasticidade do cérebro. Desta forma, os distúrbios da maquinaria sináptica podem contribuir profundamente para as deficiências cognitivas e para as perturbações cerebrais relacionados à idade⁴⁰⁶. Essas mudanças no cérebro, relacionadas à idade, estão intimamente associadas ao comprometimento da rede de proteostases⁴⁰⁵. As diferenças nos níveis de **proteínas sinápticas – chave** podem fornecer informações sobre a integridade pré-/pós-sináptica e os componentes excitatórios/inibitórios da neurotransmissão, que podem ser perturbados ou alterados durante o processo normal de envelhecimento.

1.15.1. Alterações no hipocampo com o envelhecimento

Embora o impacto do envelhecimento na memória possa variar muito entre indivíduos, muitos estudos em humanos e roedores evidenciaram que a memória, dependente do hipocampo, é particularmente afetada pelo envelhecimento^{410–412}. Com o envelhecimento, o volume do hipocampo vai-se reduzido, um fenómeno associado a condições nas quais a função cerebral é desregulada, e. g., como na depressão⁴¹³. Uma noção comum é que o envelhecimento está associado a uma perda significativa de neurónios no hipocampo⁴¹⁴. Contudo, diversos estudos sugerem que não há perda neuronal substancial com o envelhecimento natural em humanos⁴¹⁵, macacos⁴¹⁶, ratos^{417,418} ou murganhos⁴¹⁹. No entanto, o hipocampo exibe extensas alterações na conectividade, organização estrutural e propriedades funcionais, com especificidade sub-regional diferencial. Tendo um papel fundamental na aprendizagem e memória dos mamíferos^{420,421}, a plasticidade estrutural e funcional do hipocampo adulto fornece a base celular para o estabelecimento de memórias de longo prazo. As alterações na plasticidade sináptica nos diferentes circuitos sinápticos no hipocampo^{69,422} estão implicadas no declínio cognitivo relacionado à idade, tanto em animais de laboratório, quanto em humanos^{423–429}. A LTP e a LTD são os dois principais modelos de plasticidade sináptica com impacto crucial na aprendizagem e na memória de longo termo^{422,430}.

1.15.1.1. Diminuição da LTP com o envelhecimento

A LTP, amplamente considerada como o principal correlato celular da memória, requer não só alterações no tráfego e atividade de moléculas sinápticas^{431–433}, responsáveis pela sua manutenção a curto prazo, mas também a síntese e a transcrição de proteínas para a sua consolidação e manutenção a longo termo⁴¹⁴. Nas sinapses dos colaterais de Schaffer na CA1, observa-se uma redução na magnitude da LTP relacionada à idade, possivelmente devido à menor despolarização durante a indução ou à ativação reduzida de recetores NMDA^{434,435}. Fármacos que afetam a sinalização intracelular dependente

do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*), como análogos de cAMP, agonistas do recetor de dopamina D1/D5 ou inibidores da fosfodiesterase IV modulam a LTP tardia (L-LTP, do inglês, *late LTP*) e atenuam os *deficits* de memória espacial em ratinhos idosos⁴¹⁴. Foi sugerido que as propriedades sinápticas basais, indução da LTP e LTP precoce (do inglês: *Early LTP*, E-LTP) são preservadas principalmente nos circuitos do hipocampo envelhecido, estando a L-LTP, dependentes da síntese de proteínas, comprometida e sendo responsável pelo *deficit* de memória espacial em roedores idosos⁴³⁶. Esta parece afetar de forma mais marcada certos tipos de memória de longo prazo do que de curto prazo⁴³⁷.

1.15.1.2. Modulação da LTD ao longo da vida

Durante os períodos de desenvolvimento, maturação e envelhecimento do cérebro, a estrutura e o funcionamento do hipocampo é alterada. Os períodos pós-natal e juvenil iniciais são extremamente dinâmicos, à medida que os neurónios do hipocampo migram e amadurecem. Por outro lado, no cérebro envelhecido, embora não sejam aparentes grandes mudanças no número de neurónios, ocorrem mudanças significativas, relevantes à plasticidade sináptica, nomeadamente na inervação do hipocampo; arborização dendrítica; números de sinapses e em vários recetores e proteínas envolvidos na plasticidade sináptica⁴³⁸.

Curiosamente, o envelhecimento prejudica a LTP na sua indução ou manutenção e torna a LTD mais robusta e mais fácil de se ativar em roedores envelhecidos^{422,439}. Embora contraintuitivo, isto pode ser explicado pela modulação diferencial das subunidades dos recetores NMDA e as suas consequências na sinalização de Ca^{2+} ⁴⁴⁰. Na verdade, o envelhecimento está associado à redução da componente NMDA da transmissão sináptica causada por uma diminuição no número de recetores NMDA e uma diminuição na proporção das subunidades NR2B. Esta subunidade geralmente confere uma condutância de Ca^{2+} mais alta aos recetores NMDA⁴⁴⁰⁻⁴⁴³; facilita a indução de LTP e permite um melhor desempenho da memória⁴⁴⁴. O envelhecimento contribui também para a disrupção da sinalização neuronal de Ca^{2+} ⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁷ e perturba o equilíbrio entre a atividade de cinases e fosfatases. Esse desequilíbrio, ao favorecer as fosfatases (responsáveis pela LTD) em detrimento das cinases (envolvidas na LTP)⁴⁴⁸, também pode explicar os efeitos deletérios do envelhecimento sobre a plasticidade sináptica. Por fim, o envelhecimento também afeta a expressão génica do hipocampo, modificações epigenéticas e a síntese de proteínas desencadeadas pela LTP⁴⁴⁹. Isto pode contribuir para a perda de espinhas dendríticas, sem perda neuronal, como observado em ratos idosos^{415,417,418}.

Dado que os recetores NMDA e os *deficits* de LTP estão correlacionados com os *deficits* de memória relacionados à idade⁴³⁶ e que a função de resgate dos recetores NMDA salva os *deficits* de memória relacionados à idade⁴⁵⁰, propôs-se que uma causa provável do declínio da memória durante o envelhecimento resultaria de uma deficiência da plasticidade sináptica no hipocampo⁴⁵¹.

Os *deficits* de aprendizagem, com o envelhecimento, foram também atribuídos, em parte, à alteração excitabilidade neuronal piramidal no hipocampo, com os neurónios CA1 a apresentar uma redução na excitabilidade, por sobre-expressão de um tipo de canais de potássio ativados por cálcio (canais KCa1, também conhecidos como “BK”; do inglês: *Big potassium*, BK) e com os neurónios da CA3 a apresentar hiperexcitabilidade, associada a uma repolarização mais rápida do potencial de ação, por meio da expressão aumentada de K_v s dos tipos $K_v4.2/K_v4.3$, que medeiam as correntes do tipo A, particularmente no corpo celular dos neurónios piramidais CA3⁴⁵².

1.15.2. Alterações nos recetores AMPA com o envelhecimento: Razão GluA1/GluA2

Os recetores AMPA desempenham um papel essencial na transmissão basal e na plasticidade sináptica, sendo a sua biossíntese e o seu tráfego na membrana fortemente regulados. Em particular, o tráfego de recetores AMPA é necessário para a inserção sináptica de GluA1 pela sua fosforilação na

serina 845 por proteínas cinases, como o cinase A de proteínas (PKA, do inglês, *protein kinase A*)^{453,454}. O envelhecimento pode desregular o tráfico e a estabilização dos recetores AMPA, e isso pode estar por trás do aumento do risco de perturbações do humor e de doenças neurodegenerativas, com a idade⁴⁵⁵.

A composição das GluA1-4 pode afetar a plasticidade sináptica e a cognição⁴⁵⁶. Os recetores AMPA compostos pelas GluA1,3,4 são permeáveis ao Ca^{2+} e podem ser expressos como homómeros ou heterómeros^{264,457}. Os recetores AMPA que contêm a GluA2, não são permeáveis a Ca^{2+} , sendo a presença desta subunidade o fator limitante para o influxo de Ca^{2+} após ativação destes recetores⁴⁵⁸. A GluA2 é expressa abundantemente no hipocampo, na forma de dois heterodímeros – GluA1/GluA2 e GluA2/GluA3⁴⁵⁹ – importantes para a aprendizagem⁴⁶⁰ e para a memória de longo prazo⁴⁶¹⁻⁴⁶⁴. Foi descrito, em espinhas dendríticas de hipocampo de macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) fêmea, um declínio na expressão da subunidade GluA2, com a idade, tendo sido associado ao declínio da memória^{465,466}.

1.15.3. Envelhecimento e sinapses inibitórias: Mecanismos compensatórios

Em roedores, a indução e a expressão da LTD, no hipocampo, varia ao longo da idade, sendo a LTD mais facilmente induzida no hipocampo de animais juvenis (até ao P40), tornando-se mais difícil de induzir em animais adultos (do P40 ao P200), e ficando novamente mais fácil de induzir em animais idosos (a partir do P200; **Figura 1.13**). Ainda não há consenso sobre como variam os mecanismos de indução de LTD (via recetores NMDA ou mGluRs) ao longo da vida. No período pós-natal inicial, há uma mudança notável nas sinapses glutamatérgicas, de silenciosas para maduras, em que exibem, tanto correntes mediadas por recetores NMDA, quanto por recetores AMPA. Essa mudança pode explicar, pelo menos em parte, as diferenças na plasticidade sináptica do hipocampo, em geral, e na indução da LTD do hipocampo, em particular, entre animais jovens e envelhecidos⁴³⁸.

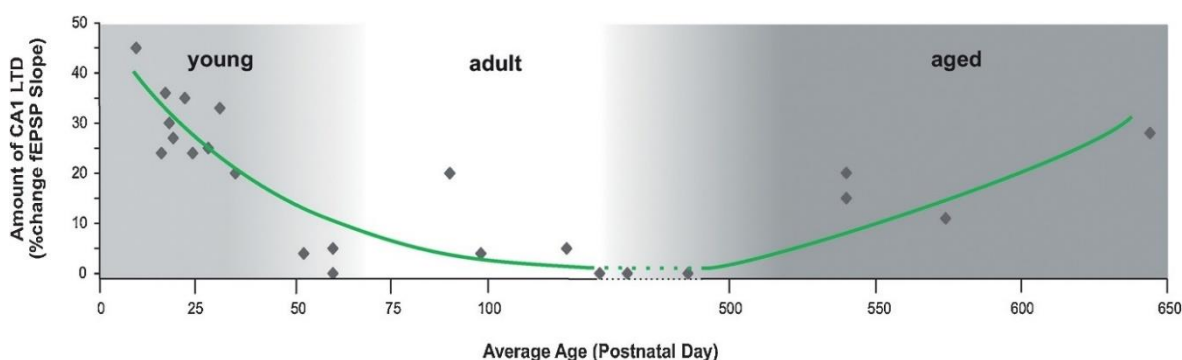


Figura 1.13 O efeito da idade na LTD no hipocampo. Relação entre a idade e a magnitude da LTD na CA1, induzida por um protocolo padrão de EBF (900×1 Hz) em rato. Os gradientes de cores refletem as faixas etárias assim definidas de animais jovens (até ao P40), adultos (do P40 ao P200) e idosos (a partir do P200). Retirado de Pinar *et al.* (2017)⁴³⁸. Abreviaturas: LTD, depressão de longa duração; EBF, estimulação de baixa frequência; P, dia pós-natal.

Recentemente, foi descrito que o envelhecimento está associado à perda de populações IS; afetando assim o balanço entre a excitação e a inibição no cérebro e diminuindo a capacidade dos neurónios de responder, com alterações plásticas, aos desafios ambientais e celulares, deixando o cérebro mais vulnerável ao declínio cognitivo e a danos causados por doenças sináptopáticas⁴⁰⁶. Dados experimentais confirmaram que a perda de *inputs* GABAérgicos, no hipocampo, durante o envelhecimento, pode ser compensada ao nível pós-sináptico pela regulação positiva da expressão de recetores GABA_A com maior sensibilidade para GABA^{467,468}. Foi ainda sugerido que a perda de sinapses inibitórias no córtex pré-frontal possa ser compensada pela regulação positiva da síntese de GABA^{469,470}. Tais mudanças compensatórias, se suficientes, ajudariam a preservar, em certa medida, o potencial plástico e a flexibilidade cognitiva⁴⁰⁶.

Ao nível das sinapses GABAérgicas, embora os recetores para o GABA tenham um impacto substancial na plasticidade sináptica, controlando a LTP, a força sináptica e a maturação das espinhas dendríticas, existem outras moléculas que contribuem para controlar a função sináptica⁴⁰⁶. A expressão de gefirina (uma proteína associada a uma vasta rede submembranar pós-sináptica que se co-localiza com os recetores de glicina e de GABA)⁴⁷¹, pode também servir como um indicador da quantidade total de recetores GABA_A nas sinapses¹³⁵. O seu funcionamento e polimerização são regulados por fosforilação¹³⁶. Pouco se sabe sobre a influência da idade nessas proteínas⁴⁰⁶, contudo, foi observada uma diminuição na expressão da gefirina com a idade no córtex visual humano¹³⁵; por outro lado, foi encontrado um aumento na expressão de gefirina no córtex parietal de ratos envelhecidos, debilitados cognitivamente⁴⁷². No hipocampo, foi sugerido haver um aumento na expressão pré-sináptica da sinaptofisina com a idade para compensar os *deficits* na aprendizagem espacial e na memória^{473,474}.

1.15.4. Envelhecimento sexualmente dimórfico

Como anteriormente referido, o envelhecimento cerebral não está associado a uma perda neuronal significativa^{417,418,475}. Curiosamente, a perda global de sinapses não parece também estar a ocorrer durante o envelhecimento do cérebro^{419,476-478}. Portanto, alterações subtis na estrutura ou na composição sináptica, que alterem a plasticidade sináptica e as respostas funcionais, são as que provavelmente contribuem para a disfunção sináptica no cérebro, no envelhecimento⁴⁷⁹⁻⁴⁸². Assim, entender o que são essas alterações e de como podem ser corrigidas, é uma meta importante para alterar o curso do declínio cognitivo.

Além dos efeitos da idade na estrutura e composição sináptica, está bem demonstrado que existem áreas cerebrais subjacentes ao declínio cognitivo relacionado à idade que respondem às hormonas sexuais. No hipocampo, as diferenças nos níveis circulantes de estrogénios e progesterona condicionam a estrutura^{483,484} e a composição sináptica, em ratos fêmea⁴⁸³, e essas áreas cerebrais respondem diferencialmente às hormonas em animais jovens e idosos⁴⁸³. Mais ainda, existem diferenças de sexo nas respostas sinápticas do hipocampo às hormonas circulantes em rato⁴⁸⁵. Apesar deste conhecimento, grande parte dos estudos que investigam as alterações sinápticas relacionadas à idade fora realizada em animais do sexo masculino. Apesar disso, é importante determinar se os cérebros de macho e fêmea se alteram com a idade de forma semelhante.

1.15.5. O papel da proteína de jangada lipídica – Caveolina-1

A sinalização mediada por caveolina-1 está também causalmente ligada ao desenvolvimento do fenótipo senescente e à regulação de fenómenos patofisiológicos dependentes da senescência⁴⁸⁶, estando sobre-expressa no cérebro de ratos envelhecidos⁴⁸⁶, tanto no hipocampo, como no córtex cerebral⁴⁸⁷, tendo sido demonstrado um papel da caveolina-1 no processamento da proteína precursora do péptido A β , por clivagem pela β -secretase⁴⁸⁷. A diminuição da expressão de caveolina-1, aumenta a longevidade na espécie-modelo *Caenorhabditis elegans*⁴⁸⁸. Em humanos, a expressão de caveolina-1 encontra-se elevada no córtex cerebral idoso⁴⁸⁷ e há um aumento do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA, do inglês, *messenger ribonucleic acid*) de caveolina-1 no hipocampo e no córtex frontal, em pacientes com doença de Alzheimer⁴⁸⁹.

Interessantemente, a caveolina-1 também pode acrescentar danos ao DNA da própria célula, pela elevação dos níveis de radicais livres, por meio da inibição de antioxidantes como TrxR1⁴⁹⁰ (um importante enzima antioxidante que controla a homeostasia *redox* celular) ou Nrf2⁴⁹¹ (um fator de transcrição que medeia as respostas citoprotetoras contra o stresse). Embora bastantes dados liguem, causalmente, o aumento da expressão/sinalização de caveolina-1 à senescência replicativa (depende do número de divisões que a célula complete) e à senescência prematura induzida por stresse (independente do *status* dos telómeros)⁴⁸⁶, outros estudos mostram que a subexpressão de caveolina-1, em células não estimuladas, também pode induzir um fenótipo senescente⁴⁹².

Assim, a caveolina-1 pode ser um regulador pleiotrópico da senescência celular. Enquanto a sua elevada sinalização contribui para o desenvolvimento da senescência replicativa e para a senescência prematura, após stress celular⁴⁸⁶, o seu *deficit* induz senescência prematura, em células em repouso, promovendo a formação/manutenção de cílios primários⁴⁹³ e disfunção mitocondrial⁴⁹².

1.16. Aprendizagem sexualmente dimórfica

A aprendizagem é uma propriedade universal de todos os animais e é definida como a capacidade de mudar o comportamento com base na experiência anterior. Os comportamentos inatos, por outro lado, são aqueles exibidos por animais ingênuos, sem experiência anterior, e considera-se serem codificados genética e/ou hormonalmente. A reprodução sexual impõe diferenças sexuais na anatomia, fisiologia e no investimento de energia. Portanto, não é surpreendente que a maioria dos comportamentos inatos associados à reprodução, como respostas a feromonas, acasalamento, postura e cuidados parentais, sejam sexualmente dimórficos (ou seja, o comportamento é qualitativamente ou quantitativamente diferente em machos e fêmeas). No entanto, para o comportamento aprendido, talvez seja mais difícil imaginar como e porque deveria estar sujeito a dimorfismo sexual⁴⁹⁴.

Os comportamentos inatos podem ser flexivelmente modificados pela experiência⁴⁹⁵ e a aprendizagem pode ser influenciada por preferências inatas. Assim, um mecanismo subjacente às diferenças sexuais na aprendizagem é a interação entre os circuitos do comportamento inato sexualmente dimórfico e os da aprendizagem e memória. À medida que a aprendizagem aumenta a sobrevivência, esta fica sob pressão seletiva⁴⁹⁴. Portanto, as diferenças entre os sexos na aprendizagem também podem surgir através das diferenças sexuais em pressões seletivas associadas a estratégias de acasalamento e a restrições ecológicas^{496,497}. Uma terceira fonte de dimorfismo sexual na aprendizagem é a fisiologia hormonal⁴⁹⁴. As hormonas desempenham um papel fundamental, não apenas na organização e ativação dos caracteres sexuais (particularmente nos vertebrados), mas também na modulação do stress e da cognição⁴⁹⁸. As diferenças fisiológicas intrínsecas podem influenciar o desempenho de cada sexo numa tarefa de aprendizagem específica ou na escolha da estratégia empregada para a resolução de uma tarefa. As diferenças sexuais nas estratégias são particularmente evidentes ao nível dos circuitos e a nível molecular⁴⁹⁴.

O dimorfismo sexual cognitivo nem sempre se manifesta como diferenças no desempenho. Por vezes, os sexos diferem na expressão de uma resposta comportamental, na estratégia empregada para resolver um problema ou nos mecanismos neuronais e moleculares subjacentes à aprendizagem e memória. Nestes contextos, os dimorfismos na implementação podem compensar as diferenças fisiológicas intrínsecas entre os sexos, a fim de manter níveis iguais de desempenho⁴⁹⁴.

Nos vertebrados, o maior dimorfismo sexual neuroquímico é encontrado ao nível hormonal⁴⁹⁴. Devido ao seu papel na regulação da neurogênese, plasticidade, aprendizagem e memória, as diferenças sexuais a nível dos estrogénios estão subjacentes a grande parte do dimorfismo sexual observado na aprendizagem dependente do hipocampo e do estriado em roedores⁴⁹⁸⁻⁵⁰⁰. É importante salientar que os machos também produzem estrogénios e que estes se encontram em níveis elevados no hipocampo⁴⁹⁸. Os estrogénios promovem a plasticidade sináptica e a potenciação. Contudo, os mecanismos subjacentes aos efeitos potencializadores do estradiol na transmissão glutamatérgica da CA1 no hipocampo são diferentes em cada sexo⁴⁹⁴. A potenciação pós-sináptica é mediada por recetores de estrogénios (ERs, do inglês, *estrogen receptors*): Nos machos, pelo recetor de estrogénio beta (ER β , do inglês, *estrogen receptor beta*); e nas fêmeas, pelo recetor de estrogénio alfa (ER α , do inglês, *estrogen receptor alpha*); Enquanto os efeitos pré-sinápticos são mediados pelo ER α , em machos, e pelo ER β , em fêmeas⁵⁰¹. Isto é importante porque os ER α,β regulam a expressão de diferentes proteínas sinápticas, aumentando a GluA1 e a proteína pós-sináptica PSD-95. Apenas o recetor ER β , quando ativado, aumenta também a expressão da GluA2 e diminui a expressão da GluA3. Curiosamente, foi descrito que os estrogénios

aumentam a ligação aos recetores NMDA, mas não teve efeito geral sobre a ligação para os recetores AMPA. Uma explicação, sugere que a sinaptogénese mediada por estrogénios resulta na formação de sinapses silenciosas que contêm NMDA, mas não AMPA. Os estrogénios também potenciam a LTP no hipocampo, requerendo a LTP de ambos os recetores – os NMDA para a indução e os AMPA para a expressão. A expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina é regulada positivamente pelo estradiol⁵⁰². O sistema endocanabinoide, nas sinapses inibitórias GABAérgicas do hipocampo, também é regulado diferencialmente em machos e em fêmeas, através de mecanismos dependentes e independente de estrogénios⁵⁰³.

Outras vias moleculares estão diferencialmente subjacentes à formação da memória em machos e em fêmeas, independentemente da sinalização dos estrogénios. Isto inclui cinases sinápticas, como as cinases da cinase Ca^{2+} /calmodulina α e β (CaMKK α e CaMKK β), o fator de transcrição CREB e o fator de *splicing* SRp20; todos necessários para a aprendizagem espacial em ratinhos macho, mas não em fêmea. Recentemente, num modelo genético de ratinho com perturbações do desenvolvimento neuronal associados à deleção do gene 16p11.2 em humanos, observou-se que os machos hemizigóticos, mas não as fêmeas, tinham uma dificuldade agravada na aprendizagem por recompensa. Os defeitos foram associados ao aumento da ativação específica, em macho, da via ERK1, no estriado, mediante recompensa e à expressão elevada de marcadores para os neurónios D2 espinhosos médios do estriado, responsáveis por inibir ações indesejadas durante o comportamento direcionado a objetivos. Estes resultados sugerem que existem diferenças entre os sexos nos mecanismos moleculares subjacentes ao processamento e ao reforço natural da recompensa no estriado⁴⁹⁴. De facto, vários genes codificadores de enzimas modificadores de histonas no cromossoma X, como *Utx*, *Jarid1c* e *Usp9x*, são expressos em níveis mais altos nas fêmeas do que nos machos e isso contribui para as diferenças dependentes do sexo na aprendizagem, através da regulação epigenética⁵⁰⁴.

2. Objetivos

O primeiro objetivo deste projeto foi o de compreender o papel do VIP endógeno na neuroproteção contra as alterações na plasticidade sináptica desencadeada pela atividade epiletiforme *in vitro*, em sinaptossomas de hipocampo e qual o papel da ativação dos recetores VPAC₁ para o VIP. Para tal, foi analisada a expressão quantitativa das seguintes proteínas de interesse: [1] **Subunidade GluA1 de recetores AMPA** – Associada a alterações fisiológicas na plasticidade sináptica; [2] **Subunidade GluA2 de recetores AMPA** – Associada a mecanismos sinápticos patológicos; [3] **PSD-95** – Proteína de nucleação de jangadas lipídicas em sinapses glutamatérgicas e âncora de múltiplos canais e recetores de membrana, nomeadamente AMPA e NMDA; [4] **Gefirina** – Proteína associada a jangadas lipídicas de sinapses GABAérgicas e âncora de recetores GABA_A; [5] **Canais Kv4.2, responsáveis pela corrente de K⁺ do tipo A** – Associado à regulação da plasticidade sináptica e da excitabilidade dendrítica em células piramidais da região CA1; [6] **Flotilina-1** – Proteína-marcador de jangadas lipídicas planares; [7] **Caveolina-1** – Proteína-marcador de jangadas lipídicas caveolares; e [8] **Sinaptofisina** – Proteína importante na biogénese das vesículas de neurotransmissores, mas que funciona também como um regulador negativo da ancoragem das vesículas à membrana plasmática, bem como um regulador na endocitose e reciclagem das vesículas sinápticas.

Também, como segundo objetivo, teve-se o propósito de tentar compreender os mecanismos moleculares relacionados ao envelhecimento sináptico, a respeito da plasticidade sináptica e da composição das jangadas lipídicas e testar a hipótese de uma associação entre o envelhecimento do cérebro de ratos com 4, 9, 12 e 21 meses (4,9,12,21M), em particular no hipocampo, em sinaptossomas, e uma potencial perda de proteínas sinápticas em machos e fêmeas, quantificada pela expressão dos níveis de proteína associadas à plasticidade sinápticas específicas, como: [a] **Subunidade GluA1 dos recetores AMPA**; [b] **Subunidade GluA2 dos recetores AMPA**; [c] **Sinaptofisina**; [d] **SNAP-25** – Uma proteína pré-sináptica participante na fusão de vesículas de neurotransmissores com a membrana plasmática e com influência na plasticidade sináptica; [e] **Gefirina**; [f] **PSD-95**; [g] **Canais Kv4.2 do tipo corrente A**; [h] **TH** – Um enzima relacionado à biossíntese de dopamina e de outras catecolaminas, importantes na regulação da aprendizagem e memória dependentes do hipocampo; e [i] **Caveolina-1**. Foram estudados ambos os sexos, uma vez que evidências recentes sugerem que as alterações nos níveis de expressão com o envelhecimento são afetadas de modo diferente em cérebros machos e fêmeas e com taxas sexualmente dimórficas.

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Neste estudo, utilizou-se o hipocampo de ratos (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) da estirpe *Wistar* (*Harlan Ibérica*, Barcelona, Espanha). Os animais foram anestesiados com isoflurano numa câmara fechada e seguidamente eutanasiados por decapitação, sendo o seu cérebro cuidadosamente removido da calote craniana e colocado em solução de Krebs gelada com a composição (mM): NaCl 124; KCl 3; NaH₂PO₄ 1,25; NaHCO₃ 26; MgSO₄ 1; CaCl₂ 2; Glucose 10, sendo ainda gaseada com uma mistura de 95% O₂ / 5% CO₂. Obtiveram-se de seguida os seus hipocampos, localizados junto aos lobos temporais esquerdo e direito do cérebro, destacando-os dos tecidos adjacentes como previamente descrito⁵⁰⁵.

Para o estudo da influência da atividade epileptiforme na expressão das proteínas sinápticas prepararam-se primeiro fatias de hipocampo obtido de ratos jovens (6-7 semanas), que se expuseram a condições experimentais que desencadeiam este tipo de atividade *in vitro*. Para o estudo do impacto do envelhecimento na expressão destas mesmas proteínas utilizaram-se diretamente os hipocampos obtidos de animais de diferentes idades (4,9,12,21M). Para garantir que se estavam a observar unicamente alterações sinápticas, homogeneizaram-se os tecidos e isolaram-se os terminais nervosos (sinaptossomas) presentes nestas preparações.

3.1.1. Aspetos éticos da investigação

A experimentação animal teve lugar na Unidade de Neurociências do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa e foi levada a cabo pelo investigador orientador (Diana Cunha-Reis) e uma colaboradora (Nádia Rodrigues). Todos os procedimentos estiveram de acordo com os padrões estabelecidos no Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, na legislação Portuguesa e Europeia sobre o bem-estar animal tendo sido aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Lisboa.

3.2. Fatias de hipocampo isoladas

As fatias de hipocampo foram obtidas a partir de ratos jovens (6-7 semanas) saudáveis, seccionando o hipocampo perpendicularmente ao seu eixo longitudinal com o auxílio de um seccionador automático de tecido (*McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co. LTD*) como previamente descrito. As fatias, de 400 µm de espessura, foram deixadas em recuperação numa câmara em solução de Krebs oxigenada por pelo menos 1 h à temperatura ambiente, para permitir a recuperação do tecido dos danos infligidos pelo processo de dissecação.

Para estudar as alterações na expressão de proteínas sinápticas induzida por atividade epileptiforme utilizou-se uma montagem experimental para estimular fatias de hipocampo com diferentes tipos de atividade epileptiforme, utilizou-se uma montagem experimental constituída por quatro câmaras de perfusão de Perspex (0,1 mL de volume; ver secção 8.3) que se perfundiram durante 15 min com solução de Krebs mantida a 30,5 °C com oxigenação constante (95% O₂ / 5% CO₂), após o que se abriram as câmaras e se introduziu 4 fatias de hipocampo em cada. Em seguida, ligaram-se os elétrodos nas extremidades superior e inferior das câmaras e iniciou-se a estimulação de campo das fatias com pulsos retangulares de 8 V (1 ms) de 20 em 20 s (0,05 Hz, S48K *Square Pulse Stimulator, Grass Instruments*). Monitorizou-se a eficácia da estimulação ao longo da experiência com o auxílio de um osciloscópio. Em duas das câmaras adicionou-se o antagonista dos recetores VPAC₁ (*PG 97-269*, 100 nM) ao Krebs de superfusão. Passados 20 min de estimulação basal, a estimulação elétrica foi interrompida e foi induzida a atividade neuronal epileptiforme com diferentes características:

- 1) A atividade do tipo intercrítica foi induzida por supressão do Mg^{2+} , com concomitante elevação da $[K^+]$ para 6 mM, na solução de Krebs superfusão (**Krebs Mg^{2+} 0 mM** ou **Krebs Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269**) durante 30 min, mimetizando deste modo a atividade neuronal de repouso observada em EEG em doentes epiléticos, e que também é observada durante a epileptogênese em modelos animais³⁶⁵;
- 2) A atividade do tipo crítico foi induzida em experiências independentes por superfusão com Krebs contendo bicuculina (10 μ M; **Bic 10 μ M** ou **Bic 10 μ M + PG 97-269**) um fármaco antagonista dos recetores GABA_A, durante 10 min, mimetizando a atividade neuronal observada durante as crises epiléticas, como já observado em registos eletrofisiológicos em fatias de hipocampo de rato^{506,507}.

Em seguida, voltaram-se a estimular as fatias a cada 20 s e a atividade elétrica das fatias foi monitorizada por 30 min sob uma estimulação basal, após a qual foram recolhidas para tubos criogénicos contendo solução de Sacarose – Seroalbumina bovina (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*) – ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanossulfónico (HEPES) – [320 mM Sacarose, 1 mg/mL BSA, 10 mM HEPES e 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*), pH 7,4] suplementada com inibidores de proteases (*complete*, *Mini*, *EDTA-free*, *Roche*). As amostras foram congeladas em azoto líquido durante alguns segundos e conservadas a -80 °C até à sua análise através da técnica analítica de *western blot* (WB). As experiências foram efetuadas em duplicado em cada dia, sendo que cada *n* representa o conjunto de duas rondas de estimulação, nas condições acima descritas. Geraram-se assim quatro condições experimentais para cada tipo de atividade epileptiforme [Controlo (*CTR*), **Mg^{2+} 0 mM**, antagonista de VPAC₁ (**PG 97-269**) e **Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269** ou *CTR*, **Bic 10 μ M, PG 97-269** e **Bic 10 μ M + PG 97-269**].

3.3. Isolamento de sinaptossomas de hipocampo

As amostras (fatias sujeitas a atividade epileptiforme ou hipocampos de várias idades) foram homogeneizadas a 900 RPM a ~4 °C numa solução de sacarose-HEPES [Sacarose 320 mM; HEPES 10 mM; BSA 1 mg/mL; EDTA 1 mM; pH 7,4]³⁸² com inibidores das proteases (**IP**; *complete*, *Mini*, *EDTA-free* – *Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, *Roche*) e inibidores das fosfatases [**IF** (NaF 10 mM; Na₃VO₄ 2 mM; PMSF 1 mM)]; ou então, quando possível, um *cocktail* de **IP** e **IF** (*MS-SAFE*, *Sigma-Aldrich*); usando um aparelho homogeneizador de Potter-Elvehjem (*B. Braun Melsungen*) com um pistão revestido a Teflon. Tanto o tubo de Potter-Elvehjem como o pistão foram previamente arrefecidos numa caixa com gelo onde se mantiveram também todas as amostras.

Os sinaptossomas foram isolados por um processo de centrifugação diferencial numa centrífuga previamente arrefecida a 4 °C. O homogenato foi primeiramente centrifugado a 750 g durante 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido, e foi centrifugado a 17000 g durante 15 min. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspensão em solução de Percoll 45% (NaCl 120 mM; HEPES 10 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 1 mM; Percoll 45% v/v; Glucose 10 mM; KCl 3 mM; CaCl₂ 1,2 mM) e, seguidamente, centrifugado a 14000 g durante 4 min. Forma-se, na parte superior do tubo eppendorf, uma camada gelatinosa fina e esbranquiçada correspondente à fração celular enriquecida em sinaptossomas e mielina, que foi coletada e transferida para um novo tubo onde foi ressuspensão em líquido cefalorraquidiano artificial [**aCSF**, do inglês, *artificial cerebrospinal fluid*; (NaCl 120 mM; HEPES 10 mM; NaH₂PO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 1 mM; Glucose 10 mM; KCl 2,7 mM; CaCl₂ 1,2 mM)] contendo **IP** e **IF**. Esta mistura foi centrifugada a 15000 g por 6 min. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se novamente o sedimento em aCSF, para lavar o Percoll que permaneça agarrado à preparação, e centrifugou-se novamente a 15000 g por 6 min. Por último, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se, agora, o precipitado com um volume menor de aCSF (100-200 μ L).

Retirou-se uma amostra desta suspensão para a determinação da concentração de proteína, seguindo o restante para reserva, a -20 °C, até que fosse possível ajustar a concentração final de proteína a 1 mg/mL.

3.4. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína das amostras foi desenvolvida segundo o método de Bradford⁵⁰⁸ (ver secção 8.4), pela sua sensibilidade e celeridade.

3.5. Identificação/Quantificação das proteínas pelo método de western blot

A massa de uma proteína é um dos atributos mais comumente usados nos procedimentos de identificação de proteínas. A massa proteica é determinada pela massa total de todos os aminoácidos que constituem a proteína, mais a massa de quaisquer modificações pós-traducionais. A estimativa da massa molecular relativa (Mr) das proteínas, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês, *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*), é obtida comparando a mobilidade eletroforética das proteínas alvo com as mobilidades de padrões de proteínas de massa conhecida⁵⁰⁹. Para a visualização das proteínas, identificação e investigação da sua abundância, foi realizada uma técnica popular e poderosa denominada *western blot*. Esta é uma técnica que, após a separação por eletroforese, consiste na transferência das proteínas para uma membrana. Quando ligadas à membrana, as proteínas ficam facilmente disponíveis para análises imunológicas ou bioquímicas.

O método de WB tem diversas aplicações para a investigação de eventos moleculares regulatórios que sustentam o metabolismo energético, reciclagem/substituição de proteínas e as adaptações fisiológicas crônicas. Na sua essência, o princípio do WB baseia-se em alguns passos: (a) A extração de proteínas celulares de uma mistura complexa de proteínas intracelulares e membranares (de tecidos, células, etc.); (b) Quantificação da concentração de proteína e separação por eletroforese das mesmas dentro de uma matriz de gel; (c) Transferência para uma membrana com alta afinidade para proteínas; (d) O bloqueio dos locais de ligação não específica a membrana a fim de reduzir a ligação dos anticorpos (Ab, do inglês, *antibody*) a esses locais; (e) Detecção de antígenos por anticorpos primários (1-Ab), específicos para as proteínas de interesse; (f) Incubação com um anticorpo secundário (2-Ab) ligado a um marcador (e. g., quimioluminescente ou fluorescente) para amplificação do sinal; (g) Desenvolvimento e detecção do sinal, teoricamente proporcional ao grau de ligação antígeno-Ab e (h) Quantificação das bandas resultantes usando *software* de densitometria⁵¹⁰.

A montagem experimental para a realização deste método, nomeadamente para preparação do gel; eletroforese e transferência foi adquirida à *Bio-Rad*. Todos os materiais utilizados foram previamente bem lavados com água de diferentes graus de pureza (da torneira, pura e ultrapura) para remover qualquer partícula ou sal depositado. No caso das placas de vidro, depois de lavadas, foram seguidamente lavadas com etanol absoluto para acelerar o tempo de secagem, evitando assim resíduos de precipitação, e somente utilizadas quando completamente secas.

3.5.1. Preparação do gel (SDS-PAGE)

Foi criado um sistema de gel de eletroforese de poliacrilamida. Este sistema foi projetado para permitir uma resolução clara das proteínas de interesse nas amostras. Consiste na sobreposição vertical de dois géis composicional e funcionalmente diferentes: o gel de concentração e o gel de separação ou resolvente. O primeiro gel tem como função concentrar a amostra, num pequeno volume, justapondo-a sobre o bordo-limite do gel resolvente, como uma banda estreita. Já o segundo gel, com uma malha mais apertada, funciona, separando as proteínas de acordo com as suas massas moleculares. Outro princípio aplicado é o da migração eletroforética de íões e proteínas através de um pH-tampão⁵¹¹. Como nem todas as proteínas têm a mesma carga elétrica, para permitir uma melhor eletroforese, todos os grupos R da proteína (grupos funcionais de aminoácidos) foram revestidos com cargas negativas através da adição

de um detergente fortemente aniônico – dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês, *sodium dodecyl sulfate*). Como resultado, isso permite a separação de proteínas apenas pelo seu peso molecular^{510,512}.

Duas placas de vidro, uma, de uma espessura maior com rebordos salientes nas laterais, e outra, mais fina e completamente lisa, quando sobrepostas as suas faces, formam no seu interior um espaçamento de 1 mm, onde irá ser formado o gel. As placas de vidro foram colocadas verticalmente num suporte apropriado e montadas num bloco estabilizador com uma borracha isolante, vedando a parte de baixo do espaçamento entre as placas de vidro.

Depois de preparada (em primeiro lugar) a solução do gel de separação [Tampão tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 375 mM, pH 8,8; Poliacrilamida 10% m/v; SDS 0,1% m/v; Persulfato de amônio (APS, do inglês, *ammonium persulfate*) 0,1% m/v; Tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,1% v/v] esta foi introduzida entre as placas de vidro (pouco mais que 4 mL), com a ajuda de uma pipeta, e, seguidamente, colocado etanol absoluto sobre a solução, para impedir a inibição da polimerização pelo oxigénio atmosférico, e aguardou-se 30 min, pelo menos, até estar polimerizado, tempo após o qual se descarta o etanol. De notar que o APS e o TEMED foram adicionados sempre em último lugar, visto que são o peróxido iniciador e o catalisador, em respetivo, que promovem a polimerização. Uma vez polimerizado o gel de separação, preparou-se a solução do gel de concentração (Tampão Tris 250 mM, pH 6,8; Poliacrilamida 5% m/v; SDS 0,1% m/v; APS 0,1% m/v; TEMED 0,1% v/v) e, introduz-se entre as placas de vidro, com uma micropipeta, sobre o gel anteriormente polimerizado, a quantidade suficiente para preencher o espaço até ao topo. Em seguida, sem delonga, insere-se um pente espaçador, num movimento oblíquo, evitando deste modo a formação de bolhas, na ranhura entre as duas placas de vidro. Este serve de molde a formação dos poços no gel de concentração, onde irão ser carregadas posteriormente as amostras a separar por eletroforese. Finalizada a sua preparação, os géis foram acondicionados em folhas de papel absorvente húmidas (com água ultrapura), dentro de um saco de plástico e armazenados a 4 °C, uma vez que a sua preparação se faz geralmente na véspera da eletroforese.

3.5.2. Preparação das amostras para eletroforese

Às amostras previamente obtidas, armazenadas a -20 °C, prontas a utilizar, transferidas para uma caixa de esferovite com flocos de gelo, adicionou-se o “tampão de amostra Laemmli” (LSB, do inglês, *Laemmli sample buffer*) – [4× LSB (*Bio-Rad*) 90% v/v; 2-mercaptoetanol (2-ME; *VWR*) 10% v/v] na proporção 1:4 tendo em conta o volume final total da amostra, depois de adicionado o LSB. O passo seguinte foi a submissão das amostras a um tratamento térmico de 95 °C durante 5 min numa microplaca de aquecimento. O choque térmico, altera a estruturas conformacionais terciárias e secundárias das proteínas, desnaturando-as à quebra as pontes de hidrogénio. O 2-ME atuará como redutor de grupos tiol, clivando as ligações persulfureto, desnovelando mais ainda as moléculas⁵¹³.

Cada amostra foi depois pipetada para o respetivo poço do gel para eletroforese, que foi previamente imerso em tampão de eletroforese (Tampão Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% m/v). Além das amostras, foi carregado num dos poços do gel um marcador de tamanho de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad*). Este marcador consiste em proteínas de tamanhos conhecidos que foram previamente coradas, permitindo assim não só acompanhar a evolução da migração das proteínas durante a eletroforese, como estimar o tamanho das proteínas nas amostras reais que migram a par nas diferentes trilhas do gel.

3.5.3. Eletroforese (SDS-PAGE)

Nesta etapa, irá dar-se a separação, por uma corrente elétrica, das proteínas desnaturadas dentro do gel de poliacrilamida preparado. Devido ao atrito das proteínas, à medida que estas migram no gel passando através dos poros formados entre as cadeias poliméricas do gel, consegue-se que haja uma separação com base no seu peso molecular⁵¹¹, dado que as proteínas do gel se vão deslocar de acordo

com a sua razão carga/massa, sendo que a sua carga vai ser determinada pela associação de cada proteína às moléculas de SDS.

Em primeiro lugar, retiraram-se os pentes espaçadores dos géis nas placas de vidro e foram lavadas cuidadosamente, as placas de vidro, com água ultrapura. Depois de lavadas, foram devidamente colocadas num módulo de corrida com elétrodos e posto dentro da tina para a eletroforese. O espaço dentro do módulo (entre as placas de vidro) foi totalmente preenchido com tampão de eletroforese (Glicina 192 mM; Tampão Tris 25 mM; SDS 0,1% m/v). Após este último passo, teve-se o cuidado de verificar que não haveria vazamentos por baixo, garantindo assim que a passagem de corrente se faz unicamente pelas moléculas e iões que atravessam o gel. Foram retiradas todas as bolhas de espuma nos poços e à superfície, por forma a garantir uma boa visibilidade para a solução no interior do módulo e prevenir interferências na passagem de corrente. O espaço fora do módulo, foi preenchido também com o tampão de eletroforese até atingir a linha demarcada, na tina (cerca de 1/3 da sua altura).

Uma vez preparados os materiais para a eletroforese, seguiu-se o carregamento dos poços dos géis. As amostras e os padrões pré-corados foram carregados com uma micropipeta. Terminado o carregamento, deu-se início à corrida eletroforética nos géis, aplicando primeiro uma tensão elétrica de 80 V, regulada por uma fonte de alimentação, o tempo suficiente para que as proteínas atravessassem o gel de concentração. Chegadas à fronteira deste com o gel de separação, foi alterada a tensão elétrica para 135 V, e seguiu-se a eletroforese o tempo suficiente para que proteínas de menor peso molecular atingissem o final do gel.

3.5.4. Eletrotransferência das proteínas para membrana de PVDF

Terminada a separação das proteínas por eletroforese, seguiu-se a transferência destas para uma membrana (eletrotransferência; com alta afinidade por proteínas), imobilizando desta forma as proteínas separadas, permitindo a subsequentemente imunodeteção e conferindo uma maior estabilidade das proteínas do que quando imobilizadas nos géis⁵¹⁴. Aplicando o mesmo princípio do SDS-PAGE, as proteínas carregadas negativamente no gel e imersas numa solução tampão (tampão de transferência) foram transferidas para uma membrana por uma corrente elétrica lateral (perpendicular ao plano do gel; **Figura 3.1**). A membrana é colocada diretamente sobre o gel, garantindo a transferência de proteínas em espelho. As proteínas são tipicamente transferidas para membranas de nitrocelulose ou difluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês, *polyvinylidene difluoride*)^{514,515}. As membranas de PVDF permitem a possibilidade do processo de *stripping* e re-imunodeteção, uma vez que são quimicamente inertes e robustas⁵¹⁶. As membranas de PVDF conseguem aderir às proteínas através de interações hidrófobas⁵¹⁷ e são capazes de ligar maior quantidade de proteína do que outros substratos⁵¹⁸. A natureza hidrófoba das membranas de PVDF requer uma pré-imersão inicial em metanol para permitir a infiltração do tampão e a ligação de proteínas⁵¹⁹. É importante notar que a transferência de proteínas para as membranas de PVDF pode ser inibida por altas concentrações de SDS⁵²⁰; assim, antes da transferência, os géis devem ser equilibrados no tampão de transferência para remover o excesso de SDS⁵¹⁰.

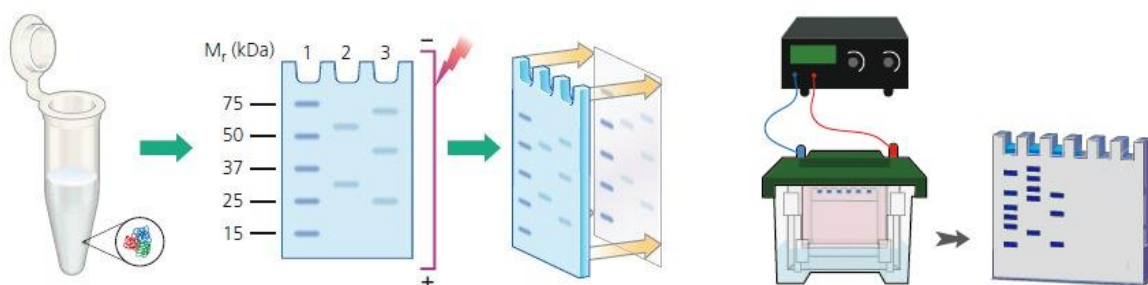


Figura 3.1 Métodos de *western blot*⁵²¹. Preparação da amostra, eletroforese e transferência.

As transferências húmidas tradicionais envolvem sucessivas camadas constituídas pela seguinte ordem: A parte posterior de uma cassete de suporte; Uma almofada de fibra espumosa; Uma folha de papel absorvente grossa; O gel de poliacrilamida; Uma membrana de PVDF; Outra folha de papel absorvente grossa; Outra almofada de fibra espumosa e; A parte frontal da cassete de suporte. Tudo isto sendo ensanduichado pela cassete de suporte e submerso entre um ânodo e um cátodo num módulo de montagem dentro de uma tina para a transferência^{514,515}.

A composição do tampão de transferência também ditará a eficiência da transferência. Geralmente, as soluções de transferência húmida são tamponadas para pH 8,3 e contêm Tris-base juntamente com glicina⁵¹⁴. É importante observar que o pH do tampão não deve ser ajustado através da adição de soluções ácidas ou básicas, pois isso resultará numa maior condutividade por meio de um maior conteúdo iónico, aumentando assim a temperatura da solução e a potencial interferência de fundo e/ou transferência ineficiente. Esses tampões podem ser previamente refrigerados para evitar sobreaquecimento, devido à alta corrente e à deformação da membrana, com as tinas de transferência geralmente contendo blocos frios, no seu interior, e, exteriormente, sendo imersas numa caixa com gelo durante o período da transferência. O metanol foi usado nos tampões de transferência originais^{514,515}, uma vez que aumenta a capacidade de aderência das membranas às proteínas, evitando também o inchaço do gel⁵¹⁰.

Na prática, após conclusão da eletroforese (SDS-PAGE), foram retirados os géis nas placas de vidro; foram separadas as placas de vidro com o auxílio de uma espátula apropriada; e foi destacado o gel de separação, seccionando, removendo-se o gel de concentração com a mesma espátula. O gel de separação foi depositado numa placa de Petri contendo tampão de transferência (Glicina 192 mM; Tampão Tris 25 mM; Metanol 20% v/v) e deixado equilibrar por pelo menos 15 min. Entretanto, cortaram-se tiras de membrana de PVDF (*GE Healthcare Life Science™ Amersham™ Hybond™ P 0.45 μm PVDF Blotting Membrane*) numa dimensão adequada que foram imersas em metanol por aproximadamente 5 s e deixadas equilibrar numa placa de Petri em tampão de transferência por pelo menos 10 min. Em seguida, foi montada a “sanduíche” na cassete de suporte (como descrito acima), havendo sempre o cuidado de remover quaisquer bolhas de ar entre as diferentes camadas, que constituiriam obstáculos à passagem de corrente e à transferência eficiente das proteínas. A cassete foi colocada no módulo de transferência, colocada na tina juntamente com o bloco frio e submersa em tampão de transferência. A tina de transferência foi imersa em flocos de gelo numa caixa de esferovite e foi dado início ao processo de eletrotransferência, aplicando uma intensidade elétrica de 370 mA, regulada por uma fonte de alimentação, durante 110 min. Por fim, transferência concluída, é recolhida a membrana e colocada numa placa de Petri com tampão Tris-salino [TBS, do inglês, *Tris-buffered saline*; (NaCl 150 mM; Tampão Tris 20 mM)] a fim de remover resquícios de gel e equilibrar a membrana com esta solução.

3.5.5. Bloqueio

O bloqueio é uma etapa do processo de WB bem pertinente, uma vez que visa precaver a ligação inespecífica de 1-Ab ou 2-Ab à membrana⁵¹². Como as membranas têm uma alta afinidade para ligar proteínas e, portanto, Ab, o bloqueio reduz a marcação de fundo não específica (*background*) nas etapas subsequentes. Podem ser utilizadas diferentes soluções para este fim, cada uma com os seus próprios benefícios e limitações. O leite em pó magro diluído em tampão Tris-salino com *Tween* 20 [TBST (TBS contendo 0,1% v/v do detergente *Tween* 20)] é frequentemente utilizado, sendo acessível. As proteínas do leite não são, no entanto, compatíveis com todos os Ab. E. g., foi descrito que a BSA (normalmente a 5%) deve ser usada preferencialmente para Ab contra biotina e antifosfoproteínas, pois o leite contém caseína, uma fosfoproteína, e biotina, o que gera alguma interferência no processo de WB. A título de exemplo, por reação de baixa especificidade dos Ab específicos para proteínas fosforiladas, devido às elevadas concentrações de caseína do leite, que ficam na membrana após o bloqueio⁵²².

Para a preparação do leite e da BSA usa-se uma solução de 2,5 a 5% m/v em TBST (o mais comumente utilizado)^{523,524}. A mistura deve ser completa e a solução deve ser filtrada para evitar que os grãos contaminem a mancha durante o desenvolvimento. Idealmente, um agente bloqueador ligar-se-á a todos os locais de interação não específica, eliminando todo o *background* sem alterar o acesso/interação com as proteínas de interesse na ligação dos Ab. A escolha do agente bloqueador deve ser baseada no próprio antigénio e no tipo de conjugação dos 2-Ab⁵¹⁰.

Não é apenas a escolha do agente bloqueador que pode afetar os resultados do WB; também são fatores importantes, o volume do agente bloqueador e, de facto, o período de incubação do bloqueio [que pode variar de desde 1 h a *overnight* (ON, em português, “dum dia para o outro”)]⁵²⁵. Quantidade insuficiente de agente bloqueador (baixa concentração) ou um período de tempo de incubação muito curto, aumentam o potencial de ligação não específica do 1-Ab às proteínas imobilizadas na membrana, o que pode resultar em elevada marcação não específica e/ou um rácio sinal-ruído reduzido. Por outro lado, um período de incubação demasiado longo e/ou quantidade excessiva de agente bloqueador pode interromper as interações antigénio-Ab, causando também uma redução no rácio sinal-ruído⁵²². Com os agentes bloqueadores mais comuns, uma incubação por mais de 90 min levou a uma intensidade de sinal reduzida (sinal para ruído)⁵²⁵ e uma incubação por 30 min ou menos resulta em *backgrounds* inaceitavelmente altos. É por isso recomendado um período de incubação de 60-90 min⁵¹⁰.

Na prática, após o término da eletrotransferência das proteínas para a membrana de PVDF, para a realização da etapa do bloqueio, as membranas foram colocadas incubadas com uma de duas soluções BSA 3% m/v ou leite em pó magro 5% m/v dissolvidas em TBST (NaCl 150 mM; Tampão Tris 20 mM; Tween 20 0,1% v/v), dependendo do tipo de proteína pretendido para análise. Esta incubação decorreu à temperatura ambiente numa plataforma de agitação (*ENDURO™ MiniMix™, Labnet*) durante 60 min. Decorridos os 60 min, as membranas foram lavadas por 5 vezes com TBST: 2 vezes de imediato; e 3 vezes compassadas por 10 min em agitação.

3.5.6. Anticorpos primários e imunodeteção das proteínas

O princípio do WB é a deteção de proteínas através do reconhecimento e ligação dos Ab a um ou mais alvos (**Figura 3.2**); essa interação deve ser altamente específica entre uma porção do antigénio (proteína) ou epitopo e os locais de reconhecimento específicos encontrados na região do fragmento de ligação do antigénio do Ab denominada paratopo⁵²⁶.

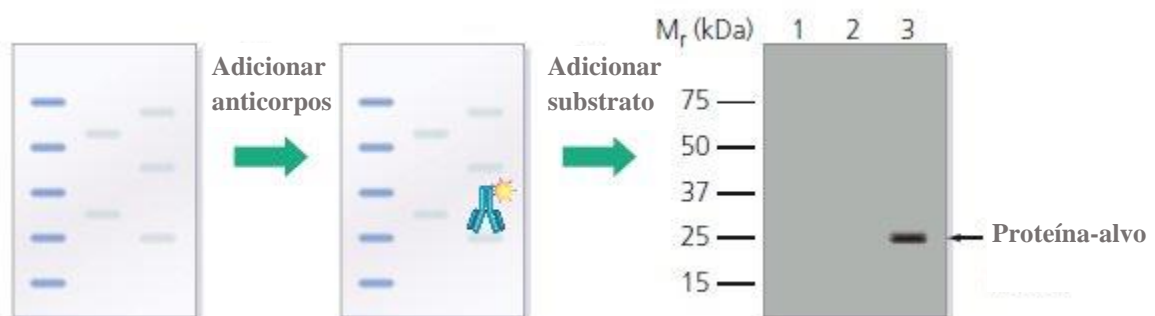


Figura 3.2 Visão geral da imunodeteção. O western blot é bloqueado, incubado com anticorpos e tratado com um substrato que torne a proteína-alvo visível. As etapas de lavagem são realizadas entre as incubações para remover o excesso de material não ligado e minimizar o sinal não específico no imunoblot⁵²⁷.

Na prática, depois do processo do bloqueio, segue-se o processo de incubação com os 1-Ab. Cada Ab foi diluído adequadamente numa solução de TBST com BSA 3% m/v contendo azida de sódio (NaN_3) 0,02% m/v para inibir o crescimento bacteriano, estando a diluição para cada Ab de acordo com

a **Tabela 3.1**. As membranas foram incubadas ON com agitação constante a uma temperatura ambiental de 4 °C.

Tabela 3.1 Diluição dos anticorpos primários e secundários utilizados e respetivo agente bloqueador.

| Anticorpo primário | | | | | | Anticorpo secundário | | |
|--|------------------------|---|---------------|---------------|----------|--|---------------------------------|---------------|
| Alvo | Origem | Marca | Diluição (1:) | Bloqueado com | MW (kDa) | Anticorpo | Marca | Diluição (1:) |
| GluA1 | Coelho, Policlonal | <i>Millipore</i> | 1 k | BSA | 110 | Cabra Anticoelho IgG (H+L), HRP* | <i>Proteintech</i> [®] | 10 k |
| GluA2 | | <i>Proteintech</i> [®] | 2 k | Leite | 110 | | | 50 k |
| PSD-95 | | <i>Cell Signaling Technology</i> [®] | 1 k | BSA | 95 | | | 15 k |
| α-Tubulina | | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> | 5 k | Leite | 55 | | | 15 k |
| SNAP-25 | | <i>Synaptic Systems</i> | 5 k | BSA | 25 | | | 10 k |
| Kv4.2 | | <i>Millipore</i> | 1 k | BSA | 75 | | | 10 k |
| Hidroxilase de tirosina | | <i>Abcam</i> | 1 k | BSA | 60 | | | 5 k |
| Sinaptofisina-1 | | <i>Synaptic Systems</i> | 7,5 k | BSA | 38 | | | 15 k |
| Flotilina-1 | | <i>Abcam</i> | 2,5 k | BSA | 50 | | | 20 k |
| Na⁺/K⁺ ATPase | | <i>Abcam</i> | 150 k | Leite | 113 | | | 50 k |
| β-Actina | Ratinho, Monoclonal | <i>Proteintech</i> [®] | 15 k | Leite | 42 | Cabra Anti- ratinho | | 20 k |
| Caveolina-1 | Ratinho, | <i>Abcam</i> | 750 | Leite | 25 | | | 15 k |
| Gefirina | Ratinho, | <i>Synaptic Systems</i> | 3 k | BSA | 93 | IgG (H+L), HRP* | | 4 k |

*Peroxidase de *Armoracia rusticana* (HRP, do inglês, *horseradish peroxidase*)

3.5.7. Anticorpos secundários

Os 2-Ab são necessários para detetar indiretamente um antígeno-alvo ligado a um 1-Ab (**Figura 3.3.A**). Normalmente, os 1-Ab não estão conjugados com um marcador a ser detetado. Resultado disto, e do interesse em amplificar o sinal detetado pelo 1-Ab para proteínas de escassa abundância, usa-se frequentemente um 2-Ab (conjugado a uma função repórter, e. g., a peroxidase de *Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey & Scherb. – HRP, fluoróforos específicos) capaz de se ligar à região do fragmento cristalizável dos 1-Ab, e permitindo assim a deteção subsequente por uma câmara ou dispositivo de imagem. A escolha do 2-Ab dependerá inicialmente do isotipo do 1-Ab e da espécie do animal em que foi criado⁵²⁸.

A diluição ideal para os 2-Ab dependerá do nível de expressão da proteína alvo e da escolha do 1-Ab [e. g., a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma proteína altamente expressa, exigindo diluições mais altas para evitar a saturação de sinal]. As soluções para os 2-Ab são tipicamente compostas pela mesma solução de bloqueio descrita anteriormente. Ao contrário das condições para os 1-Ab, as incubações com 2-Ab são geralmente realizadas à temperatura ambiente por um período de tempo mais curto, tipicamente 60 min⁵¹⁰.

Na prática, após o período de incubação com os 1-Ab, as membranas foram lavadas 5 vezes com TBST: 2 vezes de imediato e 3 vezes compassadas por 10 min em agitação. As membranas foram logo após postas a incubar com os 2-Ab diluídos em TBST com BSA 3% m/v ou TBST com leite em pó magro 5% m/v, dependendo da proteína a analisar, estando esta informação explícita na **Tabela 3.1**. O tempo de incubação durou 60 min, à temperatura ambiente, numa plataforma de agitação (*ENDURO*TM *MiniMix*TM, *Labnet*). Depois de incubadas, as membranas foram lavadas à semelhança do descrito na

primeira parte deste parágrafo. Terminado este último processo de lavagem, as membranas foram uma vez lavadas e colocadas em TBS.

3.5.8. Detecção e revelação das proteínas

Os princípios gerais de detecção para o WB são os mesmos de outros ensaios baseados em Ab, como o ensaio de imunoabsorção enzimático (do inglês: *Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA)⁵²⁹. Em termos gerais, o 2-Ab é conjugado com um composto marcador (isto é, um radioisótopo ou fluoróforo) ou enzima que permita a detecção subsequente (**Figura 3.3.B**). Atualmente, é mais usual a utilização de um marcador de fluoróforo ou do produto de uma reação enzimática⁵²³. A HRP é o enzima mais comumente empregada⁵³⁰ e pode ser utilizada para detecção colorimétrica ou quimioluminescente. Ao empregar a HRP, vale ter como sabido de antemão que a NaN_3 inibe este enzima, de modo que soluções como as usadas para o *blotting* e para a detecção não devem conter NaN_3 ou as membranas devem ser suficientemente bem lavadas antes da realização da exposição de revelação⁵¹⁰.



Figura 3.3 [A] **Detecção por anticorpo indireta.** A detecção indireta usa um anticorpo primário não marcado seguido por anticorpos secundários marcados⁵³¹. [B] **Detecção de sinal do anticorpo.** O marcador do anticorpo é exposto ao substrato, criando uma banda visível na superfície do blot (substrato colorimétrico) ou como emissão de luz (substrato ECL) capturada por dispositivos adequados⁵³².

Os ensaios de quimioluminescência, dependentes da emissão de luz como produto de uma reação química, são comumente utilizados para a detecção de proteínas em WB. O 2-Ab conjugado com HRP que faz com que o substrato da HRP luminol seja oxidado, produzindo 3-aminofalato que por sua vez emite luz a 428 nm, que pode ser capturada em radiografias ou por uma câmara geradora de imagens digitais. Contudo, o luminol tem uma emissão de luz fraca, com uma meia-vida de emissão inferior a 60 s, de modo que são adicionados intensificadores à reação para aumentar o sinal. Esta intensificação do sinal de luminol é comumente referida como “quimioluminescência aumentada” (ECL, do inglês, *Enhanced Chemiluminescence*). A intensificação do sinal com ECL, comparando com outros sistemas de detecção comuns (como a conversão dos substratos em precipitados coloridos), é a que tem maior sensibilidade. O tipo de intensificador usado também pode aumentar a duração do sinal^{533,534}. A captação ideal de um *blot* quimioluminescente será após um período de incubação de 3 a 5 min com o substrato ECL, podendo estender-se a duração do sinal por 24 h, permitindo a criação de imagens sem perda da intensidade do sinal⁵³³⁻⁵³⁵. Uma vantagem desta forma de detecção é que o *blot* pode ser lavado e exposto repetidamente ao substrato e luciferase permitindo múltiplas exposições, o que é útil para a otimização dos parâmetros de detecção, garantindo assim que o *blot* não seja sub- ou sobre-exposto. O *blot* deve ser exposto, colocado num sistema de detecção especializado (e. g., *Chemidoc*, *Odyssey*TM), sendo esta abordagem a mais comum e precisa. A quantificação dos *blots* dependerá do método de detecção de luz. Porém é mais comum utilizar um sistema de detecção especializado, tipicamente um *software* do proprietário, empregando uma análise densitométrica⁵¹⁰.

Na prática, colocadas as membranas em TBS, procedeu-se ao protocolo para a detecção das proteínas. Retiraram-se as membranas em TBS para uma placa de Petri seca e foi posto sobre as mesmas a mistura de revelação *Clarity*TM *Western ECL Substrate* (Bio-Rad) na proporção 1:1 v/v (reagente peróxido e reagente luminol/ativador), deixando a incubar pelo menos 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram colocadas numa placa de vidro e inseridas num aparelho *ChemiDoc XRS+ System*

(Bio-Rad) para a efetiva revelação das proteínas. O sistema *ChemiDoc XRS+* oferece detecção rápida e sensível à quimioluminescência que pode ser usada para geração de imagens de procedimentos que requeiram alta resolução e sensibilidade⁵³⁶.

Concluída a revelação, as membranas foram colocadas de novo na caixa com TBS e estendidas, depois, sobre uma folha de papel de filtro qualitativo de filtração rápida, para secar. Assim que secas, foram embrulhadas nessa mesma folha de papel de filtro e embrulhadas numa folha de papel de alumínio, sendo guardadas, em seguida, dentro de um saco de plástico reutilizável com fecho e armazenadas no frigorífico a uma temperatura de 4 °C.

3.6. *Stripping* das membranas para nova imunodeteção

A remoção (ou *stripping*) e a ressonagem das membranas de WB, proporciona um método eficiente em tempo útil para a determinação de vários alvos de proteína numa única corrida de gel⁵³⁷. O *stripping* permite fazer várias análises diferentes numa única membrana, economizando assim tempo, amostra e consumíveis de laboratório; maximizando a eficiência⁵¹⁰.

Apesar dos benefícios óbvios da remoção e remarcação das membranas, estes métodos nem sempre são à prova de falhas e podem ter limitações significativas. Primeiro, deve-se tomar cuidado com qual proteína da membrana é remarcada após o *stripping*, pois nem sempre é fácil difícil eliminar o sinal detetável de proteínas de alta abundância. Além disso, se o tampão de *stripping* falhar na completa remoção de todos os Ab da membrana, e as duas proteínas de interesse tiverem pesos moleculares semelhantes (e. g., uma variação de 2 kDa), o sinal do Ab ineficazmente eliminado pode interferir na subsequente detecção e quantificação da segunda proteína-alvo. Para evitar estas interferências, neste trabalho mantivemos como regra marcar sempre as proteínas mais abundantes na segunda marcação (após *stripping*) e garantido sempre que as proteínas a detetar tinham um peso molecular suficientemente distinto que permitisse observar a banda residual (caso existisse) como uma banda paralela. Além disso, o *stripping* de membrana não pode ser realizado indefinidamente⁵¹⁰. Como regra geral, apenas três incubações feitas de *stripping* são recomendadas, devido à perda de antigénio⁵³⁷. Isto limita o número de alvos que podem ser imunodetetados a partir da mesma membrana, mas ainda vale a pena considerar o benefício de medir dois ou mais alvos na mesma amostra⁵¹⁰.

Na prática, em primeiro lugar, as membranas armazenadas foram ativadas, colocando-as, para isso, em metanol e, logo após, submergidas em solução tampão de *stripping* (SDS 2% m/v; Tampão Tris 62,5 mM; 2-ME 100 mM) numa placa de Petri e incubadas por 30 min a uma temperatura de 55 °C. Em seguida, as membranas foram passadas por água ultrapura, duas vezes, e logo a seguir lavadas seis vezes com TBST e TBS alternadamente por 10 min cada vez, em agitação. Posteriormente, foram rigorosamente seguidos os passos do protocolo de WB, como já descrito mais acima, a partir do procedimento do bloqueio da membrana.

3.7. Análise

A análise das bandas de interesse depende do tipo de detecção e do sistema de imagem disponível, com muitos sistemas de imagem exigindo *software* do proprietário para aquisição e quantificação das imagens⁵¹⁰. Cada pacote de *software* utiliza métodos ligeiramente diferentes para a quantificação; contudo, em geral, é usada a altura ou área de um pico em gráfico⁵³⁸. Durante a quantificação, é essencial garantir que as bandas de interesse estejam dentro do intervalo linear de detecção, pois a saturação de píxeis nos sensores de imagem pode ocorrer dentro de alvos altamente abundantes⁵³⁹. Se ocorrer supersaturação, pode ser possível reduzir a sensibilidade da câmara (isto é, redução na classificação de píxeis) aumentando a resolução da imagem (imagem maior, mais píxeis) e, portanto, exigindo mais sinal para obter a saturação excessiva. Apesar disso, pode ocorrer a “coloração” sobressaturada da membrana (ou seja, o aparecimento de bandas amareladas visíveis, na membrana, antes da exposição) durante a

deteção quimioluminescente por proteínas altamente abundantes (e. g., a GAPDH), exigindo a redução do carregamento da amostra ou uma maior diluição do 1-Ab⁵¹⁰.

Outra consideração importante para a quantificação é a escolha da análise em banda única ou em faixas inteiras, com a primeira mais adequada para análise de proteínas individuais e a segunda melhor para a deteção de alterações globais de proteínas⁵¹⁰. A análise de banda única é realizada simplesmente através da identificação de faixas de amostra antes de determinar a faixa de interesse, enquanto a análise de faixa inteira mede a intensidade dentro de uma área designada (ou seja, uma faixa única)⁵⁴⁰. Qualquer que seja o método escolhido, deve ser consistente ao longo de todo o *blot*, com uma área igual de análise usada por faixa; caso contrário, volumes diferentes serão analisados produzindo dados potencialmente distorcidos⁵¹⁰. Embora as condições de WB tenham sido otimizadas para produzir as bandas o mais claro possível, um *background* visível ainda pode ocorrer, exigindo uma subtração de fundo aquando da análise⁵³⁸. Isso é obtido principalmente pela subtração da densidade de fundo calculada a partir dos valores de pico; contudo, a utilização de diferentes algoritmos para determinar a intensidade do plano de fundo podem não ser verdadeiramente representativos. Esta abordagem é mais adequada para bandas individuais proeminentes, pois bandas menores e/ou menos intensas podem se perder⁵¹⁰.

Na prática, foi utilizado o *software Image LabTM* versão 6.0 (Bio-Rad) para a análise, em banda única (ou seja, apenas uma banda foi detetada em cada pista), da imagem das membranas fornecida pelo sistema *ChemiDoc XRS+*. A área do pico de cada banda foi o método utilizado para quantificado o *blot*, correspondente à densidade de píxeis da banda.

3.8. Normalização da abundância das proteínas-alvo

O carregamento de diferentes quantidades de proteína nos poços resulta em diferenças na intensidade da(s) banda(s)/faixa(s) de proteína. Alterações específicas dos níveis de uma determinada proteína em diferentes amostras são assim avaliadas carregando a mesma quantidade de proteína total para diferentes amostras. Pequenos erros ao pipetar o volume da amostra em poços individuais⁵¹⁰ podem resultar também em alguma variabilidade. Para evitar possíveis erros na preparação e carregamento das amostras, é fundamental a normalização do sinal de proteínas específicas nas amostras a fim de discriminar a variação entre amostras/gel⁵¹⁰. É comum que proteínas de manutenção (HKP, do inglês, *housekeeping proteins*) específicas, como a GAPDH, α -tubulina ou a β -actina, sejam quantificadas, atuando como controlos internos do carregamento dos poços, assumindo que a sua expressão permanece estável nas condições experimentais usadas⁵⁴¹. A HKP escolhida deve ser uma que se mantém constante entre o controlo e as amostras experimentais e demonstrar que não é afetado pelo tratamento ou intervenção realizada. Assim, o sinal obtido de proteínas-alvo pode ser normalizado com os valores do sinal para a HKP, removendo o viés de carregamento⁵¹⁰. No entanto, a precisão e a eficácia dessas HKPs dependem de vários fatores, tais como a sobressaturação da proteína, alto *background* e falta de linearidade⁵⁴². Neste trabalho, a quantificação de cada banda/proteína foi alvo de uma correção, sendo o fator desta correção os valores obtidos da quantificação da α -tubulina.

3.9. Dados e análise estatística

Os dados e a análise estatística estão em conformidade com as recomendações do desenho experimental e análise em farmacologia⁵⁴³. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM, do inglês, *standard error of the mean*). O valor de *n* representará o número de experiências realizadas. A análise estatística foi realizada usando os *softwares* para o sistema operativo Windows: *Microsoft Office Excel 2007* (versão 12.0); e *Prism* (versão 6.01; *Graph Pad Software Inc.*, La Jolla, CA 92037, EUA).

Ao testar a significância do efeito de VIP após condições de tratamento com **Mg²⁺ 0 mM** ou **Bic** (10 μ M), foi utilizado o teste t de Student emparelhado; fora quando se afere as razões GluA1/GluA2, onde

foi praticado um teste t de Student independente com correção de Welch. Ao comparar o efeito de VIP e Mg^{2+} 0 mM ou Bic (10 μ M) sob condições de ausência de estimulação química ou farmacológica, foi usada uma análise de variância (ANOVA) unidirecional (*one-way*) simples, seguida do teste de comparação múltipla de Dunnett. Valores de $p \leq 0,05$ serão considerados em representação das diferenças estatisticamente significativas.

No estudo comparativo de machos e fêmeas durante o envelhecimento, ao testar ambos os sexos da mesma faixa etária, foi utilizada o teste t de Student independente com correção de Welch. Ao comparar, em paralelo, machos e fêmeas de diferentes faixas etárias, foi usada uma ANOVA unidirecional simples e logo após um teste de comparações múltiplas de Tukey. Para analisar as potenciais diferenças totais do perfil de envelhecimentos dos machos contra o perfil de envelhecimento das fêmeas, foi empregue uma ANOVA bidirecional (*two-way*) simples. Estatisticamente, em representação da análise dos resultados significativamente diferentes, foram considerados valores de $p \leq 0,05$.

O SEM das razões GluA1/GluA2 foi calculado com o auxílio da **Equação 3.1**.

Equação 3.1 Expressão geral para o desvio de padrão da propagação de erro de grandezas que envolvam multiplicação e divisão de variáveis independentes.

$$\frac{\sigma_y}{|\bar{y}|} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_{x_1}}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{x_2}}{x_2}\right)^2}$$

3.10. Reagentes, fármacos e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura com o objetivo de garantir a possibilidade reduzida de contaminações. Todos os reagentes utilizados eram do grau de pureza mais elevado possível [PA (*para análise*) ou superior].

O antagonista dos recetores VPAC₁, PG 97-269 (*Phoenix Peptides*, EUA) foi preparado numa solução “*stock*” de 0,1 mM em CH₃COOH 1%. Estes fármacos foram diluídos em Krebs para as concentrações finais utilizadas nas experiências.

Quando assim era necessário, foi utilizado o aparelho medidor de pH de bancada de laboratório com eletrodo MicropH 2001 da *Crison* com controlo interno por microprocessador, para medir o pH das soluções. Uma medida correta de pH implica uma calibração do sistema aparelho/electrodo, recorrendo-se a soluções tampão de pH conhecido. Graças a um sistema de autocalibração, o micropH 2001, é capaz de reconhecer automaticamente as soluções tampão pH 7,02; 4,00; 2,00 e 9,26 (a 20 °C), uma vez que tem gravado em memória os valores, a diferentes temperaturas, das soluções tampão anteriores. Todos os acertos de pH foram efetuados com soluções de HCl (5, 1 e 0,1 M) ou de NaOH (4, 1 e 0,1 M).

4. Resultados

4.1. Atividade epileptiforme induzida por Krebs Mg^{2+} 0 mM

Em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo de rato foram determinados os níveis de expressão de várias proteínas pré- e pós-sinápticas, tendo sido comparada a expressão destes recetores em situação controlo (*CTR*, ausência de modificações no meio de perfusão) e quando as fatias foram previamente expostas a um meio (solução de Krebs) em que se suprimiu o Mg^{2+} e em que a $[K^+]$ foi aumentada para 6 mM (Mg^{2+} 0 mM), induzindo-se assim nestas condições atividade neuronal espontânea epileptiforme do tipo intercrítico (IEDs, do inglês *interictal epileptiform discharges*). Concomitantemente, estudou-se a expressão destas proteínas quando, durante as IEDs, se bloqueou a ação do VIP endógeno nos recetores $VPAC_1$ com uma concentração supramáxima do seu antagonista seletivo PG 97-269 (100 nM; Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269), tendo sido também testada como controlo adicional a exposição ao antagonista dos recetores $VPAC_1$ (PG 97-269; 100 nM).

4.1.1. Proteínas envolvidas na plasticidade sináptica

4.1.1.1. Subunidades recetores AMPA: GluA1 e GluA2

Em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo de rato nestas condições experimentais, foram estudados os níveis de expressão das GluA1,2. Na análise destes resultados, determinou-se também a razão entre os níveis de expressão das GluA1,2 (GluA1/GluA2) nas diferentes condições estudadas, tentando assim desvendar as alterações estequiométricas destas subunidades na composição do recetor, que condicionam a sua permeabilidade ao Ca^{2+} .

Nos terminais nervosos obtidos de fatias expostas a Mg^{2+} 0 mM, os níveis de expressão pós-sináptica da GluA1 diminuíram significativamente, contrariamente aos da GluA2 que aumentaram significativamente. Os níveis de GluA1 diminuíram $79,2 \pm 4,7\%$ ($n = 5$, **Figura 4.1.A**). Os níveis de GluA2 aumentaram $64,0 \pm 13,0\%$ ($n = 3$, **Figura 4.1.C**). A razão entre os níveis de expressão de GluA1 e os de GluA2 diminuiu assim $87,3 \pm 5,9\%$ ($n = 3$, **Figura 4.1.E**).

Nas fatias expostas a PG 97-269, tanto os níveis de expressão de GluA1 (**Figura 4.1.A**) como os de GluA2 (**Figura 4.1.C**) e inclusive a razão GluA1/GluA2 (**Figura 4.1.E**), ficaram inalterados.

Assim que à exposição a Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, não se assinala nenhuma alteração significativa tanto dos níveis de expressão da GluA1 (**Figura 4.1.B**) como da de GluA2 (**Figura 4.1.D**) e da razão GluA1/GluA2 (**Figura 4.1.F**).

4.1.1.2. Proteínas marcadoras do componente pós-sináptico: Gefirina e PSD-95

A gefirina e a PSD-95 são duas proteínas localizadas na membrana pós-sináptica associadas em específico aos recetores $GABA_A$ no primeiro caso e aos recetores AMPA, NMDA e canais de K^+ , no segundo. Estas duas proteínas foram alvo de estudo a fim de quantificar os seus níveis de expressão, em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo de rato que foram expostas a Mg^{2+} 0 mM, PG 97-269 e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269.

O nível médio de expressão da gefirina quando induzida atividade intercrítica por exposição a Mg^{2+} 0 mM sofre um notável aumento em comparação ao controlo, porém não é significativo; necessitando-se assim de um maior número de experiências para poder estabelecer eventualmente diferenças estatisticamente significativas (**Figura 4.2.A**). Quando à exposição com Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, que simultaneamente induziu a atividade intercrítica na ausência da ativação dos recetores $VPAC_1$ pelo VIP endógeno, não se verifica alterações significativas comparativamente às alterações preformadas pela exposição a Krebs Mg^{2+} 0 mM (**Figura 4.2.B**). Os níveis de expressão de gefirina, também não se alteraram, quando se bloquearam os recetores $VPAC_1$ do VIP com o seu antagonista seletivo PG 97-269 (**Figura 4.2.A**).

Os níveis de expressão de PSD-95 não se alteraram significativamente, tanto nas fatias em foi induzida a atividade intercrítica por exposição a Mg^{2+} 0 mM, como quando se bloquearam os recetores VPAC₁ do VIP com o seu antagonista seletivo *PG 97-269* e ainda quando à exposição a Mg^{2+} 0 mM + *PG 97-269*, que simultaneamente induziu a atividade intercrítica na ausência da ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno, quando comparado com a exposição a Mg^{2+} 0 mM (Figura 4.2.C,D).

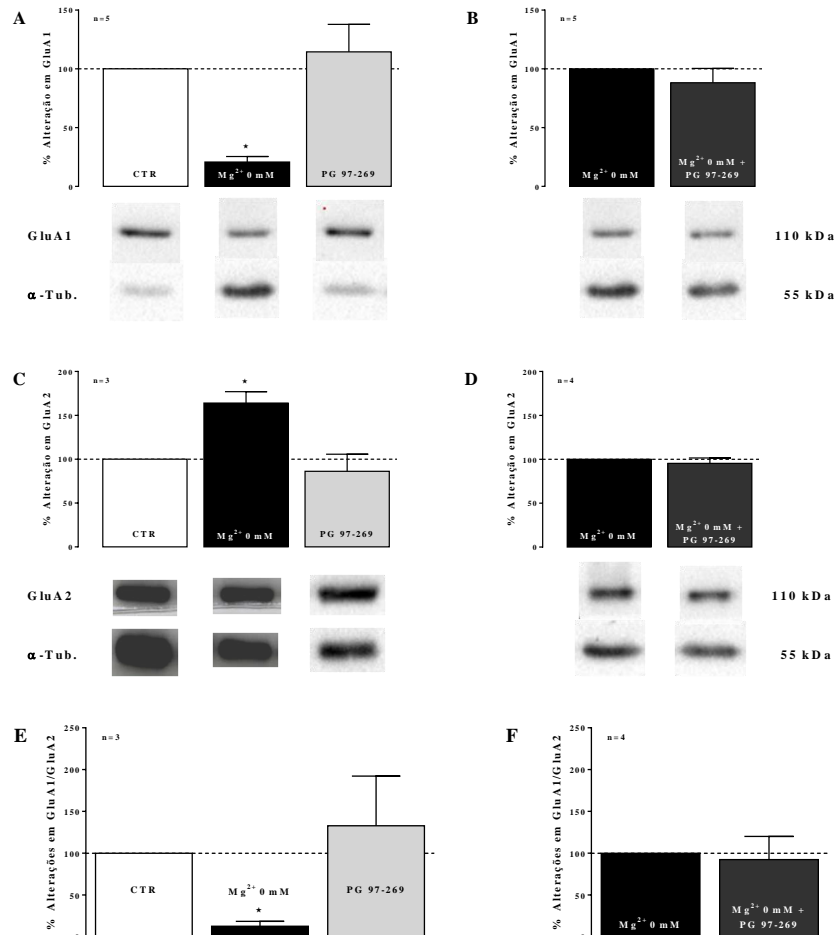


Figura 4.1 A atividade intercrítica induz um aumento marcado na expressão sinaptossomal da subunidade GluA2; uma diminuição marcada da subunidade GluA1; e uma diminuição marcada na razão GluA1/GluA2; e essas alterações não dependem da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo, estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM, ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP *PG 97-269* (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + *PG 97-269*, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme descrito no capítulo 3. As subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-F] representam a média \pm SEM de 3-5 experiências (n=3-5). Os níveis de GluA1 [A], GluA2 [C] e da razão GluA1/GluA2 [E] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou *PG 97-269* usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-*p* <0,05. Os níveis de GluA1 [B] e GluA2 [D] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal. Os níveis da razão GluA1/GluA2 [F] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student independente unicaudal com correção de Welch. As diferenças não foram estatisticamente significativas (*P* <0,05).

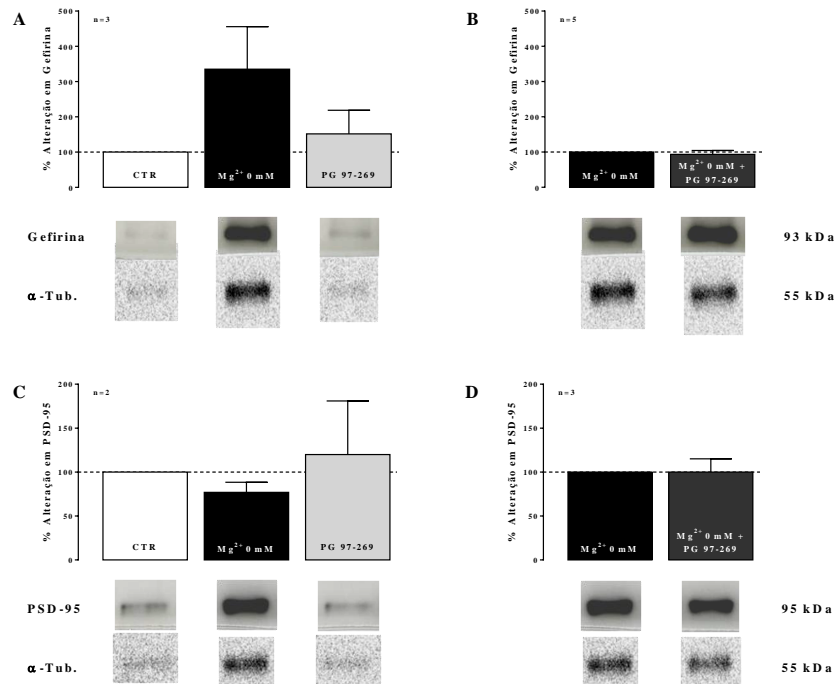


Figura 4.2 A atividade intercrítica não induz alterações na expressão sinaptossomal da proteína pós-sináptica PSD-95, mas aumenta fortemente a expressão da proteína gefirina; sendo que ambas as alterações não se mostram depender da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo de ratos saudáveis, estimuladas por exposição a $Mg^{2+} 0 mM$; ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP *PG 97-269* (100 nM) e $Mg^{2+} 0 mM$ + *PG 97-269*, tendo como a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme o descrito no capítulo 3. As gefirina e PSD-95 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média \pm SEM de 2-5 experiências (n=2-5). Os níveis de gefirina [A] e PSD-95 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de $Mg^{2+} 0 mM$ ou *PG 97-269* usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-*p* <0,05. Os níveis de gefirina [B] e PSD-95 [D] obtidos após tratamento com $Mg^{2+} 0 mM$ na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (*P* <0,05).

4.1.1.3. Canais $K_v4.2$

A influência da atividade epileptiforme em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo de rato induzida por exposição a $Mg^{2+} 0 mM$, *PG 97-269* e $Mg^{2+} 0 mM$ + *PG 97-269* na expressão dos canais $K_v4.2$, foi estudada pelo do método WB.

Os níveis de expressão dos canais $K_v4.2$ não se verificaram serem significativamente alterados, tanto quando nas fatias foi induzida a atividade intercrítica por exposição a $Mg^{2+} 0 mM$, como quando se bloquearam os recetores VPAC₁ de VIP com o seu antagonista seletivo *PG 97-269* (Figura 4.3.A). Em exposição a $Mg^{2+} 0 mM$ + *PG 97-269*, os níveis de expressão dos canais $K_v4.2$ evidenciaram-se aumentar $42,90 \pm 13,4\%$ (n = 4, Figura 4.3.B), quando comparado com a exposição a $Mg^{2+} 0 mM$.

4.1.1.4. Proteínas pré-sinápticas: Sinaptofisina

A expressão da proteína vesicular pré-sináptica sinaptofisina foi também estudada em sinaptossomas obtidos nestas condições experimentais. Os níveis de expressão de sinaptofisina não se alteraram significativamente quando nas fatias foi induzida a atividade intercrítica por exposição a $Mg^{2+} 0 mM$, nem quando se bloquearam os recetores VPAC₁ do VIP com o seu antagonista seletivo *PG 97-269* (Figura 4.4.A), bem como em relação à exposição conjunta com $Mg^{2+} 0 mM$ + *PG 97-269*, que simultaneamente induziu a atividade intercrítica na ausência de ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno, quando comparado com a exposição a $Mg^{2+} 0 mM$ (Figura 4.4.B).

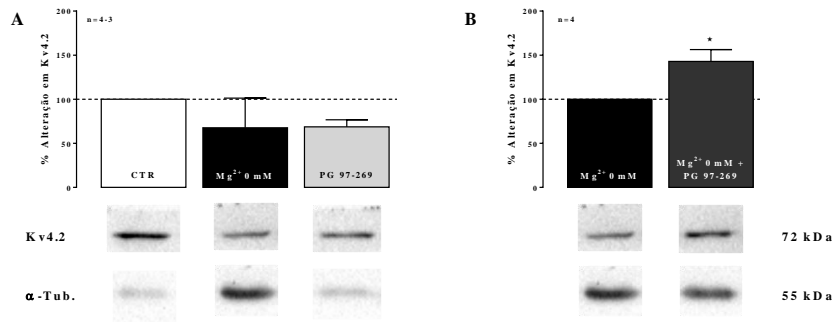


Figura 4.3 A atividade intercrítica não induz alterações na expressão sinaptossomal dos canais de potássio dependentes de voltagem do subtipo 4.2; A ação tónica do VIP nos recetores VPAC₁, contribui para esta ausência de alterações. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM, ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. Os canais Kv4.2 foram detetados com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média \pm SEM de 3-4 experiências (n=3-4). Os níveis de Kv4.2 [A] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-*p* <0,05. Os níveis de Kv4.2 [B] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se um aumento dos canais Kv4.2 (**P* <0,05).

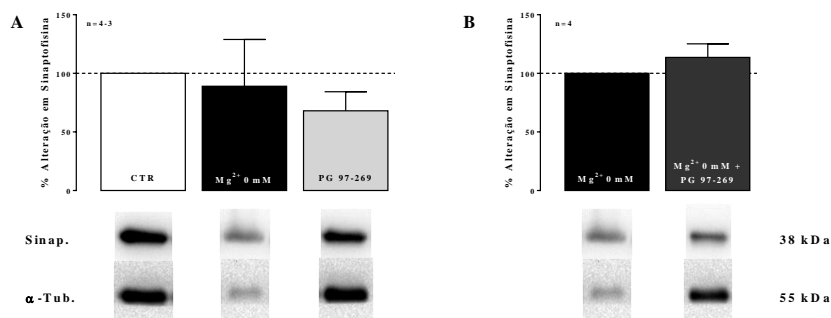


Figura 4.4 A atividade intercrítica não induz alterações na expressão sinaptossomal da sinaptofisina, que não é influenciada pela ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a Mg^{2+} 0 mM, ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP PG 97-269 (100 nM) e Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (CTR), conforme o descrito no capítulo 3. A proteína pré-sináptica sinaptofisina foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média \pm SEM de 3-4 experiências (n=3-4). Os níveis de sinaptofisina [A] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (CTR) foram comparados com os obtidos na presença de Mg^{2+} 0 mM ou PG 97-269 usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-*p* <0,05. Os níveis de sinaptofisina [B] obtidos após tratamento com Mg^{2+} 0 mM na ausência e na presença de PG 97-269 (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (*P* <0,05).

4.1.2. Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas: Caveolina-1 e flotilina-1

Para descobrir se os microdomínios membranares sinápticos (também denominados por jangadas lipídicas sinápticas) sofrem alterações, após indução da atividade epileptiforme, foi investigado os níveis de expressão de duas proteínas de estabilização de jangadas lipídicas – a caveolina-1 e a flotilina-1 – em sinaptossomas obtidos a partir de fatias de hipocampo de rato, nas condições experimentais já referidas. Se os níveis de expressão da caveolina-1 e flotilina-1 se alterarem, é especulado que haja também uma alteração na abundância dos domínios de membrana em que cada uma delas está localizada.

Os resultados da **Figura 4.5** demonstram que tanto os níveis de expressão da proteína caveolina-1 como os da flotilina-1, nos terminais nervosos obtidos a partir de fatias expostas a Mg^{2+} 0 mM,

diminuíram significativamente. Os níveis de caveolina-1 diminuíram $97,2 \pm 1,4\%$ ($n = 7-4$, **Figura 4.5.A**). Os níveis de flotilina-1 diminuíram $88,8 \pm 4,3\%$ ($n = 6-3$, **Figura 4.5.C**). Quanto à exposição a *PG 97-269*, os níveis de expressão de caveolina-1 (**Figura 4.5.A**) tal como os de flotilina-1 (**Figura 4.5.C**), não se alterarem significativamente.

Num quadro de exposição a $Mg^{2+} 0 \text{ mM} + PG 97-269$, que simultaneamente induziu a atividade intercrítica na ausência de ativação dos recetores $VPAC_1$ pelo VIP endógeno, demonstra-se haver um aumento significativo, quando comparado com a exposição somente a $Mg^{2+} 0 \text{ mM}$. Os níveis de caveolina-1 aumentaram $143,1 \pm 37,5\%$ ($n = 7$, **Figura 4.5.B**). Os níveis de flotilina-1 aumentaram $42,8 \pm 14,1\%$ ($n = 7$, **Figura 4.5.D**), sugerindo que o VIP endógeno poderá ter um efeito protetor relativamente a esta depleção de flotilina-1 e caveolina-1 induzida por atividade epileptiforme intercrítica.

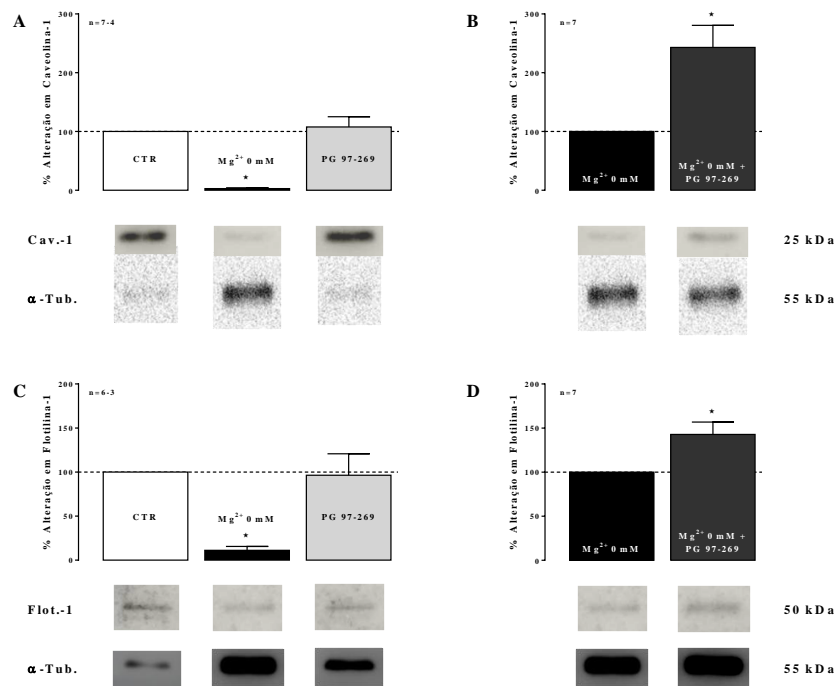


Figura 4.5 A atividade intercrítica induz uma diminuição marcada na expressão sinaptossomal de caveolina-1 e flotilina-1 e a ação do VIP endógeno, nos recetores $VPAC_1$, parece potenciar uma atenuação na perda de ambas estas proteínas de jangadas lipídicas. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a $Mg^{2+} 0 \text{ mM}$; ao antagonista dos recetores $VPAC_1$ para o VIP *PG 97-269* (100 nM); e $Mg^{2+} 0 \text{ mM} + PG 97-269$, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme descrito no capítulo 3. As proteínas de jangadas lipídicas caveolina-1 e flotilina-1 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média \pm SEM de 3-7 experiências ($n=3-7$). Os níveis de caveolina-1 [A] e flotilina-1 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de $Mg^{2+} 0 \text{ mM}$ ou *PG 97-269* usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor- $p < 0,05$. Os níveis de caveolina-1 [B] e flotilina-1 [D] obtidos após tratamento com $Mg^{2+} 0 \text{ mM}$ na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se um aumento da caveolina-1 e da flotilina-1 (* $P < 0,05$).

4.2. Atividade epileptiforme induzida por bicuculina

Em sinaptossomas, obtidos de fatias de hipocampo de rato, foi também estudado o efeito da atividade epileptiforme crítica, isto é, a atividade observada durante as crises epiléticas, induzida por bicuculina (10 μM , *Bic*), um antagonista seletivo dos recetores $GABA_A$, na expressão de diversas proteínas pré- e pós-sinápticas. Esta foi comparada com a ausência de modificações no meio de perfusão (*CTR*) e com a atividade crítica quando se bloqueou a ação do VIP endógeno nos recetores $VPAC_1$ com uma concentração supramáxima do seu antagonista seletivo *PG 97-269* (100 nM) (*Bic + PG 97-269*),

tendo sido também testada como controlo adicional a exposição ao antagonista dos recetores VPAC₁ (**PG 97-269**, 100 nM).

4.2.1. Proteínas envolvidas na plasticidade sináptica

4.2.1.1. Subunidades dos recetores AMPA: GluA1 e GluA2

Em sinaptossomas, obtidos de fatias de hipocampo de rato, estudou-se a expressão das GluA1,2 e calculou-se também a razão entre os níveis dessas duas subunidades (GluA1/GluA2), para avaliar as alterações estequiométricas na composição do recetor, que condicionam a sua permeabilidade ao Ca²⁺, nas diferentes condições experimentais.

Nos terminais nervosos obtidos de fatias expostas a **Bic**, os níveis de expressão da GluA1 diminuíram significativamente; em oposição, os níveis de expressão da GluA2 aumentaram (n = 3, **Figura 4.6.C**). Os níveis de GluA1 diminuíram 75,2 ± 1,1% (n = 5, **Figura 4.6.A**). A razão entre os níveis de expressão de GluA1 e os de GluA2 diminuiu 84,9 ± 3,6% (n = 3-5, **Figura 4.6.E**).

Quanto à exposição a **PG 97-269**, tanto os níveis de expressão de GluA1 (**Figura 4.6.A**) como os de GluA2 (**Figura 4.6.C**) e inclusive a razão GluA1/GluA2 (**Figura 4.6.E**), permaneceram inalterados.

Assim que à exposição com **Bic** + **PG 97-269**, que simultaneamente induziu a atividade crítica na ausência de ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno, é assinalada uma descida significativa dos níveis de expressão da GluA1, sem se verificar alteração significativa dos níveis de expressão da GluA2 (**Figura 4.6.D**), nem da razão GluA1/GluA2 (**Figura 4.6.F**), quando comparado com a exposição a **Bic**. Os níveis de GluA1 diminuíram 24,7 ± 11,8% (n = 6, **Figura 4.6.B**).

4.2.1.2. Proteínas-marcador pós-sinápticas: Gefirina e PSD-95

A gefirina e a PSD-95 foram também alvo de estudo, a fim de quantificar os seus níveis de expressão, em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo de rato, expostas a **Bic**, **PG 97-269** e **Bic** + **PG 97-269**.

O nível médio de expressão da gefirina nas fatias induzidas à atividade epileptiforme crítica por exposição a **Bic** aumentou claramente em comparação ao controlo (**Figura 4.7.A**). Quando à exposição com **Bic** + **PG 97-269**, que simultaneamente induziu a atividade crítica na ausência da ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno, as alterações foram semelhantes às observadas pela exposição a **Bic** (**Figura 4.7.B**). Os níveis de expressão de gefirina também não sofreram alterações significativas, quando se bloquearam os recetores VPAC₁ do VIP com o seu antagonista seletivo **PG 97-269** (**Figura 4.7.A**).

Os níveis de expressão de PSD-95, quando nas fatias foi induzida a atividade crítica por exposição a **Bic**, não se alteraram significativamente, assim como quando se bloquearam os recetores VPAC₁ do VIP com o seu antagonista seletivo **PG 97-269** (**Figura 4.7.C**). Quando à exposição com **Bic** + **PG 97-269**, também não se verificaram alterações significativas dos níveis de expressão de PSD-95 quando comparado com a exposição somente a **Bic** (**Figura 4.7.D**).

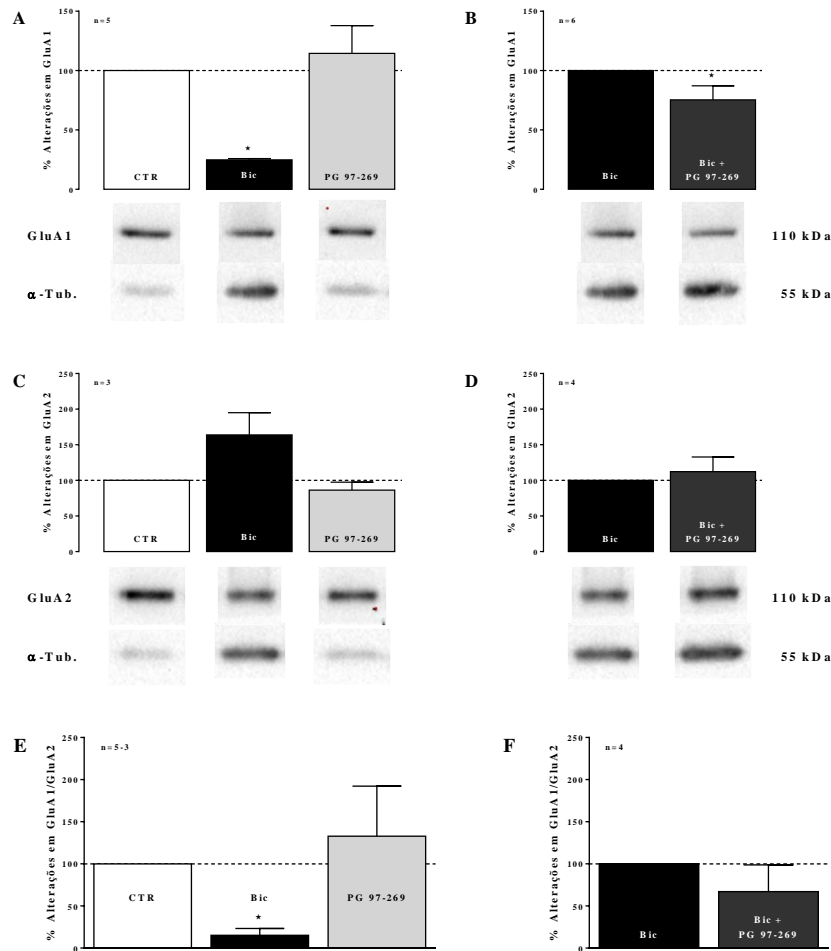


Figura 4.6 A atividade crítica diminui a expressão sinaptossomal da subunidade GluA1, não alterando a expressão da subunidade GluA2, o que resulta numa diminuição marcada na razão GluA1/GluA2. Este efeito parece ser agravado pela ação do VIP endógeno nos receptores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a *Bic* (10 μ M), ao antagonista dos receptores VPAC₁ para o VIP *PG 97-269* (100 nM) e *Bic + PG 97-269*, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme o descrito no capítulo 3. As subunidades GluA1 e GluA2 dos receptores AMPA foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-F] representam a média \pm SEM de 3-6 experiências (n=3-6). Os níveis de GluA1 [A], GluA2 [C] e da razão GluA1/GluA2 [E] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de *Mg*²⁺ 0 mM ou *PG 97-269* usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-*p* <0,05. Os níveis de GluA1 [B] e GluA2 [D] obtidos após tratamento com *Bic* (10 μ M) na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se uma diminuição da subunidade GluA1 (**P* <0,05), sem se observar diferenças estatisticamente significativas da subunidade GluA2 (*P* <0,05). Os níveis da razão GluA1/GluA2 [F] obtidos após tratamento com *Bic* (10 μ M) na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student independente unicaudal com correção de Welch e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (*P* <0,05).

4.2.1.3. Canais K_v4.2

Foi também estudada a influência da atividade epileptiforme crítica, induzida por exposição a *Bic* em fatias de hipocampo de rato, na expressão dos canais K_v4.2 nos terminais nervosos, bem como a influência do VIP endógeno nessas alterações.

A expressão dos canais K_v4.2 não foi significativamente alterada, tanto quando nas fatias foi induzida a atividade crítica por exposição a *Bic*, como quando se bloquearam os receptores VPAC₁ do VIP com o seu antagonista seletivo *PG 97-269* (Figura 4.8.A). Em exposição a *Bic + PG 97-269*, os níveis de expressão dos canais K_v4.2 também não se alteraram em comparação com a exposição somente a *Bic* (Figura 4.8.B).

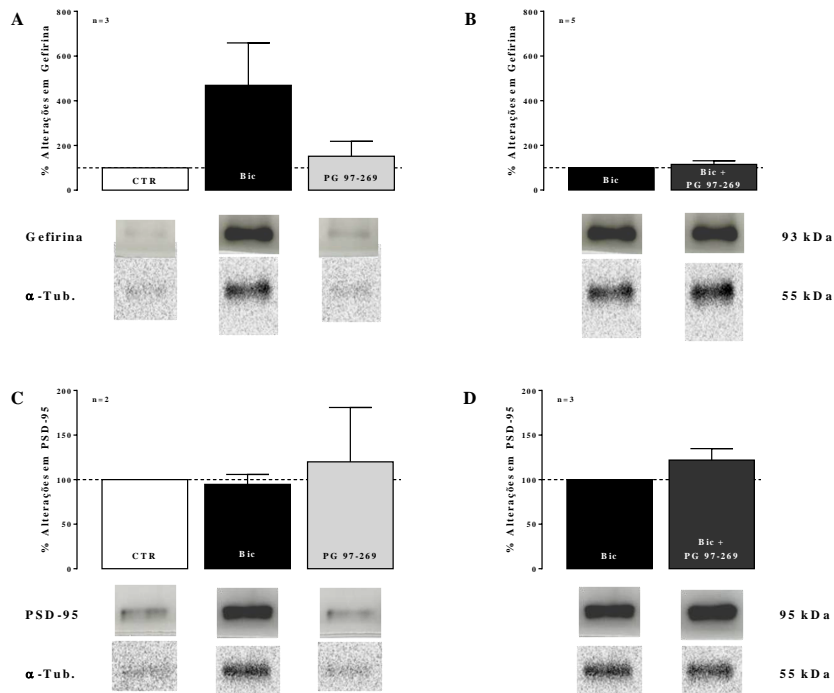


Figura 4.7 A atividade crítica não induz alterações na expressão sinaptossomal da proteína pós-sináptica PSD-95, mas aumenta fortemente a expressão da proteína gefirina; ambas de forma independente da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a *Bic* (10 μ M); ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP *PG 97-269* (100 nM) e *Bic* + *PG 97-269*, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme o descrito no capítulo 3. As proteínas pós-sinápticas gefirina e PSD-95 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média \pm SEM de 2-5 experiências (n=2-5). Os níveis de gefirina [A] e PSD-95 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de *Bic* ou *PG 97-269* usando uma *one-way ANOVA* simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-*p* <0,05. Os níveis de gefirina [B] e PSD-95 [D] obtidos após tratamento com *Bic* (10 μ M) na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (P <0,05).

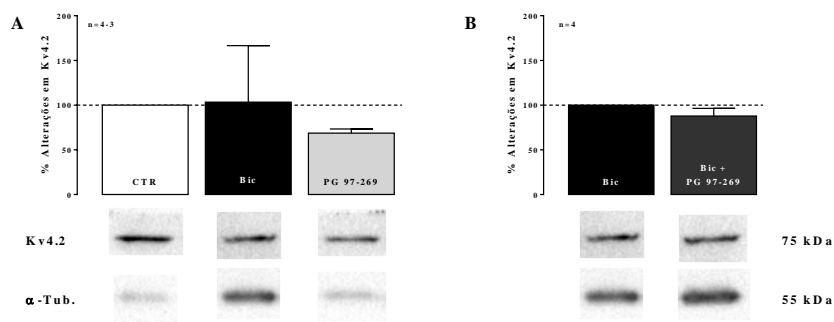


Figura 4.8 A atividade crítica não induz alterações na expressão sinaptossomal dos canais Kv4.2 observações que não dependem da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a *Bic* (10 μ M); ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP *PG 97-269* (100 nM) e *Bic* + *PG 97-269*, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme o descrito no capítulo 3. Os canais Kv4.2 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média \pm SEM de 3-4 experiências (n=3-4). Os níveis dos canais Kv4.2 [A] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de *Bic* ou *PG 97-269* usando uma *one-way ANOVA* simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-*p* <0,05. Os níveis dos canais Kv4.2 [B] obtidos após tratamento com *Bic* (10 μ M) na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (P <0,05).

4.2.1.4. Proteínas-marcador pré-sinápticas: Sinaptofisina

Os níveis de expressão da proteína vesicular pré-sináptica sinaptofisina, em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo de rato expostas a **Bic**, **PG 97-269** e **Bic + PG 97-269**. Os níveis de expressão de sinaptofisina não se alteraram significativamente quanto nas fatias foi induzida a atividade crítica por exposição a **Bic** nem quando se bloquearam os recetores VPAC₁ do VIP com o seu antagonista seletivo **PG 97-269** (**Figura 4.9.A**). Em relação à exposição conjunta com **Bic + PG 97-269**, que simultaneamente induziu a atividade crítica na ausência de ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno, também não se revelaram alterações significativas do nível de expressão de sinaptofisina, quando comparado com a exposição a **Bic** (**Figura 4.9.B**).

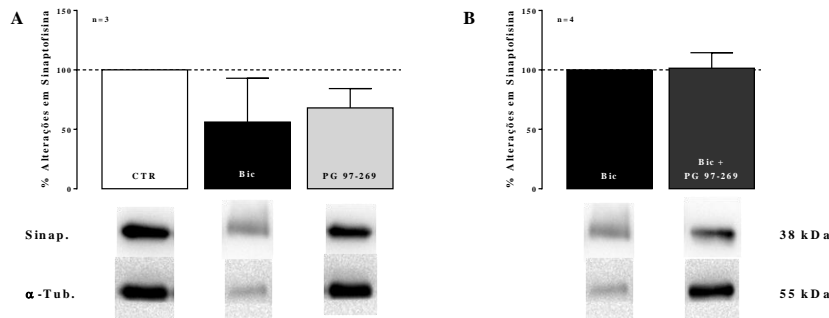


Figura 4.9 A atividade crítica não induz alterações na expressão sinaptossomal da sinaptofisina, que não é influenciada pela ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo estimuladas por exposição a **Bic** (10 μM); ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP **PG 97-269** (100 nM) e **Bic + PG 97-269**, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (**CTR**), conforme o descrito no capítulo 3. A proteína pré-sináptica sinaptofisina foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média ± SEM de 3-4 experiências (n=3-4). Os níveis de sinaptofisina [A] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (**CTR**) foram comparados com os obtidos na presença de **Bic** ou **PG 97-269** usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; valor-*p* <0,05. Os níveis de sinaptofisina [B] obtidos após tratamento com **Bic** (10 μM) na ausência e na presença de **PG 97-269** (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal e não se observaram diferenças estatisticamente significativas (*P* <0,05).

4.2.2. Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas: Caveolina-1 e flotilina-1

Para descobrir se os microdomínios de jangadas lipídicas sofrem alterações, na indução da atividade epileptiforme do tipo crítico, investigou-se os níveis de expressão das duas proteínas de estabilização das jangadas lipídicas, a caveolina-1 e a flotilina-1 em situação controlo (**CTR**, ausência de modificações no meio de perfusão), quando as fatias foram sujeitas a atividade epileptiforme do tipo crítico induzida por **Bic** (10 μM), quando se bloqueou durante a atividade crítica a ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁ (**Bic + PG 97-269**) e tendo como controlo adicional a exposição ao antagonista dos recetores VPAC₁ (**PG 97-269**).

Os resultados da **Figura 4.10** demonstram que tanto os níveis de expressão da proteína caveolina-1 como os da flotilina-1, nos terminais nervosos obtidos a partir de fatias expostas a **Bic**, diminuíram significativamente. Os níveis de caveolina-1 diminuíram $96,2 \pm 0,7\%$ (n = 5-4, **Figura 4.10.A**) e os de flotilina-1 diminuíram $79,7 \pm 10,4\%$ (n = 4-3, **Figura 4.10.C**).

Quanto à exposição a **PG 97-269**, os resultados mostraram que os níveis de expressão de caveolina-1 (**Figura 4.10.A**) tal como os de flotilina-1 (**Figura 4.10.C**), não se alterarem significativamente, como anteriormente observado.

Também é demonstrado na **Figura 4.10** que num quadro de exposição a **Bic + PG 97-269**, que simultaneamente induziu a atividade intercrítica na ausência de ativação dos recetores VPAC₁ pelo VIP endógeno, há uma diminuição significativa da expressão de caveolina-1, quando comparado com a exposição com **Bic**. Os níveis de caveolina-1 diminuíram $54,8 \pm 7,9\%$ (n = 5, **Figura 4.10.B**). Os níveis de flotilina-1 não se alteraram (**Figura 4.10.D**), dentro do quadro estabelecido.

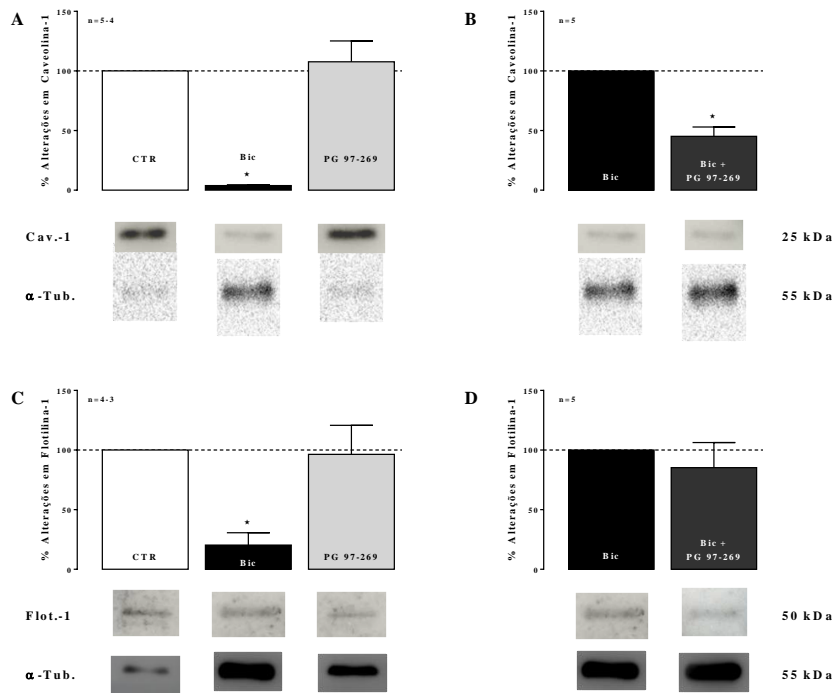


Figura 4.10 A atividade crítica induz uma diminuição marcada na expressão sinaptossomal de caveolina-1 e de flotilina-1 e a ação do VIP endógeno, nos recetores VPAC₁, o VIP protege a perda acentuada de caveolina-1, mas não de flotilina-1. As experiências foram realizadas em sinaptossomas isolados a partir de fatias de hipocampo expostas a *Bic* (10 μ M); ao antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP *PG 97-269* (100 nM) e *Bic + PG 97-269*, tendo como controlo a ausência de qualquer destes estímulos (*CTR*), conforme descrito no capítulo 3. As proteínas de jangadas lipídicas caveolina-1 e flotilina-1 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média \pm SEM de 3-5 experiências (n=3-5). Os níveis de caveolina-1 [A] e flotilina-1 [C] obtidos na ausência de estimulação química ou farmacológica (*CTR*) foram comparados com os obtidos na presença de *Bic* ou *PG 97-269* usando uma *one-way* ANOVA simples seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett; *valor-*p* <0,05. Os níveis de caveolina-1 [B] e flotilina-1 [D] obtidos após tratamento com *Bic* (10 μ M) na ausência e na presença de *PG 97-269* (100 nM) foram comparados usando um teste t de Student emparelhado unicaudal, observando-se uma diminuição da caveolina-1 (**P* <0,05), sem se observar diferenças estatisticamente significativas da flotilina-1 (*P* <0,05).

4.3. Envelhecimento

Nesta secção, todos os resultados foram obtidos de experiências levadas a cabo em apenas dois grupos de animais diferentes para cada parâmetro analisado sendo *n* o número de ensaios realizados, por regra dois por amostra.

4.3.1. Proteínas envolvidas na plasticidade sináptica

Em sinaptossomas, obtidos de hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, foram determinados os níveis de expressão sinápticos das GluA1,2 dos recetores AMPA. Foi comparada a expressão destas subunidades, entre machos e fêmeas da mesma idade; entre machos e fêmeas, independentemente da idade; e também nos machos ao longo da idade e nas fêmeas ao longo da idade, analisando as variações com o envelhecimento e tendo como referência os indivíduos de 4M. Na análise destes resultados, avaliou-se também a razão entre os níveis de expressão de GluA1/GluA2, tentando assim desvendar as alterações estequiométricas na composição dos AMPA, que condicionam a sua permeabilidade ao Ca²⁺.

4.3.1.1. Subunidades dos recetores AMPA: GluA1 e GluA2

Em sinaptossomas de hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, foram determinados os níveis de expressão sinápticos das GluA1,2.

Ao comparar as fêmeas com os machos, verificou-se que os níveis de expressão de GluA1 são significativamente inferiores nas fêmeas de 4M em comparação com os machos de 4M; os níveis de GluA1 são $46,2 \pm 13,0\%$ inferiores ($n = 4$, **Figura 4.11.A**). Os níveis de GluA2 ($n = 4$, **Figura 4.11.B**), tal como os da razão GluA1/GluA2 ($n = 4$, **Figura 4.11.E**), não se revelaram significativamente diferentes entre machos e fêmeas da mesma idade.

Os níveis de expressão de GluA1 ($n = 4$, **Figura 4.11.C**) foram significativamente diferentes (valor- $p < 0,05$) entre machos e fêmeas, independentemente da idade; contrariamente aos níveis de expressão da GluA2 ($n = 4$, **Figura 4.11.D**) e da razão GluA1/GluA2 ($n = 4$, **Figura 4.11.F**), para os quais não se observaram diferenças significativas.

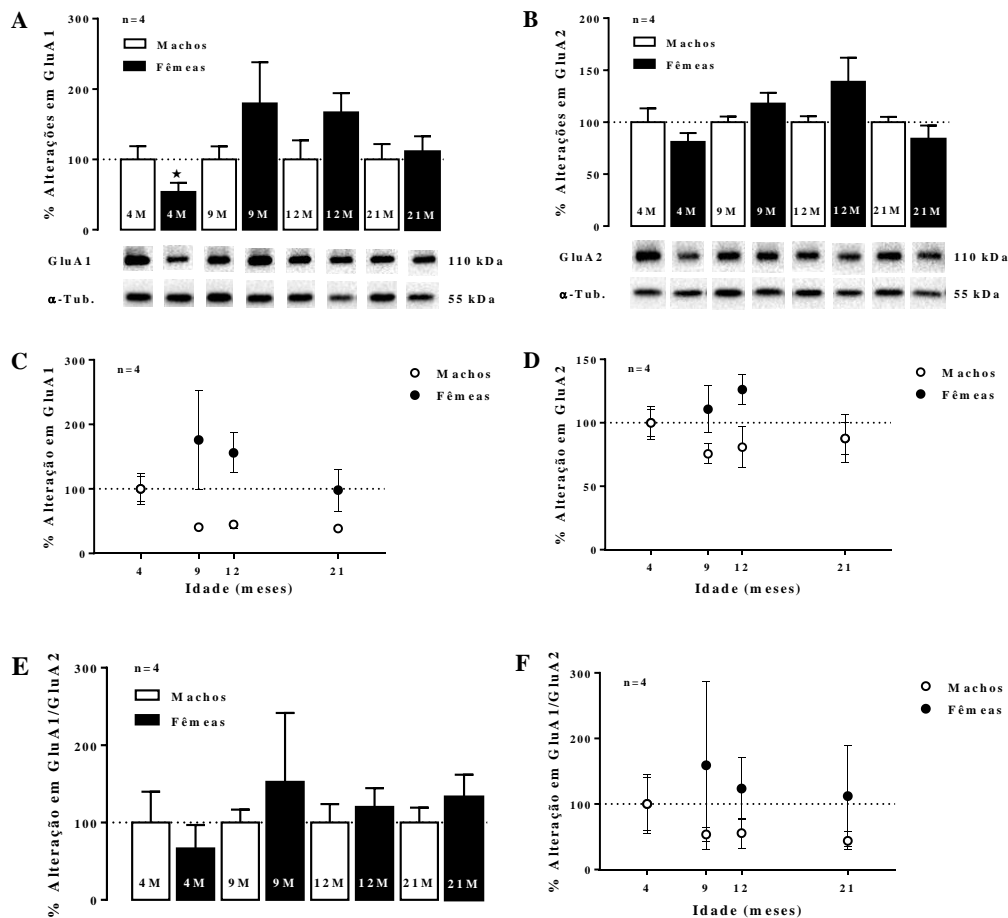


Figura 4.11 Comparação da expressão sinaptossomal de GluA1, GluA2 e da razão GluA1/GluA2 ao longo da idade em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. As subunidades GluA1 e GluA2 dos receptores AMPA foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-F] representam a média \pm SEM de 4 experiências ($n=4$). Os níveis de GluA1 [A], GluA2 [B] e da razão GluA1/GluA2 [E] dos machos foram normalizados a 100% e foram comparados com os valores das fêmeas, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor- $p < 0,05$. Os níveis de GluA1 [C], GluA2 [D] e da razão GluA1/GluA2 [F], obtidos em comparação com o valor dos machos e das fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma *one-way* ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$); a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma *two-way* ANOVA simples ($P < 0,05$).

Ao fazer o perfil dos níveis de expressão de GluA1 ao longo da idade, assinala-se, nos machos, uma diminuição a partir dos 9M até aos 21M, em referência aos 4M. Os níveis de GluA1 ($n = 4$, **Figura 4.11.C**) nos machos diminuíram: $59,5 \pm 2,3\%$, nos 9M; $55,2 \pm 6,1\%$, nos 12M; e $61,5 \pm 4,5\%$, nos 21M. Não se assinalam alterações significativas, tanto em machos como em fêmeas, nos níveis de expressão

de GluA2 (n = 4, **Figura 4.11.D**), assim como na razão GluA1/GluA2 (n = 4, **Figura 4.11.F**), tendo em conta o perfil, ao longo da idade.

4.3.1.2. Proteínas-marcador pós-sinápticas: Gefirina e PSD-95

Em sinaptossomas de hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, foram determinados os níveis de expressão sinápticos das proteínas de ancoragem pós-sináptica – gefirina e PSD-95. Foi comparada a expressão destas proteínas, entre machos e fêmeas da mesma idade; entre machos e fêmeas, independentemente da idade; e também nos machos ao longo da idade e nas fêmeas ao longo da idade, analisando as variações com o envelhecimento e tendo como referências os indivíduos de 4M.

Nos terminais nervosos, obtidos das fatias, ao comparar as fêmeas com os machos, verificou-se que os níveis de expressão de gefirina aumentaram significativamente nas fêmeas de 9M em comparação com os machos de 4M; os níveis de gefirina são $38,3 \pm 12,3\%$ superiores (n = 5, **Figura 4.12.A**). Os níveis de PSD-95 não se revelaram significativamente diferentes entre machos e fêmeas da mesma idade (n = 2, **Figura 4.12.B**).

Os níveis de expressão de gefirina (n = 5, **Figura 4.12.C**), assim como os de PSD-95 (n = 2, **Figura 4.12.D**), não se revelaram significativamente diferentes (valor-*p* <0,05) entre machos e fêmeas, independentemente da idade.

Ao fazer o perfil, ao longo da idade, com o envelhecimento dos machos e das fêmeas, não se assinalaram alterações significativas nos níveis de expressão de gefirina (n = 5, **Figura 4.12.C**), assim como nos níveis de expressão de PSD-95 (n = 2, **Figura 4.12.D**).

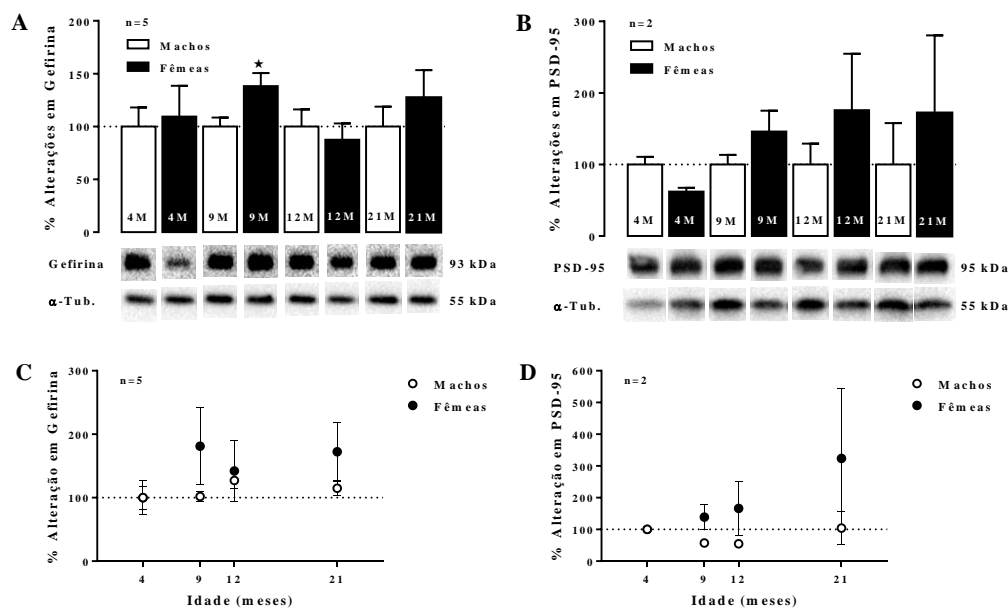


Figura 4.12 Comparação da expressão sinaptossomal das proteínas de ancoragem pós-sináptica gefirina e PSD-95 ao longo da idade em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 8, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. As proteínas pró-sinápticas gefirina e PSD-95 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média \pm SEM de 2-5 experiências (n=2-5). Os níveis de gefirina [A] e PSD-95 [B] dos machos foram normalizados a 100% para todas as idades e foram comparados os valores das fêmeas da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor-*p* <0,05. Os níveis de gefirina [C] e PSD-95 [D], obtidos em comparação com o valor dos machos e das fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma *one-way* ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey (P <0,05); e a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma *two-way* ANOVA simples (P <0,05).

4.3.1.3. Canais Kv4.2

Os níveis de expressão sináptica dos canais Kv4.2, em sinaptossomas de hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, não evidenciaram alterações ao comparar as fêmeas com os machos da mesma idade (n = 2-3, **Figura 4.13.A**).

No entanto, a expressão de Kv4.2 (n = 2-3, **Figura 4.13.B**) foi significativamente diferente entre machos e fêmeas (valor-*p* <0,05), independentemente da idade.

Ainda assim, ao longo da idade, não se assinalaram alterações significativas no perfil dos níveis de expressão de Kv4.2, para cada sexo (n = 2-3, **Figura 4.13.B**).

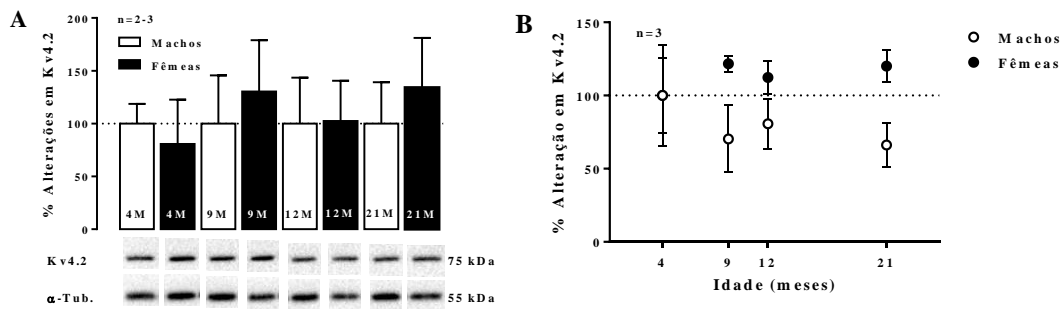


Figura 4.13 Comparação da expressão sináptica dos canais Kv4.2 ao longo da idade em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. Os canais Kv4.2 foram detectados com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média ± SEM de 2-3 experiências (n=2-3). Os níveis de Kv4.2 [A], com os valores dos machos normalizados a 100%, foram comparados os valores das fêmeas da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; valor-*p* <0,05. Os níveis de Kv4.2 [B], obtidos em comparação com o valor dos machos e fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma *one-way* ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey (P <0,05); e a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma *two-way* ANOVA simples (P <0,05).

4.3.1.4. Proteínas-marcador pré-sinápticas: Sinaptofisina e SNAP-25

Nos terminais nervosos, obtidos do hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, ao comparar as fêmeas com os machos, verificou-se que os níveis de expressão de sinaptofisina eram significativamente maiores nas fêmeas de 4M ($108,7 \pm 38,4\%$, n = 4, **Figura 4.14.A**). Os níveis de SNAP-25 não se revelaram significativamente diferentes entre machos e fêmeas da mesma idade (n = 3-4, **Figura 4.14.B**).

Os níveis de expressão de sinaptofisina (n = 4, **Figura 4.14.C**) foram significativamente diferentes (valor-*p* <0,05) entre machos e fêmeas, independentemente da idade; contrariamente aos níveis de expressão de SNAP-25 (n = 3-4, **Figura 4.14.D**), não se revelando diferenças significativas.

Ao fazer o perfil dos níveis de expressão da sinaptofisina, ao longo da idade, assinala-se, nos machos, um aumento a partir dos 21M, em comparação aos 4M. Os níveis de sinaptofisina aumentaram $115,1 \pm 29,8\%$ nos machos de 21M (n = 4, **Figura 4.14.C**). Não se assinalam alterações significativas nos níveis de expressão de SNAP-25, tendo em conta o perfil, ao longo da idade, quer nos machos quer nas fêmeas (n = 3-4, **Figura 4.14.D**).

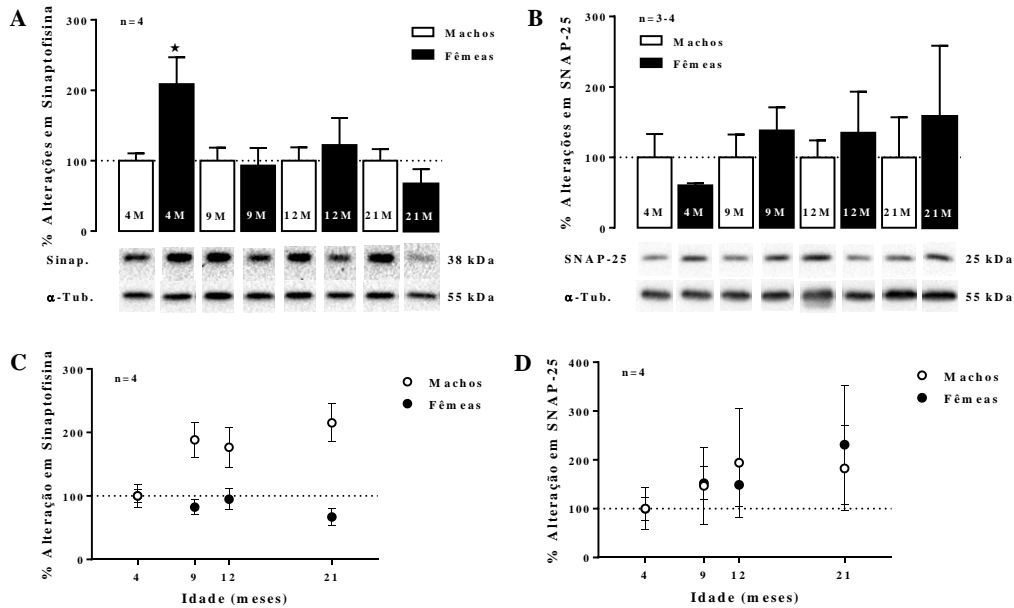


Figura 4.14 Comparação da expressão sinaptossomal das proteínas pré-sinápticas sinaptofisina e SNAP-25, ao longo da idade, em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. As proteínas pré-sinápticas sinaptofisina e SNAP-25 foram detetadas com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-D] representam a média \pm SEM de 4 experiências (n=4). Os níveis de sinaptofisina [A] e SNAP-25 [B] dos machos foram normalizados a 100% e foram comparados com os valores das fêmeas, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor- $p < 0,05$. Os níveis de sinaptofisina [C] e SNAP-25 [D], obtidos em comparação com o valor dos machos e das fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma *one-way* ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$); a diferença entre machos e fêmeas foi avaliada usando uma *two-way* ANOVA simples ($P < 0,05$).

4.3.2. Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas: Caveolina-1

Nos terminais nervosos, obtidos de hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, foram determinados os níveis de expressão sináptica da proteína de jangadas lipídicas – caveolina-1. Ao comparar as fêmeas com os machos, verificou-se que os níveis de expressão de caveolina-1 aumentaram significativamente nas fêmeas de 12M em comparação com os machos de 12M ($59,5 \pm 21,8\%$, n = 6, **Figura 4.15.A**).

Os níveis de expressão de caveolina-1 (n = 6, **Figura 4.15.B**) não foram significativamente diferentes (valor- $p < 0,05$) entre machos e fêmeas, independentemente da idade. Não se assinalam alterações significativas nos níveis de expressão de caveolina-1, tendo em conta o perfil, ao longo da idade, quer nos machos quer nas fêmeas (n = 6, **Figura 4.15.B**).

4.3.3. Proteínas-marcador de terminais catecolaminérgicos: Hidroxilase de tirosina

Nos terminais nervosos de hipocampo de ratos com 4,9,12,21M, de ambos os sexos, foram determinados os níveis de expressão sináptica da proteína enzimática TH, uma proteína marcadora das projeções catecolaminérgicas no hipocampo. Ao comparar as fêmeas com os machos da mesma idade, não se verificaram alterações nos níveis de expressão de TH (n = 3-5, **Figura 4.16.A**).

Os níveis de expressão de TH (n = 3-5, **Figura 4.16.B**) não foram significativamente diferentes (valor- $p < 0,05$) entre machos e fêmeas, independentemente da idade. E, ao perfil dos níveis de expressão de TH, ao longo da idade, nos machos e fêmeas, não se assinalaram alterações significativamente diferentes (n = 3-5, **Figura 4.16.B**).

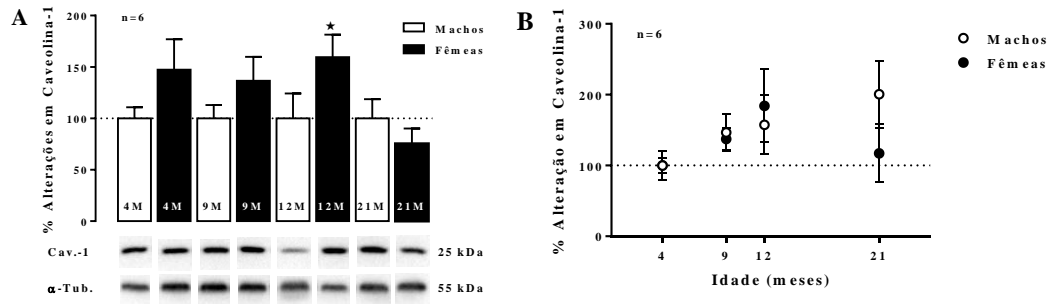


Figura 4.15 Comparação da expressão sinaptossomal da proteína de caveolae caveolina-1, ao longo da idade, em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. A proteína de jangadas lipídicas caveolina-1 foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média \pm SEM de 6 experiências (n=6). Os níveis de caveolina-1 [A], com os valores dos machos normalizados a 100%, foram comparados os valores das fêmeas com os dos machos da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; *valor- $p < 0,05$. Os níveis de caveolina-1 [B], obtidos em comparação com o valor dos machos e fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma *one-way* ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$); a diferença entre machos e fêmeas foi avaliada usando uma *two-way* ANOVA simples ($P < 0,05$).

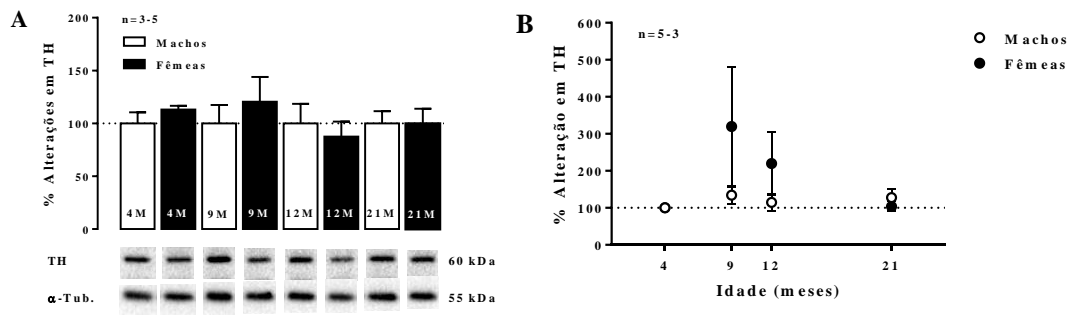


Figura 4.16 Comparação da expressão sinaptossomal do enzima marcador de terminais monoaminérgicos hidroxilase de tirosina (TH), ao longo da idade, em ratos macho e fêmea. As experiências foram realizadas em sinaptossomas de hipocampo de ratos saudáveis de 4, 9, 12 e 21 meses, conforme o descrito no capítulo 3. A TH foi detetada com anticorpos específicos. Os valores representados nos gráficos [A-B] representam a média \pm SEM de 3-5 experiências (n=3-5). Os níveis de TH [A], com os valores dos machos normalizados a 100%, foram comparados os valores das fêmeas com os dos machos da mesma idade, usando um teste t de Student independente com correção de Welch; valor- $p < 0,05$. Os níveis de TH [B], obtidos com referência ao valor dos machos e fêmeas de 4 meses normalizados a 100%, foram comparados usando uma *one-way* ANOVA simples com aplicação do teste de comparações múltiplas de Tukey ($P < 0,05$); a diferença entre machos e fêmeas foi calculada usando uma *two-way* ANOVA simples ($P < 0,05$).

5. Discussão

No contexto do projeto desta dissertação de mestrado, foram estudadas as alterações sinápticas, com especial foco para as alterações mais relevantes na plasticidade sináptica, relacionadas à epileptogênese e ao envelhecimento, no hipocampo. Em respeito à epileptogênese, estudaram-se as alterações sinápticas que surgiram na primeira hora após a atividade epileptiforme crítica e intercrítica e o papel do VIP endógeno nestas alterações; discutindo a sua possível contribuição para a neuroproteção. Em relação ao envelhecimento, estudou-se o dimorfismo sexual relacionado às alterações sinápticas durante o envelhecimento e a sua relevância para a plasticidade e memória, em diferentes estádios de vida.

5.1. Alterações moleculares após a indução da atividade epileptiforme *in vitro*

Neste trabalho, os níveis de expressão sinaptossomal de várias proteínas sinápticas encontravam-se alterados 30 min após indução de atividade epileptiforme intercrítica *in vitro* por Mg^{2+} 0 mM em fatias de hipocampo de rato. A **Tabela 5.1** sumariza as principais alterações observadas.

Tabela 5.1 Principais alterações sinápticas induzidas por atividade intercrítica e a sua dependência da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. Os alvos para os quais os efeitos da atividade intercrítica foram diferentes quando bloqueada a ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁ (Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269) estão destacados a azul. Abreviaturas: Gef, gefirina; Sinap, sinaptofisina; Cav-1, caveolina-1; Flot-1, flotilina-1.

| | GluA1 | GluA2 | GluA1/GluA2 | Gef | PSD-95 | Kv4.2 | Sinap | Cav-1 | Flot-1 |
|----------------------------|-------|-------|-------------|-----|--------|-------|-------|-------|--------|
| Mg^{2+} 0 mM | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ∅ | ∅ | ∅ | ↓ | ↓ |
| Mg^{2+} 0 mM + PG 97-269 | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ∅ | ↑ | ∅ | ↓ | ↓ |

Os níveis de expressão sinaptossomal de várias proteínas sinápticas encontravam-se também alterados 30 min após indução de atividade epileptiforme crítica *in vitro* por bicuculina (10 μ M; **Bic**) em fatias de hipocampo de rato, alguns destes de forma muito mais acentuada do que após atividade intercrítica. A **Tabela 5.2** resume as principais alterações observadas.

Tabela 5.2 Principais alterações sinápticas induzidas por atividade crítica e a sua dependência da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. Os alvos para os quais os efeitos da atividade crítica foram diferentes quando bloqueada a ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁ (**Bic** + PG 97-269) estão destacados a azul. Abreviaturas: Gef, gefirina; Sinap, sinaptofisina; Cav-1, caveolina-1; Flot-1, flotilina-1.

| | GluA1 | GluA2 | GluA1/GluA2 | Gef | PSD-95 | Kv4.2 | Sinap | Cav-1 | Flot-1 |
|------------------------|-------|-------|-------------|-----|--------|-------|-------|-------|--------|
| Bic | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ∅ | ∅ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Bic + PG 97-269 | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ∅ | ∅ | ↓ | ↓ | ↓ |

5.1.1. Subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA

Ao avaliar a composição de recetores AMPA em sinaptossomas isolados de fatias hipocampo em que se induziu atividade epileptiforme intercrítica *in vitro* por exposição a **Krebs** Mg^{2+} 0 mM observou-se que a expressão da GluA1 diminuiu e a expressão da GluA2 aumentou. Consequentemente observou-se uma redução muito marcada da razão GluA1/GluA2. No contexto do período latente da epileptogênese, onde a atividade intercrítica se observa; estas observações podem ter grande significado fisiológico. Os recetores AMPA predominantes em células piramidais do hipocampo⁵⁴⁴ apresentam preferencialmente a combinações de GluA1/2 ou GluA2/3. No entanto, os recetores AMPA que não possuam a GluA2 (isto é, formados a partir de combinações homo- ou heteroméricas de GluA1,3,4) são

permeáveis a Ca^{2+} , sendo a presença da GluA2 uma peça essencial para a impermeabilidade ao Ca^{2+} , definindo assim, de modo crítico, as propriedades biofísicas dos recetores AMPA^{544,545}, resultando numa menor condutância que, por sua vez, dificultará a sua incorporação sináptica e a alteração das propriedades de transmissão excitatória e subsequentemente a plasticidade⁵⁴⁶. Em última análise, terá ainda um efeito neuroprotetor, uma vez que diminui o risco de excitotoxicidade, que está associado à elevação do Ca^{2+} intraneuronal⁵⁴⁷.

Relativamente à composição dos recetores AMPA presentes em sinaptossomas isolados de fatias hipocampo em que se induziu atividade epileptiforme crítica, *in vitro*, por exposição a **Bic**, foi ainda mais revelante na redução da expressão da GluA1, enquanto aumentou a expressão da GluA2; embora, devido ao número reduzido de experiências neste trabalho, este resultado careça de significância estatística. Consequentemente, observou-se uma redução muito evidente da razão GluA1/GluA2.

Lopes *et al.* (2013) demonstraram que 50 dias após a indução SE com pilocarpina, os níveis de GluA1 não se encontram alterados⁵⁴⁸ no hipocampo de rato; concomitantemente, foi observado uma subexpressão da GluA2 passadas 8 semanas da indução de SE com ácido caínico (KA, do inglês, *kainic acid*)⁵⁴⁹. Estas observações não refletem os resultados do presente estudo, já que este se focou nas alterações que se observam imediatamente após crises epiléticas isoladas e antes de se estabelecerem as crises epiléticas recorrentes, características da epilepsia; sendo de esperar que os circuitos neuronais demonstrem, *in vivo*, respostas adaptativas após o surgimento das SRSs.

A subexpressão de GluA2 no hipocampo de ratos P13⁵⁵⁰, mas não de ratos adultos^{550,551} (ou ratinhos adultos⁵⁵²), leva a um fenótipo agravado de crises epiléticas, quando induzidas por KA, reforçando o conceito de que a regulação negativa de GluA2 contribui para crises epiléticas em animais jovens, mas não em adultos⁵⁵⁰; e que a entrada de Ca^{2+} , por recetores AMPA deficitários em GluA2, contribui para todo um estado de hiperexcitabilidade⁵⁵³. Por contraposição, atendendo aos resultados nesta dissertação, em que parece haver uma expressão aumentada da GluA2 após a atividade crítica, pode ser inferido que, apesar da atividade gerada, há todo um mecanismo coordenado que visa a autoproteção; isto porque, a elevação de GluA2 opõem-se ao estado hiperexcitável, fornecendo uma defesa homeostática adicional a fim de limitar a despolarização da membrana e a hiperestimulação dos recetores glutamatérgicos envolvidos na excitotoxicidade⁵⁵⁴. De facto, o recrutamento de recetores AMPA ausentes da GluA2, poderá ser um mecanismo exclusivo para formas rápidas de plasticidade homeostática⁵⁵⁵, sugerindo que a sua presença tenha uma ação de freio à plasticidade, que se sabe estar aumentada na epilepsia. As alterações na plasticidade sináptica no hipocampo têm sido apontadas como o verdadeiro mecanismo de epileptogénese no cérebro⁵⁵⁶.

Por outro lado, no hipocampo de crias de ratos *Sprague-Dawley* (P1-3), Jakawich *et al.* (2010) descobriram também que a hiperativação crónica da rede (por tratamento com bicuculina) induzia uma perda coordenada das GluA1,2 das sinapses⁵⁵⁵. Dada a imaturidade destes animais e a consequente imaturidade dos circuitos GABAérgicos nas estruturas corticais, o contraste dos resultados neste trabalho com os de Jakawich *et al.* (2010) denota concordantemente uma diminuição das GluA1; porém, em contraparte, existe um considerável aumento das GluA2, que é de difícil interpretação.

A diminuição na razão de GluA1/GluA2 encontrada neste trabalho, após a atividade intercrítica induzida por Mg^{2+} 0 mM, pode sugerir que o *pool* de recetores AMPA homotetraméricos contendo GluA2 está aumentado em ratos, desde cedo, na epileptogénese, sugerindo a presença de recetores AMPA impermeáveis a Ca^{2+} , o que dificulta a despolarização, freando a excitabilidade dos neurónios, prevenindo a excitotoxicidade; deste modo, constitui um mecanismo endógeno de prevenção da doença e da sua progressão. Serão necessários mais estudos para compreender se, de facto, esta razão

GluA1/GluA2 se mantém aumentada durante o denominado período latente da epileptogénese. Tem sido debatido na literatura se a atividade epileptiforme intercrítica contribui para a epileptogénese ou se a sua ocorrência previne o despoletar das crises epiléticas, ao que, por diversos investigadores, se demonstrou que em fatias combinadas de hipocampo–EC, *in vitro*, a atividade intercrítica, embora ocorra de forma mais persistente, pode prevenir a ocorrência de atividade crítica⁵⁵⁷. Desta forma, a atividade epileptiforme intercrítica durante o período latente poderá não só ser um mecanismo de neuroproteção contra a ocorrência de crises epiléticas secundárias, ao dano inicial, como também um mecanismo que leva à proteção contra o desenvolvimento de plasticidade sináptica anómala após esse dano. Ao reduzir o influxo de Ca²⁺ durante a ativação dos recetores AMPA, a redução da razão GluA1/GluA2 é consistente com a observação de que a plasticidade sináptica está reduzida na CA1, 30 min após a indução da atividade intercrítica.

O facto de estas alterações serem ainda mais marcadas após a atividade crítica induzida por **Bic 10 μM**, reforça a hipótese de que as alterações observadas contribuam para mecanismos endógenos de neuroproteção. O presente trabalho é pioneiro no estudar as alterações na razão GluA1/GluA2 em modelos de atividade epileptiforme *in vitro* em hipocampo de rato.

Ao estudar a atividade epileptiforme crítica e intercrítica na presença do antagonista seletivo dos recetores VPAC₁ para o VIP **PG 97-269**, não se constatou que houvesse qualquer influência da presença deste antagonista nas alterações da expressão das GluA2 dos recetores AMPA acima descritas. Respeitante à expressão das GluA1 dos recetores AMPA, observou-se uma acentuação na diminuição da sua expressão após a atividade crítica induzida por **Bic 10 μM** na presença do **PG 97-269**. Sendo esta alteração pouco marcada, sugere então que as alterações na expressão das GluA1,2, em sinaptossomas do hipocampo durante o período de epileptogénese ou após as crises, são fundamentalmente independentes da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁.

5.1.2. Proteínas estruturais pós-sinápticas

5.1.2.1. PSD-95

Neste trabalho, os níveis de expressão sinaptossomal de PSD-95, em fatias de hipocampo de rato, não se mostraram alterados após a indução, *in vitro*, de atividade epileptiforme intercrítica (por **Mg²⁺ 0 mM**) ou mesmo crítica (por **Bic 10 μM**).

Em trabalhos preliminares no nosso laboratório, usando o modelo de lítio-pilocarpina (Li²⁺-Pilo), no período crónico da TLE, *in vivo*, verificou-se uma diminuição significativa dos níveis de expressão membranar de PSD-95⁵⁵⁸. Também foi observado uma diminuição, num estudo anterior, dos níveis de expressão de PSD-95, em hipocampo de ratos de 4 a 6 semanas, após a indução de SE com KA⁵⁵⁹. Isto vem em linha com a conhecida perda de neurónios e os seus respetivos contactos sinápticos na epilepsia⁵⁶⁰.

Losi *et al.* (2004), por estudos em culturas de fatias de hipocampo, observou que a sobre-expressão de PSD-95 em neurónios resultou num aumento da expressão e resposta sináptica de recetores AMPA nas sinapses, sem afetar a expressão ou resposta de recetores NMDA⁵⁶¹. A PSD-95 parece deslocar os recetores AMPA extra-sinápticos para a sinapse, sem alteração nos níveis globais dos recetores AMPA membranares¹²⁵.

A PSD-95 é a proteína pós-sináptica estrutural mais representativa da PSD, que contribui para a ligação de recetores à membrana pós-sináptica⁵⁶², promovendo a maturação e o fortalecimento de sinapses excitatórias⁵⁶³, regulando também o tráfego de recetores AMPA *in vitro* como *in vivo*^{124,126,564,565}. Chen *et al.* (2009) descrevem que o aumento da expressão da GluA1, no neocórtex,

contribuiu para o recrutamento de PSD-95, promovendo, à vista disso, sinaptogênese⁵⁶⁶. Ehrlich *et al.* (2007) demonstraram que a LTP não poderá ser induzida no hipocampo se o gene codificante para a PSD-95 for deletado²¹⁹. Esta fisiologia leva à regulação da força sináptica, como as que subjazem aos mecanismos de plasticidade sináptica. Levando isto em consideração, a manutenção encontrada nos níveis de expressão da PSD-95 em Mg^{2+} 0 mM ou em **Bic 10 μ M**, resultará, teoricamente, numa estabilidade das sinapses excitatórias, havendo possibilidade de excitabilidade neuronal.

A presença do antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP **PG 97-269** durante a atividade epileptiforme intercrítica induzida por Mg^{2+} 0 mM e crítica induzida por **Bic 10 μ M**, não induziu efeito na expressão de PSD-95 em sinaptossomas de hipocampo de rato. Isto sugere que durante o período de epileptogênese ou epilepsia crónica a expressão de PSD-95 seja independente da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁. Este facto não é surpreendente, uma vez que o VIP é essencialmente libertado por sinapses GABAérgicas e acredita-se que a expressão dos recetores VPAC₁ seja nessas sinapses predominante³⁸¹.

5.1.2.2. Gefirina

Aqui, neste estudo, os níveis de expressão sinaptossomal de gefirina revelaram um aumento tendencial, após indução de atividade epileptiforme intercrítica e crítica *in vitro* induzida por Mg^{2+} 0 mM e por **Bic 10 μ M**, respetivamente, em fatias de hipocampo de rato. Contudo, o número diminuto de experiências não permite ainda inferir quanto a este resultado de forma alicerçada na significância estatística. Ainda assim, regista-se uma média nos níveis de expressão desta proteína substancialmente elevada em resposta à atividade epileptiforme crítica, relativamente à atividade epileptiforme intercrítica.

Interessante e notavelmente, vários estudos têm associado a gefirina à epilepsia^{567,568}. Consistente com isto, num estudo desenvolvido por Kim *et al.* (2020), observou-se que ratinhos com gefirina^{KO} exibiam crises epiléticas graves⁵⁶⁸.

Por outro lado, a perda de tónus GABAérgico e a hiperexcitabilidade neuronal parecem resultar da perda de proteínas envolvidas na transmissão GABAérgica⁵⁶⁹. Investigações indicaram que os recetores GABA_A e a sua proteína estrutural de ancoragem gefirina, se encontram subexpressos durante o período latente da epileptogênese⁵⁷⁰. Foi também documentado que, durante a epileptogênese induzida por pilocarpina, ocorria a clivagem de gefirina, muito provavelmente pela ação do enzima calpaína⁵⁷¹. Essa ação, por consequência, resulta na desmontagem da rede de gefirina e por conseguinte, a perda de locais de ancoragem para os recetores GABA_A na sinapse^{571,572}. As calpaínas representam uma família de proteases ativadas por Ca^{2+} ⁵⁷³, sendo um dos seus principais substratos a gefirina⁵⁷¹. A administração de um inibidor da calpaína, imediatamente após a indução do SE por pilocarpina, evitou parcialmente a clivagem de gefirina, sugerindo, destarte, que a ativação marcada da calpaína pode comprometer expressão superficial dos recetores GABA_A e em consequência, a neurotransmissão inibitória⁵⁷¹. Os resultados apresentados nesta dissertação, não refletem a tendência observada por estes estudos, mas sim o oposto. Apesar disso, valendo uma vez mais lembrar, que o presente estudo realizado, apenas foca a análise dos eventos celulares que ocorreram durante a primeira hora após os estímulos potencialmente epileptogénicos; posto isto, seria importante seguir com o curso destas alterações moleculares nas primeiras horas após estes estímulos, de modo a se poder interpretar melhor estes resultados. A elevação nos níveis de gefirina imediatamente após estes estímulos e a sua capacidade de promover um aumento da transmissão GABAérgica pela estabilização dos recetores GABA_A nas sinapses^{574,575} está em congruência com o observado na secção anterior, de que há uma resposta endógena no sentido de reduzir a excitabilidade e promover uma neuroproteção contra mecanismos excitotóxicos. Efetivamente, a estrutura tridimensional da gefirina no componente pós-sináptico

interage com dezenas de outros componentes sinápticos; regula a formação, transmissão e a plasticidade das sinapses GABAérgicas⁵⁶⁸; e o recrutamento e imobilização dos recetores GABA_A⁵⁷⁶ no componente pós-sináptico²⁹⁶.

Em estudos preliminares *in vivo* em ratos-modelo da TLE com SRSs induzidas por Li²⁺-Pilo levados a cabo no nosso laboratório, observou-se uma elevação significativa dos níveis de expressão membranar de gefirina⁵⁵⁸. Estudos de imunohistoquímica, em hipocampo de rato, durante o período latente e crónico da TLE, de 24 h a 2M após a 1.^a série de convulsões induzidas com Li²⁺-Pilo, mostraram níveis de expressão diminuídos de gefirina²⁹⁷. Essa diminuição da expressão não se encontra em concordância com a tendência para o aumento observada neste estudo. Todavia, num outro estudo por Marty *et al.* (2004), observou-se que a aplicação crónica de bicuculina aumentou a densidade de subunidades do recetor GABA_A e de aglomerados de gefirina⁵⁷⁴ (essenciais à associação das subunidades que constituem os recetores sinápticos de GABA_A). Desta maneira, um aumento sináptico de recetores GABA_A, em seguimento de um aumento da transmissão inibitória, possivelmente terá um papel no controlo da excitabilidade excessiva das células piramidais/principais durante a epileptogénese e/ou na TLE.

A expressão de gefirina, quando se preveniu a ativação dos recetores VPAC₁ para o VIP com o antagonista seletivo **PG 97-269**, o efeito da atividade epileptiforme, quer induzida por **Mg²⁺ 0 mM**, quer por **Bic 10 μM**, não se alterou; sugestionando que as suas potenciais alterações, no hipocampo, após se suceder atividade epileptiforme, são independentes da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁ e que estas não contribuem para o efeito do bloqueio destes recetores na expressão da LTP induzida por *θ-burst*, que se observa logo após a atividade epileptiforme⁴⁰⁴.

5.1.3. Canais K_v4.2

Observou-se, com base nas experiências realizadas, uma diminuição ligeira da expressão dos canais K_v4.2 em resposta à atividade epileptiforme induzida *in vitro* por **Mg²⁺ 0 mM**, como por **Bic 10 μM**. Estas alterações não foram significativamente diferentes, dado o reduzido número de experiências.

A adição do antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP **PG 97-269** durante a atividade induzida por **Mg²⁺ 0 mM** contrariou claramente a diminuição da expressão de K_v4.2; Não se verificando o mesmo quando à indução da atividade epileptiforme por **Bic 10 μM**, o que significa que o antagonismo de VPAC₁ pode contribuir para uma proteção contra as alterações desencadeadas pela atividade intercrítica na expressão dos K_v4.2 na membrana de sinaptossomas, no hipocampo, durante o período de epileptogénese.

O gene que codifica o canal K_v4.2 (*KCND2*) foi considerado um gene de risco para epilepsia. Responsáveis por mediar correntes de K⁺ somatodendríticas do tipo A, os canais K_v4.2 desempenham um papel vital na regulação da excitabilidade neuronal e integração do sinal dendrítico no hipocampo. Além das mutações genéticas em *KCND2*, também foram observadas, em modelos de ratinho, alterações da expressão e função de proteínas do canal K_v4.2 relativamente a perturbações neurológicas monogénicas associadas à epilepsia⁵⁷⁷. Além disso, após crises epiléticas agudas, foi detetada uma expressão reduzida de canais K_v4.2 em ratos^{578,579} e ratinhos³⁰⁹, como em modelos animais de epilepsia adquirida, tais como lesão cerebral traumática⁵⁸⁰ ou TLE induzida por pilocarpina⁵⁸¹⁻⁵⁸³.

Os neurónios de hipocampo de ratinhos com K_v4.2^{KO} apresentam uma maturação sináptica retardada; têm mais sinapses silenciosas (isto é, sem recetores de AMPA) e a sua excitabilidade intrínseca é aumentada^{304,307}. Estes *deficits* sinápticos, na ausência de canais K_v4.2, também estão refletidos a nível comportamental: Os ratinhos com K_v4.2^{KO} têm *deficits* de aprendizagem e memória; dando azo à hipótese que os canais K_v4.2 desempenhem um papel crítico na cognição³⁰³. De facto, estudos em ratinhos com K_v4.2^{KO} demonstraram que a perda completa de canais K_v4.2 leva à

subexpressão de duas das suas subunidades auxiliares, KChIP2,3 no hipocampo^{584,585} e ao aumento de correntes GABAérgicas tónicas no hipocampo⁵⁸⁶.

Tiwari *et al.* (2020)⁵⁷⁷ mostraram que a expressão reduzida de canais K_v4.2 leva à redução da densidade de espinhas dendríticas e a uma morfologia de espinha dendrítica mais imatura. Usando análises de EEG, demonstraram que níveis reduzidos de canais K_v4.2 aumentam a atividade cerebral basal e a induzida por KA, aumentando a suscetibilidade a crises epiléticas. Em contraste, a sobre-expressão de canais K_v4.2 em ratinhos *wildtype*, por meio de injeção intra-hipocampal na CA1 de lentivírus que leva à expressão de canais K_v4.2, retardou o início de crises epiléticas. Estes resultados sugerem que os canais K_v4.2 são um importante regulador da excitabilidade da rede neuronal e da morfologia das espinhas dendríticas. No futuro, a manipulação da expressão dos canais K_v4.2 poderia ser usada para alterar a suscetibilidade de crises epiléticas na epilepsia.

5.1.4. Proteínas pré-sinápticas: Sinaptofisina

A sinaptofisina é uma proteína presente nas vesículas sinápticas de inúmeros neurónios, envolvida na ancoragem de vesículas à membrana pré-sináptica. Estando amplamente presente em todos os terminais nervosos, influencia a formação das vesículas sinápticas, a exocitose e a libertação de neurotransmissores dependente de Ca²⁺, como o ciclo das vesículas sinápticas⁵⁸⁷. Em razão disso, a sinaptofisina, é um importante marcador da sinaptogénese e da remodelação sináptica; a sua posição e quantificação poderão refletir com precisão a distribuição e a função das sinapses, refletindo assim também a sua plasticidade⁵⁸⁸. A respeito aos níveis de expressão sinaptossomal de sinaptofisina, neste trabalho, não se observaram alterações em resposta às atividades epileptiformes, *in vitro*, por **Mg²⁺ 0 mM** ou por **Bic 10 μM**. Na análise de Hanaya *et al.* (2007), durante o período de epileptogénese e crónico da epilepsia, foi mostrado que a expressão desta proteína não se altera significativamente no hipocampo, mas somente no EC e na amígdala, onde poderá estar envolvida no desenvolvimento de atividade convulsiva⁵⁸⁹. Xiao *et al.* (2017) relatam a sobre-expressão da proteína em questão 2 h após a indução de crises epiléticas por administração de Li²⁺-Pilo em ratos *Sprague-Dawley*⁵⁸⁸. Noutro estudo, embora não havendo registo de um aumento da expressão de sinaptofisina, Hinz *et al.* (2001), num modelo de epilepsia em ratos sujeitos a *kindling*, após 2 h, assinalou um aumento marcado da formação do dímero sinaptofisina-sinaptobrevina – um elemento integrante do complexo neuronal SNARE⁵⁹⁰. Por isso, sugere-se que esta interação poderá contribuir para alterações na plasticidade sináptica, tornando a sinaptobrevina mais facilmente recrutável para a formação de novos complexos SNARE; ponto de vista este, também advertido por White & Stowell (2021)⁵⁹¹, constando que este compósito se presuma ser vital para a forma e a função da maquinaria exocitótica neuronal.

Elmér *et al.* (1996)⁵⁹² mostraram, se bem que indiretamente, que a expressão de sinaptofisina aumentou significativamente na camada de brotação de fibras musgosas na região da CA3, somente 4 semanas após o *kindling*. Foi também indicado que o número de vesículas terminais aumenta na membrana pré-sináptica; Portanto, há um atendimento às necessidades crescentes de vesículas sinápticas devido ao aumento da atividade sináptica. A expressão de sinaptofisina aumentou novamente na fase crónica da doença em que se observam crises espontâneas recorrentes e a sua distribuição foi uniforme com o brotamento de fibras musgosas, indicando que também existe na hiperplasia axonal e na plasticidade sináptica, na fase crónica. Desse modo, especula-se que a sinaptofisina está, conjuntamente com o surgimento das fibras musgosas, intimamente relacionada à geração de crises epiléticas⁵⁸⁸.

Apesar de haver estudos que apontam para um aumento dos níveis de expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina no período da lesão aguda, como também no crónico, em modelos animais de epilepsia; os resultados presentes deste trabalho, não desvendaram nenhuma alteração da sua expressão em reação à atividade epileptiforme induzida, *in vitro*, nas duas condições testadas. Apesar disso, o

número de experiências realizadas para a obtenção resultados apresentados é relativamente baixo (n = 3-4), pelo que seria necessário a elaboração de um maior número de experiências, com o fim de se poder dar uma resposta mais robusta a esta questão. Independentemente disso, há também a possibilidade de que as alterações estruturais, que levam à elevação da expressão da sinaptofisina, não estejam ainda em curso na primeira hora após a indução de atividade epileptiforme.

Mais ainda, aquando da adição do antagonista dos recetores de VPAC₁ para o VIP **PG 97-269** ao meio das fatias de hipocampo, induzidas *in vitro* por atividade epileptiforme, quer por **Mg²⁺ 0 mM**, quer por **Bic 10 μM**; não se demonstrou que a presença do **PG 97-269** possua qualquer influência na alteração da expressão desta proteína; significando com isto, que as potenciais alterações de sinaptofisina em sinaptossomas, no hipocampo, durante o período de epileptogénese ou epilepsia crónica, sejam independentes da ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁.

5.1.5. Proteínas envolvidas na estrutura de jangadas lipídicas

Até onde se sabe, esta é a primeira vez em que os níveis de expressão das proteínas associadas a jangadas lipídicas, caveolina-1 e flotilina-1, foram estudados no contexto da indução da atividade epileptiforme, *in vitro*.

5.1.5.1. Caveolina-1

Nesta dissertação, é mostrado que os níveis de expressão de caveolina-1 se encontram severamente diminuídos em sinaptossomas obtidos de fatias de hipocampo, quer quando foi induzida a atividade epileptiforme intercristica por exposição a **Mg²⁺ 0 mM**, quer quando à indução crítica por **Bic 10 μM**, em que, neste último, houve uma diminuição ainda mais pronunciada. Na membrana neuronal, a caveolina está envolvida no tráfego de complexos de sinalização²⁹⁸; diferenciação neuronal; regulação da ligação de neurotransmissores²⁹⁸ e na neuroproteção^{593,594}. A própria é capaz de inibir a ligação de glutamato aos recetores AMPA, pela inibição da fosfolipase A₂. Fosfolipase esta, que, quando ativada, consegue alterar o ambiente lipídico dos recetores AMPA, de forma a aumentar a sua afinidade com vários ligandos⁵⁹⁵. É possível que o elevado influxo de Ca²⁺, característico do disparo repetido e despolarização durante a atividade epileptiforme, ative essa enzima, levando a uma maior afinidade dos recetores AMPA pelo glutamato, o que, por sua vez, pode contribuir para a hiperexcitabilidade. Desse modo, os resultados apresentados neste trabalho, que demonstram a diminuição dos níveis expressão de caveolina-1, nas condições em que foram submetidas as amostras, assim como resultados preliminares obtidos no nosso laboratório que indicam semelhantes alterações em membranas de hipocampo de ratos com SRSs (fase crónica)⁵⁵⁸, no modelo de Li²⁺-Pilo, pode dar um suporte à concetualização de que a desinibição da atividade da fosfolipase A₂, que promove a hiperexcitabilidade pela hiperativação dos recetores AMPA, levando conseqüentemente a eventos excitotóxicos, acabe por resultar em lesões neuronais.

Além disso, um estudo recente realizado por Egawa *et al.* (2017) descreveu que a sobre-expressão de caveolina-1 tem uma ação neuroprotetora contra lesões cerebrais e que desempenha também um papel importante na manutenção das funções neurológicas comportamentais e motoras⁵⁹⁶. Contrariamente, tem sido documentado por vários estudos que o *deficit* de caveolina-1 pode endossar a ativação de vários agentes inflamatórios, apoptóticos e biomarcadores de stresse oxidativo [como o óxido nítrico (NO) ou a mieloperoxidase (MPO)], passíveis de causar lesões neurológicas extensas após um AVC isquémico^{597,598}. Já na revisão de Förstermann *et al.* (2012) pode-se depreender que níveis elevados de caveolina-1 restrinjam a sinalização de NO, por ligação ao óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), inibindo-o⁵⁹⁹. Gao *et al.* (2016) descreve que um dos papéis de proteção da caveolina-1 é a redução significativa a expressão dos biomarcadores apoptóticos, incluso a caspase-3 – uma proteína com uma função central na apoptose⁶⁰⁰. Neste ponto, poder-se-á concluir, à luz deste conhecimento e face ao conjunto de dados recolhidos neste trabalho, que a atividade epileptiforme – que visa à inibição

da expressão de caveolina-1 – pode levar ao desencadeamento de todo um processo de inflamação, muitíssimo lesivo, podendo, porventura, acabar em morte celular.

Na presença do antagonista dos recetores VPAC₁ para o VIP **PG 97-269**, o efeito da atividade intercristica induzida por **Mg²⁺ 0 mM**, na expressão de caveolina-1 foi atenuado. Ora, isto sugere que o VIP endógeno favoreça uma diminuição da expressão de caveolina-1, nestas condições experimentais, facto que poderá contribuir para um reforço das alterações nesta proteína de jangadas lipídicas, durante o período de epileptogénese. Quando a atividade epileptiforme crítica foi induzida por **Bic 10 μM**, houve uma diminuição dos níveis de expressão de caveolina-1, nos terminais nervosos, que foi acentuada pela administração do **PG 97-269**, agravando, deste jeito, o efeito descrito anteriormente. Isto pode indicar que o VIP endógeno contraria a tendência para a diminuição de caveolina-1, tornando as alterações desta proteína de jangadas lipídicas mais ligeiras, em resposta à atividade crítica, como a que ocorre no período crónico da epilepsia.

Em ambas as situações experimentais, os recetores VPAC₁ parecem ter um papel de relevância na perda de caveolina-1; embora esta modulação ocorra de forma antagónica: As alterações induzidas pela atividade epileptiforme, característica do período latente da epileptogénese, a serem agravadas pela ação do VIP nos recetores VPAC₁; enquanto as induzidas pela atividade do tipo epileptiforme, característico da fase crónica da TLE, parecem ser compensadas por esta ação.

5.1.5.2. Flotilina-1

Neste trabalho, é mostrado que os níveis de expressão de flotilina-1 se encontram muito diminuídos quando à indução, *in vitro*, das atividades epileptiformes crítica e intercristica.

A flotilina-1 desempenha um papel de relevância no hipocampo, principalmente, na diferenciação e crescimento neuronal^{601,602}, assim como na formação de sinapses glutamatérgicas⁶⁰², como também na internalização de transportadores de neurotransmissores⁶⁰³. Por ensaios de eletrofisiologia e imunocitoquímica, Swanwick *et al.* (2010)⁶⁰² demonstraram que a proteína flotilina-1 promove a formação de sinapses glutamatérgicas, mas não GABAérgicas, no hipocampo. A flotilina-1 parece favorecer a formação de sinapses glutamatérgicas, acelerando assim a formação e maturação de espinhas dendríticas. Outra proteína pós-sináptica característica de jangadas lipídicas é a PSD-95, em que tanto a PSD-95 como a flotilina-1 aumentam, mesmo que de forma independente, a transmissão glutamatérgica. Quando se interfere na composição lipídica das membranas pós-sinápticas, ao inibir a síntese de colesterol e esfingolípido (o que promove a exaustão das jangadas lipídicas), decorre uma redução da expressão de PSD-95 ao longo das dendrites⁶⁰⁴. Os resultados deste trabalho indicam que os dois tipos de atividade epileptiforme induzidos, resultam numa forte quebra dos níveis de flotilina-1, o que pode viabilizar uma diminuição da transmissão glutamatérgica, dado a função da desta proteína em promover a formação e maturação de sinapses glutamatérgicas.

Ao prevenir a ação do VIP endógeno nos recetores VPAC₁ com o antagonista seletivo **PG 97-269**, a diminuição da expressão de flotilina-1 foi menos marcada, em resposta à atividade epileptiforme induzida por **Mg²⁺ 0 mM** (intercristica). Isto pode significar que o VIP endógeno contribua para a diminuição dos níveis desta proteína nestas condições experimentais. Já relativamente à indução da atividade crítica (por **Bic 10 μM**), quando bloqueados os recetores VPAC₁, não se registou alterações substanciais, no efeito deste estímulo, na expressão de flotilina-1 nos terminais nervosos; que foi, nada obstante, igualmente diminuída. Com este resultado, pode se especular que os recetores VPAC₁ não tenham um papel crucial no efeito da atividade crítica na flotilina-1 ou que esta atividade já tenha feito sofrer um efeito máximo na inibição da sua expressão.

5.2. Envelhecimento e dimorfismo sexual

Neste trabalho, de acordo com o anteriormente escrito, foi estudado a relevância do envelhecimento cerebral, nas alterações sinápticas, conjuntamente com as possíveis diferenças de sexo em animais em quatro diferentes estádios de vida: Adultos-jovens, 4M; adultos, 9M; de meia-idade, 12M e envelhecidos, 21M. Nas várias etapas do envelhecimento, o hipocampo de ratos macho e fêmea exibiu alterações nos níveis de expressão sinaptossomal de diversas proteínas sinápticas, nas quais, muitas se distinguem em ambos os sexos. A **Tabela 5.3** resume as principais alterações observadas no envelhecimento para os diferentes alvos estudados.

Tabela 5.3 Principais alterações nos níveis de expressão sinaptossomal de proteínas sinápticas observadas durante o envelhecimento e nos diferentes sexos. Abreviaturas: Gef, gefirina; Sinap, sinaptofisina; Cav-1, caveolina-1; TH, hidroxilase de tirosina.

| | | GluA1 | GluA2 | GluA1/GluA2 | Gef | PSD-95 | Kv4.2 | Sinap | SNAP-25 | Cav-1 | TH |
|-------|---|-------|-------|-------------|-----|--------|-------|-------|---------|-------|----|
| Ratos | ♂ | ↑ | ↑↓ | ↓ | ↑ | ↑ | ∅ | ∅ | ↑ | ↑↓ | ↓ |
| | ♀ | ↓ | ↓ | ↓ | ∅ | ∅ | ↓ | ↑ | ∅ | ↑ | ↓ |

5.2.1. Subunidades GluA1 e GluA2 dos recetores AMPA

Um dos objetivos do presente estudo foi o de investigar as alterações com a idade na estequiometria das GluA1 e GluA2 – as mais comuns encontradas na CA1 dos neurónios do hipocampo⁶⁰⁵ e que podem contribuir conspicuamente para as propriedades do recetor, como a cinética do canal; seletividade de iões; tráfego intracelular⁶⁰⁶ e/ou a sensibilidade à voltagem⁶⁰⁷. A expressão da GluA1 mostrou alterações mais marcadas ao longo do envelhecimento fisiológico e de forma distinta dependente do sexo.

Aqui, observou-se um dimorfismo sexual nos níveis de expressão da GluA1 (**Figura 4.11**), em que os níveis nas fêmeas foram, de forma geral, superiores aos dos machos; excetuando aos 4M, em que os níveis de GluA1 em fêmeas foram indubitavelmente inferiores. Considerando apenas a variação nos níveis de GluA1 nos machos ao longo da idade, nota-se a ocorrência de uma diminuição pronunciada dos 4M (fase adulto-jovem) para os 9M, com um nível médio de cerca 60% inferior. Os níveis mantiveram-se estáveis neste intervalo de valores até aos 12M e 21M. Nas fêmeas observou-se um aumento marcado da expressão de GluA1 dos 4M para os 9M, mantendo-se aos 12M. Aos 21M verificou-se uma diminuição para níveis similares aos observados aos 4M.

Relativamente aos níveis de expressão de GluA2, observaram-se alterações muito menos pronunciadas aos 9M e 12M, nos dois sexos; mas, novamente de forma distinta entre machos (uma ligeira diminuição) e fêmeas (um leve aumento). Aos 21M, os níveis foram semelhantes aos observados aos 4M para ambos os sexos.

Desta forma, este trabalho parece mostrar evidências de dimorfismo sexual na expressão das GluA1,2; ao longo da idade; no entanto, a razão GluA1/GluA2 aparenta não ser muito influenciada.

A plasticidade sináptica no hipocampo tem sido considerada como um potencial substrato celular da aprendizagem espacial^{185,608}. É mediada pela ativação de recetores NMDA e pensa-se que requeira uma incorporação controlada da GluA1^{233,609,610}. A expressão de GluA1 é mais elevada em regiões que demonstram uma alta densidade de recetores AMPA permeáveis a Ca^{2+} ^{611,612}, tendo sido demonstrado que o GluA1^{KO} incapacitou ratinhos adultos de gerar LTP e os mesmos apresentaram *deficits* cognitivos⁶¹³, indicando que a GluA1 desempenha um papel crítico na plasticidade sináptica e cognição⁶¹⁴. Ainda é pouco compreendido o modo de transporte dos recetores AMPA contendo GluA1

do corpo celular para as espinhas⁶¹⁵. As principais formas de recetores AMPA no hipocampo incluem: Homómeros GluA1, como, heterómeros GluA1/2 e GluA2/3^{247,459}. Além dos efeitos mediados pelos recetores NMDA, foi demonstrado que a eficácia da transmissão glutamatérgica depende da composição das subunidades dos recetores AMPA⁶¹⁶, com uma papel particular da GluA1, envolvida na plasticidade estrutural e funcional⁶¹⁷. O tráfego de recetores AMPA é um processo crítico na regulação da transmissão sináptica e é influenciado pela fosforilação da GluA1 [resíduo 845 de serina (Ser₈₄₅)] por cinases de proteínas como a PKA^{453,454}. É também geralmente aceite que o tráfego dos AMPA contendo as GluA1/2 seja regulado pela atividade sináptica e neuronal, enquanto os compostos pelas GluA2/3 são continuamente mobilizados, por mecanismos de exocitose, com o objetivo de manter a atividade basal^{264,457}. Foi também proposto que a fosforilação da GluA1, no Ser₈₄₅, tenha uma missão de estabilização de homómeros de GluA1 e de retenção de AMPAs permeáveis a Ca²⁺, em locais perissinápticos⁶¹⁸. Por contraste, a desfosforilação da pS845 está correlacionada com a LTD⁶¹⁹ e a subexpressão, na superfície celular, da GluA1⁶²⁰; como a debilitação da memória espacial⁶²¹.

Pouco se sabe sobre a ocorrência de diferenças específicas de sexo na expressão das subunidades relativas a esta secção. Ainda assim, numa avaliação quantitativa da densidade de recetores glutamatérgicos AMPA, cainato e NMDA por auto-radiografia, no hipocampo de ratos *Wistar* adultos, revelou diferenças consideráveis, a modos que são expressos mais recetores AMPA, cainato e NMDA em machos do que em fêmeas²⁶. No estudo de Xiang *et al.* (2011), em ratos *Sprague-Dawley* adultos-jovens (70-90 dias), foi demonstrado que as fêmeas tinham níveis mais baixos de GluA1, no hipocampo, em comparação com os machos; e também demonstraram uma forte correlação positiva entre os níveis de GluA1 hipocámpais e comportamentos de ansiedade⁶²².

Pertinentemente, o hipocampo dos ratos fêmea está sujeito a alterações dos níveis plasmáticos de esteroides sexuais, devido aos ciclos hormonais naturais, que, por sua parte, levam a flutuações significativas na densidade dos recetores AMPA, contrariamente à dos NMDA²⁶. De facto, a ativação de ERs (como os ER α , β), leva ao aumento da expressão das GluA1,2 e à diminuição de GluA3⁵⁰², induzindo também alterações na expressão de PSD-95, que pode ser causa da diminuição da expressão das subunidades do recetor AMPA, nos terminais nervosos. Estas alterações acompanham os conhecidos efeitos dos estrogénios na sinaptogénese e na maturação sináptica. Neste trabalho, o ciclo estral das fêmeas não foi controlado, pelo que as diferenças observadas, na expressão das várias proteínas sinápticas, só poderão ser explicadas à luz de diferenças globais dos níveis destas hormonas em ambos os sexos e não pela sua oscilação ao longo do ciclo das hormonas sexuais femininas.

A expressão de GluA1 no hipocampo aumenta gradualmente durante o desenvolvimento até se estabilizar ao P20, tal como a expressão da homóloga GluA2⁶²³. Além disso, sabe-se que as mudanças rápidas associadas à plasticidade sináptica são impulsionadas pela inserção de GluA1, que ocorrem poucos minutos após a estimulação em culturas neuronais, seguido por GluA2, prosseguido por GluA3⁶²⁴. À medida que o tráfego da GluA2 aumenta na sinapse durante a plasticidade, surgem aglomerados GluA2–PSD-95, que obstam a endocitose dos recetores AMPA⁶²⁵. A estabilização dos recetores AMPA, dentro da membrana sináptica, é de relevância para o aumento das espinhas dendríticas^{463,464}, que, por seu turno, é um facilitador da plasticidade sináptica.

A influência do envelhecimento nos níveis destas subunidades não se encontra assim tão bem caracterizada. As alterações na expressão das GluA1,2, no processo de envelhecimento, neste trabalho observadas, são parcialmente concordantes com as observadas por Nicoletti *et al.* (1995)⁶²⁶, onde descrevem uma ligeira diminuição da proteína GluA1, ao longo da idade, em ratos macho. Os mesmos autores não observaram quaisquer alterações significativas nos níveis de proteínas das outras subunidades dos recetores AMPA ou mesmo nos níveis de mRNA das GluA1-4.

5.2.2. Canais $K_v4.2$

O presente estudo demonstrou que os níveis de expressão dos $K_v4.2$ (um tipo de canal iônico predominante no cérebro, que controla a excitabilidade dendrítica e a função dos neurónios do hipocampo e também a plasticidade sináptica)⁶²⁷ são relativamente estáveis ao longo do processo de envelhecimento. No entanto, a sua expressão foi diferente entre o grupo dos machos e o das fêmeas, encontrando-se os níveis de expressão, no grupo dos machos, inferiores, quando comparados aos valores das fêmeas. Nenhuma interação foi detetada de forma significativa de idade por sexo, sugerindo que o padrão de envelhecimento, na individualidade de cada sexo, não difere.

A nível celular, está descrito a presença de mRNA e proteínas $K_v4.2$ em células piramidais do hipocampo, corroborado por estudos eletrofisiológicos que mostraram que os canais $K_v4.2$ estão subjacentes às correntes A somatodendríticas em neurónios piramidais na região CA1 do hipocampo. As células piramidais da CA3 e as células granulares do DG expressam tanto canais $K_v4.2$ como $K_v4.3$, enquanto as células piramidais da CA1 expressam apenas $K_v4.2$, de acordo com a expressão de mRNA e de proteína⁶²⁷.

Apesar dos estudos, *in vivo*, em humanos e outros animais, enfatizem que as alterações das propriedades funcionais da CA3 possam desempenhar um papel crítico nos *deficits* cognitivos alusivos ao envelhecimento, os substratos moleculares subjacentes a essas alterações ainda permanecem por descobrir⁴⁵². Resultados de Simkin *et al.* (2015) indicam que a rápida repolarização dos potenciais de ação mediada pelos canais $K_v4.2/K_v4.3$ dá aos neurónios piramidais envelhecidos da CA3 a capacidade de disparar mais potenciais de ação em resposta à estimulação sináptica, promovendo assim uma maior excitabilidade⁴⁵².

Análises de *histoblot* de Alfaro-Ruíz *et al.* (2019) indicaram uma intensidade semelhante de $K_v4.2$ e $K_v4.3$ nas camadas dendríticas da CA3 e no DG, enquanto a microscopia imunoelectrónica revelou uma distribuição subcelular muito semelhante destes dois subtipos de canal nas células principais⁶²⁷. Nestes duas regiões do hipocampo, os aferentes excitatórios são fornecidos principalmente pelas vias colaterais entorrinais, comissurais e locais²³. A expressão de $K_v4.2$ foi observada principalmente em compartimentos pós-sinápticos (cerca de 99%), embora também tenha sido detetada, em níveis muito baixos, marcação pré-sináptica em terminais de axónios⁶²⁷. Embora estes dois subtipos de canal possam se encontrar em qualquer posição no domínio somatodendrítico, a densidade de $K_v4.2$ e $K_v4.3$ é muito mais alta nas espinhas do que nas hastes dendríticas das células piramidais ou granulares, sugerindo que estes canais estão associados a impulsos excitatórios. Ao todo, a marcação de espinhas dendríticas de células principais e a proximidade de PSDs indicam que os $K_v4.2$ e $K_v4.3$ podem ser modulados pela atividade sináptica. Deveras, vários estudos funcionais demonstraram que as correntes do tipo A são reguladas sinápticamente e controlam a retropropagação dos potenciais de ação nas dendrites das células principais⁶²⁷. Isso ativa os Cav e os Nav e os recetores NMDA, que influencia a integração dendrítica das entradas sinápticas^{302,628-630}. Juntando as informações existentes, o subtipo de canal mais provável subjacente às correntes do tipo A, em domínios somatodendríticos de células piramidais CA1, é o $K_v4.2$. No entanto, a possibilidade de que os outros subtipos de canais subjacentes às correntes do tipo A também estejam envolvidos, como os $K_v1.4$, $K_v3.4$ e $K_v4.1$, não pode ser excluída⁶²⁷.

Além da sua distribuição ao longo dos compartimentos somatodendríticos das células principais e interneurónios, como já descrito em $K_v4.2$ e $K_v4.3$, estes canais também estão concentrados na especialização da membrana pós-sináptica, diretamente oposta ao terminal pré-sináptico⁶²⁷. Alfaro-Ruíz *et al.* (2019)⁶²⁷, demonstra que os canais $K_v4.2$ e $K_v4.3$ estão localizados, inclusive, em sinapses GABAérgicas, em neurónios do hipocampo, apesar de o seu papel funcional ainda precise de ser mais

bem esclarecido, podendo, ainda assim, estar envolvido no aumento da excitação dendrítica, pela atenuação da inibição ou pela amplificação da excitação.

5.2.3. Proteínas estruturais pré-sinápticas: Sinaptofisina e SNAP-25

Neste estudo, examinou-se também as alterações em marcadores pré-sinápticos no envelhecimento do cérebro, assim como outros dos marcadores pós-sinápticos (ver secção 5.2.4) de sinapses excitatórias e inibitórias. Esta abordagem foi procedida com o intuito de obter informações acerca de possíveis alterações relacionadas à idade na função pré-sináptica. Para tal, foram selecionadas as proteínas sinaptofisina (que se julga estar envolvida no tráfego e na reciclagem de vesículas)²⁷⁵ e SNAP-25 (que está envolvida na fusão das vesículas, contendo neurotransmissores, com a membrana plasmática, promovendo uma exocitose regulada)^{279,631}.

A sinaptofisina está amplamente distribuída nas vesículas sinápticas e é considerado uma proteína marcadora específica das mesmas⁶³². Além de estar associada à plasticidade sináptica, pode ser útil na determinação da distribuição e da densidade sináptica⁶³³, tendo em conta, também, a sua participação na transmissão da informação neuronal, acabando por ter uma influência considerável nas mudanças de eficiência da transmissão sináptica⁶³⁴.

O processo de envelhecimento, segundo Ruíz-Salinas *et al.* (2020)⁶³⁵, é caracterizado por uma diminuição nos níveis de sinaptofisina. Outra característica interessante do envelhecimento é a alteração da morfologia sináptica, incluindo a perda de proteínas estruturais pré-/ pós-sinápticas como a sinaptofisina e, portanto, a perda progressiva da densidade sináptica⁶³⁵. Vários estudos anteriores enunciaram existir diminuições relacionadas à idade dos níveis de sinaptofisina no hipocampo, como e. g.: Em Adams *et al.* (2008)⁴⁷⁹, em ratos macho híbridos *F344 × BN* (F1) jovens (10-12M), meia-idade (18-20M) e velhos (29-32M); Saito *et al.* (1994)⁶³⁶, em ratos *Fischer 344* machos com 3,12,24,33M; Ou, em Smith *et al.* (2000)⁶³⁷, em ratos macho *Long-Evans* jovens (6M) e velhos (24-28M). Em peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822), durante o envelhecimento natural do cérebro, observou-se uma correlação significativa de sexo/idade nos níveis de sinaptofisina, em indivíduos jovens (6-8M), de meia-idade (11-14,5M) e idosos (24-30M), num estudo avançado por Karoglu *et al.* (2017)⁶³⁸, salientando conjuntamente que os níveis de sinaptofisina se achavam baixos em idade avançada, em machos, assim que comparados com os das fêmeas.

No presente estudo, em ratos com 4,9,12,21M, machos e fêmeas, a expressão de sinaptofisina, aumentou com a idade nos ratos macho, sendo cerca de duas vezes superior aos 21M; ao passo que nas fêmeas a expressão se manteve sem grandes alterações até aos 21M, onde até se observou um ligeiro declínio. Em animais adultos-jovens, observou-se uma diferença marcada entre fêmeas e machos, nos níveis de sinaptofisina, sendo estes cerca de duas vezes superiores nas fêmeas. Estas observações solidam o dimorfismo sexual nos níveis de expressão de sinaptofisina, em sinaptossomas do hipocampo. O aumento nos níveis de sinaptofisina, provavelmente, será indicativo de que o tráfego e a reciclagem de vesículas são possivelmente alterados com a idade, no hipocampo de ratos macho. Não é de desconsiderar, também, a possibilidade de se dar o caso de que as alterações nos níveis de sinaptofisina refletirem diferenças no tamanho ou no número de sinapses.

A SNAP-25, uma das proteínas pertencentes ao chamado complexo SNARE, que regulam o tráfego e fusão vesicular, é uma molécula de adesão central para a ancoragem, tráfego e exocitose de vesículas⁶³⁹. Além do seu papel bem caracterizado na exocitose, esta proteína também modula vários Cav⁶⁴⁰. Foi demonstrado que a SNAP-25 controla negativamente a resposta neuronal ao Ca²⁺ durante a despolarização⁶⁴¹, inibindo os Cav⁶⁴². Consistentemente, ao se silenciar a SNAP-25 endógena, em neurónios glutamatérgicos, tem-se como resultado um aumento da atividade dos Cav^{643,644}.

No desenvolvimento do hipocampo de ratinho, na 1.^a semana de vida, predomina a isoforma SNAP-25a, que participa na fusão vesicular^{631,645}. Ao longo da idade dos ratinhos, os níveis de SNAP-25b e -25 em geral, aumentam consideravelmente em todo o cérebro. Às 3 semanas, o nível de SNAP-25b é superior em 50% ao de SNAP-25a no hipocampo. Além disso, entre as 3 e as 8 semanas, o tempo de maturação sináptica provável, foi reportado um aumento substancial na quantidade total de SNAP-25²⁹⁴.

Apesar de não abundar estudos relativamente à expressão de SNAP-25 no envelhecimento natural do cérebro, os resultados do presente estudo não permitem afirmar que exista um dimorfismo sexual presente, nem em alteração significativa dos níveis de expressão de SNAP-25 com a idade. Isto pode prenunciar que o controlo da regulação da dinâmica de $[Ca^{2+}]_i$, tal como os processos de exo-/endocitose de vesículas sinápticas no terminal pré-sináptico e possivelmente na regulação do tráfego de recetores pós-sinápticos, morfogénese das espinhas e da plasticidade⁶⁴⁰, podendo ter impacto nas funções pré- e pós-sinápticas, não são alterados pela regulação da SNAP-25.

5.2.4. Proteínas estruturais pós-sinápticas: PSD-95 e gefirina

O presente estudo mostra que os níveis de PSD-95, presente em sinapses excitatórias; e gefirina, presente nas sinapses inibitórias; ambas indicadores da integridade sináptica, não se alteram ao longo da idade. Foi detetada, singularmente, uma interação significativa da idade por sexo, observado nos níveis de gefirina aos 9M. Os níveis de PSD-95 não se alteraram significativamente com o envelhecimento em ambos os sexos, embora se observe uma exígua tendência para aumentar nas fêmeas, que provavelmente não atingiu significado estatístico devido ao reduzido número de experiências. Tomados em conjunto, estes dados indicam que o envelhecimento não altera a dinâmica molecular das sinapses de uma forma dependente do sexo.

Sendo uma proteína de ancoragem para recetores NMDA e AMPA, a PSD-95 foi utilizada para estimar a integridade dos contactos sinápticos excitatórios. Equivalentemente, a gefirina, que desempenha um papel semelhante para os recetores GABA_A e de glicina nas sinapses inibitórias, foi usada para determinar a integridade das sinapses inibitórias. Em virtude da não contemplação de alterações significativas nos níveis de PSD-95, como nos de gefirina, permite levantar o fundamento de que o equilíbrio excitatório/inibitório seja presumivelmente mantido ao longo do processo de envelhecimento, constando, ademais, aparentar ser de forma independente do sexo, no nosso modelo. Estudos prévios indicaram que existe uma diminuição relacionada à idade (26-28M) nos níveis de PSD-95, em sinaptossomas de hipocampo, de grupos de ratos híbridos *Fischer 344 × Brown Norway* (F1) machos⁴⁸². Com base nesses resultados, é razoável concluir que o equilíbrio excitatório/inibitório possa ser diferente em fêmeas idosas em relação aos machos.

Considerada vital para a aprendizagem e memória, a plasticidade sináptica no hipocampo, durante a indução da LTP, ativa os recetores NMDA e um influxo de Ca^{2+} , em sequência, que, por dependência da formação do complexo Ca^{2+} /calmodulina, resulta na ativação do enzima cinase CaMKII, que promove um rápido incremento de recetores AMPA⁶⁴⁶. A NR2B, uma subunidade dos recetores NMDA, na PSD, consegue ligar-se a CaMKII, o que leva à sua fosforilação no Ser₁₃₀₃, ocasionando aí um acréscimo do número de recetores NMDA. O estradiol pode alterar a densidade e a fosforilação dos recetores NMDA e estimular a formação de sinapses glutamatérgicas através de um mecanismo dependente dos ERS⁵⁶². Quando à exposição a estrogénios, estudos prévios indicaram que haveria um aumento da espessura da PSD e da extensão da fenda sináptica na pré-sinapse [em ratinhos fêmea (8 semanas)]⁶⁴⁷ e, outrossim, aumento dos níveis de mRNA para PSD-95 [em ratos fêmea (3M)]⁶⁴⁸; em ambos os estudos, estas alterações foram relacionadas à melhoria da memória espacial, ao que se sugere que alterações estruturais sinápticas possam contribuir para tal melhoramento.

Foi também sugerido que a PSD-95 tenha como função o controlo do rácio excitação/inibição e desempenhe um papel importante na regulação da plasticidade sináptica do hipocampo, sinaptogénese, aprendizagem e memória⁶⁴⁹. Zhang *et al.* (2010) estudaram os efeitos do envelhecimento e da ovariectomia na expressão de PSD-95, em hipocampo de ratos fêmeas, ao que se observou que a expressão pós-natal de PSD-95 se correlacionava com a flutuação das hormonas sexuais femininas circulantes, como o estrogénio. O nível de PSD-95 neonatal era muito baixo, porém aumentou dramaticamente durante o 1M, atingindo um pico ao P30, mantendo-se estável a P60 e diminuindo significativamente no hipocampo idoso (18M)⁶⁴⁹. Outros estudos anteriores, nos quais a idade mais avançada estudada foi de apenas P50⁶⁵⁰, 3M⁶⁵¹ ou 6M¹²¹, onde surgiram aumentos com a idade, bem como os dados do presente estudo, não permitem traçar um perfil que determine se a PSD-95, no hipocampo, varia dos 4M aos 21M. Sem embargo, em hipocampo adulto (P60), a ovariectomia fez diminuir significativamente a expressão de PSD-95 durante a 1.ª semana, recuperando para níveis normais à 2.ª semana⁶⁴⁹. Em suma, Zhang *et al.* (2010)⁶⁴⁹ concluíram que as hormonas ovarianas circulantes podem ser fundamentais na regulação das sinapses excitatórias do hipocampo, pois o perfil de expressão da PSD-95 está correlacionado com a progressão da sinaptogénese durante o desenvolvimento do hipocampo e com a alteração relacionada ao envelhecimento, em tarefas de aprendizagem e memória, o que desvela o papel central que a PSD-95 desempenha no hipocampo.

5.2.5. Proteínas estruturais de jangadas lipídicas: Caveolina-1

Uma proteína estrutural primária da membrana plasmática e um componente regulador de cavéolas⁶⁵² com participação em diversos processos fisiológicos, como a formação de vesículas; metabolismo de fosfolípidos de membrana; transporte de colesterol e sinalização celular⁶⁵³ – a caveolina-1 – mostra-se relativamente estável quanto aos seus níveis de expressão, neste estudo, entre machos e fêmeas, exceto nos 12M. Os níveis desta proteína mantêm-se preservados ao longo da idade, quer para ambos os sexos. Tomados estes dados em conjunto, não nos é indicado a existência de alguma alteração relevante da biogénese de cavéolas, no envelhecimento, e, por consequência, da motilidade das proteínas e fluidez da membrana plasmática, de forma diferente entre os dois sexos, apesar do número de amostras utilizadas não permita conclusões mais evidentes.

Descobertas independentes, por vários laboratórios, identificaram a caveolina-1 como um fator determinante para a aquisição de um fenótipo senescente⁴⁸⁶. A expressão aumentada de caveolina-1 foi causalmente associada ao desenvolvimento da senescência replicativa e da senescência prematura induzida por stresse⁴⁸⁶. A sua subexpressão foi também causalmente associada ao desenvolvimento da senescência prematura, o que apoia a hipótese de que, tanto a abundância, como a escassez de sinalização mediada por caveolina-1, promove senescência⁴⁸⁶.

A caveolina-1 é a principal proteína estrutural das cavéolas, estando envolvida na organização e desenvolvimento sináptico e na sinalização⁶⁵⁴. Head *et al.* (2010) descreveram que ratinhos com caveolina-1^{KO} demonstravam um envelhecimento acelerado⁵⁹³. Park *et al.* (2003) descrevem que ratinhos com caveolina-1^{KO} apresentava uma menor longevidade⁶⁵⁵. Nam *et al.* (2019) relatam que o envelhecimento cerebral acelerado, induzido por D-galactose, envolvendo a acumulação de stresse oxidativo (tal como ocorre naturalmente em humanos durante o envelhecimento), induz a subexpressão de caveolina-1, no hipocampo, que está associado ao fenótipo de envelhecimento, na mesma região cerebral⁶⁵⁴. Noutros animais com indução da senescência cerebral por D-galactose exibem fenótipos de envelhecimento cerebral, incluindo perda de memória e a redução da neurogénese, no hipocampo adulto, fornecendo mais provas de que a caveolina-1 seja um indicador molecular crítico do envelhecimento cerebral e neurodegeneração^{492,593,656}.

Mais estudos, indicam que a subexpressão de caveolina-1 ou da caveolina-1^{KO} acelera a senescência ao inativar Sirt1^{492,593} – uma proteína que promove a neurogênese, crescimento dendrítico/axonal e a plasticidade sináptica⁶⁵⁷.

Head *et al.* (2008), ao estudarem o cérebro isquémico, verificaram que a caveolina-1 era necessária para a neuroproteção contra a lesão celular e morte⁶⁵⁸.

Semelhantemente, em trabalhos anteriores, do grupo de Mandyam *et al.* (2017)⁶⁵⁹, foi demonstrado que a caveolina-1 e componentes sinápticos [e.g., PSD-95; recetores NMDA e AMPA; cinase do tipo B do recetor ligado a tropomiosina (TrkB, do inglês, *tropomyosin-related receptor kinase B*)], estão diminuídos no cérebro envelhecido, especificamente em sinaptossomas e membranas/jangadas lipídicas (MJLs) isoladas a partir de hipocampo^{461,593}. Na composição lipídica da membrana, as alterações relacionadas à idade e à perda de componentes sinápticos funcionais (pré- e pós-sinápticos) podem contribuir para uma plasticidade inadaptada do cérebro envelhecido⁶⁵⁹. Mandyam *et al.* (2017)⁶⁵⁹ mostram ainda, em ratinhos idosos (20M) submetidos a testes cognitivos, que a sobre-expressão de caveolina-1 aumentou significativamente a arborização dendrítica dos neurónios da CA1 no str. rad, resultados estes, semelhantes aos observados em ratinhos adultos (6M). Além disso, a sobre-expressão de caveolina-1, em animais idosos, aumentou a formação de MJLs; o recrutamento de TrkB para as MJLs; e a plasticidade estrutural de neurónios do hipocampo, o que talvez contribua para a gênese de neurites e manutenção/estabilização das sinapses⁶⁵⁹.

Rougé *et al.* (2013)⁶⁶⁰ confirmaram que a caveolina-1 era indetetável em neurónios de hipocampo de ratinhos macho adultos-jovens (2M), estando entretanto presente nos neurónios dos mesmos em idade avançada (24M). Curiosamente, o fenótipo senescente pode ser revertido pela diminuição dos níveis de caveolina-1⁶⁶¹⁻⁶⁶³. Este conjunto de resultados factuais sugere fortemente que, a nível geral, uma das facetas do processo de envelhecimento neuronal é iniciada nas jangadas lipídicas de membrana e depende da abundância de caveolina-1, mas também de colesterol⁶⁶⁰. De grande pertinência realçar que não podemos excluir a possibilidade de que as alterações no perfil e conteúdo de jangadas lipídicas, durante o envelhecimento, sejam eventos compensatórios.

As caveolinas são necessárias para acoplar os ER α , β associados à membrana a mGluRs específicos⁶⁶⁴. Meitzen *et al.* (2019)⁶⁶⁵ investigaram se a expressão de caveolina-1 e caveolina-3 diferia por sexo, no modelo de rato. A análise de qPCR da expressão de *Cav1* (que codifica para a caveolina-1) não diferiu por sexo, no hipocampo neonatal (P8). No hipocampo adulto (P60), a expressão de *Cav1* encontrou-se diminuída em fêmeas. Estes dados indicam que a expressão de caveolina-1 pode ser regulada durante ao longo da idade de uma forma dessemelhante específica do sexo⁶⁶⁵. Dado que a caveolina-1 é necessária para organizar a via ER α /mGluRs⁶⁶⁴, é possível que o aumento da expressão da caveolina-1, nos machos, seja responsável por permitir a potenciação induzida por estradiol da sinalização glutamatérgica, permitindo o tráfego de ER α ⁶⁶⁵. Consistente com esta especulação, parece que a expressão de caveolina-1 está envolvida com diversos modelos de plasticidade sináptica^{594,666,667}; e resultados de Liu *et al.* (2013), em ratos macho, sugeriram que a caveolina-1 pode desempenhar um papel relevante na modulação da plasticidade sináptica ao longo da vida e a sua subexpressão, no hipocampo, pode contribuir para o comprometimento da plasticidade sináptica, no processo de envelhecimento fisiológico⁶⁵⁶. Esta intrigante noção pode ser útil na tomada de decisões estratégicas e na prevenção da perda de plasticidade sináptica induzida pelo envelhecimento.

5.2.6. Hidroxilase de tirosina

Neste trabalho, estudou-se também a expressão de TH⁶⁶⁸, responsável pela conversão da tirosina em L-DOPA, um precursor na biossíntese de dopamina, noradrenalina e adrenalina. Por isso, este enzima é

considerado um marcador de terminais noradrenérgicos e dopaminérgicos do SNC⁶⁶⁹⁻⁶⁷¹, estando a sua expressão está associada às atividades e funções de neurónios noradrenérgicos e dopaminérgicos no cérebro. A noradrenalina exerce ações neuromoduladoras potentes. O principal efeito da noradrenalina é reduzir a atividade basal e aumentar a capacidade de resposta dos seus neurónios-alvo a novos estímulos sinápticos⁶⁷²; não obstante, facilita ainda a plasticidade sináptica, incluindo a LTP, no neocórtex, hipocampo, amígdala e no cerebelo^{341,673,674}. A dopamina (uma catecolamina) é outro neuromodulador presente principalmente no SNC de humanos e de outros mamíferos e desempenha um papel central na atividade nervosa, incluindo o hipocampo⁶⁷⁵⁻⁶⁷⁷. Pode regular muitos processos biológicos no sistema cardiovascular e de secreção de hormonas, bem como gerir toda uma variedade de funções cognitivas do SNC, tais como a memória, comportamento, aprendizagem e a emoção⁶⁷⁸⁻⁶⁸². A concentração anormal de dopamina, em fluidos biológicos, foi considerada ser um indicador para o diagnóstico de várias doenças neurológicas⁶⁸³, incluindo assim, a esquizofrenia⁶⁸⁴, doença de Parkinson⁶⁸⁵, síndrome das pernas inquietas⁶⁸⁶ e a doença de Alzheimer⁶⁸⁷. Uma expressão reduzida de TH foi tomada como um índice de envelhecimento⁶⁸⁸.

Neste trabalho não foram observadas alterações à expressão de TH no cérebro de ratos macho ou fêmea. No entanto, estudos anteriores mostraram o declínio da inervação noradrenérgica e dopaminérgica no hipocampo em modelos animais e no cérebro humano³⁴⁴. De facto, Twarkowski & Manahan-Vaughan (2016) descreveram, no modelo de rato, a perda de modulação catecolaminérgica e da plasticidade sináptica, no hipocampo, como a causa da perda de função cognitiva nestes animais³⁴⁴.

Gould *et al.* (2020)⁶⁸⁹ descreveram uma via de modulação *redox* dependente de dopamina, no hipocampo de ratinhos macho, que promove a consolidação da memória. Nomeadamente, após a aquisição de novas informações, a redutase de quinona do tipo 2 (QR2, do inglês, *quinone reductase 2*) é suprimida pelo microRNA-182 (miR-182) na região da CA1, por meio da ativação do recetor D₁ de dopamina. Isto reduz as espécies reativas de oxigénio geradas pela atividade da QR2; um processo que altera as propriedades intrínsecas dos interneurónios da CA1, 3 h após a aprendizagem, numa forma de eustresse oxidativo. Curiosamente, as experiências *de novidade* diminuíram a expressão de QR2, predominantemente em interneurónios inibitórios. A via QR2 está cronicamente subativada em animais idosos, resultando na subexpressão de miR-182 e sobre-expressão de QR2, levando isto assim a stresse oxidativo cumulativo. Esta via, potenciada pela sinalização da dopamina na CA1, aparenta ser crucial para formação de novas memórias e um novo alvo para o aumento da memória no envelhecimento e doenças dependentes da idade.

O declínio da sinalização de dopamina no cérebro, durante o envelhecimento, está associado ao aparecimento de deficiências neurológicas que debilitam a função cognitiva. Lubec *et al.* (2021)⁶⁹⁰ descrevem que a inibição do transportador de dopamina (DAT, do inglês, *dopamine transporter*), uma proteína transmembranar responsável pela recaptção de dopamina da fenda sináptica e pelo término da transmissão dopaminérgica⁶⁹¹, pelo aumento níveis de dopamina nas regiões do cérebro associadas à cognição, resultando na potenciação da neurotransmissão e restauração coincidente das espinhas dendríticas no hipocampo de ratos, indicativo do restabelecimento da plasticidade sináptica induzida por dopamina em roedores envelhecidos. Além disso, o fármaco restaurou a aprendizagem e a memória em ratos idosos comparáveis ao seu desempenho quando em jovem⁶⁹⁰. A inibição de DAT normalizador o declínio na função cognitiva, relacionado à idade, a nível sináptico, por meio do aumento da sinalização de dopamina.

6. Conclusão

Neste trabalho foram consagrados dois focos distintos. O primeiro [1], em questões relacionadas à epileptogênese; e o segundo [2], em questões referentes ao processo de envelhecimento sináptico e o seu dimorfismo sexual. Ambos foram estudados com o propósito de poder prever as alterações da plasticidade sináptica, junto com a composição de jangadas lipídicas.

No primeiro foco [1], caracterizou-se essencialmente a expressão de proteínas de sinaptossomas, isolados a partir de fatias de hipocampo (do modelo de rato) em que se induziu *in vitro* dois tipos de atividade epileptiforme: [1.1] A atividade intercrítica, induzida pela depleção de Mg^{2+} (mimetizando fase de epileptogênese da epilepsia) e [1.2] a atividade crítica, induzida pelo fármaco antagonista dos recetores GABA_A – bicuculina – (mimetizando a fase crónica da epilepsia). Foi também investigado, o contributo da sinalização do VIP endógeno, nos recetores VPAC₁, relativamente às alterações observadas, utilizando para tal fim o antagonista seletivo dos recetores VPAC₁ – PG97-269. Assim, observou-se que: [1.1] Após a atividade *intercrítica*, detetou-se um aumento dos níveis de GluA2, e uma diminuição nos níveis de GluA1, razão GluA1/GluA2, caveolina-1 e de flotilina-1. O bloqueio do recetor VPAC₁ influenciou os níveis de expressão dos canais K_v4.2, caveolina-1 e flotilina-1; significando que a sinalização pelo VIP endógeno não é inócua quanto à expressão destas proteínas de relevância, parecendo conferir até uma ação neuroprotetora, numa tentativa de reequilíbrio do sistema. [1.2] Após atividade *crítica*, observou-se uma diminuição na expressão das proteínas-alvo coincidentes com as da atividade intercrítica. O bloqueio do recetor VPAC₁ interferiu com a expressão de: GluA1 e caveolina-1; significando que a ativação destes recetores pelo VIP endógeno tende, nesta situação, a revelar-se tóxica, promovendo uma ação contrária ao reequilíbrio do sistema.

Apesar deste trabalho ter desvelado alguns mecanismos moleculares que podem basear as alterações na expressão da LTP e as alterações sinápticas, em modelos *in vitro* de atividade epileptiforme; serão necessários mais dados, de diversas naturezas, para que compreendamos substancialmente a mecânica (pato)fisiológica e, no futuro, dela fazer uso com a finalidade de estrategicamente contornar, de um modo mais fino, patologias como a epilepsia refratária, que teima em ser refratária perante às atuais terapias farmacológicas. Complementarmente, seria interessante, além de estudos bioquímicos de quantificação específica de proteína, fazer estudos eletrofisiológicos; quer em modelos *in vitro*, como em *in vivo*. Uma vez que neste trabalho os níveis de expressão das proteínas de jangadas lipídicas se mostraram bastante alterados, não deixaria de ser pertinente a organização de estudos no âmbito da lipidómica. Uma das questões a descobrir é se as alterações aferidas refletem um mecanismo de autoproteção, visando o equilíbrio, ou se são apenas um revérbero de uma harmonia disruptiva, face à estimulação submetida.

No que toca ao segundo foco [2], foi elaborada uma perspetiva temporal e sexual dimórfica, em ratos em quatro etapas diferentes da vida. Foi avaliado os níveis de expressão de proteínas de sinaptossomas, isolados de hipocampo; em que se verificou: [2.1] Em comparação com os machos, uma descida dos níveis de GluA1 e sinaptofisina, em ratos fêmea adultos-jovem; e uma subida nos níveis de gefirina, em adulto, e nos de caveolina-1, nos de meia-idade. [2.2] Fêmeas e machos divergiram quanto aos níveis de expressão de GluA1, K_v4.2 e sinaptofisina, apontando diferenças estruturais e funcionais na composição de proteínas sinápticas. [2.3] Com a idade, há uma diminuição do GluA1, logo após a idade jovem, em macho, que depois se mantém estável ao longo da vida; detetando-se também um aumento de sinaptofisina, em machos, em idade avançada, comparativamente à idade mais jovem. Nesta parte do trabalho, são abertas portas para um conjunto de pontos interessantes/divergentes que podem servir de base para futuros outros estudos, mais seletivos, com relação aos processos associados ao envelhecimento e/ou dependentes do sexo.

7. Referências

1. Bartsch, T. *The clinical neurobiology of the hippocampus: An integrative view*. (Oxford University Press, Oxford, UK, 2012).
2. Kesner, R. P. & Rolls, E. T. A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **48**, 92–147 (2015).
3. Strange, B. A., Witter, M. P., Lein, E. S. & Moser, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 655–669 (2014).
4. Bakker, A., Kirwan, C. B., Miller, M. & Stark, C. E. L. Pattern separation in the human hippocampal CA3 and dentate gyrus. *Science* **319**, 1640–1642 (2008).
5. Mueller, S. G., Chao, L. L., Berman, B. & Weiner, M. W. Evidence for functional specialization of hippocampal subfields detected by MR subfield volumetry on high resolution images at 4T. *Neuroimage* **56**, 851–857 (2011).
6. Chételat, G. *et al.* Three-dimensional surface mapping of hippocampal atrophy progression from MCI to AD and over normal aging as assessed using voxel-based morphometry. *Neuropsychologia* **46**, 1721–1731 (2008).
7. Cramer, S. C. *et al.* Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* **134**, 1591–1609 (2011).
8. Leuner, B. & Gould, E. Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annu. Rev. Psychol.* **61**, 111–140 (2010).
9. Bliss, T. & Schoepfer, R. Controlling the Ups and Downs of Synaptic Strength. *Science* **304**, 973–974 (2004).
10. Pastalkova, E. *et al.* Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* **313**, 1141–1444 (2006).
11. Mufson, E. J. *et al.* Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer’s disease. *Neuroscience* **309**, 51–67 (2015).
12. Lustosa, Í. R., Soares, J. I., Biagini, G. & Lukoyanov, N. V. Neuroplasticity in cholinergic projections from the basal forebrain to the basolateral nucleus of the amygdala in the kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5688 (2019).
13. Finke, C., Bruehl, H., Düzel, E., Heekeren, H. R. & Ploner, C. J. Neural correlates of short-term memory reorganization in humans with hippocampal damage. *J. Neurosci.* **33**, 11061–11069 (2013).
14. Ryan, T. J., Roy, D. S., Pignatelli, M., Arons, A. & Tonegawa, S. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science* **348**, 1007–1013 (2015).
15. Bartsch, T. *et al.* Selective neuronal vulnerability of human hippocampal CA1 neurons: Lesion evolution, temporal course, and pattern of hippocampal damage in diffusion-weighted MR imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 1836–1845 (2015).
16. McEwen, B. S. The plasticity of the hippocampus is the reason for its vulnerability. *Semin. Neurosci.* **6**, 239–246 (1994).
17. Aranzi, G. C. *De Humano Foetu Liber*. (Apud Jacobum Brechtanum, 1587).
18. Golgi, C. V. Sulla fina anatomia del grande piede d’Hippocampo. in *Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso* 161–192 (Rivista Sperimentale di Freniatria e di Medicina

- Legale, 1883).
19. Ramón y Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés: Cervelet, cerveau moyen, rétine, couche optique, corps strié, écorce cérébrale générale & régionale, grand sympathique*. (A. Maloine, 1911).
 20. Van Strien, N. M., Cappaert, N. L. M. & Witter, M. P. The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 272–282 (2009).
 21. Squire, L. R. & Zola-Morgan, J. T. The cognitive neuroscience of human memory since H.M. *Annu. Rev. Neurosci.* **34**, 259–288 (2011).
 22. Bartsch, T. & Wulff, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience* **309**, 1–16 (2015).
 23. Amaral, D. G. & Lavenex, P. *The Hippocampus Book*. (Oxford Univ. Press, 2007).
 24. Neves, G., Cooke, S. F. & Bliss, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: A neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 65–75 (2008).
 25. Gross, D. W. W., Misaghi, E., Steve, T. A. A., Wilman, A. H. H. & Beaulieu, C. Curved multiplanar reformatting provides improved visualization of hippocampal anatomy. *Hippocampus* **30**, 156–161 (2020).
 26. Palomero-Gallagher, N., Bidmon, H.-J. & Zilles, K. AMPA, kainate, and NMDA receptor densities in the hippocampus of untreated male rats and females in estrus and diestrus. *J. Comp. Neurol.* **459**, 468–474 (2003).
 27. Flores, R. *et al.* Characterization of hippocampal subfields using ex vivo MRI and histology data: Lessons for in vivo segmentation. *Hippocampus* **30**, 545–564 (2019).
 28. Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A. & Tonegawa, S. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 361–372 (2004).
 29. Murray, A. J. *et al.* Parvalbumin-positive CA1 interneurons are required for spatial working but not for reference memory. *Nat. Neurosci.* **14**, 297–299 (2011).
 30. Lavenex, P. & Amaral, D. G. Hippocampal-neocortical interaction: A hierarchy of associativity. *Hippocampus* **10**, 420–430 (2000).
 31. Kang, J. & Shen, J. Cell-autonomous role of Presenilin in age-dependent survival of cortical interneurons. *Mol. Neurodegener.* **15**, 72 (2020).
 32. Freund, T. F. & Buzsáki, G. Interneurons of the Hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347–470 (1996).
 33. Paulsen, O. & Moser, E. I. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **21**, 273–278 (1998).
 34. Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 793–807 (2004).
 35. Spruston, N. Pyramidal neurons: Dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 206–221 (2008).
 36. Kandel, E. *Principles of neural science*. (McGraw Hill Professional, 2013).
 37. Castro-Alamancos, M. A. & Connors, B. W. Thalamocortical synapses. *Prog. Neurobiol.* **51**, 581–606 (1997).

38. Aksoy-Aksel, A. & Manahan-Vaughan, D. Synaptic strength at the temporoammonic input to the hippocampal CA1 region in vivo is regulated by NMDA receptors, metabotropic glutamate receptors and voltage-gated calcium channels. *Neuroscience* **309**, 191–199 (2015).
39. Wheeler, D. W. *et al.* Hippocampome.org: A knowledge base of neuron types in the rodent hippocampus. *Elife* **4**, e09960 (2015).
40. Amaral, D. G., Scharfman, H. E. & Lavenex, P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* **163**, 3–790 (2007).
41. Lisman, J. E. Relating hippocampal circuitry to function: Recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* **22**, 233–242 (1999).
42. Lisman, J. E. & Otmakhova, N. A. Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: Elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* **11**, 551–568 (2001).
43. Wulff, P. *et al.* Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3561–3566 (2009).
44. Battaglia, F. P., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C. M. A. & Wiener, S. I. The hippocampus: Hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn. Sci.* **15**, 310–318 (2011).
45. Buzsáki, G. & Moser, E. I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci.* **16**, 130–138 (2013).
46. Kolb, B. & Muhammad, A. Harnessing the power of neuroplasticity for intervention. *Front. Hum. Neurosci.* **8**, 377 (2014).
47. Kolb, B. & Gibb, R. Searching for the principles of brain plasticity and behavior. *Cortex* **58**, 251–260 (2014).
48. de Lartigue, G. & Xu, C. Mechanisms of vagal plasticity influencing feeding behavior. *Brain Res.* **1693**, 146–150 (2018).
49. Hulme, S. R., Jones, O. D. & Abraham, W. C. Emerging roles of metaplasticity in behaviour and disease. *Trends Neurosci.* **36**, 353–362 (2013).
50. Jones, O. D. Astrocyte-mediated metaplasticity in the hippocampus: Help or hindrance? *Neuroscience* **309**, 113–124 (2015).
51. Michaelis, E. K. Selective Neuronal Vulnerability in the Hippocampus: Relationship to Neurological Diseases and Mechanisms for Differential Sensitivity of Neurons to Stress. in *The Clinical Neurobiology of the Hippocampus: An Integrative view* (Oxford University Press, 2012). doi:10.1093/acprof:oso/9780199592388.003.0004.
52. Schmidt-Kastner, R. & Freund, T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* **40**, 599–636 (1991).
53. Bartsch, T. *et al.* Selective affection of hippocampal CA-1 neurons in patients with transient global amnesia without long-term sequelae. *Brain* **129**, 2874–2884 (2006).
54. Bartsch, T. *et al.* Focal mr spectroscopy of hippocampal ca-1 lesions in transient global amnesia. *Neurology* **70**, 1030–1035 (2008).
55. Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B. & Plum, F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* **11**, 491–498 (1982).

56. Kirino, T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* **239**, 57–69 (1982).
57. Coultrap, S. J., Nixon, K. M., Alvestad, R. M., Fernando Valenzuela, C. & Browning, M. D. Differential expression of NMDA receptor subunits and splice variants among the CA1, CA3 and dentate gyrus of the adult rat. *Mol. Brain Res.* **135**, 104–111 (2005).
58. Gee, C. E. *et al.* NMDA receptors and the differential ischemic vulnerability of hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 2595–2603 (2006).
59. Quintana, P., Alberi, S., Hakkoum, D. & Muller, D. Glutamate receptor changes associated with transient anoxia/hypoglycaemia in hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 975–983 (2006).
60. Newrzella, D. *et al.* The functional genome of CA1 and CA3 neurons under native conditions and in response to ischemia. *BMC Genomics* **8**, 370 (2007).
61. Butler, T. R. *et al.* Selective vulnerability of hippocampal cornu ammonis 1 pyramidal cells to excitotoxic insult is associated with the expression of polyamine-sensitive N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors. *Neuroscience* **165**, 525–534 (2010).
62. Wang, X. & Michaelis, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* **2**, 12 (2010).
63. Harry, G. J. & D’Hellencourt, C. L. Dentate gyrus: Alterations that occur with hippocampal injury. *Neurotoxicology* **24**, 343–356 (2003).
64. Avignone, E., Frenguelli, B. G. & Irving, A. J. Differential responses to NMDA receptor activation in rat hippocampal interneurons and pyramidal cells may underlie enhanced pyramidal cell vulnerability. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 3077–3090 (2005).
65. O’Dell, C. M., Das, A., Wallace, G., Ray, S. K. & Banik, N. L. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: A review. *J. Neurosci. Res.* **90**, 913–924 (2012).
66. Sloviter, R. S. & Bumanglag, A. V. Defining ‘epileptogenesis’ and identifying ‘antiepileptogenic targets’ in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* **69**, 3–15 (2013).
67. Cendes, F., Sakamoto, A. C., Spreafico, R., Bingaman, W. & Becker, A. J. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol.* **128**, 21–37 (2014).
68. Coras, R. & Blümcke, I. Clinico-pathological subtypes of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy and their differential impact on memory impairment. *Neuroscience* **309**, 153–161 (2015).
69. Burke, S. N. & Barnes, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 30–40 (2006).
70. West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G. & Troncoso, J. C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer’s disease. *Lancet* **344**, 769–772 (1994).
71. Lister, J. P. & Barnes, C. A. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch. Neurol.* **66**, 829–833 (2009).
72. La Joie, R. *et al.* Differential effect of age on hippocampal subfields assessed using a new high-resolution 3T MR sequence. *Neuroimage* **53**, 506–514 (2010).

73. Mueller, S. G. & Weiner, M. W. Selective effect of age, Apo e4, and Alzheimer's disease on hippocampal subfields. *Hippocampus* **19**, 558–564 (2009).
74. Shing, Y. L. *et al.* Hippocampal Subfield Volumes: Age, Vascular Risk, and Correlation with Associative Memory. *Front. Aging Neurosci.* **3**, 1–8 (2011).
75. Wisse, L. E. M. *et al.* Hippocampal subfield volumes at 7T in early Alzheimer's disease and normal aging. *Neurobiol. Aging* **35**, 2039–2045 (2014).
76. Burke, S. N. & Barnes, C. A. Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in Neurosciences* vol. 33 153–161 (2010).
77. Burger, C. Region-specific genetic alterations in the aging hippocampus: Implications for cognitive aging. *Frontiers in Aging Neuroscience* vol. 2 140 (2010).
78. Olariu, A., Cleaver, K. M. & Cameron, H. A. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. *J. Comp. Neurol.* **501**, 659–667 (2007).
79. Südhof, T. C. The presynaptic active zone. *Neuron* vol. 75 11–25 (2012).
80. Bayés, Á. *et al.* Characterization of the proteome, diseases and evolution of the human postsynaptic density. *Nat. Neurosci.* **14**, 19–21 (2011).
81. Arendt, D. The Evolutionary Assembly of Neuronal Machinery. *Curr. Biol.* **30**, R603–R616 (2020).
82. Hanus, C., Ehrensperger, M. V. & Triller, A. Activity-dependent movements of postsynaptic scaffolds at inhibitory synapses. *J. Neurosci.* **26**, 4586–4595 (2006).
83. Okabe, S. Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and Cellular Neuroscience* vol. 34 503–518 (2007).
84. Sheng, M. & Hoogenraad, C. C. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annual Review of Biochemistry* vol. 76 823–847 (2007).
85. Newpher, T. M. & Ehlers, M. D. Glutamate Receptor Dynamics in Dendritic Microdomains. *Neuron* vol. 58 472–497 (2008).
86. Choquet, D. & Triller, A. The dynamic synapse. *Neuron* vol. 80 691–703 (2013).
87. Petrini, E. M. & Barberis, A. Diffusion dynamics of synaptic molecules during inhibitory postsynaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 8 300 (2014).
88. Pizzarelli, R. *et al.* Tuning GABAergic Inhibition: Gephyrin Molecular Organization and Functions. *Neuroscience* vol. 439 125–136 (2020).
89. Catterall, W. A. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–23 (2011).
90. Yoon, T. Y. & Munson, M. SNARE complex assembly and disassembly. *Current Biology* vol. 28 R397–R401 (2018).
91. Emes, R. D. & Grant, S. G. N. Evolution of synapse complexity and diversity. *Annual Review of Neuroscience* vol. 35 111–131 (2012).
92. Parker, M. J., Zhao, S., Bredt, D. S., Sanes, J. R. & Feng, G. PSD93 Regulates Synaptic Stability at Neuronal Cholinergic Synapses. *J. Neurosci.* **24**, 378–388 (2004).

93. Bemben, M. A., Shipman, S. L., Nicoll, R. A. & Roche, K. W. The cellular and molecular landscape of neuroligins. *Trends in Neurosciences* vol. 38 496–505 (2015).
94. Keith, D. & El-Husseini, A. Excitation control: Balancing PSD-95 function at the synapse. *Front. Mol. Neurosci.* **1**, 4 (2008).
95. Tyagarajan, S. K. & Fritschy, J. M. Gephyrin: A master regulator of neuronal function? *Nature Reviews Neuroscience* vol. 15 141–156 (2014).
96. Groeneweg, F. L., Trattnig, C., Kuhse, J., Nawrotzki, R. A. & Kirsch, J. Gephyrin: a key regulatory protein of inhibitory synapses and beyond. *Histochemistry and Cell Biology* vol. 150 489–508 (2018).
97. Harvey, K. *et al.* The GDP-GTP exchange factor collybistin: An essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J. Neurosci.* **24**, 5816–5826 (2004).
98. Kins, S., Betz, H. & Kirsch, J. Collybistin, a newly identified brain-specific GEF, induces submembrane clustering of gephyrin. *Nat. Neurosci.* **3**, 22–29 (2000).
99. Boeckers, T. M. The postsynaptic density. *Cell and Tissue Research* vol. 326 409–422 (2006).
100. Craig, A. M., Graf, E. R. & Linhoff, M. W. How to build a central synapse: Clues from cell culture. *Trends in Neurosciences* vol. 29 8–20 (2006).
101. Fujiyama, F., Stephenson, F. A. & Bolam, J. P. Synaptic localization of GABA_A receptor subunits in the substantia nigra of the rat: effects of quinolinic acid lesions of the striatum. *Eur. J. Neurosci.* **15**, 1961–1975 (2002).
102. Hafidi, A. & Hillman, D. E. Distribution of glutamate receptors Glur 2/3 and NR1 in the developing rat cerebellum. *Neuroscience* **81**, 427–436 (1997).
103. Knott, G. W., Quairiaux, C., Genoud, C. & Welker, E. Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice. *Neuron* **34**, 265–273 (2002).
104. Chen, J. *et al.* Genotypic association of the DAOA gene with resting-state brain activity in major depression. *Mol. Neurobiol.* **46**, 361–373 (2012).
105. van Versendaal, D. *et al.* Elimination of Inhibitory Synapses Is a Major Component of Adult Ocular Dominance Plasticity. *Neuron* **74**, 374–383 (2012).
106. Chiu, C. Q. *et al.* Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science* (80-.). **340**, 759–762 (2013).
107. Villa, K. L. *et al.* Inhibitory Synapses Are Repeatedly Assembled and Removed at Persistent Sites In Vivo. *Neuron* **89**, 756–769 (2016).
108. Chen, J. L. *et al.* Clustered Dynamics of Inhibitory Synapses and Dendritic Spines in the Adult Neocortex. *Neuron* **74**, 361–373 (2012).
109. Leonoudakis, D., Braithwaite, S. P., Beattie, M. S., Beattie, E. C. & Leonoudakis, D. D. TNF α -induced AMPA-receptor trafficking in CNS neurons; relevance to excitotoxicity? *Neuron Glia Biol.* **1**, 263–273 (2004).
110. Hollmann, M. Cloned Glutamate Receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31–108 (1994).
111. Chittajallu, R., Braithwaite, S. P., Clarke, V. R. J. & Henley, J. M. Kainate receptors: Subunits, synaptic localization and function. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 20 26–35 (1999).
112. Wood, I. K. *Neuroscience: Exploring the brain. Journal of Child and Family Studies* vol. 5

- (Wolters Kluwer, 1996).
113. Nicholls, R. E. *et al.* Transgenic Mice Lacking NMDAR-Dependent LTD Exhibit Deficits in Behavioral Flexibility. *Neuron* **58**, 104–117 (2008).
 114. Kouvaros, S. & Papatheodoropoulos, C. Theta burst stimulation-induced LTP: Differences and similarities between the dorsal and ventral CA1 hippocampal synapses. *Hippocampus* **26**, 1542–1559 (2016).
 115. Citri, A., Soler-Llavina, G., Bhattacharyya, S. & Malenka, R. C. *N*-methyl-d-aspartate receptor- and metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression are differentially regulated by the ubiquitin-proteasome system. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 1443–1450 (2009).
 116. Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. & Seeburg, P. H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science (80-.)*. **269**, 1737–1740 (1995).
 117. Li, B., Otsu, Y., Murphy, T. H. & Raymond, L. A. Developmental Decrease in NMDA Receptor Desensitization Associated with Shift to Synapse and Interaction with Postsynaptic Density-95. *J. Neurosci.* **23**, 11244–11254 (2003).
 118. Lin, Y., Skeberdis, V. A., Francesconi, A., Bennett, M. V. L. & Zukin, R. S. Postsynaptic density protein-95 regulates NMDA channel gating and surface expression. *J. Neurosci.* **24**, 10138–10148 (2004).
 119. Lin, Y., Jover-Mengual, T., Wong, J., Bennett, M. V. L. & Zukin, R. S. PSD-95 and PKC converge in regulating NMDA receptor trafficking and gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19902–19907 (2006).
 120. Roche, K. W. *et al.* Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* **4**, 794–802 (2001).
 121. Sans, N. *et al.* A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J. Neurosci.* **20**, 1260–1271 (2000).
 122. Yudowski, G. A., Olsen, O., Adesnik, H., Marek, K. W. & Brecht, D. S. Acute Inactivation of PSD-95 Destabilizes AMPA Receptors at Hippocampal Synapses. *PLoS One* **8**, e53965 (2013).
 123. Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* vol. 40 361–379 (2003).
 124. El-Husseini, A. E., Schnell, E., Chetkovich, D. M., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* **290**, 1364–8 (2000).
 125. Schnell, E. *et al.* Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13902–13907 (2002).
 126. Stein, V., House, D. R. C., Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J. Neurosci.* **23**, 5503–5506 (2003).
 127. Feng, G. *et al.* Dual-requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science (80-.)*. **282**, 1321–1324 (1998).
 128. Baer, K. *et al.* Postsynaptic clustering of γ -aminobutyric acid type a receptors by the γ 3 subunit in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12860–12865 (1999).
 129. Baer, K. *et al.* Rescue of γ 2 subunit-deficient mice by transgenic overexpression of the GABA_A

- receptor $\gamma 2S$ or $\gamma 2L$ subunit isoforms. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2639–2643 (2000).
130. Dumoulin, A., Lévi, S., Riveau, B., Gasnier, B. & Triller, A. Formation of mixed glycine and GABAergic synapses in cultured spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 3883–3892 (2000).
 131. Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M. & Lüscher, B. Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the $\gamma 2$ subunit and gephyrin. *Nat. Neurosci.* **1**, 563–571 (1998).
 132. Fischer, F. *et al.* Reduced synaptic clustering of GABA and glycine receptors in the retina of the gephyrin null mutant mouse. *J. Comp. Neurol.* **427**, 634–648 (2000).
 133. Meier, J. & Grantyn, R. Preferential accumulation of GABA_A receptor $\gamma 2L$, not $\gamma 2S$, cytoplasmic loops at rat spinal cord inhibitory synapses. *J. Physiol.* **559**, 355–365 (2004).
 134. Schweizer, C. *et al.* The $\gamma 2$ subunit of GABAA receptors is required for maintenance of receptors at mature synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**, 442–450 (2003).
 135. Pinto, J. G. A., Hornby, K. R., Jones, D. G. & Murphy, K. M. Developmental changes in GABAergic mechanisms in human visual cortex across the lifespan. *Front. Cell. Neurosci.* **4**, (2010).
 136. Fritschy, J. M., Panzanelli, P. & Tyagarajan, S. K. Molecular and functional heterogeneity of GABAergic synapses. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 69 2485–2499 (2012).
 137. Dahan, M. *et al.* Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. *Science (80-.)*. **302**, 442–445 (2003).
 138. Lardi-Studler, B. *et al.* Vertebrate-specific sequences in the gephyrin E-domain regulate cytosolic aggregation and postsynaptic clustering. *J. Cell Sci.* **120**, 1371–1382 (2007).
 139. Guerriero, R. M., Giza, C. C. & Rotenberg, A. Glutamate and GABA Imbalance Following Traumatic Brain Injury. *Current Neurology and Neuroscience Reports* vol. 15 27 (2015).
 140. Giza, C. C. & Hovda, D. A. The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery* **75**, S24–S33 (2014).
 141. Arundine, M. & Tymianski, M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 61 657–668 (2004).
 142. Li, Y. F., Jackson, K. L., Stern, J. E., Rabeler, B. & Patel, K. P. Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **291**, 2847–2856 (2006).
 143. Schummers, J., Mariño, J. & Sur, M. Synaptic integration by V1 neurons depends on location within the orientation map. *Neuron* **36**, 969–978 (2002).
 144. Voytenko, S. V. & Galazyuk, A. V. Intracellular Recording Reveals Temporal Integration in Inferior Colliculus Neurons of Awake Bats. *J. Neurophysiol.* **97**, 1368–1378 (2007).
 145. Gullledge, A. T., Kampa, B. M. & Stuart, G. J. Synaptic integration in dendritic trees. *J. Neurobiol.* **64**, 75–90 (2005).
 146. Chagnac-Amitai, Y. & Connors, B. W. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J. Neurophysiol.* **61**, 747–758 (1989).
 147. BOWER, J. M. The Organization of Cerebellar Cortical Circuitry Revisited. Implications for Function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **978**, 135–155 (2002).

148. Levinson, J. N. & El-Husseini, A. Building excitatory and inhibitory synapses: Balancing neuroligin partnerships. *Neuron* vol. 48 171–174 (2005).
149. Mann, E. O., Radcliffe, C. A. & Paulsen, O. Hippocampal gamma-frequency oscillations: From interneurons to pyramidal cells, and back. *J. Physiol.* **562**, 55–63 (2005).
150. Schousboe, A. Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem. Res.* **28**, 347–352 (2003).
151. Baines, R. A. Neuronal homeostasis through translational control. *Mol. Neurobiol.* **32**, 113–121 (2005).
152. Corner, M. A. & Ramakers, G. J. A. Spontaneous firing as an epigenetic factor in brain development - physiological consequences of chronic tetrodotoxin and picrotoxin exposure on cultured rat neocortex neurons. *Dev. Brain Res.* **65**, 57–64 (1992).
153. Davis, G. W. & Goodman, C. S. Synapse-specific control of synaptic efficacy at the terminals of a single neuron. *Nature* **392**, 82–86 (1998).
154. Leslie, K. R., Nelson, S. B. & Turrigiano, G. G. Postsynaptic depolarization scales quantal amplitude in cortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **21**, RC170–RC170 (2001).
155. Mee, C. J., Pym, E. C. G., Moffat, K. G. & Baines, R. A. Regulation of neuronal excitability through pumilio-dependent control of a sodium channel gene. *J. Neurosci.* **24**, 8695–8703 (2004).
156. Ramakers, G. J. A., Corner, M. A. & Habets, A. M. M. C. Development in the absence of spontaneous bioelectric activity results in increased stereotyped burst firing in cultures of dissociated cerebral cortex. *Exp. Brain Res.* **79**, 157–166 (1990).
157. Ramakers, G. J. A., van Galen, H., Feenstra, M. G. P., Corner, M. A. & Boer, G. J. Activity-dependent plasticity of inhibitory and excitatory amino acid transmitter systems in cultured rat cerebral cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* **12**, 611–621 (1994).
158. Turrigiano, G. G. & Nelson, S. B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 5 97–107 (2004).
159. Turrigiano, G. G., Leslie, K. R., Desai, N. S., Rutherford, L. C. & Nelson, S. B. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391**, 892–896 (1998).
160. Van den Pol, A. N., Obrietan, K. & Belousov, A. Glutamate hyperexcitability and seizure-like activity throughout the brain and spinal cord upon relief from chronic glutamate receptor blockade in culture. *Neuroscience* **74**, 653–674 (1996).
161. Kilman, V., Van Rossum, M. C. W. & Turrigiano, G. G. Activity deprivation reduces miniature IPSC amplitude by decreasing the number of postsynaptic GABAA receptors clustered at neocortical synapses. *J. Neurosci.* **22**, 1328–1337 (2002).
162. Maffei, A., Nataraj, K., Nelson, S. B. & Turrigiano, G. G. Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature* **443**, 81–84 (2006).
163. Marty, S., Berninger, B., Carroll, P. & Thoenen, H. GABAergic stimulation regulates the phenotype of hippocampal interneurons through the regulation of brain-derived neurotrophic factor. *Neuron* **16**, 565–570 (1996).
164. Rutherford, L. C., DeWan, A., Lauer, H. M. & Turrigiano, G. G. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures. *J. Neurosci.* **17**, 4527–4535 (1997).

165. Colledge, M. *et al.* Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron* **40**, 595–607 (2003).
166. Ehlers, M. D. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Neurosci.* **6**, 231–242 (2003).
167. El-Husseini, A. E. D. *et al.* Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* **108**, 849–863 (2002).
168. Sala, C. *et al.* Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein Homer1a. *J. Neurosci.* **23**, 6327–6337 (2003).
169. Mellor, J. Synaptic Plasticity at Hippocampal Synapses: Experimental Background. 201–226 (2018) doi:10.1007/978-3-319-99103-0_6.
170. Bear, M., Connors, B. & Paradiso, M. *Neuroscience: Exploring the Brain*. (Wolters Kluwer, 2016).
171. Bliss, T. & Collingridge, G. Persistent memories of long-term potentiation and the N -methyl-d-aspartate receptor. *Brain Neurosci. Adv.* **3**, 1–10 (2019).
172. Larson, J. & Munkácsy, E. *Theta-burst LTP*. *Brain Research* vol. 1621 38–50 (Elsevier B.V., 2015).
173. Albeni, B. C., Oliver, D. R., Toupin, J. & Odero, G. Electrical stimulation protocols for hippocampal synaptic plasticity and neuronal hyper-excitability: Are they effective or relevant? *Experimental Neurology* vol. 204 1–13 (2007).
174. Collingridge, G. L., Peineau, S., Howland, J. G. & Wang, Y. T. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* **11**, 459–473 (2010).
175. Kemp, A. & Manahan-Vaughan, D. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.* **30**, 111–118 (2007).
176. Kitchigina, V. F., Kudina, T. A., Kutyreva, E. V & Vinogradova, O. S. Neuronal activity of the septal pacemaker of theta rhythm under the influence of stimulation and blockade of the median raphe nucleus in the awake rabbit. *Neuroscience* **94**, 453–463 (1999).
177. Bliss, T. V. P. & Lømo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–356 (1973).
178. Patihis, L. The historical significance of the discovery of long-term potentiation: An overview and evaluation for nonexperts. *Am. J. Psychol.* **131**, 369–380 (2018).
179. Dringenberg, H. C. The history of <scp>long-term</scp> potentiation as a memory mechanism: Controversies, confirmation, and some lessons to remember. *Hippocampus* **30**, 987–1012 (2020).
180. Huganir, R. L. & Nicoll, R. A. AMPARs and synaptic plasticity: The last 25 years. *Neuron* vol. 80 704–717 (2013).
181. Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L., Morris, R. G. M. & Reymann, K. G. Long-term potentiation in the hippocampus: Discovery, mechanisms and function. *Neuroforum* vol. 24 A103–A120 (2018).
182. SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **20**, 11–21 (1957).

183. Tsien, J. Z., Huerta, P. T. & Tonegawa, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**, 1327–1338 (1996).
184. Martin, S. J., De Hoz, L. & Morris, R. G. M. Retrograde amnesia: Neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia* **43**, 609–624 (2005).
185. Morris, R. G. M., Anderson, E., Lynch, G. S. & Baudry, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**, 774–776 (1986).
186. Berger, T. W., Rinaldi, P. C., Weisz, D. J. & Thompson, R. F. Single-unit analysis of different hippocampal cell types during classical conditioning of rabbit nictitating membrane response. *J. Neurophysiol.* **50**, 1197–1219 (1983).
187. Vazdarjanova, A. & Guzowski, J. F. Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: Evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J. Neurosci.* **24**, 6489–6496 (2004).
188. Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K. & McGaugh, J. L. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J. Neurosci.* **21**, 5089–5098 (2001).
189. Gabrieli, J. D. E., Brewer, J. B., Desmond, J. E. & Glover, G. H. Separate neural bases of two fundamental memory processes in the human medial temporal lobe. *Science* (80-.). **276**, 264–266 (1997).
190. Maguire, E. A. Neuroimaging, memory and the human hippocampus. in *Revue Neurologique* vol. 157 791–794 (2001).
191. Henke, K., Buck, A., Weber, B. & Wieser, H. G. Human hippocampus establishes associations in memory. *Hippocampus* **7**, 249–256 (1997).
192. Mishkin, M. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* **273**, 297–298 (1978).
193. Murray, E. Medial temporal lobe structures contributing to recognition memory: the amygdaloid complex versus rhinal cortex. in *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction* (ed. Aggleton, J. P.) 453–70 (Wiley-Liss, 1992).
194. Squire, L. R. & Zola-Morgan, S. The medial temporal lobe memory system. *Science* vol. 253 1380–1386 (1991).
195. Zola-Morgan, S., Squire, L. R. & Ramus, S. J. Severity of memory impairment in monkeys as a function of locus and extent of damage within the medial temporal lobe memory system. *Hippocampus* **4**, 483–495 (1994).
196. Andersen, P., Bliss, T. V., Lomo, T., Olsen, L. I. & Skrede, K. K. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol. Scand.* **76**, (1969).
197. Bliss, T. V. P., Collingridge, G. L. & Morris, R. G. M. *The Hippocampus Book*. (Oxford Univ. Press, 2007).
198. Gruart, A., Muñoz, M. D. & Delgado-García, J. M. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J. Neurosci.* **26**, 1077–1087 (2006).
199. Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. & Bear, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* (80-.). **313**, 1093–1097 (2006).

200. Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A. & Malinow, R. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science (80-.)*. **308**, 83–88 (2005).
201. 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.* **89**, 4363–4367 (1992).
202. Abraham, W. C., Bliss, T. V. & Goddard, G. V. Heterosynaptic changes accompany long-term but not short-term potentiation of the perforant path in the anaesthetized rat. *J. Physiol.* **363**, 335–349 (1985).
203. Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O., Swann, J. W. & Wigström, H. Possible mechanisms for long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices from guinea-pigs. *J. Physiol.* **302**, 463–482 (1980).
204. Dan, Y. & Poo, M. M. Spike timing-dependent plasticity of neural circuits. *Neuron* vol. 44 23–30 (2004).
205. Barrionuevo, G., Schottler, F. & Lynch, G. The effects of repetitive low frequency stimulation on control and ‘potentiated’ synaptic responses in the hippocampus. *Life Sci.* **27**, 2385–2391 (1980).
206. Staubli, U. & Lynch, G. Stable depression of potentiated synaptic responses in the hippocampus with 1-5 Hz stimulation. *Brain Res.* **513**, 113–118 (1990).
207. Montgomery, J. M. & Madison, D. V. State-Dependent Heterogeneity in Synaptic Depression between Pyramidal Cell Pairs. *Neuron* **33**, 765–777 (2002).
208. Dudek, S. M. & Bear, M. F. Bidirectional long-term modification of synaptic effectiveness in the adult and immature hippocampus. *J. Neurosci.* **13**, 2910–2918 (1993).
209. Skrede, K. K. & Westgaard, R. H. The transverse hippocampal slice: a well-defined cortical structure maintained in vitro. *Brain Res.* **35**, 589–593 (1971).
210. Banker, G. A. & Cowan, W. M. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* **126**, 397–425 (1977).
211. Gähwiler, B. H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* **4**, 329–342 (1981).
212. Malenka, R. C. & Bear, M. F. LTP and LTD: An embarrassment of riches. *Neuron* vol. 44 5–21 (2004).
213. Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K. & Silva, A. J. Autophosphorylation at Thr286 of the α calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science (80-.)*. **279**, 870–873 (1998).
214. Dicionário Online - Dicionário Caldas Aulete - Significado de engrama. <https://www.aulete.com.br/engrama>.
215. Hebb, D. O. *The Organization of Behavior*. (Wiley, 1949).
216. Borgdorff, A. J. & Choquet, D. Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* **417**, 649–653 (2002).
217. Ehrlich, I. & Malinow, R. Postsynaptic Density 95 controls AMPA Receptor Incorporation during Long-Term Potentiation and Experience-Driven Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **24**, 916–927 (2004).
218. Béïque, J. C. *et al.* Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 19535–19540 (2006).
219. Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S. & Malinow, R. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4176–4181 (2007).
 220. Elias, G. M. *et al.* Synapse-Specific and Developmentally Regulated Targeting of AMPA Receptors by a Family of MAGUK Scaffolding Proteins. *Neuron* **52**, 307–320 (2006).
 221. Chen, H. W., Lanzetta, K. M., Pascarelle, S. & Yahata, N. Unusual spectral energy distribution of a galaxy previously reported to be at redshift 6.68. *Nature* **408**, 562–564 (2000).
 222. Chen, L., El-Husseini, A., Tomita, S., Brecht, D. S. & Nicoll, R. A. Stargazin differentially controls the trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate and kainate receptors. *Mol. Pharmacol.* **64**, 703–706 (2003).
 223. Dakoji, S., Tomita, S., Karimzadegan, S., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology* **45**, 849–856 (2003).
 224. Bats, C., Groc, L. & Choquet, D. The Interaction between Stargazin and PSD-95 Regulates AMPA Receptor Surface Trafficking. *Neuron* **53**, 719–734 (2007).
 225. Migaud, M. *et al.* Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**, 433–439 (1998).
 226. Mauna, J. C., Miyamae, T., Pulli, B. & Thiels, E. Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus* **21**, 1093–1104 (2011).
 227. Lindecke, A. *et al.* Long-term depression activates transcription of immediate early transcription factor genes: involvement of serum response factor/Elk-1. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 555–563 (2006).
 228. Manahan-Vaughan, D., Kulla, A. & Frey, J. U. Requirement of translation but not transcription for the maintenance of long-term depression in the CA1 region of freely moving rats. *J. Neurosci.* **20**, 8572–8576 (2000).
 229. Bastrikova, N., Gardner, G. A., Reece, J. M., Jeromin, A. & Dudek, S. M. Synapse elimination accompanies functional plasticity in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3123–3127 (2008).
 230. Becker, N., Wierenga, C. J., Fonseca, R., Bonhoeffer, T. & Nägerl, U. V. LTD Induction Causes Morphological Changes of Presynaptic Boutons and Reduces Their Contacts with Spines. *Neuron* **60**, 590–597 (2008).
 231. Zhou, Q., Homma, K. J. & Poo, M. M. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* **44**, 749–757 (2004).
 232. Carroll, R. C., Beattie, E. C., Von Zastrow, M. & Malenka, R. C. Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 2 315–324 (2001).
 233. Malinow, R. & Malenka, R. C. AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 103–126 (2002).
 234. Song, I. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* vol. 25 578–588 (2002).
 235. Carroll, R. C. & Zukin, R. S. NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neurosciences* vol. 25 571–577 (2002).

236. Hirbec, H. *et al.* Rapid and differential regulation of AMPA and kainate receptors at hippocampal mossy fibre synapses by PICK1 and GRIP. *Neuron* **37**, 625–38 (2003).
237. Benke, T. A., Luthi, A., Isaac, J. T. R. & Collingridge, G. L. Modulation of ampa receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* **393**, 793–797 (1998).
238. Collingridge, G. L., Isaac, J. T. R. & Yu, T. W. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 5 952–962 (2004).
239. Lin, J. W. *et al.* Distinct molecular mechanisms and divergent endocytotic pathways of AMPA receptor internalization. *Nat. Neurosci.* **3**, 1282–1290 (2000).
240. Firman, J. W., Patel, A., Date, M., Cronin, M. T. D. & Schultz, T. W. Read-across of 90-day rodent repeated-dose toxicity: A case study for selected simple aryl alcohol alkyl carboxylic acid esters. *Comput. Toxicol.* **7**, 1–8 (2018).
241. Lissin, D. V., Carroll, R. C., Nicoll, R. A., Malenka, R. C. & von Zastrow, M. Rapid, activation-induced redistribution of ionotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **19**, 1263–72 (1999).
242. Beattie, E. C. *et al.* Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat. Neurosci.* **3**, 1291–1300 (2000).
243. Ehlers, M. D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron* **28**, 511–525 (2000).
244. Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. Long-term potentiation - A decade of progress? *Science* vol. 285 1870–1874 (1999).
245. Hastings, M. H. & Man, H.-Y. Synaptic Capture of Laterally Diffusing AMPA Receptors – An Idea That Stuck. *Trends Neurosci.* **41**, 330–332 (2018).
246. Micheva, K. D., Busse, B., Weiler, N. C., O'Rourke, N. & Smith, S. J. Single-Synapse Analysis of a Diverse Synapse Population: Proteomic Imaging Methods and Markers. *Neuron* **68**, 639–653 (2010).
247. Lu, W. *et al.* Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors Revealed by a Single-Cell Genetic Approach. *Neuron* **62**, 254–268 (2009).
248. Buonarati, O. R., Hammes, E. A., Watson, J. F., Greger, I. H. & Hell, J. W. Mechanisms of postsynaptic localization of AMPA-type glutamate receptors and their regulation during long-term potentiation. *Sci. Signal.* **12**, eaar6889 (2019).
249. Adotevi, N. *et al.* α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor Plasticity Sustains Severe, Fatal Status Epilepticus. *Ann. Neurol.* **87**, 84–96 (2020).
250. Rakhade, S. N. *et al.* Early alterations of AMPA receptors mediate synaptic potentiation induced by neonatal seizures. *J. Neurosci.* **28**, 7979–7990 (2008).
251. Choi, D. W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261–1276 (1992).
252. Lee, J. M., Zipfel, G. J. & Choi, D. W. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* vol. 399 (1999).
253. Mattson, M. P. *et al.* Calcium signaling in the ER: Its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences* vol. 23 222–229 (2000).
254. Weiss, J. H. & Sensi, S. L. Ca^{2+} - Zn^{2+} permeable AMPA or kainate receptors: Possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* vol. 23 365–371 (2000).

255. Mattson, M. P. & Chan, S. L. Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell Calcium* **34**, 385–397 (2003).
256. Tsai, G. & Coyle, J. T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 165–179 (2002).
257. Kamenetz, F. *et al.* APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* **37**, 925–937 (2003).
258. Tzschentke, T. M. & Schmidt, W. J. Glutamatergic mechanisms in addiction. *Molecular Psychiatry* vol. 8 373–382 (2003).
259. Ogoshi, F. & Weiss, J. H. Heterogeneity of Ca²⁺-permeable AMPA/Kainate Channel Expression in Hippocampal Pyramidal Neurons: Fluorescence Imaging and Immunocytochemical Assessment. *J. Neurosci.* **23**, 10521–10530 (2003).
260. Herron, C. E., Lester, R. A. J., Coan, E. J. & Collingridge, G. L. Frequency-dependent involvement of NMDA receptors in the hippocampus: A novel synaptic mechanism. *Nature* **322**, 265–268 (1986).
261. MacGillavry, H. D., Song, Y., Raghavachari, S. & Blanpied, T. A. Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic ampa receptors. *Neuron* **78**, 615–622 (2013).
262. Nair, D. *et al.* Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J. Neurosci.* **33**, 13204–13224 (2013).
263. Chen, H., Tang, A. H. & Blanpied, T. A. Subsynaptic spatial organization as a regulator of synaptic strength and plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 51 147–153 (2018).
264. Shi, S. H., Hayashi, Y., Esteban, J. A. & Malinow, R. Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons. *Cell* **105**, 331–343 (2001).
265. Henley, J. M. & Wilkinson, K. A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 17 337–350 (2016).
266. Ehlers, M. D., Heine, M., Groc, L., Lee, M. C. & Choquet, D. Diffusional Trapping of GluR1 AMPA Receptors by Input-Specific Synaptic Activity. *Neuron* **54**, 447–460 (2007).
267. Petrini, E. M. *et al.* Endocytic trafficking and recycling maintain a pool of mobile surface AMPA receptors required for synaptic potentiation. *Neuron* **63**, 92–105 (2009).
268. Greger, I. H., Ziff, E. B. & Penn, A. C. Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends in Neurosciences* vol. 30 407–416 (2007).
269. Greger, I. H., Watson, J. F. & Cull-Candy, S. G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* vol. 94 713–730 (2017).
270. Lee, S. H. *et al.* Super-resolution imaging of synaptic and extra-synaptic AMPA receptors with Different-Sized fluorescent probes. *Elife* **6**, (2017).
271. Morise, J. *et al.* AMPA receptors in the synapse turnover by monomer diffusion. *Nat. Commun.* **10**, 5245 (2019).
272. Takamori, S. *et al.* Molecular Anatomy of a Trafficking Organelle. *Cell* **127**, 831–846 (2006).
273. Hajjar, T. *et al.* Alterations in neuronal morphology and synaptophysin expression in the rat brain as a result of changes in dietary n-6: n-3 fatty acid ratios. *Lipids Heal. Dis.* 2013 121 **12**, 1–9

- (2013).
274. Li, W. *et al.* Effects of electroconvulsive stimulation on long-term potentiation and synaptophysin in the hippocampus of rats with depressive behavior. *J. ECT* **28**, 111–117 (2012).
 275. Kwon, S. E. & Chapman, E. R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons. *Neuron* **70**, 847–854 (2011).
 276. Reddy, P. H. *et al.* Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer’s disease: Implications for synaptic dysfunction. *J. Alzheimer’s Dis.* **7**, 103–117 (2005).
 277. Tarpey, P. S. *et al.* A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* **2009** *415* **41**, 535–543 (2009).
 278. Schmitt, U., Tanimoto, N., Seeliger, M., Schaeffel, F. & Leube, R. E. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* **162**, 234–243 (2009).
 279. Oyler, G. A. *et al.* The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.* **109**, 3039–3052 (1989).
 280. Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. & Rothman, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409–418 (1993).
 281. Gonzalo, S., Greentree, W. K. & Linder, M. E. SNAP-25 is targeted to the plasma membrane through a novel membrane-binding domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 21313–21318 (1999).
 282. Lane, S. R. & Liu, Y. Characterization of the Palmitoylation Domain of SNAP-25. *J. Neurochem.* **69**, 1864–1869 (2002).
 283. Veit, M., Söllner, T. H. & Rothman, J. E. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Lett.* **385**, 119–123 (1996).
 284. Jahn, R. & Scheller, R. H. SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 7 631–643 (2006).
 285. G, G. *et al.* SNAP-25 requirement for dendritic growth of hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* **56**, (1999).
 286. Osen-Sand, A. *et al.* Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides in vitro and in vivo. *Nature* **364**, 445–448 (1993).
 287. Risinger, C. *et al.* Evolutionary conservation of synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP-25) shown by *Drosophila* and *Torpedo* cDNA clones. *undefined* (1993).
 288. Tao-Cheng, J. H., Du, J. & McBain, C. J. SNAP-25 is polarized to axons and abundant along the axolemma: An immunogold study of intact neurons. *J. Neurocytol.* **29**, 67–77 (2000).
 289. Gu, Y. & Huganir, R. L. Identification of the SNARE complex mediating the exocytosis of NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 12280–12285 (2016).
 290. Selak, S. *et al.* A Role for SNAP25 in Internalization of Kainate Receptors and Synaptic Plasticity. *Neuron* **63**, 357–371 (2009).
 291. Lau, C. G. *et al.* SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J. Neurosci.* **30**, 242–254 (2010).
 292. Jurado, S. *et al.* LTP Requires a Unique Postsynaptic SNARE Fusion Machinery. *Neuron* **77**,

- 542–558 (2013).
293. Hussain, S. *et al.* A possible postsynaptic role for SNAP-25 in hippocampal synapses. *Brain Struct. Funct.* **224**, 521–532 (2019).
 294. Gopaul, K. R. *et al.* Developmental time course of SNAP-25 isoforms regulate hippocampal long-term synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 295. Pennacchietti, F. *et al.* Nanoscale molecular reorganization of the inhibitory postsynaptic density is a determinant of gabaergic synaptic potentiation. *J. Neurosci.* **37**, 1747–1756 (2017).
 296. Petrini, E. M. *et al.* Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABA A receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nat. Commun.* **5**, 1–19 (2014).
 297. Fang, M. *et al.* Downregulation of gephyrin in temporal lobe epilepsy neurons in humans and a rat model. *Synapse* **65**, 1006–1014 (2011).
 298. Allen, J. A., Halverson-Tamboli, R. A. & Rasenick, M. M. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 128–40 (2007).
 299. Tulodziecka, K. *et al.* Remodeling of the postsynaptic plasma membrane during neural development. *Mol. Biol. Cell* **27**, 3480–3489 (2016).
 300. Squire, L. R. *Encyclopedia of neuroscience.* (Elsevier, 2009).
 301. Jerng, H. H., Pfaffinger, P. J. & Covarrubias, M. Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels. *Molecular and Cellular Neuroscience* vol. 27 343–369 (2004).
 302. Hoffman, D. A., Magee, J. C., Colbert, C. M. & Johnston, D. K⁺ channel regulation of signal propagation in dendrites of hippocampal pyramidal neurons. *Nature* **387**, 869–875 (1997).
 303. Lugo, J. N., Brewster, A. L., Spencer, C. M. & Anderson, A. E. Kv4.2 knockout mice have hippocampal-dependent learning and memory deficits. *Learn. Mem.* **19**, 182–189 (2012).
 304. Chen, X. *et al.* Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K⁺ current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **26**, 12143–12151 (2006).
 305. Zhao, C., Wang, L., Netoff, T. & Yuan, L. L. Dendritic mechanisms controlling the threshold and timing requirement of synaptic plasticity. *Hippocampus* **21**, 288–297 (2011).
 306. Jung, S. C., Kim, J. & Hoffman, D. A. Rapid, Bidirectional Remodeling of Synaptic NMDA Receptor Subunit Composition by A-type K⁺ Channel Activity in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* **60**, 657–671 (2008).
 307. Kim, E. & Hoffman, D. A. Dynamic regulation of synaptic maturation state by voltage-gated A-type K⁺ channels in CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **32**, 14427–14432 (2012).
 308. Hu, J. –H *et al.* Activity-dependent isomerization of Kv4.2 by Pin1 regulates cognitive flexibility. *Nat. Commun.* **11**, 1–18 (2020).
 309. Gross, C. *et al.* MicroRNA-Mediated Downregulation of the Potassium Channel Kv4.2 Contributes to Seizure Onset. *Cell Rep.* **17**, 37–45 (2016).
 310. Abraham, W. C. & Bear, M. F. Metaplasticity: The plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **19**, 126–130 (1996).
 311. Yu, F. & Zhu, L. Q. Ionotronic Neuromorphic Devices for Bionic Neural Network Applications.

- Phys. status solidi – Rapid Res. Lett.* **13**, pssr.201800674 (2019).
312. Abraham, W. C. Metaplasticity: Tuning synapses and networks for plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9 387–399 (2008).
 313. Klausberger, T. & Somogyi, P. Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations. *Science* **321**, 53–57 (2008).
 314. O'Keefe, J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp. Neurol.* **51**, 78–109 (1976).
 315. Quiroga, R. Q., Reddy, L., Kreiman, G., Koch, C. & Fried, I. Invariant visual representation by single neurons in the human brain. *Nature* **435**, 1102–1107 (2005).
 316. Cenquizca, L. A. & Swanson, L. W. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat. *J. Comp. Neurol.* **497**, 101–114 (2006).
 317. Kocsis, B., Varga, V., Dahan, L. & Sik, A. Serotonergic neuron diversity: Identification of raphe neurons with discharge time-locked to the hippocampal theta rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1059–1064 (2006).
 318. Borhegyi, Z., Varga, V., Szilágyi, N., Fabo, D. & Freund, T. F. Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J. Neurosci.* **24**, 8470–8479 (2004).
 319. Földy, C., Lee, S. Y., Szabadics, J., Neu, A. & Soltesz, I. Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nat. Neurosci.* **10**, 1128–1130 (2007).
 320. Lawrence, J. J., Statland, J. M., Grinspan, Z. M. & McBain, C. J. Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *J. Physiol.* **570**, 595–610 (2006).
 321. Cossart, R. *et al.* Interneurons targeting similar layers receive synaptic inputs with similar kinetics. *Hippocampus* **16**, 408–420 (2006).
 322. Hájos, N. & Mody, I. Synaptic communication among hippocampal interneurons: Properties of spontaneous IPSCs in morphologically identified cells. *J. Neurosci.* **17**, 8427–8442 (1997).
 323. Lien, C. C. & Jonas, P. Kv3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* **23**, 2058–2068 (2003).
 324. Acsády, L., Görcs, T. J. & Freund, T. F. Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* **73**, 317–334 (1996).
 325. Gulyás, A. I., Hájos, N. & Freund, T. F. Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J. Neurosci.* **16**, 3397–3411 (1996).
 326. Kamigaki, T. Dissecting executive control circuits with neuron types. *Neuroscience Research* vol. 141 13–22 (2019).
 327. Parra, P., Gulyás, A. I. & Miles, R. How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* **20**, 983–993 (1998).
 328. Maccaferri, G. & Lacaille, J. C. Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications - Making things as simple as possible, not simpler. *Trends in Neurosciences* vol. 26 564–571 (2003).

329. Cunha Reis, D. L. J. Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases GABAergic transmission to interneurons and pyramidal cells in the hippocampus: consequences for pyramidal cell activity and modulation by endogenous adenosine. (Universidade de Lisboa Faculdade de Medicina, 2006).
330. Guet-McCreight, A., Skinner, F. K. & Topolnik, L. Common Principles in Functional Organization of VIP/Calretinin Cell-Driven Disinhibitory Circuits Across Cortical Areas. *Front. Neural Circuits* **0**, 32 (2020).
331. Larsson, L. I. *et al.* Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 3197–3200 (1976).
332. Rogers, J. H. Calretinin: a gene for a novel calcium-binding protein expressed principally in neurons. *J. Cell Biol.* **105**, 1343–1353 (1987).
333. Chamberland, S. & Topolnik, L. Inhibitory control of hippocampal inhibitory neurons. *Front. Neurosci.* **0**, 165 (2012).
334. Gulyás, A. I., Megías, M., Emri, Z. & Freund, T. F. Total Number and Ratio of Excitatory and Inhibitory Synapses Converging onto Single Interneurons of Different Types in the CA1 Area of the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **19**, 10082–10097 (1999).
335. Megías, M., Emri, Z., Freund, T. F. & Gulyás, A. I. Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* **102**, 527–540 (2001).
336. Bezaire, M. J. & Soltesz, I. Quantitative assessment of CA1 local circuits: Knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus* **23**, 751–785 (2013).
337. Fuentealba, P. *et al.* Expression of COUP-TFII Nuclear Receptor in Restricted GABAergic Neuronal Populations in the Adult Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **30**, 1595–1609 (2010).
338. Harris, K. D. *et al.* Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics. *PLOS Biol.* **16**, e2006387 (2018).
339. Artinian, J. & Lacaille, J. C. Disinhibition in learning and memory circuits: New vistas for somatostatin interneurons and long-term synaptic plasticity. *Brain Research Bulletin* vol. 141 20–26 (2018).
340. Vizi, E. S. & Kiss, J. P. *Neurochemistry and Pharmacology of the Major Hippocampal Transmitter Systems: Synaptic and Nonsynaptic Interactions.* *Hippocampus* vol. 8 (1998).
341. Hagen, H., Hansen, N. & Manahan-Vaughan, D. β -Adrenergic Control of Hippocampal Function: Subservicing the Choreography of Synaptic Information Storage and Memory. *Cereb. Cortex* **26**, 1349–1364 (2016).
342. Mongeau, R., Blier, P. & De Montigny, C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: Their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Research Reviews* vol. 23 145–195 (1997).
343. Hansen, N. & Manahan-Vaughan, D. Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. *Cereb. Cortex* **24**, 845–858 (2014).
344. Twarkowski, H. & Manahan-Vaughan, D. Loss of Catecholaminergic Neuromodulation of Persistent Forms of Hippocampal Synaptic Plasticity with Increasing Age. *Front. Synaptic Neurosci.* **8**, 30 (2016).
345. Rifaai, R. A., Mokhemer, S. A., Saber, E. A., El-Aleem, S. A. A. & El-Tahawy, N. F. G.

- Neuroprotective effect of quercetin nanoparticles: A possible prophylactic and therapeutic role in alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* **107**, 101795 (2020).
346. Santana, Y. *et al.* Understanding the Mechanism of Antidepressant-Related Sexual Dysfunction: Inhibition of Tyrosine Hydroxylase in Dopaminergic Neurons after Treatment with Paroxetine but Not with Agomelatine in Male Rats. *J. Clin. Med.* **8**, 133 (2019).
 347. Popova, J. S. & Petkov, V. D. Age-related changes in rat brain muscarinic receptors and β -adrenoreceptors. *Gen. Pharmacol.* **20**, 581–584 (1989).
 348. Araki, T., Kato, H., Shuto, K., Fujiwara, T. & Itoyama, Y. Effect of aging on dopaminergic receptors and uptake sites in the rat brain studied by receptor autoradiography. *J. Neurol. Sci.* **148**, 131–137 (1997).
 349. Suzuki, M. *et al.* Age-related changes of dopamine D1-like and D2-like receptor binding in the F344/N rat striatum revealed by positron emission tomography and in vitro receptor autoradiography. *Synapse* **41**, 285–293 (2001).
 350. Megidido, I. *et al.* Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. *Epilepsia* **57**, 464–474 (2016).
 351. Jenssen, S., Gracely, E. J. & Sperling, M. R. How Long Do Most Seizures Last? A Systematic Comparison of Seizures Recorded in the Epilepsy Monitoring Unit. *Epilepsia* **47**, 1499–1503 (2006).
 352. Siegel, G. J. *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects.* (Lippincott Williams & Wilkins, 1999).
 353. Vezzani, A., Balosso, S. & Ravizza, T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nature Reviews Neurology* vol. 15 459–472 (2019).
 354. Pitkänen, A., Lukasiuk, K., Edward Dudek, F. & Staley, K. J. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, (2015).
 355. Mula, M. & Monaco, F. Ictal and peri-ictal psychopathology. *Behav. Neurol.* **24**, 21–25 (2011).
 356. Muldoon, S. F. *et al.* GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice. *Brain* **138**, 2875–2890 (2015).
 357. El-Hassar, L., Esclapez, M. & Bernard, C. Hyperexcitability of the CA1 hippocampal region during epileptogenesis. in *Epilepsia* vol. 48 131–139 (Blackwell Publishing Inc., 2007).
 358. Cunha-Reis, D. Contribution of endogenous VIP VPAC1 receptor activation during hypoxia and interictal-like activity induced in vitro by 0-Mg²⁺ to subsequent changes in LTP expression in the rat hippocampus. in *IUPS 2013* (2013).
 359. Stefan, Hermann, Theodore, W. H. *Handbook of Clinical Neurology, Vol. 107 (3rd series), Part I - Epilepsy.* (Elsevier BV, 2012).
 360. Lévesque, M., Shiri, Z., Chen, L.-Y. & Avoli, M. High-frequency oscillations and mesial temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Lett.* **667**, 66–74 (2018).
 361. El-hassar, L. *et al.* Cell domain-dependent changes in the glutamatergic and GABAergic drives during epileptogenesis in the rat CA1 region. *J. Physiol.* **578**, 193–211 (2007).
 362. Wipfler, P., Dunn, N., Beiki, O., Trinka, E. & Fogdell-Hahn, A. The Viral Hypothesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy - Is Human Herpes Virus-6 the Missing Link? A systematic review and meta-analysis. *Seizure* **54**, 33–40 (2018).

363. Cossart, R. *et al.* Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nat Neurosci* **4**, 52–62 (2001).
364. Cossart, R., Bernard, C. & Ben-Ari, Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies. *Trends Neurosci* **28**, 108–115 (2005).
365. Antonio, L. L. *et al.* In vitro seizure like events and changes in ionic concentration. *J. Neurosci. Methods* **260**, 33–44 (2016).
366. Leal, B. *et al.* Age of onset of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the effect of apolipoprotein E and febrile seizures. *Int. J. Neurosci.* 1–5 (2016) doi:10.1080/00207454.2016.1264396.
367. FRANKENHAEUSER, B. & HODGKIN, A. L. The after-effects of impulses in the giant nerve fibres of Loligo. *J. Physiol.* **131**, 341–376 (1956).
368. Orkand, R. K., Nicholls, J. G. & Kuffler, S. W. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* **29**, 788–806 (1966).
369. Fertziger, A. P. & Ranck, J. B. Potassium accumulation in interstitial space during epileptiform seizures. *Exp. Neurol.* **26**, 571–585 (1970).
370. Glötzner, F. & Grüsser, O. J. Membranpotential und Entladungsfolgen corticaler Zellen, EEG und corticales DC-Potential bei generalisierten Krampfanfällen. *Arch. für Psychiatr. und Nervenkrankheiten Ver. mit Zeitschrift für die Gesamte Neurol. und Psychiatr.* **210**, 313–339 (1968).
371. Zuckermann, E. C. & Glaser, G. H. Hippocampal epileptic activity induced by localized ventricular perfusion with high-potassium cerebrospinal fluid. *Exp. Neurol.* **20**, 87–110 (1968).
372. Lux, H. D., Heinemann, U. & Dietzel, I. Ionic changes and alterations in the size of the extracellular space during epileptic activity. *Advances in neurology* vol. 44 619–639 (1986).
373. Johnson, S. E., Hudson, J. L. & Kapur, J. Synchronization of action potentials during low-magnesium-induced bursting. *J. Neurophysiol.* **113**, 2461–70 (2015).
374. Guo, F. *et al.* Low-Mg²⁺ treatment increases sensitivity of voltage-gated Na⁺ channels to Ca²⁺/calmodulin-mediated modulation in cultured hippocampal neurons. *Am. J. Physiol. Physiol.* **308**, C594–C605 (2015).
375. Liotta, A. *et al.* Partial disinhibition is required for transition of stimulus-induced sharp wave-ripple complexes into recurrent epileptiform discharges in rat hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* **105**, 172–187 (2011).
376. Liu, R., Wang, J., Liang, S., Zhang, G. & Yang, X. Role of NKCC1 and KCC2 in Epilepsy: From Expression to Function. *Front. Neurol.* **10**, 1407 (2020).
377. Jarolimek, W., Lewen, A. & Misgeld, U. A furosemide-sensitive K⁺-Cl⁻ cotransporter counteracts intracellular Cl⁻ accumulation and depletion in cultured rat midbrain neurons. *J. Neurosci.* **19**, 4695–4704 (1999).
378. Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G. & Lux, H. D. Stimulus-induced changes in extracellular Na⁺ and Cl⁻ concentration in relation to changes in the size of the extracellular space. *Exp. Brain Res.* **46**, 73–84 (1982).
379. Jefferys, J. G. Influence of electric fields on the excitability of granule cells in guinea-pig hippocampal slices. *J. Physiol.* **319**, 143–152 (1981).

380. Mutt, V. & Said, S. I. Structure of the Porcine Vasoactive Intestinal Octacosapeptide: The Amino-Acid Sequence. Use of Kallikrein in Its Determination. *Eur. J. Biochem.* **42**, 581–589 (1974).
381. Cunha-Reis, D. & Caulino-Rocha, A. VIP Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity: A Role for VIP Receptors as Therapeutic Targets in Cognitive Decline and Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 14 153 (2020).
382. Cunha-Reis, D., Ribeiro, J. A., de Almeida, R. F. M. & Sebastião, A. M. VPAC₁ and VPAC₂ receptor activation on GABA release from hippocampal nerve terminals involve several different signalling pathways. *Br. J. Pharmacol.* (2017) doi:10.1111/bph.14051.
383. Cunha-Reis, D., Rodrigues, N. C. & Ribeiro, J. A. On the cellular and molecular pathways involved in the inhibition of LTP in the CA1 area of the hippocampus. *J. Mol. Neurosci.* **42**, 278 (2010).
384. Cunha-Reis, D., Aidil-Carvalho, M. de F. & Ribeiro, J. A. Endogenous inhibition of hippocampal LTD and depotentiation by vasoactive intestinal peptide VPAC₁ receptors. *Hippocampus* **24**, 1353–1363 (2014).
385. de Lanerolle, N. C. *et al.* Vasoactive intestinal polypeptide and its receptor changes in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* **686**, 182–193 (1995).
386. Brenneman, D. E. & Eiden, L. E. Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1159–62 (1986).
387. Yang, K., Lei, G., Jackson, M. F. & MacDonald, J. F. The involvement of PACAP/VIP system in the synaptic transmission in the hippocampus. *Journal of Molecular Neuroscience* vol. 42 319–326 (2010).
388. Harmar, A. J. *et al.* Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *British Journal of Pharmacology* vol. 166 4–17 (2012).
389. Laburthe, M., Couvineau, A. & Marie, J. C. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors and Channels* vol. 8 137–153 (2002).
390. Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K. & Nagata, S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* **8**, 811–819 (1992).
391. Usdin, T. B., Bonner, T. I. & Mezey, E. Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* **135**, 2662–2680 (1994).
392. Sheward, W. J., Lutz, E. M., Copp, A. J. & Harmar, A. J. Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC1) receptor mRNA during development of the mouse embryo. *Dev. Brain Res.* **109**, 245–253 (1998).
393. Borbély, É., Scheich, B. & Helyes, Z. Neuropeptides in learning and memory. *Neuropeptides* vol. 47 439–450 (2013).
394. Cunha-Reis, D., Caulino-Rocha, A. & Correia-de-Sá, P. VIPergic neuroprotection in epileptogenesis: challenges and opportunities. *Pharmacol. Res.* 105356 (2020) doi:10.1016/j.phrs.2020.105356.
395. Clynen, E., Swijsen, A., Raijmakers, M., Hoogland, G. & Rigo, J. M. Neuropeptides as Targets for the Development of Anticonvulsant Drugs. *Molecular Neurobiology* vol. 50 626–646 (2014).

396. Waschek, J. A. VIP and PACAP: Neuropeptide modulators of CNS inflammation, injury, and repair. *British Journal of Pharmacology* vol. 169 512–523 (2013).
397. Cunha-Reis, D., Sebastião, A. M., Wirkner, K., Illes, P. & Ribeiro, J. A. VIP enhances both pre- and postsynaptic GABAergic transmission to hippocampal interneurons leading to increased excitatory synaptic transmission to CA1 pyramidal cells. *Br. J. Pharmacol.* **143**, 733–744 (2004).
398. Yanovsky, Y., Sergeeva, O. A., Freund, T. F. & Haas, H. L. Activation of interneurons at the stratum oriens/alveus border suppresses excitatory transmission to apical dendrites in the CA1 area of the mouse hippocampus. *Neuroscience* **77**, 87–96 (1997).
399. Călin, A. *et al.* Chemogenetic Recruitment of Specific Interneurons Suppresses Seizure Activity. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 293 (2018).
400. Turi, G. F. *et al.* Vasoactive Intestinal Polypeptide-Expressing Interneurons in the Hippocampus Support Goal-Oriented Spatial Learning. *Neuron* **101**, 1150-1165.e8 (2019).
401. Yang, K. *et al.* Vasoactive intestinal peptide acts via multiple signal pathways to regulate hippocampal NMDA receptors and synaptic transmission. *Hippocampus* **19**, 779–789 (2009).
402. Rodrigues, N. C., Caulino-Rocha, A., Ribeiro, J. A. & Cunha-Reis, D. Tonic activation of VPAC1 receptors by VIP modulates theta-burst induced LTP in the hippocampus: transduction pathways and GABAergic mechanisms. *Authorea Prepr.* (2021) doi:10.22541/AU.161787961.10433709/V1.
403. Solés-Tarrés, I., Cabezas-Llobet, N., Vaudry, D. & Xifró, X. Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide Against Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 14 221 (2020).
404. Carvalho-Rosa, J. D. & Cunha-Reis, D. Endogenous VIP VPAC1 receptor activation during ictal and interictal-like activity induced in vitro by bicuculline and 0-Mg²⁺ modulates subsequent LTP expression in the rat hippocampus. *Frontiers in cellular neuroscience* (2019) doi:10.3389/conf.fncel.2019.01.00028.
405. Oh, J. H., Nam, T. J. & Choi, Y. H. Activation of BDNF-mediated PKA signaling in the ventral hippocampus by Capsosiphon fulvescens glycoproteins alleviates depressive-like behavior in aged rats. *J. Funct. Foods* **73**, 104112 (2020).
406. Rozycka, A. & Liguz-Leczna, M. The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse. *Aging Cell* **16**, 634–643 (2017).
407. Mattay, V. S. *et al.* Neurophysiological correlates of age-related changes in working memory capacity. *Neurosci. Lett.* **392**, 32–37 (2006).
408. Ouda, L., Profant, O. & Syka, J. Age-related changes in the central auditory system. *Cell and Tissue Research* vol. 361 337–358 (2015).
409. Sibille, E. Molecular aging of the brain, neuroplasticity, and vulnerability to depression and other brain-related disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15**, 53–65 (2013).
410. Bettio, L. E. B., Rajendran, L. & Gil-Mohapel, J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 79 66–86 (2017).
411. Erickson, C. A. & Barnes, C. A. The neurobiology of memory changes in normal aging. in *Experimental Gerontology* vol. 38 61–69 (Pergamon, 2003).
412. O’Shea, A., Cohen, R. A., Porges, E. C., Nissim, N. R. & Woods, A. J. Cognitive Aging and the Hippocampus in Older Adults. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 298 (2016).

413. Steffens, D. C. *et al.* Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol. Psychiatry* **48**, 301–309 (2000).
414. Shivarama Shetty, M. & Sajikumar, S. ‘Tagging’ along memories in aging: Synaptic tagging and capture mechanisms in the aged hippocampus. *Ageing Research Reviews* vol. 35 22–35 (2017).
415. West, M. J. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol. Aging* **14**, 287–293 (1993).
416. Peters, A. *et al.* Neurobiological Bases of Age-Related Cognitive Decline in the Rhesus Monkey. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 861–873 (1996).
417. Rapp, P. R. & Gallagher, M. Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9926–9930 (1996).
418. Rasmussen, T., Schliemann, T., Sørensen, J. C., Zimmer, J. & West, M. J. Memory impaired aged rats: No loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol. Aging* **17**, 143–147 (1996).
419. Calhoun, M. E. *et al.* Hippocampal neuron and synaptophysin-positive bouton number in aging C57BL/6 mice. *Neurobiol. Aging* **19**, 599–606 (1998).
420. Milner, B. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clin. Neurosurg.* **19**, 421–446 (1972).
421. Zola-Morgan, S., Squire, L. R. & Amaral, D. G. Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* **6**, 2950–2967 (1986).
422. Rosenzweig, E. S. & Barnes, C. A. Impact of aging on hippocampal function: Plasticity, network dynamics, and cognition. *Progress in Neurobiology* vol. 69 143–179 (2003).
423. Benayoun, B. A., Pollina, E. A. & Brunet, A. Epigenetic regulation of ageing: Linking environmental inputs to genomic stability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 16 593–610 (2015).
424. Bergado, J. A. & Almaguer, W. Aging and synaptic plasticity: A review. *Neural Plasticity* vol. 9 217–232 (2002).
425. Delgado-Morales, R., Agís-Balboa, R. C., Esteller, M. & Berdasco, M. Epigenetic mechanisms during ageing and neurogenesis as novel therapeutic avenues in human brain disorders. *Clinical Epigenetics* vol. 9 1–18 (2017).
426. Katsimpardi, L. & Lledo, P. M. Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 53 131–138 (2018).
427. Lynch, G., Rex, C. S. & Gall, C. M. Synaptic plasticity in early aging. *Ageing Research Reviews* vol. 5 255–280 (2006).
428. Penner, M. R., Roth, T. L., Barnes, C. A. & Sweatt, J. D. An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction. *Front. Aging Neurosci.* **2**, 9 (2010).
429. Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R. & Berger, S. L. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell* vol. 166 822–839 (2016).
430. Lynch, M. A. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews* vol. 84 87–136 (2004).
431. Costa-Mattioli, M., Sossin, W. S., Klann, E. & Sonenberg, N. Translational Control of Long-

- Lasting Synaptic Plasticity and Memory. *Neuron* vol. 61 10–26 (2009).
432. Frey, U., Huang, Y. Y. & Kandel, E. R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science* (80-.). **260**, 1661–1664 (1993).
 433. Kelleher, R. J., Govindarajan, A. & Tonegawa, S. Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron* vol. 44 59–73 (2004).
 434. Deupree, D. L., Turner, D. A. & Watters, C. L. Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res.* **554**, 1–9 (1991).
 435. Moore, C. I., Browning, M. D. & Rose, G. M. Hippocampal plasticity induced by primed burst, but not long-term potentiation, stimulation is impaired in area CA1 of aged fischer 344 rats. *Hippocampus* **3**, 57–66 (1993).
 436. Bach, M. E. *et al.* Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5280–5285 (1999).
 437. Winocur, G. Long-term memory loss in senescent rats: neuropsychological analysis of interference and context effects. *Psychol. Aging* **3**, 273–279 (1988).
 438. Pinar, C. *et al.* Revisiting the flip side: Long-term depression of synaptic efficacy in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **80**, 394–413 (2017).
 439. Norris, C. M., Korol, D. L. & Foster, T. C. Increased susceptibility to induction of long-term depression and long-term potentiation reversal during aging. *J. Neurosci.* **16**, 5382–5392 (1996).
 440. Kumar, A. & Foster, T. C. Alteration in NMDA Receptor Mediated Glutamatergic Neurotransmission in the Hippocampus During Senescence. *Neurochem. Res.* **44**, 38–48 (2019).
 441. Clayton, D. A. & Browning, M. D. Deficits in the expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. *Neurobiol. Aging* **22**, 165–168 (2001).
 442. Magnusson, K. R., Nelson, S. E. & Young, A. B. Age-related changes in the protein expression of subunits of the NMDA receptor. *Mol. Brain Res.* **99**, 40–45 (2002).
 443. Sonntag, W. E. *et al.* Age and insulin-like growth factor-1 modulate N-methyl-D-aspartate receptor subtype expression in rats. *Brain Res. Bull.* **51**, 331–338 (2000).
 444. Tang, Y. P. *et al.* Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**, 63–69 (1999).
 445. Foster, T. C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell* vol. 6 319–325 (2007).
 446. Kumar, A., Bodhinathan, K. & Foster, T. C. Susceptibility to calcium dysregulation during brain aging. *Frontiers in Aging Neuroscience* vol. 1 1–13 (2009).
 447. Verkhratsky, A. & Toescu, E. C. Calcium and neuronal ageing. *Trends Neurosci.* **21**, 2–7 (1998).
 448. Norris, C. M., Halpain, S. & Foster, T. C. Alterations in the Balance of Protein Kinase/Phosphatase Activities Parallel Reduced Synaptic Strength During Aging. *J. Neurophysiol.* **80**, 1567–1570 (1998).
 449. Ryan, M. M., Guévremont, D., Luxmanan, C., Abraham, W. C. & Williams, J. M. Aging alters long-term potentiation-related gene networks and impairs synaptic protein synthesis in the rat hippocampus. *Neurobiol. Aging* **36**, 1868–1880 (2015).

450. Brim, B. L. *et al.* Memory in aged mice is rescued by enhanced expression of the GluN2B subunit of the NMDA receptor. *Behav. Brain Res.* **238**, 211–226 (2013).
451. Dahan, L., Rampon, C. & Florian, C. Age-related memory decline, dysfunction of the hippocampus and therapeutic opportunities. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* vol. 102 109943 (2020).
452. Simkin, D. *et al.* Aging-related hyperexcitability in CA3 pyramidal neurons is mediated by enhanced A-type K⁺ channel function and expression. *J. Neurosci.* **35**, 13206–13218 (2015).
453. Anggono, V. & Huganir, R. L. Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 461–469 (2012).
454. Esteban, J. A. *et al.* PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. *Nat. Neurosci.* **6**, 136–143 (2003).
455. Jurado, S. AMPA receptor trafficking in natural and pathological aging. *Frontiers in Molecular Neuroscience* vol. 10 (2018).
456. Chater, T. E. & Goda, Y. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 8 401 (2014).
457. Passafaro, M., Piãch, V. & Sheng, M. Subunit-specific temporal and spatial patterns of AMPA receptor exocytosis in hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* **4**, 917–926 (2001).
458. Isaac, J. T. R., Ashby, M. & McBain, C. J. The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron* vol. 54 859–871 (2007).
459. Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos, J. & Niedzielski, A. S. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J. Neurosci.* **16**, 1982–1989 (1996).
460. Joels, G. & Lamprecht, R. Interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluR2 is essential for fear memory formation in lateral amygdala. *J. Neurosci.* **30**, 15981–15986 (2010).
461. Henley, J. M. & Wilkinson, K. A. AMPA receptor trafficking and the mechanisms underlying synaptic plasticity and cognitive aging. *Dialogues Clin. Neurosci.* **15**, 11–27 (2013).
462. Miguez, P. V. *et al.* PKM maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat. Neurosci.* **13**, 630–634 (2010).
463. Sebastian, V., Estil, J. B., Chen, D., Schrott, L. M. & Serrano, P. A. Acute Physiological Stress Promotes Clustering of Synaptic Markers and Alters Spine Morphology in the Hippocampus. *PLoS One* **8**, e79077 (2013).
464. Sebastian, V., Vergel, T., Baig, R., Schrott, L. M. & Serrano, P. A. PKM ζ Differentially Utilized between Sexes for Remote Long-Term Spatial Memory. *PLoS One* **8**, e81121 (2013).
465. Aicardi, G. Protein kinase M ζ -dependent maintenance of GluA2 at the synapse: A possible target for preventing or treating age-related memory decline? *Rejuvenation Res.* **16**, 327–329 (2013).
466. Hara, Y. *et al.* Synaptic Distributions of GluA2 and PKM ζ in the Monkey Dentate Gyrus and Their Relationships with Aging and Memory. *J. Neurosci.* **32**, 7336–7344 (2012).
467. Ruano, D. *et al.* GABA(A) and α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate receptors are differentially affected by aging in the rat hippocampus. *J. Biol. Chem.* **275**, 19585–19593 (2000).
468. Vela, J., Gutierrez, A., Vitorica, J. & Ruano, D. Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J. Neurochem.* **85**, 368–377 (2003).

469. Luebke, J. I., Chang, Y. M., Moore, T. L. & Rosene, D. L. Normal aging results in decreased synaptic excitation and increased synaptic inhibition of layer 2/3 pyramidal cells in the monkey prefrontal cortex. *Neuroscience* **125**, 277–288 (2004).
470. Bories, C., Husson, Z., Guitton, M. J. & De Koninck, Y. Differential balance of prefrontal synaptic activity in successful versus unsuccessful cognitive aging. *J. Neurosci.* **33**, 1344–1356 (2013).
471. Wang, H., Bedford, F. K., Brandon, N. J., Moss, S. J. & Olsen, R. W. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**, 69–72 (1999).
472. Majdi, M., Ribeiro-da-Silva, A. & Cuello, A. C. Variations in excitatory and inhibitory postsynaptic protein content in rat cerebral cortex with respect to aging and cognitive status. *Neuroscience* **159**, 896–907 (2009).
473. Benice, T. S., Rizk, A., Kohama, S., Pfankuch, T. & Raber, J. Sex-differences in age-related cognitive decline in C57BL/6J mice associated with increased brain microtubule-associated protein 2 and synaptophysin immunoreactivity. *Neuroscience* **137**, 413–423 (2006).
474. Kumar, D. & Thakur, M. K. Age-related expression of Neurexin1 and Neuroligin3 is correlated with presynaptic density in the cerebral cortex and hippocampus of male mice. *Age (Omaha)*. **37**, (2015).
475. West, M. J., Slomianka, L. & Gundersen, H. J. G. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* **231**, 482–497 (1991).
476. Newton, I. G. *et al.* Effects of aging and caloric restriction on dentate gyrus synapses and glutamate receptor subunits. *Neurobiol. Aging* **29**, 1308–1318 (2008).
477. Poe, B. H., Linville, C., Riddle, D. R., Sonntag, W. E. & Brunso-Bechtold, J. K. Effects of age and insulin-like growth factor-1 on neuron and synapse numbers in area CA3 of hippocampus. *Neuroscience* **107**, 231–238 (2001).
478. Shi, L. *et al.* Caloric restriction eliminates the aging-related decline in NMDA and AMPA receptor subunits in the rat hippocampus and induces homeostasis. *Exp. Neurol.* **206**, 70–79 (2007).
479. Adams, M. M. *et al.* Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA3 and spatial learning ability. *Exp. Neurol.* **211**, 141–149 (2008).
480. Ganeshina, O., Berry, R. W., Petralia, R. S., Nicholson, D. A. & Geinisman, Y. Differences in the Expression of AMPA and NMDA Receptors between Axospinous Perforated and Nonperforated Synapses Are Related to the Configuration and Size of Postsynaptic Densities. *J. Comp. Neurol.* **468**, 86–95 (2004).
481. Vanguilder, H. D., Yan, H., Farley, J. A., Sonntag, W. E. & Freeman, W. M. Aging alters the expression of neurotransmission-regulating proteins in the hippocampal synaptoproteome. *J. Neurochem.* **113**, 1577–1588 (2010).
482. VanGuilder, H. D. *et al.* Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiol. Dis.* **43**, 201–212 (2011).
483. Adams, M. M., Shah, R. A., Janssen, W. G. M. & Morrison, J. H. Different modes of hippocampal plasticity in response to estrogen in young and aged female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8071–8076 (2001).
484. Woolley, C. S. & McEwen, B. S. Roles of estradiol and progesterone in regulation of

- hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J. Comp. Neurol.* **336**, 293–306 (1993).
485. Brandt, N., Vierk, R. & Rune, G. M. Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. *Int. J. Dev. Biol.* **57**, 351–356 (2013).
486. Volonte, D. & Galbiati, F. Caveolin-1, a master regulator of cellular senescence. *Cancer Metastasis Rev.* **39**, 397–414 (2020).
487. Kang, M. J. *et al.* Caveolin-1 upregulation in senescent neurons alters amyloid precursor protein processing. *Exp. Mol. Med.* **38**, 126–133 (2006).
488. Roitenberg, N. *et al.* Modulation of caveolae by insulin/ IGF -1 signaling regulates aging of *Caenorhabditis elegans* . *EMBO Rep.* **19**, (2018).
489. Gaudreault, S. B., Dea, D. & Poirier, J. Increased caveolin-1 expression in Alzheimer’s disease brain. *Neurobiol. Aging* **25**, 753–759 (2004).
490. Volonte, D. & Galbiati, F. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by caveolin 1 promotes stress-induced premature senescence. *EMBO Rep.* **10**, 1334–1340 (2009).
491. Volonte, D. *et al.* Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence. *Mol. Biol. Cell* **24**, 1852–1862 (2013).
492. Yu, D. M. *et al.* Caveolin-1 deficiency induces premature senescence with mitochondrial dysfunction. *Aging Cell* **16**, 773–784 (2017).
493. Jeffries, E. P., Filippo, M. Di & Galbiati, F. Failure to reabsorb the primary cilium induces cellular senescence. *FASEB J.* **33**, 4866–4882 (2019).
494. Molina-García, L. & Barrios, A. Sex differences in learning — shared principles across taxa. *Curr. Opin. Physiol.* **6**, 65–74 (2018).
495. Beny, Y. & Kimchi, T. Innate and learned aspects of pheromone-mediated social behaviours. *Anim. Behav.* **97**, 301–311 (2014).
496. Jacobs, L. F. Sexual selection and the brain. *Trends in Ecology and Evolution* vol. 11 82–86 (1996).
497. Healy, S. D., Bacon, I. E., Haggis, O., Harris, A. P. & Kelley, L. A. Explanations for variation in cognitive ability: Behavioural ecology meets comparative cognition. *Behavioural Processes* vol. 80 288–294 (2009).
498. Frick, K. M., Kim, J., Tuscher, J. J. & Fortress, A. M. Sex steroid hormones matter for learning and memory: Estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning and Memory* vol. 22 472–493 (2015).
499. Korol, D. L. & Pisani, S. L. Estrogens and cognition: Friends or foes?. An evaluation of the opposing effects of estrogens on learning and memory. *Hormones and Behavior* vol. 74 105–115 (2015).
500. Duarte-Guterman, P., Yagi, S., Chow, C. & Galea, L. A. M. Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Horm. Behav.* **74**, 37–52 (2015).
501. Oberlander, J. G. & Woolley, C. S. 17 β -estradiol acutely potentiates glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus through distinct mechanisms in males and females. *J. Neurosci.* **36**, 2677–2690 (2016).

502. Waters, E. M. *et al.* Estrogen receptor alpha and beta specific agonists regulate expression of synaptic proteins in rat hippocampus. *Brain Res.* **1290**, 1–11 (2009).
503. Tabatadze, N., Huang, G., May, R. M., Jain, A. & Woolley, C. S. Sex differences in molecular signaling at inhibitory synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* **35**, 11252–11265 (2015).
504. Mizuno, K. & Giese, K. P. Towards a molecular understanding of sex differences in memory formation. *Trends in Neurosciences* vol. 33 285–291 (2010).
505. Rodrigues, N. C. *et al.* Cellular and molecular mechanisms involved in LTP induced by mild theta-burst stimulation in hippocampal slices from young male rats: from weaning to adulthood. *bioRxiv* 2021.04.19.440440 (2021) doi:10.1101/2021.04.19.440440.
506. Cruz, A. D. da S. The influence of epilepsy in synaptic plasticity in the hippocampus: neuroprotective role of VIP and its receptors. *Biochem. MSc Thesis, Fac. Sci. Univ. Lisbon* (2010).
507. Avoli, M. & Jefferys, J. G. R. Models of drug-induced epileptiform synchronization in vitro. *J. Neurosci. Methods* **260**, 26–32 (2016).
508. Bradford, M. M. 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 (1976).
509. Edition, S. *Protein Analysis and Purification .pdf*.
510. Bass, J. J. *et al.* An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports* vol. 27 4–25 (2017).
511. Ornstein, L. DISC ELECTROPHORESIS-I BACKGROUND AND THEORY. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321–349 (1964).
512. Jensen, E. C. The Basics of Western Blotting. *Anatomical Record* vol. 295 369–371 (2012).
513. Abcam. Western blot sample preparation. vol. 13 1–11 (2020).
514. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354 (1979).
515. Burnette, W. N. ‘Western Blotting’: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195–203 (1981).
516. Kurien, B. T. & Scofield, R. H. Western blotting. *Methods* **38**, 283–293 (2006).
517. MacPhee, D. J. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **61**, 171–177 (2010).
518. Matsudaira, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035–10038 (1987).
519. Mansfield, M. A. Rapid immunodetection on polyvinylidene fluoride membrane blots without blocking. *Anal. Biochem.* **229**, 140–143 (1995).
520. Mozdzanowski, J., Hembach, P. & Speicher, D. W. High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **13**, 59–64 (1992).

521. Western Blotting: Samples, Gels and Blotting | Bio-Rad. https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blotting-samples-gels-and-blotting-membranes.html?JSESSIONID_STERLING=8CE0D74A023C4CF599D6B00495AE67DF.ecommerce1&JSESSIONID=1C564DD8C27D295EBA79FB817B5340AC.lsdse1a&evCntryLang=PT-en&cntry=PT&thirdPartyCookieEnabled=true.
522. Mahmood, T. & Yang, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **4**, 429–434 (2012).
523. Crossland, H. *et al.* Focal adhesion kinase is required for IGF-I-mediated growth of skeletal muscle cells via a TSC2/mTOR/S6K1-associated pathway. *Am. J. Physiol. Metab.* **305**, E183–E193 (2013).
524. Franchi, M. V. *et al.* Architectural, functional and molecular responses to concentric and eccentric loading in human skeletal muscle. *Acta Physiol.* **210**, 642–654 (2014).
525. Gershoni, J. M. & Palade, G. E. Protein blotting: Principles and applications. *Analytical Biochemistry* vol. 131 1–15 (1983).
526. Kurien, B. T., Dorri, Y., Dillon, S., Dsouza, A. & Scofield, R. H. An overview of western blotting for determining antibody specificities for immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* **717**, 55–67 (2011).
527. Introduction to Western Blotting | Bio-Rad. <https://www.bio-rad-antibodies.com/western-blotting-immunoblotting-introduction.html>.
528. Lipman, N. S., Jackson, L. R., Trudel, L. J. & Weis-Garcia, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J.* **46**, 258–268 (2005).
529. Voller, A., Bartlett, A. & Bidwell, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* vol. 31 507–520 (1978).
530. Kricka, L. J. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clinical Chemistry* vol. 37 1472–1481 (1991).
531. Direct vs Indirect Detection - Immunodetection | Bio-Rad. <https://www.bio-rad-antibodies.com/immunodetection-indirect-direct-detection-western-blotting.html>.
532. Immunodetection: Detection with Substrate | Bio-Rad. <https://www.bio-rad-antibodies.com/immunodetection-detection-with-substrate-western-blotting.html>.
533. HRP Substrate | Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/featured/en/hrp-substrate.html>.
534. ECL western blotting substrates for horseradish peroxidase (HRP) detection. | Enhanced Luminol | Life Science Research | Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/featured/en/ecl-western-blotting-substrates.html>.
535. Alegria-Schaffer, A., Lodge, A. & Vattem, K. Chapter 33 Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. in *Methods in Enzymology* vol. 463 573–599 (Academic Press Inc., 2009).
536. ChemiDoc XRS+ System | Life Science Research | Bio-Rad. <https://www.bio-rad.com/en-pt/product/chemidoc-xrs-system?ID=NINJHRKG4>.
537. Sennepin, A. D. *et al.* Multiple reprobing of Western blots after inactivation of peroxidase activity by its substrate, hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **393**, 129–131 (2009).

538. Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B. & Vogel, J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* **30**, 1845–1855 (2009).
539. Mollica, J. P., Oakhill, J. S., Lamb, G. D. & Murphy, R. M. Are genuine changes in protein expression being overlooked? Reassessing Western blotting. *Anal. Biochem.* **386**, 270–275 (2009).
540. Taylor, S. C. & Posch, A. The design of a quantitative western blot experiment. *BioMed Research International* vol. 2014 (2014).
541. Welinder, C. & Ekblad, L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J. Proteome Res.* **10**, 1416–1419 (2011).
542. McDonough, A. A., Veiras, L. C., Minas, J. N. & Ralph, D. L. Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot. *Am. J. Physiol. Physiol.* **308**, C426–C433 (2015).
543. Curtis, M. J. *et al.* Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 3461–3471 (2015).
544. Lussier, M. P., Nasu-Nishimura, Y. & Roche, K. W. Activity-dependent ubiquitination of the AMPA receptor subunit GluA2. *J. Neurosci.* **31**, 3077–3081 (2011).
545. Konen, L. M. *et al.* A new mouse line with reduced GluA2 Q/R site RNA editing exhibits loss of dendritic spines, hippocampal CA1-neuron loss, learning and memory impairments and NMDA receptor-independent seizure vulnerability. *Mol. Brain* **13**, 27 (2020).
546. Sun, X. & Wolf, M. E. Nucleus accumbens neurons exhibit synaptic scaling that is occluded by repeated dopamine pre-exposure. *Eur. J. Neurosci.* **30**, 539–550 (2009).
547. Guo, C. & Ma, Y.-Y. Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Front. Neural Circuits* **0**, 82 (2021).
548. Lopes, M. W. *et al.* Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. *Exp. Brain Res.* **226**, 153–163 (2013).
549. Lorgen, J. Ø., Egbenya, D. L., Hammer, J. & Davanger, S. PICK1 facilitates lasting reduction in GluA2 concentration in the hippocampus during chronic epilepsy. *Epilepsy Res.* **137**, 25–32 (2017).
550. Friedman, L. K. & Koudinov, A. R. Unilateral GluR2(B) Hippocampal Knockdown: A Novel Partial Seizure Model in the Developing Rat. *J. Neurosci.* **19**, 9412–9425 (1999).
551. Friedman, L. K., Velísková, J., Kaur, J., Magrys, B. W. & Liu, H. GluR2(B) Knockdown Accelerates CA3 Injury after Kainate Seizures. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 733–750 (2003).
552. Wiltgen, B. J. *et al.* A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One* **5**, e12818 (2010).
553. Forcelli, P. A. Reigning in Excitatory Signaling in CDKL5 Deficiency. *Epilepsy Currents* vol. 19 341–343 (2019).
554. Jang, S.-S. *et al.* Regulation of STEP61 and tyrosine-phosphorylation of NMDA and AMPA receptors during homeostatic synaptic plasticity. *Mol. Brain* **8**, 55 (2015).
555. Jakawich, S. K., Neely, R. M., Djakovic, S. N., Patrick, G. N. & Sutton, M. A. An essential postsynaptic role for the ubiquitin proteasome system in slow homeostatic synaptic plasticity in

- cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* **171**, 1016–1031 (2010).
556. Avanzini, G., Forcelli, P. A. & Gale, K. Are There Really “Epileptogenic” Mechanisms or Only Corruptions of “Normal” Plasticity? 95–107 (2014) doi:10.1007/978-94-017-8914-1_8.
557. Avoli, M. Do interictal discharges promote or control seizures? Experimental evidence from an in vitro model of epileptiform discharge. *Epilepsia* **42**, 2–4 (2001).
558. Bento-Oliveira, A. Changes in synaptic plasticity and lipid raft composition in a rat model of temporal lobe epilepsy. (Universidade de Lisboa, 2019).
559. Sun, Q. J. *et al.* Alterations of NR2B and PSD-95 expression in hippocampus of kainic acid-exposed rats with behavioural deficits. *Behav. Brain Res.* **201**, 292–299 (2009).
560. Devinsky, O. *et al.* Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers* vol. 4 (2018).
561. Losi, G. *et al.* PSD-95 regulates NMDA receptors in developing cerebellar granule neurons of the rat. *Journal of Physiology* vol. 548 21–29 (2003).
562. Wu, D. *et al.* Impairment of learning and memory induced by perinatal exposure to BPA is associated with ER α -mediated alterations of synaptic plasticity and PKC/ERK/CREB signaling pathway in offspring rats. *Brain Res. Bull.* **161**, 43–54 (2020).
563. Kim, M. J. *et al.* Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95. *Neuron* **56**, 488–502 (2007).
564. Bêique, J. C. & Andrade, R. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *Journal of Physiology* vol. 546 859–867 (2003).
565. Carlisle, H. J., Fink, A. E., Grant, S. G. N. & O’dell, T. J. Opposing effects of PSD-93 and PSD-95 on long-term potentiation and spike timing-dependent plasticity. *J. Physiol.* **586**, 5885–5900 (2008).
566. Chen, W. *et al.* AMPA glutamate receptor subunits 1 and 2 regulate dendrite complexity and spine motility in neurons of the developing neocortex. *Neuroscience* **159**, 172–182 (2009).
567. Ko, J., Chooi, G. & Um, J. W. The balancing act of GABAergic synapse organizers. *Trends in Molecular Medicine* vol. 21 256–268 (2015).
568. Kim, S. *et al.* Loss of IQSEC3 Disrupts GABAergic Synapse Maintenance and Decreases Somatostatin Expression in the Hippocampus. *Cell Rep.* **30**, 1995–2005.e5 (2020).
569. Fritschy, J. M. Epilepsy, E/I balance and GABAA receptor plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* **1**, 5 (2008).
570. González, M. I., Cruz Del Angel, Y. & Brooks-Kayal, A. Down-regulation of gephyrin and GABAA receptor subunits during epileptogenesis in the CA1 region of hippocampus. *Epilepsia* **54**, 616–624 (2013).
571. González, M. I. Calpain-dependent cleavage of GABAergic proteins during epileptogenesis. *Epilepsy Res.* **157**, 106206 (2019).
572. Costa, J. T. *et al.* Gephyrin Cleavage in In Vitro Brain Ischemia Decreases GABAA Receptor Clustering and Contributes to Neuronal Death. *Mol. Neurobiol.* **53**, 3513–3527 (2016).
573. Campbell, R. L. & Davies, P. L. Structure-function relationships in calpains. *Biochemical Journal* vol. 447 335–351 (2012).
574. Marty, S., Wehrle, R., Fritschy, J.-M. & Sotelo, C. Quantitative effects produced by

- modifications of neuronal activity on the size of GABAA receptor clusters in hippocampal slice cultures. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 427–440 (2004).
575. Choquet, D. & Triller, A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 251–265 (2003).
576. Förstera, B. *et al.* Irregular RNA splicing curtails postsynaptic gephyrin in the cornu ammonis of patients with epilepsy. *Brain* **133**, 3778–3794 (2010).
577. Tiwari, D. *et al.* The potassium channel Kv4.2 regulates dendritic spine morphology, electroencephalographic characteristics and seizure susceptibility in mice. *Exp. Neurol.* **334**, 113437 (2020).
578. Tsauro, M. L., Sheng, M., Lowenstein, D. H., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Differential expression of K⁺ channel mRNAs in the rat brain and down-regulation in the hippocampus following seizures. *Neuron* **8**, 1055–1067 (1992).
579. Francis, J. *et al.* Kainic acid-induced generalized seizures alter the regional hippocampal expression of the rat Kv4.2 potassium channel gene. *Neurosci. Lett.* **232**, 91–94 (1997).
580. Lei, Z., Deng, P., Li, J. & Xu, Z. C. Alterations of A-Type Potassium Channels in Hippocampal Neurons after Traumatic Brain Injury. <https://home.liebertpub.com/neu> **29**, 235–245 (2012).
581. Bernard, C. *et al.* Acquired dendritic channelopathy in temporal lobe epilepsy. *Science* (80-.). **305**, 532–535 (2004).
582. Monaghan, M. M., Menegola, M., Vacher, H., Rhodes, K. J. & Trimmer, J. S. Altered expression and localization of hippocampal A-type potassium channel subunits in the pilocarpine-induced model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* **156**, 550–562 (2008).
583. Tiwari, D. *et al.* MicroRNA inhibition upregulates hippocampal A-type potassium current and reduces seizure frequency in a mouse model of epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **130**, 104508 (2019).
584. Menegola, M. & Trimmer, J. S. Unanticipated Region- and Cell-Specific Downregulation of Individual KChIP Auxiliary Subunit Isoforms in Kv4.2 Knock-Out Mouse Brain. *J. Neurosci.* **26**, 12137–12142 (2006).
585. Menegola, M., Clark, E. & Trimmer, J. S. The importance of immunohistochemical analyses in evaluating the phenotype of Kv channel knockout mice. *Epilepsia* **53**, 142–149 (2012).
586. Andrásfalvy, B. K., Makara, J. K., Johnston, D. & Magee, J. C. Altered synaptic and non-synaptic properties of CA1 pyramidal neurons in Kv4.2 knockout mice. *J. Physiol.* **586**, 3881–3892 (2008).
587. Wiedenmann, B. & Franke, W. W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* **41**, 1017–1028 (1985).
588. Xiao, Z., Peng, J., Wu, L., Arafat, A. & Yin, F. The effect of IL-1 β on synaptophysin expression and electrophysiology of hippocampal neurons through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurol. Res.* **39**, 640–648 (2017).
589. Hanaya, R., Boehm, N. & Nehlig, A. Dissociation of the immunoreactivity of synaptophysin and GAP-43 during the acute and latent phases of the lithium-pilocarpine model in the immature and adult rat. *Exp. Neurol.* **204**, 720–732 (2007).
590. Hinz, B. *et al.* Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 615–619 (2001).

591. White, D. N. & Stowell, M. H. B. Room for Two: The Synaptophysin/Synaptobrevin Complex. *Front. Synaptic Neurosci.* **0**, 47 (2021).
592. Elmér, E., Kokaia, M., Kokaia, Z., Ferencz, I. & Lindvall, O. Delayed kindling development after rapidly recurring seizures: Relation to mossy fiber sprouting and neurotrophin, GAP-43 and dynorphin gene expression. *Brain Res.* **712**, 19–34 (1996).
593. Head, B. P. *et al.* Loss of caveolin-1 accelerates neurodegeneration and aging. *PLoS One* **5**, e15697 (2010).
594. Gaudreault, S. B., Blain, J. F., Gratton, J. P. & Poirier, J. A role for caveolin-1 in post-injury reactive neuronal plasticity. *J. Neurochem.* **92**, 831–839 (2005).
595. Gaudreault, S. B., Chabot, C., Gratton, J. P. & Poirier, J. The Caveolin Scaffolding Domain Modifies 2-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole Propionate Receptor Binding Properties by Inhibiting Phospholipase A2 Activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 356–362 (2004).
596. Egawa, J. *et al.* Neuron-specific caveolin-1 overexpression improves motor function and preserves memory in mice subjected to brain trauma. *FASEB J.* **31**, 3403–3411 (2017).
597. Jasmin, J. F. *et al.* Caveolin-1 deficiency increases cerebral ischemic injury. *Circ. Res.* **100**, 721–729 (2007).
598. Zhang, J. *et al.* Lower Serum Caveolin-1 Is Associated with Cerebral Microbleeds in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
599. Förstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).
600. Gao, L. *et al.* Caveolin-1 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury through ameliorating peroxynitrite-mediated cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **95**, 209–215 (2016).
601. Munderloh, C. *et al.* Reggies/flotillins regulate retinal axon regeneration in the zebrafish optic nerve and differentiation of hippocampal and N2a neurons. *J. Neurosci.* **29**, 6607–6615 (2009).
602. Swanwick, C. C., Shapiro, M. E., Vicini, S. & Wenthold, R. J. Flotillin-1 promotes formation of glutamatergic synapses in hippocampal neurons. *Dev. Neurobiol.* **70**, 875–883 (2010).
603. Cremona, M. L. *et al.* Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. *Nat. Neurosci.* **14**, 469–477 (2011).
604. Hering, H., Lin, C.-C. & Sheng, M. Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* **23**, 3262–71 (2003).
605. Qu, W. *et al.* Emerging role of AMPA receptor subunit GluA1 in synaptic plasticity: Implications for Alzheimer’s disease. *Cell Prolif.* **54**, e12959 (2021).
606. Purkey, A. M. & Dell’Acqua, M. L. Phosphorylation-Dependent Regulation of Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors During Hippocampal Synaptic Plasticity. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, 8 (2020).
607. Tasker, J. G., Prager-Khoutorsky, M., Teruyama, R., Lemos, J. R. & Armstrong, W. E. Advances in the neurophysiology of magnocellular neuroendocrine cells. *J. Neuroendocrinol.* **32**, e12826 (2020).
608. Martin, K. C., Barad, M. & Kandel, E. R. Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 587–592 (2000).
609. Zamanillo, D. *et al.* Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not

- for spatial learning. *Science* **284**, 1805–1811 (1999).
610. Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J. & Spedding, M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**, 2–5 (2009).
611. Engelman, H. S., Allen, T. B. & MacDermott, A. B. The distribution of neurons expressing calcium-permeable AMPA receptors in the superficial laminae of the spinal cord dorsal horn. *J. Neurosci.* **19**, 2081–2089 (1999).
612. Hartmann, B. *et al.* The AMPA receptor subunits GluR-A and GluR-B reciprocally modulate spinal synaptic plasticity and inflammatory pain. *Neuron* **44**, 637–650 (2004).
613. Schmitt, W. B. *et al.* Restoration of spatial working memory by genetic rescue of GluR-A - Deficient mice. *Nat. Neurosci.* **8**, 270–272 (2005).
614. Pierrot, N. *et al.* Sex-regulated gene dosage effect of PPAR α on synaptic plasticity. *Life Sci. Alliance* **2**, e201800262 (2019).
615. Palenzuela, R. *et al.* MAP1B light chain modulates synaptic transmission via AMPA receptor intracellular trapping. *J. Neurosci.* **37**, 9945–9963 (2017).
616. Sprengel, R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res.* **326**, 447–455 (2006).
617. Kopec, C. D., Real, E., Kessels, H. W. & Malinow, R. GluR1 links structural and functional plasticity at excitatory synapses. *J. Neurosci.* **27**, 13706–13718 (2007).
618. He, K. *et al.* Stabilization of Ca²⁺-permeable AMPA receptors at perisynaptic sites by GluR1-S845 phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20033–20038 (2009).
619. Lee, S. H., Simonetta, A. & Sheng, M. Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons. *Neuron* **43**, 221–236 (2004).
620. Holman, D., Feligioni, M. & Henley, J. M. Differential redistribution of native AMPA receptor complexes following LTD induction in acute hippocampal slices. *Neuropharmacology* **52**, 92–99 (2007).
621. Lee, H. K. *et al.* Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* **112**, 631–643 (2003).
622. Xiang, X., Huang, W., Haile, C. N. & Kosten, T. A. Hippocampal GluR1 associates with behavior in the elevated plus maze and shows sex differences. *Behav. Brain Res.* **222**, 326–331 (2011).
623. Zhu, J. J., Esteban, J. A., Hayashi, Y. & Malinow, R. Postnatal synaptic potentiation: Delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat. Neurosci.* **3**, 1098–1106 (2000).
624. Tanaka, H. & Hirano, T. Visualization of Subunit-Specific Delivery of Glutamate Receptors to Postsynaptic Membrane during Hippocampal Long-Term Potentiation. *Cell Rep.* **1**, 291–298 (2012).
625. Zanca, R. M. *et al.* Contextual fear memory modulates PSD95 phosphorylation, AMPAR subunits, PKM ζ and PI3K differentially between adult and juvenile rats. *Neurobiol. Stress* **10**, 100139 (2019).
626. Nicoletti, V. G., Condorelli, D. F., Dell’Albani, P., Ragusa, N. & Stella, A. M. G. AMPA-selective glutamate receptor subunits in the rat hippocampus during aging. *J. Neurosci. Res.* **40**,

- 220–224 (1995).
627. Alfaro-Ruíz, R., Aguado, C., Martín-Belmonte, A., Moreno-Martínez, A. E. & Luján, R. Expression, cellular and subcellular localisation of Kv4.2 and Kv4.3 channels in the rodent hippocampus. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 628. Cai, X. *et al.* Unique roles of SK and Kv4.2 potassium channels in dendritic integration. *Neuron* **44**, 351–364 (2004).
 629. Goldberg, J. H., Tamas, G. & Yuste, R. Ca²⁺ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: Ia-type K⁺ channels control action potential backpropagation. *J. Physiol.* **551**, 49–65 (2003).
 630. Losonczy, A. & Magee, J. C. Integrative Properties of Radial Oblique Dendrites in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron* **50**, 291–307 (2006).
 631. Bark, C. I., Hahn, K. M., Ryabinkin, A. E. & Wilson, M. C. Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1510–1514 (1995).
 632. Hayashi, Y. *et al.* A novel non-canonical Notch signaling regulates expression of synaptic vesicle proteins in excitatory neurons. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
 633. Zhao, F. *et al.* Effects of developmental arsenite exposure on hippocampal synapses in mouse offspring. *Metallomics* **9**, 1394–1412 (2017).
 634. Yang, J. *et al.* Gastrin-releasing peptide facilitates glutamatergic transmission in the hippocampus and effectively prevents vascular dementia induced cognitive and synaptic plasticity deficits. *Exp. Neurol.* **287**, 75–83 (2017).
 635. Ruíz-Salinas, A. K. *et al.* The treatment of Goji berry (*Lycium barbarum*) improves the neuroplasticity of the prefrontal cortex and hippocampus in aged rats. *J. Nutr. Biochem.* **83**, 108416 (2020).
 636. Saito, S. *et al.* Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J. Neurosci. Res.* **39**, 57–62 (1994).
 637. Smith, T. D., Adams, M. M., Gallagher, M., Morrison, J. H. & Rapp, P. R. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J. Neurosci.* **20**, 6587–6593 (2000).
 638. Karoglu, E. T. *et al.* Aging alters the molecular dynamics of synapses in a sexually dimorphic pattern in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiol. Aging* **54**, 10–21 (2017).
 639. Mazzucchi, S. *et al.* The role of synaptic biomarkers in the spectrum of neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Proteomics* **17**, 543–559 (2020).
 640. Antonucci, F. *et al.* SNAP-25, a Known presynaptic protein with emerging postsynaptic functions. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* vol. 8 7 (2016).
 641. Verderio, C. *et al.* SNAP-25 Modulation of Calcium Dynamics Underlies Differences in GABAergic and Glutamatergic Responsiveness to Depolarization. *Neuron* **41**, 599–610 (2004).
 642. Pozzi, D. *et al.* Activity-dependent phosphorylation of Ser187 is required for SNAP-25-negative modulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 323–328 (2008).
 643. Condliffe, S. B., Corradini, I., Pozzi, D., Verderio, C. & Matteoli, M. Endogenous SNAP-25

- regulates native voltage-gated calcium channels in glutamatergic neurons. *J. Biol. Chem.* **285**, 24968–24976 (2010).
644. Condliffe, S. B. & Matteoli, M. Inactivation kinetics of voltage-gated calcium channels in glutamatergic neurons are influenced by SNAP-25. *Channels* **5**, (2011).
645. Bark, C. *et al.* Developmentally regulated switch in alternatively spliced SNAP-25 isoforms alters facilitation of synaptic transmission. *J. Neurosci.* **24**, 8796–8805 (2004).
646. Lisman, J., Yasuda, R. & Raghavachari, S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* **2012** *133* **13**, 169–182 (2012).
647. Xu, X. & Zhang, Z. Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sci.* **79**, 1553–1560 (2006).
648. Pan, M., Li, Z., Yeung, V. & Xu, R. J. Dietary supplementation of soy germ phytoestrogens or estradiol improves spatial memory performance and increases gene expression of BDNF, TrkB receptor and synaptic factors in ovariectomized rats. *Nutr. Metab.* **7**, 75 (2010).
649. Zhang, D., Zhang, J., Bian, C. & Deng, Q. Postnatal and ovariectomic regulation of postsynaptic density protein-95 in the hippocampus of female Sprague-Dawley rats. *Synapse* **64**, 875–878 (2010).
650. Petralia, R. S., Sans, N., Wang, Y. X. & Wenthold, R. J. Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**, 436–452 (2005).
651. Lu, X., Rong, Y. & Baudry, M. Calpain-mediated degradation of PSD-95 in developing and adult rat brain. *Neurosci. Lett.* **286**, 149–153 (2000).
652. Wang, Q. *et al.* Caveolin-1 modulates hypertensive vascular remodeling via regulation of the Notch pathway. *Mol. Med. Rep.* **22**, 4320–4328 (2020).
653. Fernandez-Rojo, M. A. & Ramm, G. A. Caveolin-1 Function in Liver Physiology and Disease. *Trends Mol. Med.* **22**, 889–904 (2016).
654. Nam, S. M. *et al.* Ascorbic acid mitigates d-galactose-induced brain aging by increasing hippocampal neurogenesis and improving memory function. *Nutrients* **11**, 176 (2019).
655. Park, D. S. *et al.* Caveolin-1 Null (-/-) Mice Show Dramatic Reductions in Life Span. *Biochemistry* **42**, 15124–15131 (2003).
656. Liu, Y. *et al.* Downregulation of caveolin-1 contributes to the synaptic plasticity deficit in the hippocampus of aged rats. *Neural Regen. Res.* **8**, 2725–2733 (2013).
657. Ng, F., Wijaya, L. & Tang, B. L. SIRT1 in the brain—connections with aging-associated disorders and lifespan. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 64 (2015).
658. Head, B. P. *et al.* Caveolin-1 expression is essential for N -methyl- D -aspartate receptor-mediated Src and extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and protection of primary neurons from ischemic cell death. *FASEB J.* **22**, 828–840 (2008).
659. Mandyam, C. D. *et al.* Neuron-Targeted Caveolin-1 Improves Molecular Signaling, Plasticity, and Behavior Dependent on the Hippocampus in Adult and Aged Mice. *Biol. Psychiatry* **81**, 101–110 (2017).
660. Rougé, P. M. *et al.* Citrulline diet supplementation improves specific age-related raft changes in wild-type rodent hippocampus. *Age (Dordr).* **35**, 1589–1606 (2013).
661. Park, W. Y. *et al.* Up-regulation of caveolin attenuates epidermal growth factor signaling in

- senescent cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 20847–20852 (2000).
662. Yeo, E. J. & Park, S. C. Age-dependent agonist-specific dysregulation of membrane-mediated signal transduction: Emergence of the gate theory of aging. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 1563–1578 (2002).
663. Cho, K. A. *et al.* Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status. *J. Biol. Chem.* **278**, 27789–27795 (2003).
664. Boulware, M. I., Kordasiewicz, H. & Mermelstein, P. G. Caveolin proteins are essential for distinct effects of membrane estrogen receptors in neurons. *J. Neurosci.* **27**, 9941–9950 (2007).
665. Meitzen, J., Britson, K. A., Tuomela, K. & Mermelstein, P. G. The expression of select genes necessary for membrane-associated estrogen receptor signaling differ by sex in adult rat hippocampus. *Steroids* **142**, 21–27 (2019).
666. Braun, J. E. A. & Madison, D. V. A novel SNAP25-caveolin complex correlates with the onset of persistent synaptic potentiation. *J. Neurosci.* **20**, 5997–6006 (2000).
667. Takayasu, Y. *et al.* Caveolin-1 knockout mice exhibit impaired induction of mGluR-dependent long-term depression at CA3-CA1 synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21778–21783 (2010).
668. Udenfriend, S. B. TYROSINE HYDROXYLASE. *Pharmacol. Rev.* **18**, 43–51 (1966).
669. Blanchard, V. *et al.* Cellular Quantification of Tyrosine Hydroxylase in the Rat Brain by Immunoautoradiography. *J. Neurochem.* **61**, 617–626 (1993).
670. Raisman-Vozari, R. *et al.* Quantitative Autoradiography of Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Rat Brain. *J. Neurochem.* **57**, 1212–1222 (1991).
671. Fan, Y. *et al.* Transcription Factors Phox2a/2b Upregulate Expression of Noradrenergic and Dopaminergic Phenotypes in Aged Rat Brains. *Neurotox. Res.* **38**, 793–807 (2020).
672. Benarroch, E. E. Locus coeruleus. *Cell Tissue Res.* **373**, 221–232 (2017).
673. Lim, E. P., Tan, C. H., Jay, T. M. & Dawe, G. S. Locus coeruleus stimulation and noradrenergic modulation of hippocampo-prefrontal cortex long-term potentiation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **13**, 1219–1231 (2010).
674. Lippiello, P. *et al.* Noradrenergic modulation of the parallel fiber-Purkinje cell synapse in mouse cerebellum. *Neuropharmacology* **89**, 33–42 (2015).
675. Weng, S. *et al.* A unique turn-off fluorescent strategy for sensing dopamine based on formed polydopamine (pDA) using graphene quantum dots (GQDs) as fluorescent probe. *Sensors Actuators B Chem.* **221**, 7–14 (2015).
676. Venton, B. J. & Wightman, R. M. Psychoanalytical electrochemistry: Dopamine and behavior. *Anal. Chem.* **75**, 414A–421A (2003).
677. Pang, Y. *et al.* Facile and sensitive detection of dopamine based on in situ formation of fluorescent polydopamine nanoparticles catalyzed by peroxidase-like ficin. *Sensors Actuators B Chem.* **263**, 177–182 (2018).
678. Youhui Lin *et al.* Silver nanoprobe for sensitive and selective colorimetric detection of dopamine via robust Ag–catechol interaction. *Chem. Commun.* **47**, 1181–1183 (2011).
679. Ji, X. *et al.* On the pH-Dependent Quenching of Quantum Dot Photoluminescence by Redox Active Dopamine. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 6006–6017 (2012).

680. Suzuki, Y. Design and synthesis of fluorescent reagents for selective detection of dopamine. *Sensors Actuators B Chem.* **239**, 383–389 (2017).
681. Silva, T. R. & Vieira, I. C. A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine. *Analyst* **141**, 216–224 (2015).
682. Ejaz, A., Joo, Y. & Jeon, S. Fabrication of 1,4-bis(aminomethyl)benzene and cobalt hydroxide @ graphene oxide for selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin. *Sensors Actuators B Chem.* **240**, 297–307 (2017).
683. Baskerville, T. A. & Douglas, A. J. Dopamine and Oxytocin Interactions Underlying Behaviors: Potential Contributions to Behavioral Disorders. *CNS Neurosci. Ther.* **16**, e92–e123 (2010).
684. Yu, H. wei *et al.* Preparation of quantum dots CdTe decorated graphene composite for sensitive detection of uric acid and dopamine. *Anal. Biochem.* **519**, 92–99 (2017).
685. Tian, T., He, Y., Ge, Y. & Song, G. One-pot synthesis of boron and nitrogen co-doped carbon dots as the fluorescence probe for dopamine based on the redox reaction between Cr(VI) and dopamine. *Sensors Actuators B Chem.* **240**, 1265–1271 (2017).
686. Al-Khaled, M., Heldmann, M., Bolstorff, I., Hagenah, J. & Münte, T. F. Intertemporal choice in Parkinson's disease and restless legs syndrome. *Parkinsonism Relat. Disord.* **21**, 1330–1335 (2015).
687. Ao Zhang, *,†, John L. Neumeier, ‡ and Baldessarini§, R. J. Recent Progress in Development of Dopamine Receptor Subtype-Selective Agents: Potential Therapeutics for Neurological and Psychiatric Disorders. *Chem. Rev.* **107**, 274–302 (2006).
688. Rollo, C. D. Dopamine and Aging: Intersecting Facets. *Neurochem. Res.* **34**, 601–629 (2008).
689. Gould, N. L. *et al.* Dopamine-Dependent QR2 Pathway Activation in CA1 Interneurons Enhances Novel Memory Formation. *J. Neurosci.* **40**, 8698–8714 (2020).
690. Lubec, J. *et al.* Reinstatement of synaptic plasticity in the aging brain through specific dopamine transporter inhibition. *Mol. Psychiatry* (2021) doi:10.1038/s41380-021-01214-x.
691. Varrone, A. & Halldin, C. Human Brain Imaging of Dopamine Transporters. in *Imaging of the Human Brain in Health and Disease* (eds. Seeman, P. & Madras, B.) 203–240 (Academic Press, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-418677-4.00009-9.
692. hippocampus - Wiktionary. <https://en.wiktionary.org/wiki/hippocampus>.
693. Graves, R. *The Greek Myths*. (The Folio Society, 1996).
694. THEOI GREEK MYTHOLOGY - Exploring Mythology in Classical Literature & Art. <https://www.theoi.com/>.
695. Bir, S. C., Ambekar, S., Kukreja, S. & Nanda, A. Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: History behind the discovery. *J. Neurosurg.* **122**, 971–975 (2015).
696. Turgut, Y. B. & Turgut, M. A mysterious term hippocampus involved in learning and memory. *Child's Nerv. Syst.* **27**, 2023–2025 (2011).
697. Olry, R. & Haines, D. E. Cerebral Mythology: A Skull Stuffed With Gods. *J. Hist. Neurosci.* **7**, 82–83 (1998).
698. Judaš, M. & Pletikos, M. A note on the sea-horse in the human brain. *Transl. Neurosci.* **1**, 335–

337 (2010).

699. Engelhardt, E. Hippocampus discovery First steps. *Dement Neuropsychol* **10**, 58–62 (2016).
700. de Diemerbroeck, I. *Anatome corporis humani, Plurimis Novis inventis instructa, variisque observationibus, & Paradoxis, cum Medicis, tum Physiologicis adornata.* (Sumptibus et typis Meinardi à Dreunen, 1672).
701. Bentivoglio, M. & Swanson, L. W. On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). *Brain Res. Bull.* **54**, 461–483 (2001).
702. Noguez, P. *L'anatomie du corps de l'homme en abrégé: Ou description courte de toutes ses Parties. Où l'on donne l'explication de leurs differens usages, tirée de leur structure & des Observations les plus modernes.* (Guillaume Cavelier, 1726).
703. de Garengeot, R. C. *Splanchnologie, ou L'anatomie des Visceres; avec des Figures originales tirées d'après les cadavres, suivie d'une Dissertation sur l'Origine de la Chirurgie.* (chez Charles Osmont, 1742).
704. Pearce, J. M. Ammon's horn and the hippocampus. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **71**, 351 (2001).
705. Winslow, J. B. *Exposition anatomique de la structure du corps humain.* (chez Guillaume Desprez et Jean Desessartz, 1732).
706. Vicq d'Azyr, F. *Traité d'anatomie et de physiologie.* (François-Ambroise Didot l'ainé, 1786).
707. Clark, R. E. & Squire, L. R. 4. Similarity in Form and Function of the Hippocampus in Rodents, Monkeys, and Humans. in *In the Light of Evolution: The Human Mental Machinery* (eds. Cela-Conde, C. J., Lombardo, R. G., Avise, J. C. & Ayala, F. J.) vol. 7 (National Academies Press, 2014).
708. Tarin, P. *Adversaria anatomica, de omnibus corporis humani partium, tum descriptionibus, cum picturis: adversaria anatomica prima, de omnibus cerebri, nervorum & organorum functionibus animalibus inservientium, descriptionibus & iconismis.* (ex typis Joannis Francisci Moreau, 1750).
709. Huxley, T. H. On the zoological relations of man with the lower animals. *Nat. Hist. Rev.* **1**, 67–84 (1861).
710. Stahnisch, F. W. & Nitsch, R. Santiago Ramón y Cajal's concept of neuronal plasticity: The ambiguity lives on. *Trends Neurosci.* **25**, 589–591 (2002).
711. Rosenzweig, M. R. & Bennett, E. L. Psychobiology of plasticity: Effects of training and experience on brain and behavior. *Behav. Brain Res.* **78**, 57–65 (1996).
712. Andersen, P. & Lømo, T. Control of Hippocampal Output by Afferent Volley Frequency. *Prog. Brain Res.* **27**, 400–412 (1967).
713. Bliss, T. V & Lomo, T. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J. Physiol.* **207**, 61P (1970).
714. Lømo, T. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in dentate area of hippocampal formation. *Acta Physiol. Scand.* **68**, (suppl. 277): 128 (1966).
715. Lomo, T. Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. *Exp. brain Res.* **12**, 18–45 (1971).
716. Lømo, T. Potentiation of monosynaptic EPSPs in the perforant path-dentate granule cell synapse.

- Exp. Brain Res.* **12**, 46–63 (1971).
717. Gessner, C. “A creature of fantasy onto which ancient pagans would sit Neptune, their God of the sea”. *Nomenclator Aquatiliū Animantium (1560) Page 182. in Museum für medizinhistorische Bücher Muri – Publicações / Facebook* https://www.facebook.com/permalink.php?story_fbid=1526358947559179&id=737028423158906 (2021).
718. Seress, L. Hippocampus and seahorse.JPG. *Wikimedia Commons* https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hippocampus_and_seahorse_cropped.JPG (1980).
719. Brainmaps.org. Brainmaps-macaque-hippocampus.jpg. *Wikimedia Commons* <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Brainmaps-macaque-hippocampus.jpg> (2008).
720. Golgi, C. *Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso.* (Ulrico Hoepli, 1886).
721. Neely, C. L. C., Lippi, S. L. P., Lanzirrotti, A. & Flinn, J. M. Localization of free and bound metal species through X-Ray synchrotron fluorescence microscopy in the rodent brain and their relation to behavior. *Brain Sci.* **9**, 74 (2019).
722. Ramón y Cajal, S. & Looie496. CajalHippocampus (modified).png. *Wikimedia Commons* [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CajalHippocampus_\(modified\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CajalHippocampus_(modified).png) (2008).
723. Bliss, T. V. P. & 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.* **232**, 357–374 (1973).
724. Reymann, K., Frey, U. & Matthies, H. A Multi-Phase Model of Synaptic Long-Term Potentiation in Hippocampal CA1 Neurons: Protein Kinase C Activation and Protein Synthesis Are Required for the Maintenance of the Trace. in *Synaptic Plasticity in the Hippocampus* 126–129 (Springer Berlin Heidelberg, 1988). doi:10.1007/978-3-642-73202-7_37.
725. Bliss, T. V. P. & Collingridge, G. L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31–39 (1993).
726. Bennett, M. R. The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog. Neurobiol.* **60**, 109–137 (2000).
727. Sheng, M. & Kim, M. J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* **298**, 776–780 (2002).
728. Abraham, W. C. & Williams, J. M. Properties and Mechanisms of LTP Maintenance. *Neuroscientist* **9**, 463–474 (2003).
729. Raymond, C. R. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the ‘long’ in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* **30**, 167–175 (2007).
730. Blundon, J. A. & Zakharenko, S. S. Dissecting the components of long-term potentiation. *Neuroscientist* **14**, 598–608 (2008).
731. Nicoll, R. A. & Roche, K. W. Long-term potentiation: Peeling the onion. *Neuropharmacology* **74**, 18–22 (2013).
732. Lømo, T. The discovery of long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **358**, 617–620 (2003).
733. Abraham, W. C., Logan, B., Greenwood, J. M. & Dragunow, M. Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the Hippocampus. *J.*

- Neurosci.* **22**, 9626–9634 (2002).
734. Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O. & Wigström, H. Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature* **266**, 736–737 (1977).
735. McNaughton, B. L. Long-term potentiation, cooperativity and Hebb's cell assemblies: a personal history. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **358**, 629–634 (2003).
736. Buzsáki, G. Two-stage model of memory trace formation: A role for 'noisy' brain states. *Neuroscience* **31**, 551–570 (1989).
737. Larson, J., Wong, D. & Lynch, G. Patterned stimulation at the theta frequency is optimal for the induction of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **368**, 347–350 (1986).
738. Lømo, T. Discovering long-term potentiation (LTP) - recollections and reflections on what came after. *Acta Physiol.* **222**, e12921 (2018).
739. Barnes, C. A. Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **93**, 74–104 (1979).
740. Barnes, C. A. & McNaughton, B. L. An age comparison of the rates of acquisition and forgetting of spatial information in relation to long-term enhancement of hippocampal synapses. *Behav. Neurosci.* **99**, 1040–1048 (1985).
741. McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Rao, G., Baldwin, J. & Rasmussen, M. Long-term enhancement of hippocampal synaptic transmission and the acquisition of spatial information. *J. Neurosci.* **6**, 563–571 (1986).
742. Castro, C. A., Silbert, L. H., McNaughton, B. L. & Barnes, C. A. Recovery of spatial learning deficits after decay of electrically induced synaptic enhancement in the hippocampus. *Nature* **342**, 545–548 (1989).
743. Saucier, D. & Cain, D. P. Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Nature* **378**, 186–189 (1995).
744. Rogan, M. T., Staubli, U. V. & LeDoux, J. E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* **390**, 604–607 (1997).
745. McKernan, M. G. & Shinnick-Gallagher, P. Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro. *Nature* **390**, 607–611 (1997).
746. Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D., Hess, G. & Donoghue, J. P. Strengthening of horizontal cortical connections following skill learning. *Nat. Neurosci.* **1**, 230–234 (1998).
747. Rioult-Pedotti, M. S., Friedman, D. & Donoghue, J. P. Learning-induced LTP in neocortex. *Science* **290**, 533–536 (2000).
748. Nabavi, S. *et al.* Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* **511**, 348–352 (2014).
749. Gray, D. T. & Barnes, C. A. Distinguishing adaptive plasticity from vulnerability in the aging hippocampus. *Neuroscience* **309**, 17–28 (2015).
750. de Flores, R., La Joie, R. & Chételat, G. Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience* **309**, 29–50 (2015).
751. Malykhin, N. V. & Coupland, N. J. Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder. *Neuroscience* **309**, 200–213 (2015).
752. Tamminga, C. A. & Zukin, R. S. Schizophrenia: Evidence implicating hippocampal GluN2B

- protein and REST epigenetics in psychosis pathophysiology. *Neuroscience* **309**, 233–242 (2015).
753. Sierra, A., Gröhn, O. & Pitkänen, A. Imaging microstructural damage and plasticity in the hippocampus during epileptogenesis. *Neuroscience* **309**, 162–172 (2015).
754. van der Marel, K. *et al.* Effects of long-term methylphenidate treatment in adolescent and adult rats on hippocampal shape, functional connectivity and adult neurogenesis. *Neuroscience* **309**, 243–258 (2015).
755. Stranahan, A. M. Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience* **309**, 125–139 (2015).
756. Barrientos, R. M., Kitt, M. M., Watkins, L. R. & Maier, S. F. Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. *Neuroscience* **309**, 84–99 (2015).
757. Heine, J. *et al.* Imaging of autoimmune encephalitis – Relevance for clinical practice and hippocampal function. *Neuroscience* **309**, 68–83 (2015).
758. Novkovic, T., Shchyglo, O., Gold, R. & Manahan-Vaughan, D. Hippocampal function is compromised in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience* **309**, 100–112 (2015).

8. Anexos

8.1. Breves histórias

8.1.1. A origem do termo ‘hipocampo’

O termo ‘hipocampo’ já tem uma origem bastante antiga; deriva do latim tardio *hippocampus*, que por sua vez proveio do grego antigo *ἵπποκαμπος* (pronuncia-se |ippókampos|, que significa “cavalomarinho”), que resulta da junção de *ἵππος* (pronuncia-se |íppos|, que significa “cavalo”) + *Κάμπος* (pronuncia-se |Kámpos|, que significa “Campe”: o monstro marinho que vigiava Tártaro, o inferno mitológico grego)⁶⁹²⁻⁶⁹⁴. Segundo a Mitologia Grega, Poseidon, deus do mar e dos terremotos, deslocava-se através das profundezas dos oceanos numa carruagem puxada por monstros marinhos que eram metade peixe metade cavalo (ou um cavalo com uma cauda de peixe no lugar das duas patas traseiras). Como eram monstros-cavalo tinham o nome grego ‘*hippokamos*’. Os cavalos-marinhos, muito comuns nas águas do mar Mediterrâneo, associados a esta mitologia, também eram chamados de hipocampos⁶⁹³⁻⁶⁹⁵. Relativamente à “Doença Sagrada de Hipócrates” (460–377 a.C.), foi declarado que Poseidon causava certos tipos de epilepsia⁶⁹⁶, muito curiosamente. Na Mitologia Romana, Neptuno, análogo de Poseidon, frequentemente conduzia uma carruagem marítima puxada por *hippocampi* (plural latinizado do grego ‘*hippokamos*’) ou por cavalos que poderiam cavalgar no mar⁶⁹⁶. Porém, foi o anatomista italiano Julius Caesar Arantius, o primeiro a descrever aquela estrutura do cérebro à qual cunhou com o termo pelo qual é conhecido ainda hoje; por achar semelhante a um cavalo-marinho, deu-lhe também o nome de *hippocampus* – hipocampo, em português. Inicialmente, Arantius, atribuiu-lhe o nome de bicho-da-seda branco (*Bombycinus vermis candidus*) e, posteriormente, cavalo-marinho (*Hippocampus*), como descrito no seu livro *De Humano Foetu Liber* (1587)¹⁷, que fora contestado por vários de seus pares^{695,697-699}. Posteriormente, cerca de um século depois, por razões que não são completamente claras, o médico holandês IJsbrand van Diemberbroeck (1672)⁷⁰⁰, parece ter adicionado um “pé” a cada cavalo-marinho (“*Pedes hippocampi*”)^{695,701}. A diante, o médico francês Pierre Noguez (1726)⁷⁰² introduziu o sinónimo “*cornes d’Ammon*”, ou, em português, cornos de Ámon (Ámon, um antigo deus associado iconograficamente a uma cabeça de carneiro, da Mitologia Egípcia), para descrever o hipocampo⁷⁰¹, tal como é, mais tarde, mencionado no livro do cirurgião francês René-Jacques Croissant de Garengot in *Splanchnologie, ou L’anatomie des Visceres; avec des Figures originales tirées d’après les cadavres, suivie d’une Dissertation sur l’Origine de la Chirurgie* (1742)⁷⁰³, também^{695,697,704}. Entretanto, o anatomista dinamarquês Jacob Benignus Winsløw (1732)⁷⁰⁵ tinha proposto o nome “corno de carneiro”^{695,697,701}, para o hipocampo. Cerca de meio século depois, o anatomista francês Félix Vicq d’Azyr (1786)⁷⁰⁶ fez a distinção entre um hipocampo grande e um pequeno (*hippocampus major* e *hippocampus minor*)^{695,701}. Este último traçava estas duas estruturas proeminentes conhecidas atualmente como, o *hippocampus major*: Denominado correntemente como “hipocampo”; e o *hippocampus minor*: Corrente pelo uso do termo latino *calcar avis*⁷⁰⁷. Embora tenha sido reimpresso e traduzido frequentemente, é no seu único artigo publicado sobre o hipocampo que o médico italiano Camillo Golgi (1883)¹⁸ escolheu usar uma combinação dos três termos: “*grande piede d’Hippocampo*” (*pes Hippocampi major*)⁷⁰¹. Também, importante denotar o anatomista francês Pierre Tarin (1750)⁷⁰⁸, que distinguiu o que chamou de “*fascia dentata*” do resto do hipocampo^{695,701}; ao que o biólogo britânico Thomas Henry Huxley (1861)⁷⁰⁹ proveu com o nome de “giro dentado”, em alternativa⁷⁰¹. Hoje, o termo que vingou, foi o acreditado e reconhecido por Arantius – hipocampo – comumente dividido em giro dentado e corno de Ámon (ou hipocampo propriamente dito), segundo o Comitê Federativo de Terminologia Anatómica, em 1998, decidindo referir-se ao termo como “*Hippocampus proper*”^{695,701}.

8.1.2. A LTP e a sua relevância para a neurociência

A noção de que o cérebro completamente desenvolvido continua a expressar alterações neuroplásticas, tem uma longa e surpreendente controversa história, a começar pelo histologista espanhol, comumente considerado como o “pai da neurociência” – Santiago Ramón y Cajal [1852–1934; ver Stahnisch & Nitsch (2002)⁷¹⁰ e, ver também, Rosenzweig & Bennett (1996)⁷¹¹]. Não obstante, foi, com base em anos de pesquisa^{712–716}, no ano de 1973, quando o neurocientista britânico Tim Bliss (do *National Institute for Medical Research*, Londres, Inglaterra) e o fisiologista norueguês Terje Lømo (do *Institute of Neurophysiology*, da Universidade de Oslo, Noruega), em Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ que finalmente publicaram, no *The Journal of Physiology*, um entendimento completo e explícito do que chamaram de “*long lasting potentiation*” (em português, “potenciação de longa duração”; a ser posteriormente renomeado para LTP)¹⁷⁸. Pela visão de Patihis (2018), o que parece separar o artigo de Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ dos seus artigos anteriores foi a mudança de estratégia ao usar múltiplos pulsos tetânicos com o intuito de usar um pulso tetânico inicial precedido e seguido por estímulos de sondagem fracos e o subsequente monitorização da LTP por horas. A utilização dessa técnica, além de fazer variar experimentalmente a frequência daquele pulso único, foi o que permitiu aos investigadores finalmente encontrar uma frequência e duração que levou a um efeito de longo prazo por várias horas¹⁷⁸. A **Figura 8.2** mostra a configuração usada por Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ e apresenta a anatomia do hipocampo, incluindo as fibras da via perfurante e os interneurónios da área dentada adjacente.

Figura 8.1 [A] Ilustração da criatura mitológica – Hipocampo: “Uma criatura fantástica sobre a qual os antigos pagãos sentariam Neptuno, o seu Deus do mar”, Conrad Gessner in *Nomenclator Aquatilium Animantium* (1560; página 182). Digitalização cedida pelo Museu de História: *Museum für medizinhistorische Bücher Muri*, em Muri, Suíça⁷¹⁷. [B] Ampliação da parte superior da imagem (A) desta mesma figura, evidenciando apenas o desenho ilustrativo. [C] Preparação de hipocampo e fórnix humanos (à esquerda) em comparação com um cavalo-marinho (à direita); (Preparação pelo professor emérito László Seress, da Universidade de Pécs, Pécs, Hungria, em 1980). Imagem obtida da pesquisa de Domínio Público do *Wikimedia Commons*⁷¹⁸. [D] Secção coronal através do hipocampo dorsal de um rato *Wistar* macho adulto, corado com Nissl e apresentando as regiões e camadas nas quais as densidades médias dos recetores AMPA, cainato e NMDA foram medidas. CA1-3: Sub-regiões do *cornu Ammonis*; DG: Giro dentado; *Stratum or: oriens*, *pyr: pyramidale*, *rad: radiatum*, *l-m: lacunosum-moleculare*, e *l: lucidum* do *cornu Ammonis*; *Stratum mol: moleculare* e *gr: granulosum* do giro dentado. Barra de escala = 1 mm. Imagem retirada de Palomero-Gallagher, Bidmon & Zilles (2003)²⁶. [E] Secção histológica coronal do cérebro inteiro de um macaco adulto (*Macaca mulatta*) com coloração de Nissl, com o hipocampo destacado dentro de uma área circulada delineada, no canto inferior direito. Imagem obtida na pesquisa de Domínio Público do *Wikimedia Commons*⁷¹⁹. [F] Ampliação do canto inferior direito da imagem (E) desta mesma figura, evidenciando a área circular correspondente ao hipocampo. [G] Anatomia transversal do hipocampo humano denotando uma relação de intertravamento do giro dentado (DG) e o *cornu Ammonis* (CA) formando dois anéis em forma de C que se interligam. Desenho de um hipocampo, pelo patologista italiano Camillo Golgi, corado pelo método de nitrato de prata. Imagem originalmente retirada de Golgi (1886)⁷²⁰. Ilustração obtida em Gross *et al.* (2019)²⁵. [H] Organização da formação do hipocampo originalmente desenhada pelo neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal com uma representação esquemática da organização das camadas, usando o método de Golgi-Cox. O circuito trissináptico no hipocampo é organizado em três regiões principais: O giro dentado e os campos das CA3 e CA1. A via perfurante conecta o córtex entorrinal com o giro dentado e foi o local original de estudo para a potenciação de longa duração (LTP). As fibras musgosas do giro dentado projetam-se para o campo da CA3. Dos campos da CA3, as fibras podem sair pelo fórnix (canto superior direito) ou continuar para a CA1 pela via colateral de Schaffer. Os neurónios da CA1 então projetam-se noutros neurónios no córtex entorrinal e subículo. EC = córtex entorrinal; CA = *cornu Ammonis*; DG = giro dentado; Sub = subículo⁷²¹. Imagem modificada do circuito neural do hipocampo de rato, [retirada originalmente de Ramón y Cajal in *Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme & des Vertébrés*; Paris, França: *Maloine* (1911)¹⁹]; imagem girada, legendada de novo e com diagrama adicional criado em Gi; obtida da pesquisa de Domínio Público do *Wikimedia Commons*⁷²².

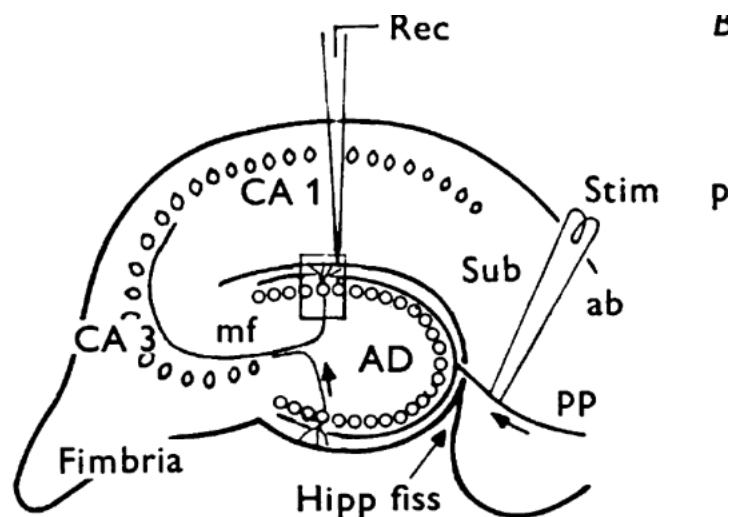


Figura 8.2 O hipocampo; a configuração de estimulação e registo utilizada por Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷, em que a via perfurante (PP) é estimulada (Stim) com uma rajada de alta frequência, e o eléctrodo de registo (Rec) na área dentada (AD) revela um fortalecimento nas sinapses de conexão que persiste durante horas. ab = Feixe angular (do inglês, *angular bundle*); CA = Áreas *cornu Ammonis*; Hipp fiss = Fissura do hipocampo; mf = Fibras musgosas; sub = Subículo. Diagrama retirado de Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷.

Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ observaram em coelhos adultos de ambos os sexos, anestesiados com uretano, que a EBF da via perfurante induziu um nível basal baixo de atividade na área dentada do hipocampo, mas que após uma estimulação transitente de alta frequência da via perfurante (estimulação tetânica, 1 segundo), os estímulos de baixa frequência subsequentes revelam um aumento da eficiência de comunicação e manteriam uma taxa significativamente maior de disparo nos interneurónios dentados, em comparação com o observado antes da EAF¹⁷⁸. Na **Figura 8.3** é apresentado um gráfico onde talvez esta conceção seja mais fácil de visualizar.

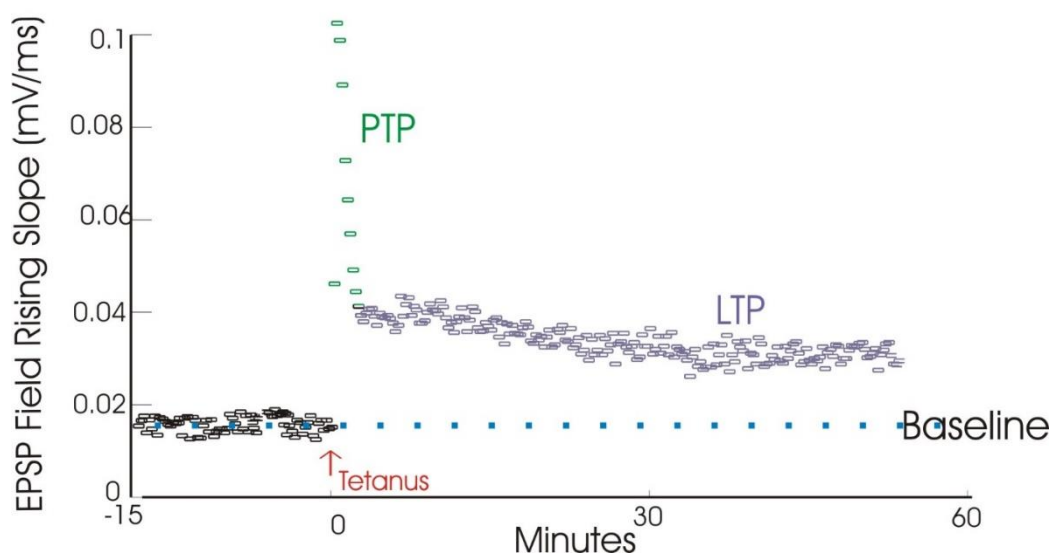


Figura 8.3 Representação simplificada de uma experiência em que se induziu LTP na CA1, revelando o fortalecimento sináptico prolongado após um trem de alta frequência (estimulação tetânica). Os estímulos de teste antes e depois do tétano são de baixa frequência, todavia capazes de acionar um disparo elevado dos neurónios dentados por horas após o pulso de alta frequência. EPSP = Potencial pós-sináptico excitatório; PTP = Potenciação pós-tetânica; Rec = eléctrodo de registo; Stim = eléctrodo de estímulo. Atribuição do diagrama: CC BY-SA 3.0; Ficheiro, “LTP exemplar.jpg”; Criado a 15 de agosto de 2005; Consultado em, *Wikimedia Commons*, Category: *Long-term potentiation*, a 13 de janeiro de 2021, em https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Long-term_potentiation; Figura adaptada.

O facto de a LTP durar horas no estudo de Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ parecia um grande avanço, uma vez que prometia ser o inédito mecanismo neural que finalmente explicaria a aprendizagem e o armazenamento de informações. Naquele mesmo ano, o mesmo cientista Tim Bliss e o investigador Tony Gardner-Medwin (do Departamento de Fisiologia, da *University College London*, Londres, Inglaterra; atual professor emérito de Fisiologia), levaram à publicação no *The Journal of Physiology* – Bliss & Gardner-Medwin (1973)⁷²³, um estudo de investigação em coelhos (2-3 Kg), sem anestesia, após a recuperação de uma operação de implementação de eléctrodos em locais fixos no cérebro; estudo esse, em que deram um salto qualitativo ao sugerirem evidências preliminares de que uma estimulação tetânica, nas fibras da via perfurante, poderia induzir a LTP na área dentada do hipocampo por até 3 dias. Na verdade, num coelho atípico, a LTP pareceu durar 16 semanas. Estas escalas de tempo aumentadas poderiam, hipoteticamente, ajudar a explicar processos mais longos de memória, como a consolidação e o armazenamento de informações a longo prazo. Contudo, havia uma série de possíveis confusões e problemas que impediam a ilação de que a LTP explicaria a memória a um nível fundamental. E. g., poderia ser que os resultados não se repliquem, que a electricidade da sonda não mimetizasse a aprendizagem neuronal conforme ocorre naturalmente ou que os mecanismos por trás destas observações sejam insuficientes para apoiar a descoberta original da LTP¹⁷⁸. É essencial, neste caso, olhar para o expressivo número de estudos posteriores a respeito da LTP para se ter a visão e poder avaliar melhor a importância histórica da descoberta de Bliss e Lømo.

Hoje, não há dúvida de que a descoberta e a subsequente caracterização da LTP, juntamente com a sua contraparte, a LTD, constituem grandes avanços nos campos da neurociência e das ciências biológicas de forma mais geral¹⁷⁹. Desde a descrição inicial por Terje Lømo (1966)⁷¹⁴ na forma de um resumo e como artigos experimentais completos de Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷ e Bliss & Gardner-Medwin (1973)⁷²³, fez-se mostrar um rápido aumento do interesse acerca da LTP, como se evidencia na contagem anual de publicações de artigos sobre a LTP, a partir da década de 1990 (**Figura 8.4**). Nos últimos 5 anos (de 2016 a 2020), a contagem anual de artigos publicados sobre a LTP normalmente excede os 1500 (pesquisa em *Web of Science*, realizada a 14 de janeiro de 2021), o que se traduz numa média de pouco mais de quatro artigos publicados a cada dia do ano, criando, em vista disto, um ambiente verdadeiramente assustador para qualquer um que tente acompanhar esta literatura específica.

Os resultados deste impressionante corpo de trabalho forneceram uma caracterização completa da LTP como um fenómeno fisiológico que ocorre em sinapses em diversas (talvez todas) regiões do cérebro e espécies animais¹⁷⁹. Descrições altamente detalhadas dos mecanismos de indução e manutenção da LTP em todos os níveis de análise abrangendo desde circuitos cerebrais em grande escala à maquinaria sináptica, celular, molecular e genética que medeia o fenómeno da LTP¹⁷⁹ estão agora disponíveis na literatura, [e. g., em Reymann, Frey & Matthies (1988)⁷²⁴; Bliss & Collingridge (1993)⁷²⁵; Bennett (2000)⁷²⁶; Sheng & Kim (2002)⁷²⁷; Abraham & Williams (2003)⁷²⁸; Lynch (2004)⁴³⁰; Malenka & Bear (2004)²¹²; Raymond (2007)⁷²⁹; Blundon & Zakharenko (2008)⁷³⁰; Nicoll & Roche (2013)⁷³¹; Larson & Munkácsy (2015)¹⁷²; Bliss *et al.* (2018)¹⁸¹]. Ao que tudo indica, o esforço da investigação com objetivo ao desenvolvimento de uma compreensão profunda da LTP como um mecanismo de plasticidade tem sido um sucesso inequívoco¹⁷⁹.

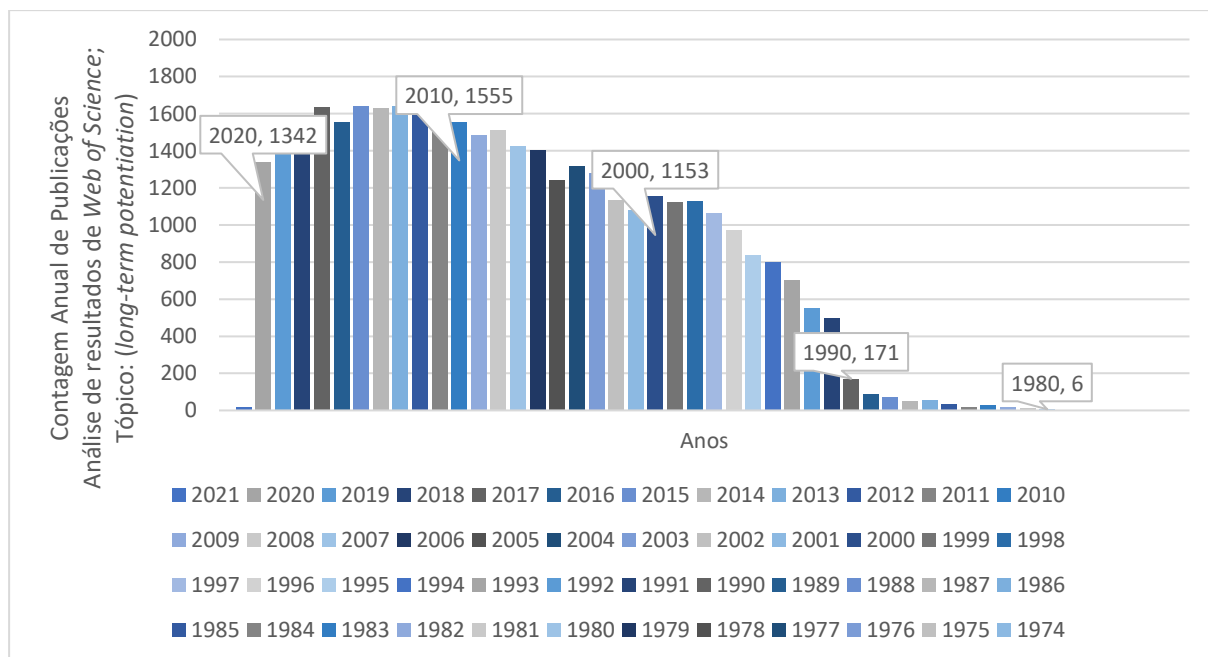


Figura 8.4 Contagem anual de publicações por pesquisa por tópico escrevendo as palavras “long-term potentiation” em *Web of Science* (consultado a 14 de janeiro de 2021, em https://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do?product=WOS&SID=D1RjaGaKomSOVpra4bk&field=PY_PublicationYear_PublicationYear_en&yearSort=true). Com base neste gráfico, é feito notar-se uma clara subida no número de publicações anuais a contar a partir de 1990 (com 171 artigos publicados) até de 2011 (com 1609 artigos publicados), por exemplo. No ano de 2006, foi ultrapassada a marca dos 1400 artigos (com 1405 artigos publicados), seguindo-se então uma estabilização a um nível médio de 1547 artigos por ano desde 2006 até 2020. Os balões-rótulo de chamada de dados apresentados neste gráfico representam: [Ano, Número de publicações].

Surpreendentemente, a descoberta da LTP não gerou inicialmente um grande interesse (como se pode ver refletido no número de artigos publicados na **Figura 8.4**), aliás, o próprio T. Lømo mencionou “*We (...) did our last experiment in September 1969... The results (...) appeared in the Journal of Physiology in 1973.*”, lembrando também “... *relative lack of enthusiasm expressed by most people upon hearing the results.*”, em Lømo (2003; página 619)⁷³².

Entretanto, os dois famigerados artigos de 1973 juntamente com os primeiros subsequentes trabalhos, sugeriram, claramente, diversas semelhanças, relevantes, entre a LTP, como um fenómeno experimental, e a aprendizagem comportamental dependente do hipocampo e a aquisição de memória (ver **Tabela 8.1**). Entre estas inclui-se a rápida indução e a duração variável da LTP (variando de minutos a meses)⁷³³; especificidade de entrada relativamente às fibras estimuladas⁷³⁴; características de cooperatividade/associatividade entre fibras e sinapses⁷³⁵; bem como a indução ideal de LTP por padrões de atividade relacionados à aprendizagem fisiologicamente relevantes⁷³⁶; em particular o ritmo θ do hipocampo no que diz respeito à zona CA1^{172,737}. Consequentemente, a possibilidade de a LTP servir como “mecanismo de aprendizagem/memória” foi reconhecida logo após a sua descoberta [e. g., Andersen & Lømo (1967)⁷¹²; Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷; Bliss & Collingridge (1993)⁷²⁵; McNaughton (2003)⁷³⁵; Lømo (2003)⁷³²; Lømo (2018)⁷³⁸], muito antes do início dos testes empíricos dessa hipótese¹⁷⁹ (ver gráfico na **Figura 8.5** – uma cronologia dos principais eventos no trabalho de investigação sobre a LTP e a memória).

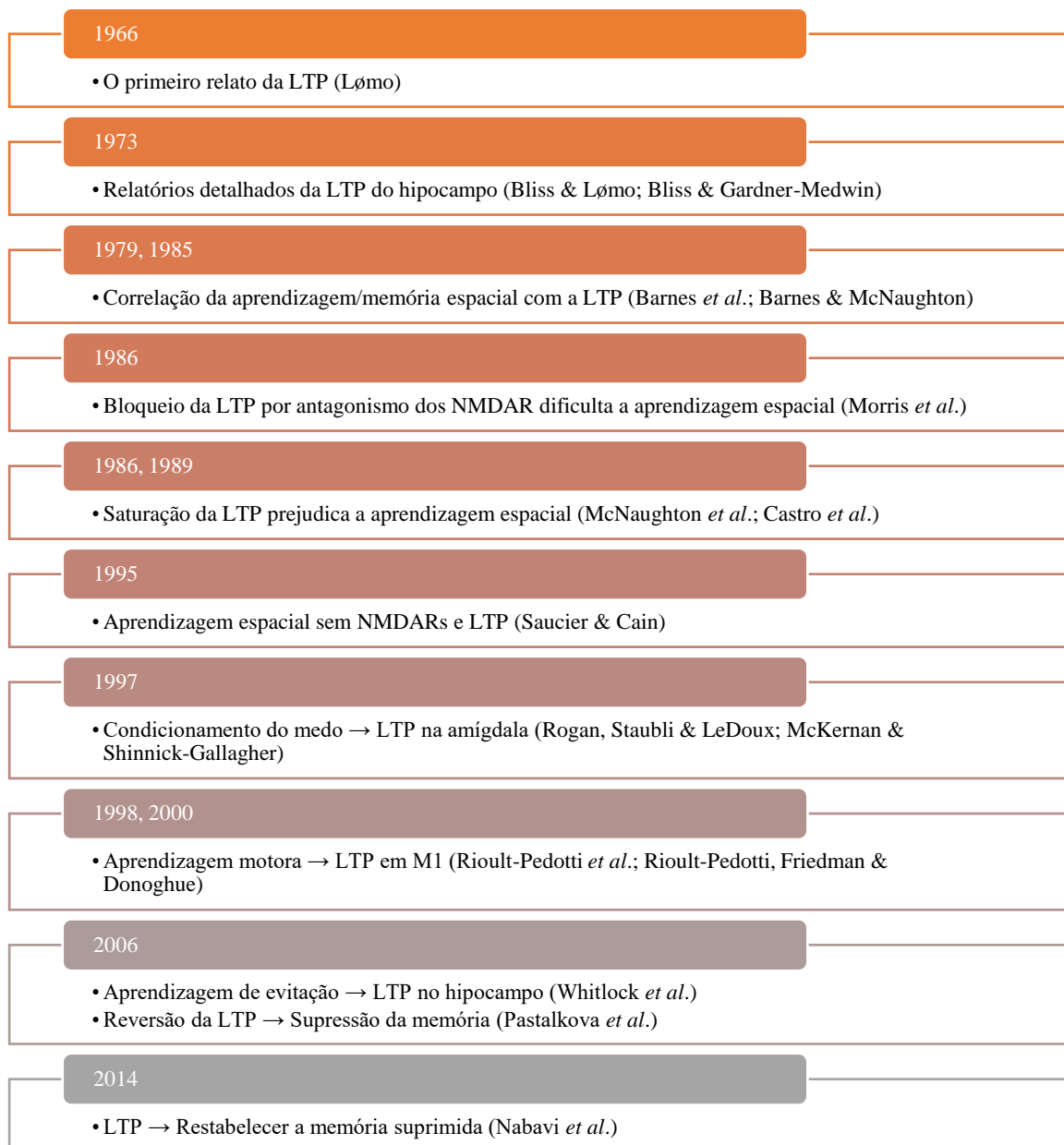


Figura 8.5 Marcos importantes na descoberta da LTP como um mecanismo de memória. Linha temporal dos principais marcos da investigação que avaliam a ligação entre a LTP e a aprendizagem e o armazenamento de memória. Observe-se o atraso de várias décadas desde a primeira descrição da LTP até à emergência de evidências que suportem um papel da LTP na memória. Consultar a secção de Referências para as citações dos artigos incluídos aqui: Lømo (1966)⁷¹⁴; Bliss & Lømo (1973)¹⁷⁷; Bliss & Gardner-Medwin (1973)⁷²³; Barnes (1979)⁷³⁹; Barnes & McNaughton (1985)⁷⁴⁰; Morris *et al.* (1986)¹⁸⁵; McNaughton *et al.* (1986)⁷⁴¹; Castro *et al.* (1989)⁷⁴²; Saucier & Cain (1995)⁷⁴³; Rogan, Staubli & LeDoux (1997)⁷⁴⁴; McKernan & Shinnick-Gallagher (1997)⁷⁴⁵; Rioult-Pedotti *et al.* (1998)⁷⁴⁶; Rioult-Pedotti, Friedman & Donoghue (2000)⁷⁴⁷; Whitlock *et al.* (2006)¹⁹⁹; Pastalkova *et al.* (2006)¹⁰; Nabavi *et al.* (2014)⁷⁴⁸.

Tabela 8.1 Semelhanças entre as características da potenciação de longa duração (LTP), aprendizagem e formação de memória dependente do hipocampo.

| LTP | Aprendizagem e memória |
|---|---|
| Indução rápida (cerca de 1 s) | Aprendizagem rápida de uma tentativa/experiência (e.g., codificação de memória episódica) |
| Indução por padrões de atividade relevantes para a aprendizagem (estimulação <i>θ</i>-burst) | Codificação de informações durante a atividade teta (θ) do hipocampo |
| Duração variável (minutos a meses) | Memória de curto, intermédio e longo prazo |
| Decadência temporal | Decadência da memória (esquecimento com o tempo) |
| Especificidade de entrada (<i>Input specificity</i>) | Especificidade de memória, separação de padrões |
| Cooperatividade/associatividade da atividade sináptica | Aprendizagem associativa |

8.2. A plasticidade neuronal e o hipocampo

A plasticidade neuronal pode ser amplamente definida como a capacidade do sistema nervoso de responder a estímulos intrínsecos e extrínsecos por reorganização da sua estrutura, função e conexões; pode ser descrito em vários níveis, do molecular ao celular, aos sistemas e ao comportamento; e pode ocorrer durante o desenvolvimento, em resposta ao ambiente, no alicerçamento à aprendizagem, em resposta a doenças ou em relação à terapia. Tal plasticidade pode ser vista como adaptativa, quando associada a um ganho de função, ou como inadaptada (*maladaptive*), quando associada a consequências negativas, como perda de função ou aumento de lesões; pontos estes ilustrados por modelos animais e alguns estudos em humanos⁷; **Figura 8.6**.

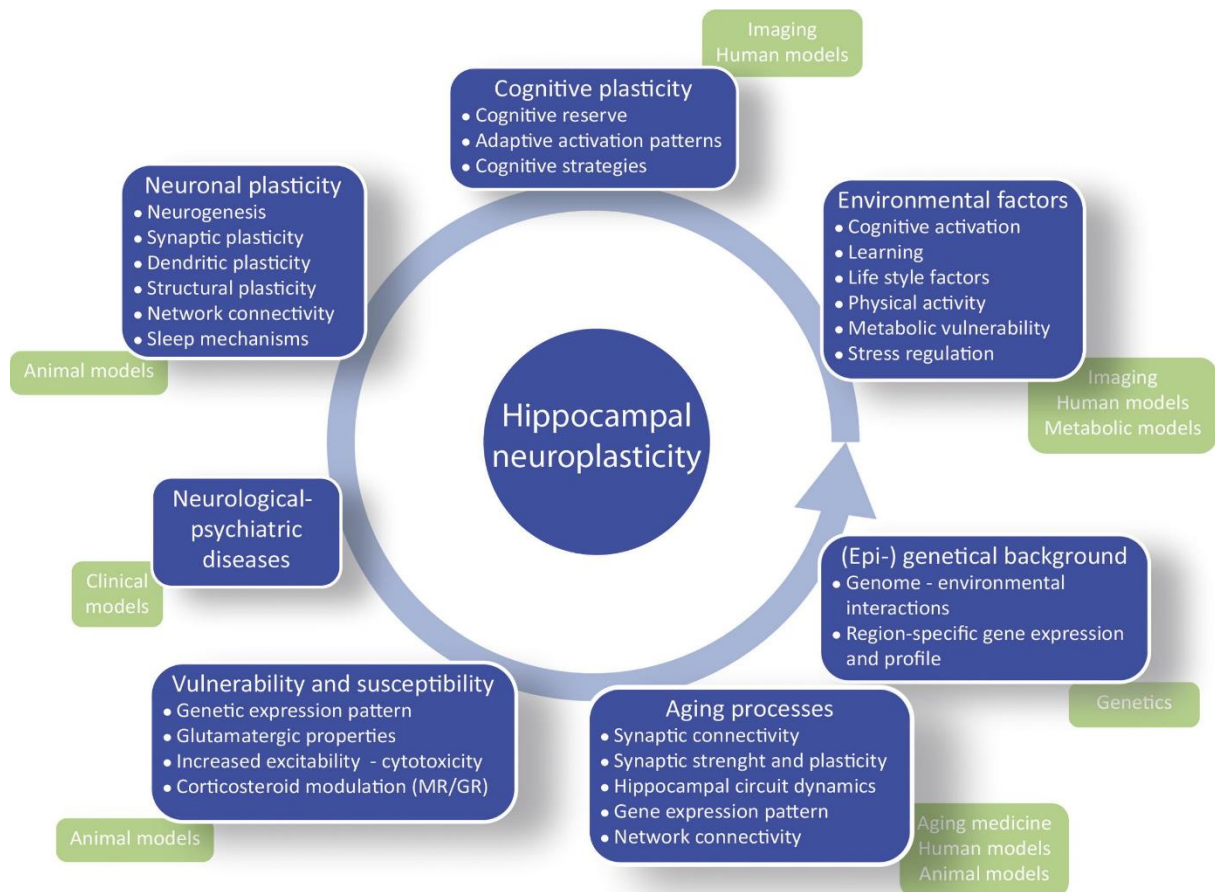


Figura 8.6 Visão geral e esquemática dos vários fatores contribuintes, diferentes escalas e níveis metodológicos e conceituais que determinam a plasticidade neuronal no hipocampo. Figura retirada de Bartsch & Wulff (2015)²².

O conceito de plasticidade neuronal pode ser aplicado a um múltiplo de doenças neurológicas e psiquiátricas, bem como ao envelhecimento⁷⁴⁹, incluindo a doença de Alzheimer^{11,750}; depressão⁷⁵¹; esquizofrenia⁷⁵²; epilepsia^{68,753}; perturbações do neurodesenvolvimento⁷⁵⁴; perturbações metabólicas⁷⁵⁵; e à neuro-inflamação^{756,757}, incluindo a esclerose múltipla⁷⁵⁸.

8.3. Exposição das fatias de hipocampo a diversos tipos de atividade epileptiforme

A **Figura 8.7** mostra a montagem experimental utilizada para expor as fatias de hipocampo a atividade epileptiforme *in vitro* do tipo crítico e intercrítico quando o objetivo é fazer registos eletrofisiológicos (**Figura 8.7.A,B**) ou quando o objetivo é obter quantidade suficiente desta preparação para estudos de WB (**Figura 8.7.C**).

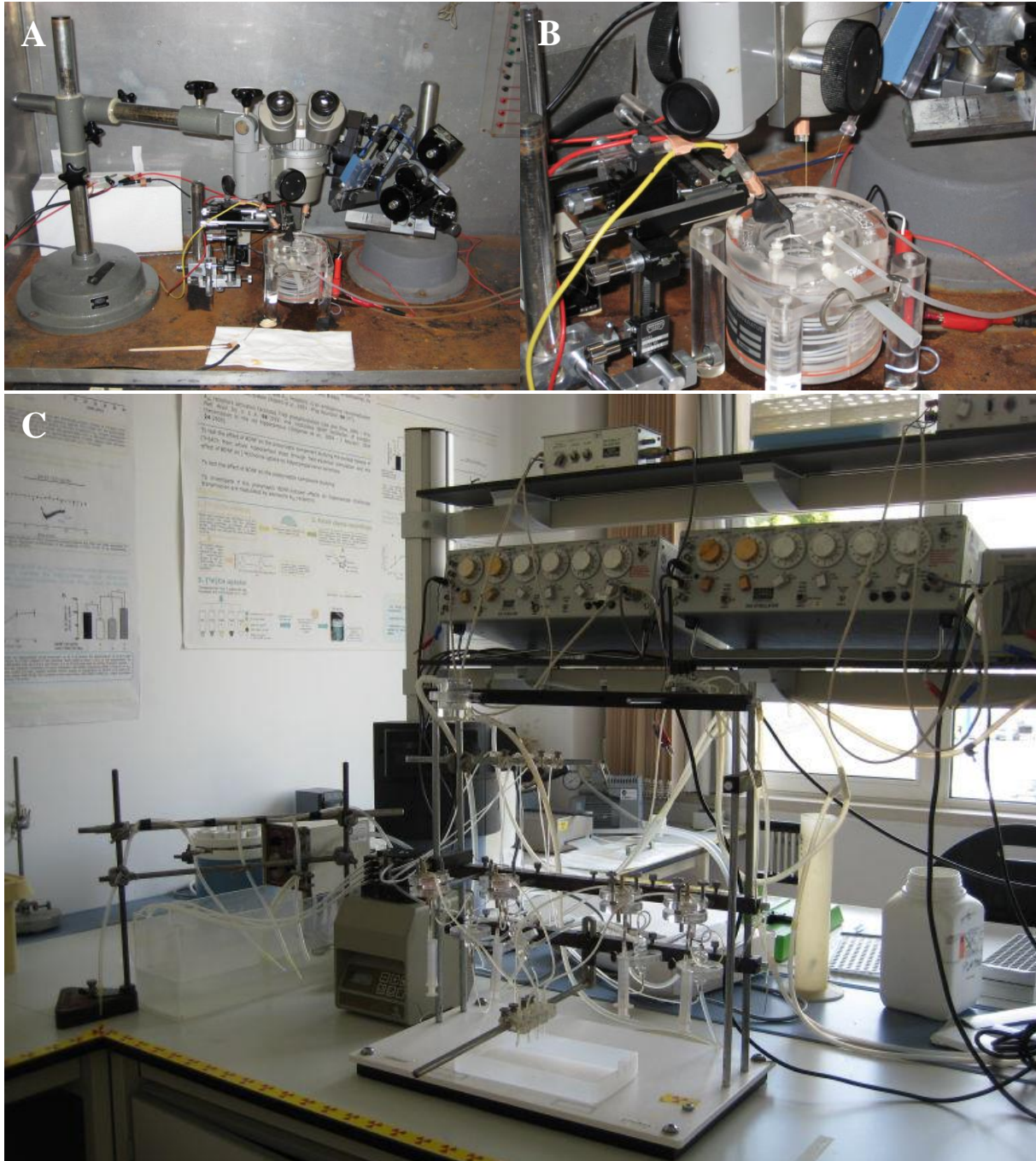


Figura 8.7 Exposição das fatias de hipocampo a atividade epileptiforme. Montagens experimentais utilizadas para obtenção de registos eletrofisiológicos em fatias de hipocampo [A e B] e para obtenção de tecido para análise por western blot. [A] Vista geral da gaiola de Faraday com câmara de registo, micromanipuladores, estereomicroscópio. [B] Plano aproximado da câmara de registo, banho de aquecimento, eléctrodos de estimulação e eléctrodo de registo. [C] Sistema de quatro câmaras paralelas utilizado na estimulação das fatias de hipocampo, mostrando o sistema de perfusão e os estimuladores.

8.4. Método de Bradford

Bradford, é um método de determinação de proteínas que envolve a ligação de *Coomassie Brilliant Blue G-250* às proteínas. A ligação do corante às proteínas causa uma mudança na absorção máxima do corante de 465 para 595 nm e é o aumento da absorção para 595 nm que é detectado por espectrofotometria. Este ensaio é rápido e reproduzível, com o processo de ligação do complexo proteína-corante praticamente completo em aproximadamente 2 min, com estabilidade de cor por 1 h. Há pouca ou nenhuma interferência de cátions como Na^+ ou K^+ , nem de hidratos de carbono como a sacarose⁵⁰⁸.

8.4.1. Ensaio padrão

Foi criada uma curva padrão da concentração de proteína, isto é, uma série de soluções com concentrações de proteína conhecidas, que nos servirão de comparação, posteriormente, para a relação gráfica entre valores da razão das absorvências e a concentração. Com base na análise gráfica, será possível verificar a linearidade do padrão e quando se quiser conhecer a concentração das amostras, acha-se os valores da absorvência, determinados pela leitura do espectrofotômetro, encontrando-se a sua concentração, com recurso ao cálculo da equação da reta.

Na prática, foram criados sete padrões de concentrações diferentes de BSA diluída em *aCSF IP IF*. Primeiramente, foi criada a solução-mãe de concentração 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a partir desta foram criadas as diluições, obtendo-se no final a seguinte série de concentrações de padrão: 0, 100, 200, 400, 700, 1200 e 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Cada ensaio foi realizado em triplicado. Cada padrão foi depois pipetado (5 μL) para os poços de uma microplaca, adicionando-se em seguida 245 μL de reagente de Bradford (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,01% m/v; Ácido *o*-fosfórico 8,5% m/v; Etanol absoluto 4,7% m/v) para cada poço. Para poços independentes pipetaram-se 5 μL de cada amostra e a mesma quantidade de reagente de Bradford. Incubaram-se as misturas durante pelo menos 5 min e, em seguida, realizaram-se as medições espectrofotométricas.

8.4.2. Leitura espectrofotométrica

Os valores da absorvência foram determinados por um espectrofotômetro (*TECAN, Sunrise; software: RdrOle4*). Foi definido a medição da absorvência para 590 nm; a medição de referência para 450 nm e calculou-se posteriormente a razão entre os dois valores medidos para cada poço. Imediatamente antes da leitura efetiva, foi parametrizado uma agitação de 5 s.

Os gráficos de reta-padrão poderão ser consultados em **Figura 8.8** e **Figura 8.9**.

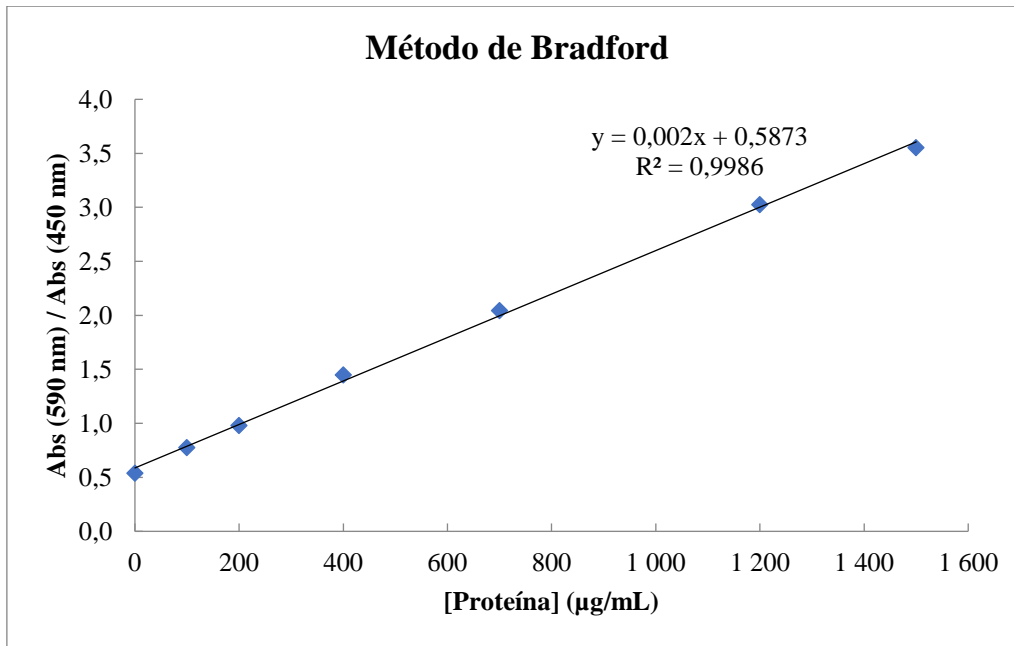


Figura 8.8 Retra-padrão de calibração para o método de Bradford⁵⁰⁸, para a determinação da concentração de proteínas nas amostras *CTR*; *PG 97-269*; $\text{Mg}^{2+} 0 \text{ mM}$; $\text{Mg}^{2+} 0 \text{ mM} + \text{PG 97-269}$; *Bic & Bic + PG 97-269*. A linha contínua representa o ajuste linear da razão das absorvências lidas a 590 nm e a 450 nm obtidas para cada concentração de proteína. O R^2 é o coeficiente de determinação, cujo reflete a qualidade da regressão linear, quer dizer, quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste.

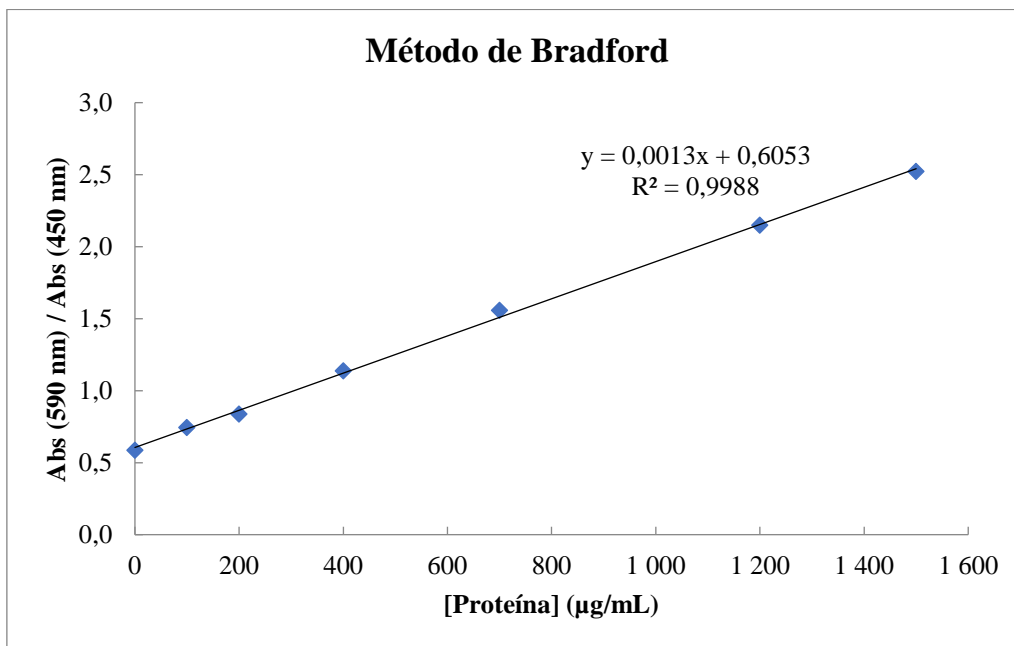


Figura 8.9 Retra-padrão de calibração para o método de Bradford⁵⁰⁸, para determinação da concentração de proteínas nas amostras σ (*4M*, *9M*, *12M*, *21M*) e φ (*4M*, *9M*, *12M*, *21M*). A linha contínua representa o ajuste linear da razão das absorvências lidas a 590 nm e a 450 nm obtidas para cada concentração de proteína. O R^2 é o coeficiente de determinação.