

BRUNA SANTOS DE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE ELÉTRICA SOBRE ESPECIFICAÇÃO DE
PROGENITORES NEURAIIS DA ZONA SUBVENTRICULAR DO
CAMUNDONGO ADULTO**

NATAL/RN

2018



Instituto do Cérebro

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Instituto do Cérebro

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**Influência da atividade elétrica sobre especificação de progenitores neurais na
Zona Subventricular do Camundongo Adulto**

Bruna Santos de Carvalho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.
Orientador: Eduardo Bouth Sequerra

Natal-RN, Brasil

Agosto de 2018

Carvalho, Bruna Santos de.

Influência da atividade elétrica sobre especificação de progenitores neurais da zona subventricular do camundongo adulto / Bruna Santos de Carvalho. - Natal, 2018.

70f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto do Cérebro, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, 2018.

Orientador: Eduardo Bouth Sequerra.

1. Neurogênese adulta. 2. Especificação neuronal. 3. Bulbo olfatório. 4. Zona subventricular. I. Sequerra, Eduardo Bouth. II. Título.

RN/UF/Biblioteca Setorial Árvore do Conhecimento, Instituto do

BRUNA SANTOS DE CARVALHO

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE ELÉTRICA SOBRE ESPECIFICAÇÃO DE
PROGENITORES NEURAIS DA ZONA SUBVENTRICULAR DO
CAMUNDONGO ADULTO**

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Bouth Sequerra – UFRN
Presidente

Profa. Dra. Emelie Katarina Svahn Leão – UFRN
Examinadora Interna

Profa. Dra. Cecília Hedin Pereira – UFRJ
Examinadora Externa

AGOSTO

2018

Dedico este trabalho à memória da Dra. Anna Cláudia Domingos da Silveira da Luz, a primeira pessoa a me guiar nessa linda estrada da neurociência e que compartilhou comigo sua força e amor pela ciência em seus últimos meses de vida me dando lições que me trouxeram até este trabalho. E, também, aos animais que deram involuntariamente suas vidas pela ciência.

Agradecimentos

Aos meus pais maravilhosos, Luzia e Rinaldo, por todo amor e apoio sempre, em tudo.

Ao Heitor por não revirar os olhos toda vez que tem de ouvir sobre ciência e por fazer de mim uma pessoa melhor todas as vezes que tento agir como um exemplo para o meu pequeno irmãozinho.

Ao meu orientador, Dudu, por acreditar em mim e sempre me provocar a ser uma pensadora independente e analítica.

Ao professor Marcos Costa, por todo o conhecimento compartilhado e conselhos oferecidos.

Ao Professor Tarciso Velho, por todos os ensinamentos sobre todas as coisas possíveis e imagináveis, pelas discussões e orientações sobre o meu projeto. E pela amizade nesses quase três anos.

Ao professor Cláudio Queiroz, pela grande ajuda com a programação.

À Crisllaine que executou de forma brilhante parte deste trabalho.

Ao Neurocell.

Ao Velho Lab.

Aos funcionários do ICe.

Ao container e toda a gama de gente maravilhosa que o habita.

Às maravilhosas amigas do grupo GFP.

Aos meus amigos que tornaram esse processo mais leve e menos estressante, em especial: Tita, Fernanda, Jéssica, Hélio, Carol, Renata, Bruno, Juliana, Igor, Luiz, Mary, Xexéu, Guido, Masiel, Annara, Andréa, Ana Raquel e Pedrosa.

À Turma 106 de Medicina da UFRN que me acolheu quando perdi minha primeira turma devido à realização desse trabalho. Vocês me fizeram sentir em casa. Em especial Igor e Luiz (que são como a minha presença quando eu não posso estar), Tiago, Georgiana, Ana Carol, Heitor, Luana, Kevin, Rayane, Sandra e Gio.

A todos que ajudaram me dando tantas formas de suporte e me ajudando em tantas descobertas nesse caminho, esses dois anos (quase três) foram profundamente transformadores e só posso ser grata por tantos nomes mais que deveriam estar escritos aqui.

Resumo

A zona subventricular (SVZ) é o sítio de geração de novos neurônios da neurogênese adulta para o bulbo olfatório (BO). Os progenitores da SVZ geram principalmente dois tipos de interneurônios que se integram ao BO: granulares e periglomerulares (PG). Estas células também podem ser subdivididas com base na expressão das proteínas Calbindina, Calretinina ou Tirosina Hidroxilase. Os mecanismos que levam à especificação desses tipos neuronais são desconhecidos. Na neurogênese da medula espinhal, a identidade de neurotransmissor é especificada de acordo com a atividade elétrica espontânea inicial nas células progenitoras e precursoras. Este padrão de atividade elétrica leva à expressão de fatores de transcrição e diferenciação em um subtipo particular de neurônio. A manipulação da atividade elétrica pode alterar o destino dos progenitores e neurônios derivados. Nossa hipótese é que a especificação dos interneurônios do sistema SVZ-BO também poderia ser influenciada pela atividade elétrica. Para testar essa hipótese, dois experimentos foram projetados para manipular a eletricidade da célula de maneira farmacológica e genética. No primeiro, camundongos DCX-Cre-ER2 / GFP-lox foram injetados com Ácido Caínico (KA) ou PBS na SVZ anterior (SVZa), onde neuroblastos migram da SVZ para o BO. Tamoxifeno foi injetado 4 dias após a injeção de KA para a marcação de neuroblastos imaturos afetados pelo cainato. A perfusão foi realizada 45 dias após a injeção de KA. Em um segundo conjunto de experimentos, camundongos do tipo selvagem foram injetados com um retrovírus contendo o RNA para a expressão de NaChBac, um canal bacteriano de sódio que aumenta a atividade elétrica da célula. Este canal é fundido com o GFP que identifica as células infectadas. Para controle, foi utilizada uma versão mutada e não funcional do canal chamada EtoK. A identidade celular foi analisada 45 e 28 dias após a injeção. Nossos resultados apontam uma redução de neurônios TH+ na manipulação com KA.

Palavras – chave: Neurogênese Adulta; Zona Subventricular; Bulbo Olfatório; Especificação Neuronal.

Abstract

The Subventricular zone (SVZ) is the site of adult neurogenesis to the olfactory bulb (OB). SVZ progenitors generate mainly two types of interneurons that integrate in the OB: granular and periglomerular (PG) neurons. These cells can also be further subdivided based on the expression of the proteins calbindin, calretinin or tyrosine hydroxylase. The mechanisms that lead to the specification into these neuronal types are unknown. In the spinal cord neurogenesis, neurotransmitter identity is specified according to early spontaneous electrical activity in progenitor and precursor cells. This electrical pattern guide master transcription factors expression and the differentiation in a particular subtype. Manipulation of electrical activity can change de fate of progenitors and derived neurons. We hypothesize that the specification of SVZ-OB interneurons could also be influenced by electrical activity. To test this hypothesis, two experiments were designed to manipulate the cell electricity either pharmacologically or genetically . First, DCX-Cre-ER2/lox-GFP mice were injected with Kainic Acid (KA) or PBS in the neuroblasts migratory route to the bulb. Tamoxifen was injected 4 days after to label immature neuroblasts affected by KA and perfusion was performed 45 days after KA injection. In a second set of experiments, wild type mice were injected with a retrovirus containing the RNA for the expression of NaChBac, a bacterial sodium channel that increases electric activity. This channel is fused with the GFP that labels the infected cells. To control this experiment, a mutated non-functional version of the NaChBac channel was used. Cell identity was analyzed 45 and 28 days after injection. Our results suggest a reduction of TH+ cells in the KA treated group.

Keywords: Adult Neurogenesis; Subventricular Zone; Olfactory Bulb; Neuronal Specification.

Lista de abreviações

BMP – do inglês, *Bone morphogenic protein*

BO – Bulbo Olfatório

EPL – do inglês, *External Plexiform Layer*

EtoK – Canal de sódio Bacteriano com uma mutação de ácido glutâmico para lisina

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GCL – do inglês, *Granular Cell Layer*

GFAP – do inglês, *Glial fibrillary acidic protein*

GL – do inglês *Glomerular Layer*

KA – do inglês, *Kainic acid*

MCL – do inglês, *Mitral Cell Layer*

NaChBac – Canal de Sódio Bacteriano

PBS – do inglês, *Phosphate Buffer Saline*

RMS – do inglês, *Rostral migratory stream*

Shh – Sonic Hedgehog

SNC – Sistema Nervoso Central

SVZ – do inglês, *Subventricular Zone*

TH – Tirosina Hidroxilase

ONL – do inglês, *Olfactory Nerve Layer*

TOL – Trato Olfatório Lateral

PG – Periglomerular

CTN – Célula Tronco Neural

CalB – Calbindina

Calret – Calretinina

PGC – *do inglês*, Periglomerular Cell

V-SVZ – *do inglês*, Ventricular-Subventricular Zone

Dpi – dias pós injeção

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIACÕES	9
1.0 INTRODUÇÃO	13
1.1 O BULBO OLFATÓRIO: CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS, HISTOLÓGICAS E FUNCIONAIS.	15
1.2 NEUROGÊNESE ADULTA DO SISTEMA SVZ-BO E SUA A ESPECIFICAÇÃO NEURONAL	21
1.3 ESPECIFICAÇÃO DE NEUROTRANSMISSOR DEPENDENTE DE ATIVIDADE	27
1.4 VETORES VIRAIS COMO FERRAMENTA PARA ALTERAR A ATIVIDADE ELÉTRICA CELULAR	31
2.0 JUSTIFICATIVA	33
3.0 HIPÓTESE	34
4.0 OBJETIVOS	35
4.1) GERAIS	35
4.2) ESPECÍFICOS	35
5.0 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1) VETORES VIRAIS:	36
5.2) ÁCIDO CAÍNICO:	36
5.3) ANIMAIS	36
5.4) CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	36
5.4.1) NANOINJETOR	37
5.4.2) MICROINJETOR:	37
5.5) PROCEDIMENTOS PARA IMUNOHISTOQUÍMICA	37
5.6) ANÁLISE DOS FENÓTIPOS GERADOS NO BULBO OLFATÓRIO	38
6.0 DESENHOS EXPERIMENTAIS	39
6.1) EXPERIMENTO A: ESTÍMULO FARMACOLÓGICO DE NEUROBLASTOS DA SVZ ANTERIOR COM CAINATO	39
6.2) EXPERIMENTO B: INJEÇÃO LENTIVÍRUS CARREGANDO O CANAL DE SÓDIO NACHBAC OU SEU MUTANTE COM PERDA DE FUNÇÃO, ETOK, NA SVZ ANTERIOR	40
6.3) EXPERIMENTO C: ETOK X NACHBAC MICROINJETOR	40
6.4) EXPERIMENTO D: NACHBAC X PALMCHERRY	40
7.0 RESULTADOS	42

7.1 EXPERIMENTO A: NÃO HÁ DIFERENÇA NA DISTRIBUIÇÃO ENTRE CAMADAS E DISTRIBUIÇÃO NA GCL ENTRE OS GRUPOS PBS E KA	43
7.2 EXPERIMENTO B: HÁ AUMENTO DE CÉLULAS NA CAMADA GCL E DIMINUIÇÃO NA CAMADA GL NO GRUPO NACHBAC	47
7.2.1 DISTRIBUIÇÃO CELULAR POR CAMADA EXPERIMENTO B	47
7.3 EXPERIMENTO C: NÃO HÁ DIFERENÇA NA DISTRIBUIÇÃO ENTRE CAMADAS E DISTRIBUIÇÃO NA GCL ENTRE OS GRUPOS ETOK X NACHBAC	49
7.3.1 DISTRIBUIÇÃO CELULAR POR CAMADA EXPERIMENTO C	50
7.3.2. NÃO HÁ DIFERENÇA ENTRE AS CÉLULAS PERIGLOMERULARES DOS GRUPOS NEUROQUÍMICOS AVERIGUADOS NO EXPERIMENTO C	52
7.4 A DIFERENÇA DE DISTRIBUIÇÃO ENTRE AS CAMADAS GL E GCL DESAPARECE APÓS AUMENTO DO N AMOSTRAL	56
7.5 EXPERIMENTO D: NACHBAC X PALMCHERRY INSUFICIENTE EM ESTABELECE UM CONTROLE INTERNO	57
8.0 DISCUSSÃO	59
9.0 CONCLUSÃO	63
10. BIBLIOGRAFIA	64

1.0 Introdução

Os neurônios são células altamente especializadas que apresentam mudança e condução de potenciais elétricos em resposta a estímulos diversos (químicos, elétricos, luminosos...), apresentam morfologia específica para sua funcionalidade e estão conectados a sistemas complexos que dão origem aos comportamentos e reações fisiológicas necessários à preservação da espécie.

Dada a importância do sistema nervoso se faz necessário compreender os diversos passos e fenômenos que levam uma célula progenitora indiferenciada a desenvolver-se em um neurônio funcional e integrado a uma circuitaria pré-existente. Essa diferenciação pode se dar em três momentos: durante a embriogênese, no período pós-natal e na fase adulta.

As primeiras evidências de neurogênese em adultos remontam os anos 1960 a partir de estudos da autorradiografia de timidina tritiada realizados por J. Altman, revelando células com morfologia neuronal marcadas com a timidina radioativa no hipocampo e bulbo olfatório de mamíferos (ALTMAN, 1962, 1963, 1969, ALTMAN; DAS, 1965, 1967). Os dados permaneceram discutíveis e pouco acreditados na literatura por quase trinta anos quando novas tecnologias permitiram a identificação do fenômeno em pássaros canoros (NOTTEBOHM, 1981), com posterior reconhecimento da funcionalidade dos novos neurônios (PATON; NOTTEBOHM, 1984), as evidências em mamíferos também se tornaram robustas e puderam ser demonstradas no córtex visual (KAPLAN, 1981), hipocampo e bulbo olfatório (LUSKIN, 1993)(LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1994). Tendo os dois últimos se tornado os focos centrais da pesquisa em neurogênese adulta dado o grande aporte celular observado.

Os neurônios gerados na neurogênese adulta tem como característica principal serem interneurônios, ou seja, neurônios que realizam apenas projeções locais em um circuito, sendo notadamente inibitórios no bulbo olfatório (SHEPHERD, 2004). As populações de interneurônios podem ser divididas de algumas maneiras, entre elas a marcação por fatores de transcrição expressos e expressão de proteínas ligadoras de cálcio como Calretinina, Calbindina e Parvalbumina. A geração desses neurônios também está bem descrita, em cérebros de roedores, como típica de dois sítios específicos o Hipocampo e a Zona Subventricular. A neurogênese adulta da zona subventricular possui topografia de fenótipos neuronais gerados, progenitores da SVZ dorsal e ventral geram subtipos

distintos de interneurônios para o bulbo olfatório. Uma grande questão neste campo gira em torno da especificação dessa neurogênese, seriam esses progenitores instruídos desde a embriogênese ou seriam estes responsivos aos estímulos ambientais?

Há indícios de que progenitores neurais passam, em sua diferenciação, por um período de influência ambiental, que se reflete, entre outras coisas, em mudanças no padrão de atividade elétrica espontânea. Este trabalho visa testar a hipótese que a atividade elétrica celular pode interferir na especificação fenotípica de progenitores neurais adultos da zona subventricular. A hipótese será testada por meio da manipulação farmacológica e genética dos progenitores com o uso de Cainato para a manipulação farmacológica e retrovírus para a expressão de um canal de sódio bacteriano para a manipulação genética. Ambos interferindo no padrão da atividade elétrica. Após as manipulações serão verificadas as distribuições específicas de neurônios do bulbo olfatório gerados durante a vida adulta do animal.

1.1 O Bulbo Olfatório: considerações anatômicas, histológicas e funcionais.

O olfato é o único sentido cuja aferência cortical não se estabelece através do relé talâmico. Para tal função conectiva entre periferia e córtex sensorial existe o Bulbo Olfatório (BO). O BO é uma estrutura prosencefálica que recebe input dos Neurônios Olfatórios enviando *output* diretamente para o córtex olfatório e outras estruturas que participam do processamento olfatório como a Amígdala e o Córtex Entorrinal (Figura 1). Esta relação foi bem preservada durante a evolução sendo encontrada em quase todos os vertebrados (SHEPHERD, 2004).

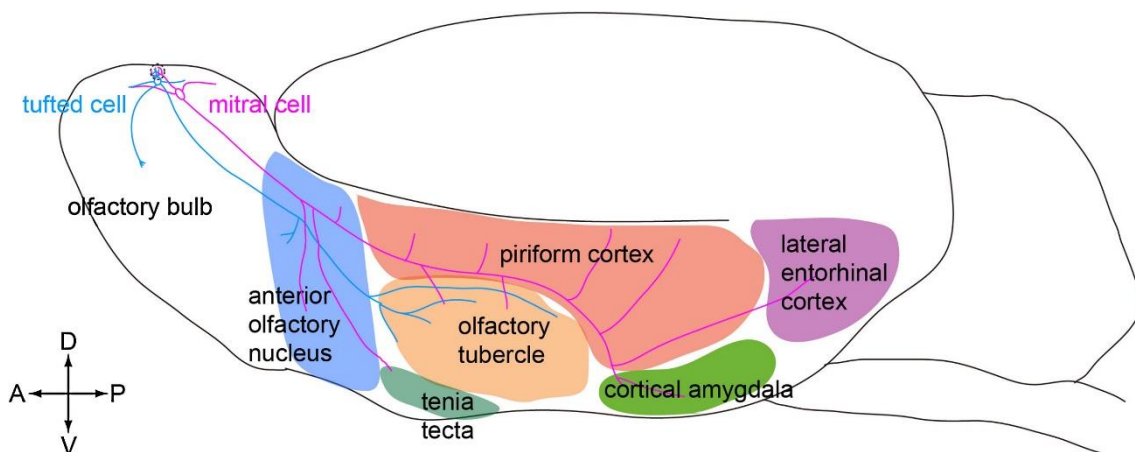


Figura 1 Projeções do BO realizadas pelas células tipo Tufted e pelas células da camada mitral para diversas áreas alvo (ADAPTADO DE IMAI, 2014) .

Ao longo do último século neurocientistas utilizaram o bulbo olfatório como modelo experimental em suas pesquisas, dentre as vantagens em se adotar esse modelo podemos notar a posição estratégica do órgão nos murinos, sendo seu acesso fácil para manipulações diversas. Além disso, a aferência dos neurônios periféricos é completamente isolada da eferência para o córtex podendo esses serem manipulados separadamente. A histologia do BO também contribui para sua apreciação como modelo experimental nas neurociências. Sua conformação se dá em camadas simples e bem delimitadas com tipos celulares variados. Ademais, o BO tem parte de seus neurônios renovados continuamente. É um dos poucos territórios do SNC dotado de neurogênese adulta. Isso o classifica como modelo de estudo de neurogênese, migração e integração neuronal no SNC adulto.

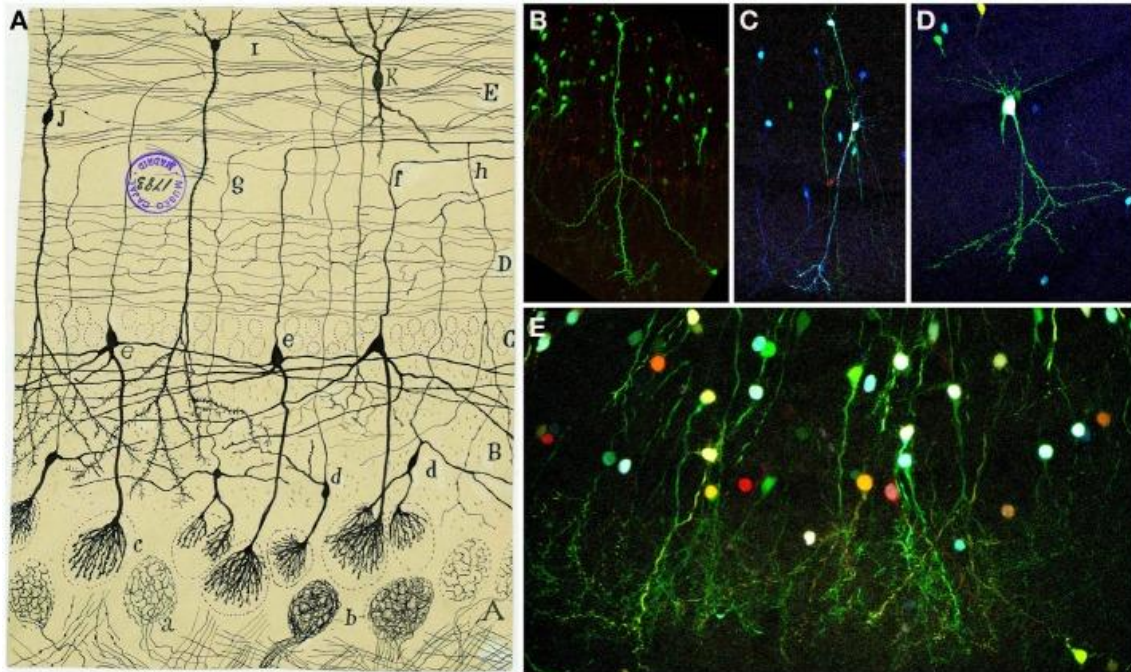


Figura 2 (A) Desenho original de Cajal do Bulbo olfatório do gato (Ramón y Cajal, 1901). Camada Glomerular (A), Camada Plexiforme Externa (B), Camada Mitral (C), Camada Plexiforme Interna (D), Camada Granular (E). (a) Arborização terminal de um neurônio olfatório; (b) Glomérulo; (c) Projeções mitrais; (d) Células Tufted. Cajal Legacy (Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain). (B–E) Células granulares do bulbo olfatório de camundongos adultos jovens (P20) marcadas após eletroporação intrauterina de diferentes plasmídeos em E12-14 (B, C) Células Granulares similares ao desenho de Cajal (i, j) (D) Célula Tufted. (E) Células granulares estendendo seus processos à Camada Glomerular. ADAPTADO DE (FIGUERES-OÑATE; LÓPEZ-MASCARAQUE, 2016)

Ao descrever a histologia do BO de gatos Santiago Ramón y Cajal no início dos anos 1900's trouxe evidências para aceitação da doutrina neuronal (JONES, 1994). A organização do tecido em camadas é notável. São distinguidas classicamente 6 camadas: Camada do nervo olfatório (ONL), Camada Glomerular (GL), Camada Plexiforme Externa (EPL) que pode ser dividida em subcamadas de acordo com a profundidade superficial, intermediária e profunda (NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014), Camada de Células Mitrais (MCL), Camada Plexiforme Interna (IPL) e Camada Granular (GCL)

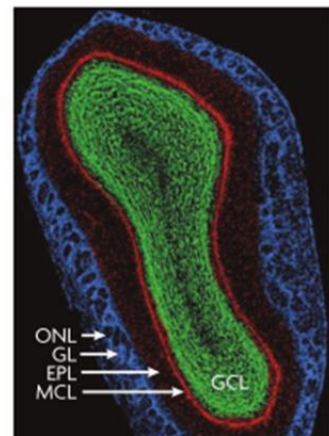


Figura 3 Imunohistoquímica destacando as camadas do BO e sua distribuição concêntrica. Adaptado de (ZOU; CHESLER; FIRESTEIN,

que por vezes tem seu centro segregado e denominado *Core*. As camadas são dispostas

concentricamente ao longo do eixo anteroposterior do BO.

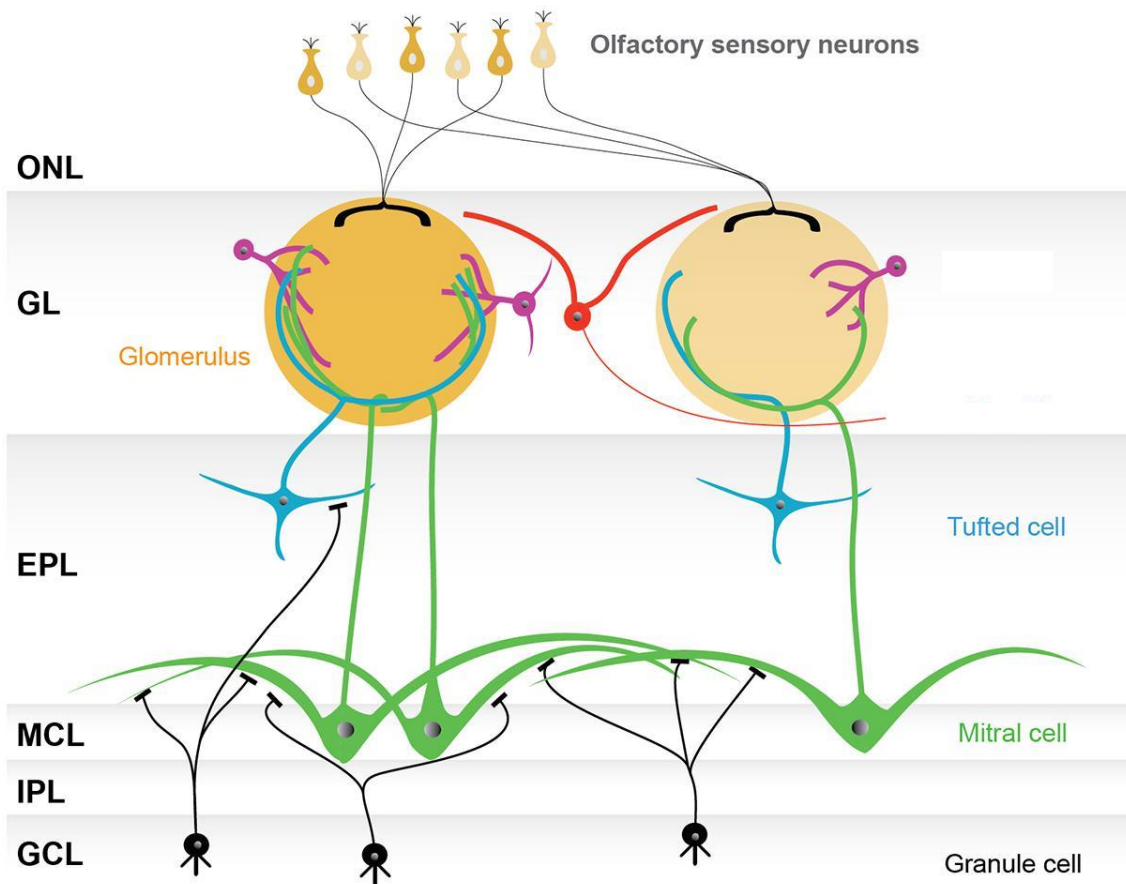


Figura 4 Camadas do bulbo olfatório. Camada de neurônios olfatórios (do inglês ONL, Olfactory Neuron Layer), Camada Glomerular (GL), Camada Plexiforme Externa (EPL), Camada de Células Mítrais (MCL), Camada Plexiforme Interna (IPL) e Camada Granular (GCL) (ADAPTADO DE NAGAYAMA; HOMMA; IMAMURA, 2014)

Para melhor compreensão da organização do bulbo olfatório e seus circuitos os tipos neuronais podem ser divididos em três categorias de acordo com sua partição na circuitaria olfatória: input, output e intrínsecos. Nos roedores, as principais aferências vêm do órgão vomeronasal e dos neurônios do neuroepitélio olfatório, salvo exceções raras os neurônios desses tecidos se constituem morfologicamente em uma população homogênea (SHEPHERD, 2004). É possível que uma organização posicional de tipo celular determinada pela posição horizontal do neurônio no epitélio ocorra e que dessa forma seja regulado o padrão de projeção para a camada glomerular (MOMBAERTS, 2006). Contrapondo a aparente uniformidade morfológica o fenótipo molecular dos Neurônios Olfatórios é muito diverso e varia entre as espécies. Nos camundongos, por exemplo, são conhecidos mais de 1000 receptores olfatórios diferentes distribuídos em 228 famílias, cada Neurônio Olfatório expressando apenas um tipo de receptor, pelo fenômeno conhecido como exclusão alélica, e com dispersão aparentemente aleatória

pelo Neuroepitélio Olfatório (BUCK; AXEL, 1991; ZHANG; FIRESTEIN, 2002). Curiosamente, foi demonstrado que Neurônios Olfatórios que possuem o mesmo receptor projetam para o mesmo glomérulo. Além disso, as projeções são recebidas em dois glomérulos distintos localizados no parte medial e lateral de cada bulbo olfatório(MOMBAERTS et al., 1996).

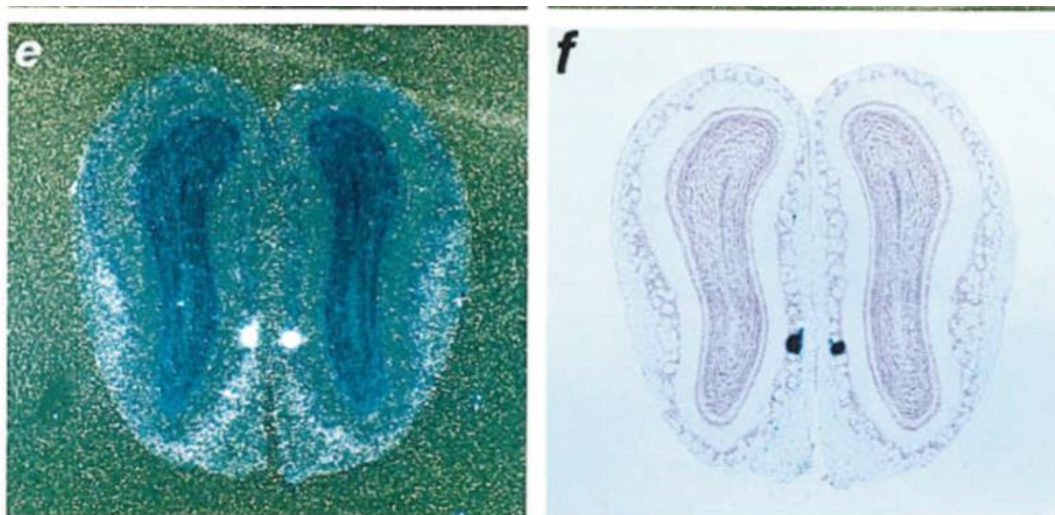


Figura 5 Hibridização *in situ* com o probe para o gene do receptor P2 (e) e coloração em X-Gal (f) no mutante P2-IRES-tau-lacZ, mostrando a especificidade das projeções para glomérulos mediais bilaterais (ADAPTADO DE MOMBAERTS et al. 1996)

Os neurônios olfatórios são continuamente repostos ao longo da vida. A especificidade de conexão entre o neurônio olfatório e seu glomérulo correspondente parece se manter ao longo da vida, porém os mecanismos que guiam esses novos axônios até o glomérulo correto no BO ainda não foram completamente esclarecidos (MOMBAERTS, 2006; SHEPHERD, 2004). Esse nível de plasticidade é único no cérebro, ainda que evidências sugiram que a geração e integração de interneurônios para o BO e Giro Denteado do adulto possam também representar essa capacidade de plasticidade da circuitaria cerebral (SHEPHERD, 2004).

O BO também recebe *input* central, provavelmente ligado à regulação da olfação. Axônios colaterais provenientes dos neurônios piramidais do córtex olfatório fazem conexão principalmente com neurônios da GCL, fibras nos Núcleo Olfatório Anterior também projetam para essa camada. Os Núcleos da Rafe e *Locus Coeruleus* também inervam difusamente a estrutura estabelecendo conexões tanto com a GCL como com o centro dos glomérulos da GL (SHEPHERD, 2004).

O *output* do bulbo olfatório é realizado basicamente por dois tipos celulares: as células mitrais e *tufted*. As células mitrais têm seu corpo localizado na camada mitral e emitem, geralmente, dendritos apicais e basais. O padrão de projeção desses últimos dendritos define o subtipo de célula mitral, células mitrais tipo I projetam seus dendritos basais para a região mais profunda da EPL e as do tipo II para regiões médias (MORI, 1987). Essas subpopulações fazem conexão com subtipos distintos de células granulares formando microcircuitos de processamento olfatório. Os axônios mitrais penetram o BO até formar posterolateralmente o Trato Olfatório Lateral (TOL), trato este que finda na camada Ia do córtex olfatório. As células *tufted* são divididas em internas, externas e médias e seus axônios também formam o TOL. Estas últimas são a maior população e se localizam próximo ao meio da EPL. Os sítios de projeção das células *tufted* para o córtex diferem das mitrais, assim como seu padrão de axônios colaterais que provavelmente exercem um papel modulador sobre as células granulares distinto do exercido pelas células mitrais (SHEPHERD, 1976; Figura 6).

A circuitaria intrínseca do BO conta com uma boa variedade de subtipos de interneurônios que podem ser divididos em duas categorias básicas: neurônios da camada glomerular e neurônios da camada granular. Dentre os interneurônios glomerulares, são mais comuns os Periglomerulares (PG) assim chamados pois seus corpos celulares margeiam o glomérulo. Os PG possuem dendritos bastante ramificados que se estendem por aproximadamente 50-100 micrometros dentro do glomérulo, estabelecendo sinapses com neurônios olfatórios, células mitrais e *tufted*. Os axônios das PG são curtos, atingindo no geral 5 glomérulos de distância. Algumas células PG não apresentam axônios (SHEPHERD, 2004). Há células glomerulares que possuem o corpo celular maior e o axônio mais curto, são chamadas “*short axon*” ou justaglomerulares. Os neurônios glomerulares também foram caracterizados pela expressão de diferentes proteínas ligadoras de cálcio como Calretinina e Calbindina (KOSAKA et al., 1998; TOIDA et al., 1998, 2000) e pela marcação em imunohistoquímica de Ácido gama-aminobutírico (GABA) e comarcação de GABA e Tirosina Hidroxilase (TH) (TOIDA et al., 2000) (KIYOKAGE; KOBAYASHI; TOIDA, 2016) estabelecendo subpopulações neuroquímicas.

Já os neurônios da camada granular são divididos entre as células granulares em si, maioria na camada, e algumas células do tipo “*short axon*” profundas. As células granulares possuem um corpo celular pequeno e sua grande densidade na camada dá o

aspecto de grãos ao microscópio óptico. Seus dendritos dão origem a um processo radial em direção à camada plexiforme externa (EPL) que se ramifica terminalmente. A altura dessa ramificação na EPL distingue subtipos de célula granular, classificada por Mori e colaboradores (1983) em GI, GII e GIII. As células GI são células granulares intermediárias, ramificando seu dendrito por toda EPL; GII células granulares profundas ramificando seu dendrito apenas na parte profunda da EPL; GIII células granulares superficiais, com ramificações na EPL superficial. Essa classificação pode ser correlacionada com a profundidade do corpo celular na camada granular, os corpos celulares posicionados mais profundamente geralmente ramificam seus processos na EPL profunda e assim por diante (ORONA; SCOTT; RAINER, 1983). Estudos recentes reafirmam a classificação tradicional e propõem novas classificações morfológicas para as células granulares (MERKLE et al., 2014).

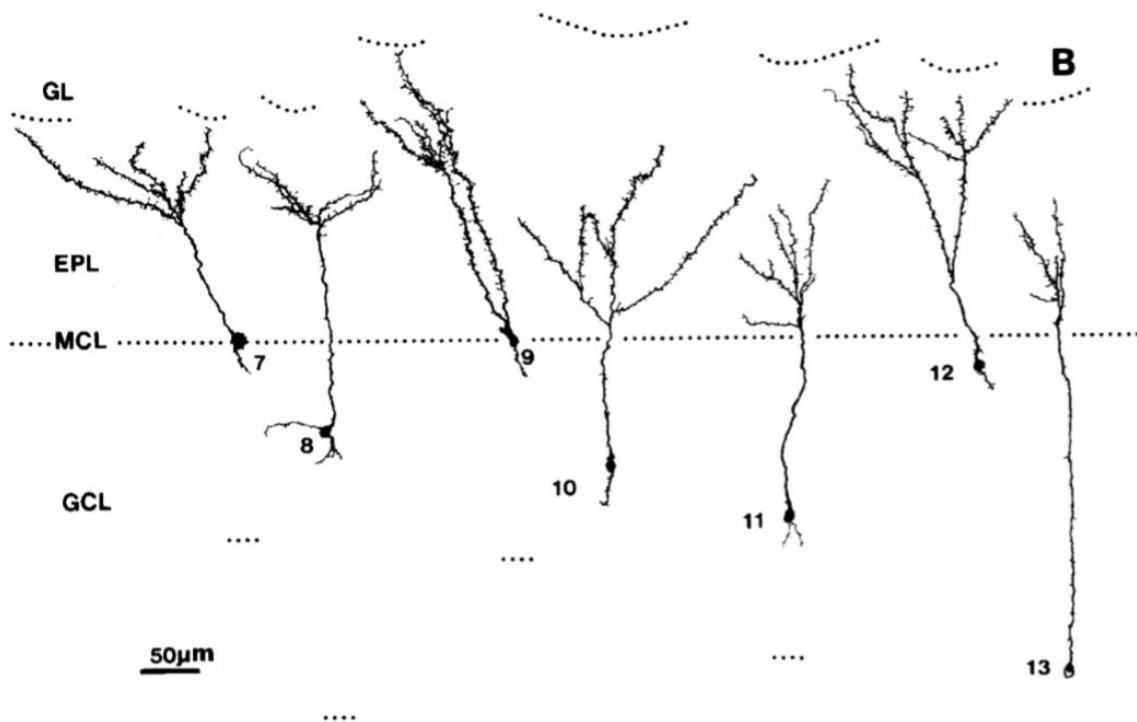


Figura 6 Reconstrução em neurolicida de neurônios granulares marcados com coloração de Golgi. Notar a correlação entre a profundidade do corpo celular na camada granular e ramificação do dendrito na camada plexiforme externa. GL, Camada glomerular. EPL, Camada plexiforme externa. MCL, camada mitral. GCL, camada granular. (RETIRADO DE ORONA; SCOTT; RAINER, 1983)

1.2 Neurogênese adulta do sistema SVZ-BO e sua a especificação neuronal

A geração de neurônios (neurogênese) no sistema nervoso central (SNC) ocorre, principalmente, durante o desenvolvimento, ficando restrita a poucas regiões do SNC na vida pós-natal e adulta. As primeiras evidências de neurogênese em mamíferos adultos remontam os anos 1960 a partir de estudos da autorradiografia de timina tritiada realizados por Joseph Altman, revelando células com morfologia neuronal marcadas com a timidina radioativa no hipocampo e bulbo olfatório de mamíferos (ALTMAN, 1962, 1963, 1969, ALTMAN; DAS, 1965, 1967). Os dados permaneceram discutíveis e pouco acreditados na literatura por quase trinta anos devido a discordâncias entre os pesquisadores sobre a especificidade da marcação de timidina apenas para células que passaram por um processo de divisão já que poderia haver outras formas de captação do marcador pela célula para reparo de DNA, por exemplo. O fato de neurônios maduros não passarem por mitose e não haver ainda o conceito de célula tronco neural corroborou para que os dados permanecessem duvidosos (COLUCCI-D'AMATO; BONAVIDA; PORZIO, 2006). Porém, a maior limitação dessa técnica se encontra na forma de revelação da marcação por timidina. A marcação envolve a precipitação de grãos de prata sobre o tecido sendo uma maneira pouco específica de marcação. O tecido possui várias camadas de células podendo a precipitação marcar uma célula que não incorporou a timidina ao seu DNA.

Os anos 1980 trouxeram novas tecnologias, como os anticorpos anti-BrdU e a microscopia confocal, que permitiram a identificação da neurogênese adulta em pássaros canoros (NOTTEBOHM, 1981), com posterior reconhecimento da funcionalidade dos novos neurônios (PATON; NOTTEBOHM, 1984). As evidências em mamíferos também se tornavam mais confiáveis com a adição da microscopia eletrônica ao protocolo de timidina tritiada dando origem a trabalhos com evidências da neurogênese adulta no córtex visual (KAPLAN, 1981). A marcação retroviral tornou robustas e altamente reproduzíveis as evidências de neurogênese observada no hipocampo e bulbo olfatório de roedores pós-natos e adultos (LUSKIN, 1993) (LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1994). Tendo os dois últimos, hipocampo e bulbo olfatório, se tornado os focos centrais da pesquisa em neurogênese adulta dado o aporte celular observado. A descoberta de células tronco neurais (CTN) que se multiplicavam na presença de dois fatores de crescimento (EGF e FGF) trouxe atenção para o campo. A partir do isolamento dessas células que ao serem cultivadas podem dar origem às três linhagens neurais, astrócitos, neurônios e

oligodendrócitos (REYNOLDS; WEISS, 1992), a produção de neurônios advindos CTN adultas se tornou possível em cultura e o fenômeno *in vivo* passível de explicação.

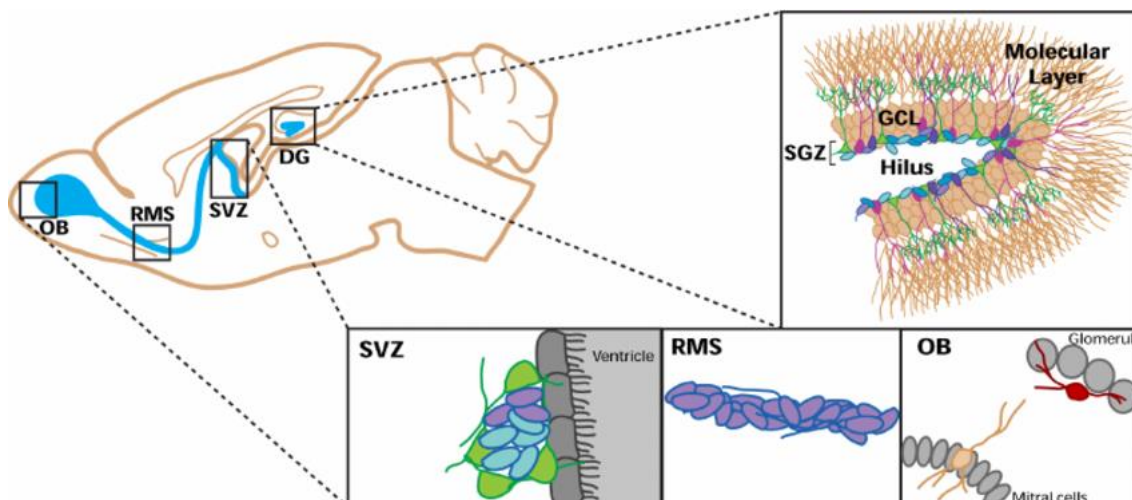


Figura 7 Corte sagital mostrando as áreas de neurogênese adulta no cérebro do roedor. Em detalhe o Giro Denteado (DG) do hipocampo e sua zona geminativa a SGZ e o sistema SVZ-OB com detalhe para a RMS. (JOHNSON; ABLES; EISCH, 2009)

O BO é uma das duas estruturas cerebrais que indiscutivelmente reuniu evidências de geração e integração de novos neurônios durante a vida adulta. A outra, o giro denteado do hipocampo, possui progenitores na Zona Subgranular que dão origem aos neuroblastos que se tornam neurônios da camada granular, não muito distante do seu lugar de nascimento (MING; SONG, 2005). As CTN adultas da neurogênese do BO se encontram na Zona Subventricular (SVZ), também chamada Zona Subependimal, localizada na borda dos ventrículos laterais do cérebro. Os neuroblastos migram em cadeia na via migratória rostral (RMS) da SVZ até o bulbo olfatório (KIRSCHENBAUM et al., 1999; LOIS; ALVAREZ-BUYLLA, 1994; LOIS; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1996), há evidências que esta migração pode ser guiada por fatores liberados por vasos sanguíneos (SNAPYAN et al., 2009). Prestando os vasos sanguíneos o papel desempenhado pela glia radial utilizada como guia na migração radial durante a neurogênese embrionária. A regulação da migração na RMS já se mostrou influenciada por vários fatores, porém não parece ser necessárias pistas advindas do BO para sua manutenção. Mesmo com a excisão cirúrgica do bulbo olfatório os neuroblastos da SVZ continuam a se dividir e migrar passando a acumular-se na RMS (KIRSCHENBAUM et al., 1999). Contudo, a atividade olfatória parece exercer papel regulador sobre a proliferação e sobrevivência dos novos neurônios. A axotomia da aferência olfatória ao BO aumenta a morte neuronal na zona granular e promove a proliferação de

progenitores na SVZ(MANDAIRON; JOURDAN; DIDIER, 2003). A ablação do epitélio olfatório leva a um aumento na proliferação na SVZ e o enriquecimento olfatório através de tarefas de discriminação de odores leva ao aumento de proliferação tanto na SVZ como na RMS (ALONSO et al., 2006, 2008, 2012).

Os progenitores encontrados na SVZ podem ser classificados como: células tipo A, os neuroblastos, ou seja, células já comprometidas com fenótipo neuronal; células tipo B, tidas como a CTN em si, pois geralmente se apresentam em estado de quiescência identificadas por marcadores como a Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP), formam neuroesferas quando cultivadas em presença de EGF (DOETSCH et al., 2002) e regeneram a população de células tipo C após estas terem sofrido ablação pelo uso de antimitóticos como a Citarabina (Ara-C) (DOETSCH; GARCÍA-VERDUGO; ALVAREZ-BUYLLA, 1999); células tipo C ditas amplificadoras, pois têm o poder de dividir-se cerca de três vezes antes de apresentar um comprometimento fenotípico (COSTA et al., 2011; KIRSCHENBAUM et al., 1999).

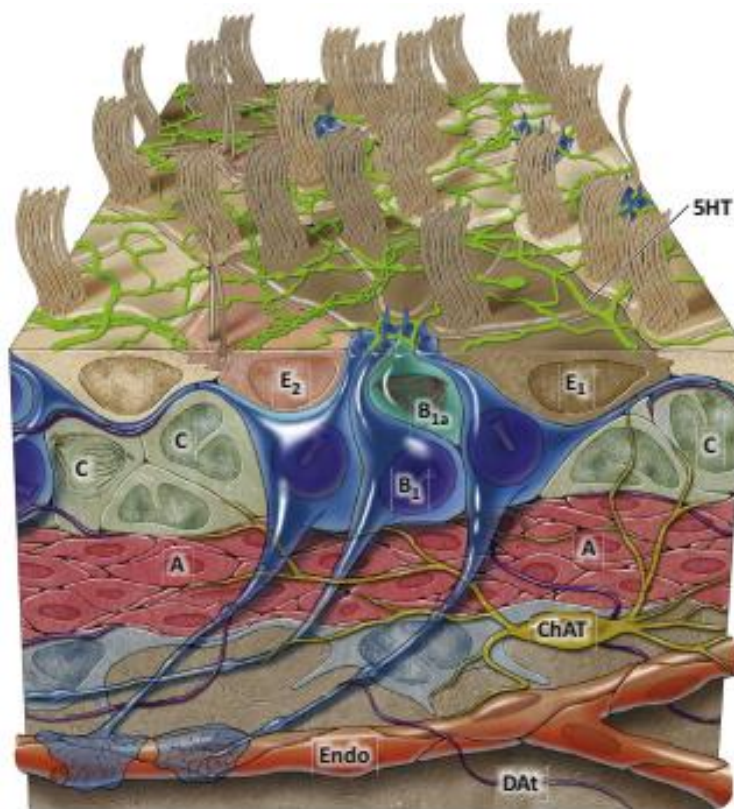


Figura 8 Classificação das células da SVZ. Células B1 representando astrócitos ou CTN, Células C ou amplificadores transientes e Células A neuroblastos em migração para a RMS. Retirado de (LIM; ALVAREZ-BUYLLA, 2014).

Além da classificação por nível de diferenciação, a regionalização dorsoventral que os progenitores adquirem na SVZ é útil para a demarcação de populações geradas para o bulbo olfatório. A neurogênese adulta gera duas populações de neurônios para o BO: neurônios granulares e periglomerulares. A camada granular abriga células profundas e superficiais, expressando a proteína ligadora de cálcio Calretinina (CalR+). A periglomerular células CalR+, positivas para Calbindina (CalB+) e dopaminérgicas (TH+). Essas populações possuem marcação imunohistoquímica que não se sobrepõem. Na SVZ, os progenitores que originam a maioria das células TH+ encontram-se na SVZ dorsal, enquanto as CalB+ são produzidas ventralmente. Progenitores das CalR+ ocupam a porção anterior da parede medial do ventrículo, produzindo células para as camadas granular e periglomerular. Células da camada granular profunda possuem progenitores ventrais enquanto a camada superficial progenitores dorsais (MERKLE; MIRZADEH; ALVAREZ-BUYLLA, 2007). O padrão de mosaico encontrado na SVZ parece também afetar a gênese não apenas de neurônios, mas também de oligodendrócitos (AZIM; BERNINGER; RAINETEAU, 2016)

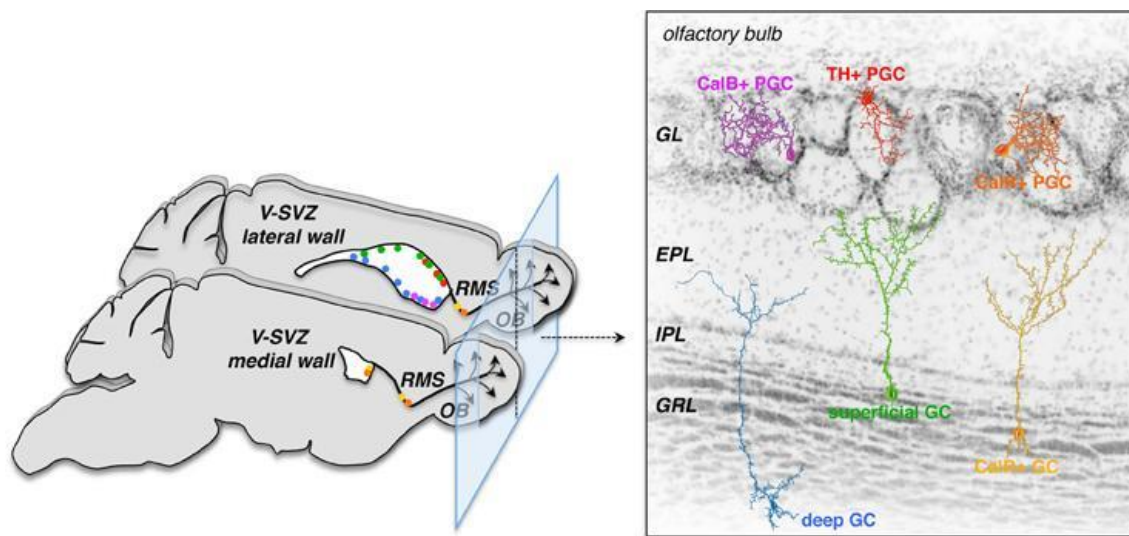


Figura 9 Regionalização dos progenitores na SVZ e seus tipos neuronais no bulbo olfatório. CalB, Calbindin; CalR, Calretinin; EPL, external plexiform layer; IPL, internal plexiform layer; GC, granule cell; GL, glomerular layer; GRL, granule cell layer; OB, olfactory bulb PGC, periglomerular cell; RMS, rostral migratory stream; TH, tyrosine hydroxylase; V-SVZ, ventricular-subventricular zone. (RETIRADO DE OBERNIER; TONG; ALVAREZ-BUYLLA, 2014)

Essa regionalização parece obedecer a sinais de morfógenos como o Sonic Hedgehog (Shh). O Shh é produzido por um pequeno grupo de células do prosencéfalo ventral, seu gradiente de concentração é um importante fator de regionalização durante a embriogênese do sistema nervoso induzindo fenótipo ventral em regiões cuja

concentração apresenta níveis elevados, ajudando a criar um eixo de desenvolvimento dorsoventral. Até recentemente, a regionalização dos progenitores da SVZ adulta não era compreendida, porém Ihrie e colaboradores demonstraram que a sinalização persistente de Shh no cérebro adulto estabelece identidade posicional das células da SVZ. Ao produzir a ablação de Shh na SVZ ocorreu redução na produção de células com fenótipo ventral e quando foi promovida a expressão do receptor de Shh constitutivamente ativo em progenitores dorsais passaram a gerar células correspondentes ao fenótipo ventral (IHRIE et al., 2011).

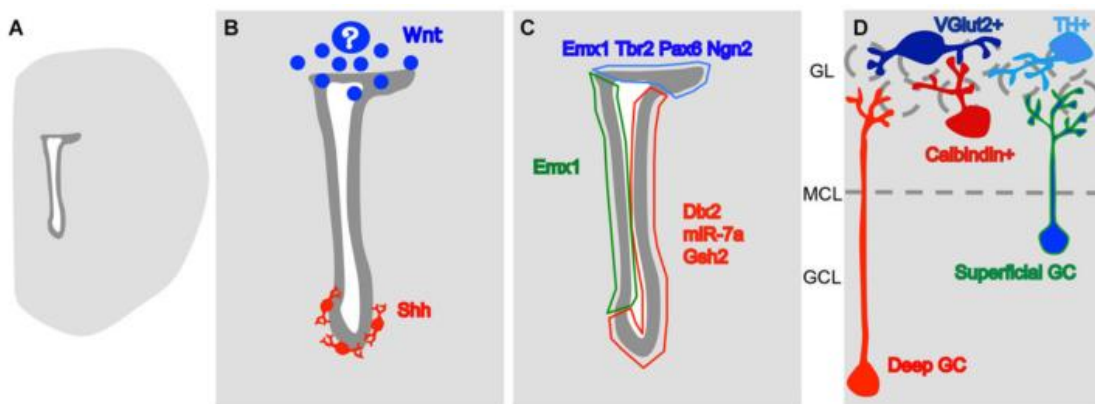


Figura 10 Modelo de regionalização da SVZ através de morfógenos e fatores de transcrição. Em A um corte coronal do cérebro evidenciando o ventrículo lateral. Em B localização dorsoventral dos morfógenos Wnt e Shh. Em C fatores de transcrição envolvidos com a padronização dorsoventral dos tipos neuronais gerados pela SVZ adulta. Em D subtipos granulares e periglomerulares marcados em cor respectiva a sua região de origem na SVZ. (SEQUERRA, 2014).

O destino dorsal parece ser mantido pela sinalização da via canônica de Wnt/ β -catenina, essa via contribui para a ativação local de Tbr2 um fator de transcrição que está ligado à regionalização dorsal (AZIM et al., 2014). O *knockdown* para os reguladores *downstream* de Tbr2, Dvl2 e Vangl2 levou a queda na geração dos neurônios granulares superficiais, advindos de progenitores dorsais (HIROTA et al., 2012). Dessa forma, a padronização espacial dos progenitores da SVZ segue a forma dos territórios morfogenéticos da embriogênese, mostrando que o programa genético de definição do destino celular deve ser constantemente alimentado por informações ambientais que talvez detenham influência sobre a definição do fenótipo celular. Ainda que as CTN encontradas na SVZ descendam diretamente da Glia Radial e sua especificação regional se dê por volta do dia E11.5 (FUENTEALBA et al., 2015; TONG et al., 2015), a

composição dos receptores das CTN da SVZ adulta pode diferir e assim limitar a capacidade plástica restringindo o destino neural (SEQUERRA, 2014).

Mesmo com a identificação desse tipo de geração regionalizada pouco se sabe sobre os mecanismos que levam à escolha do fenótipo neural na neurogênese adulta, entretanto parece haver padrões alusivos à neurogênese embrionária e pós-natal (ZHAO; DENG; GAGE, 2008). Então, pode-se postular que há possibilidade de um dado mecanismo observado durante a neurogênese embrionária dispor de algum papel na neurogênese adulta. Borodinsky e colaboradores (BORODINSKY et al., 2004) apontam que a escolha por um neurotransmissor na neurogênese embrionária é dependente do padrão de atividade elétrica espontânea relacionada aos *spikes* de Ca^{2+} e que este passa por influência de um gradiente de morfógenos como o Shh, garantindo a configuração dorsoventral no tubo neural (BORODINSKY; BELGACEM; SWAPNA, 2012). Essa atividade de *spikes* de cálcio parece regular o desenvolvimento dos circuitos da medula espinhal definindo a escolha entre padrões excitatórios e inibitórios dos neurônios ali diferenciados, exercendo uma diferenciação balanceada de acordo com a homeostase do sistema em formação, quando há aumento na atividade formam-se neurônios inibitórios e com a diminuição excitatórios (BELGACEM; BORODINSKY, 2011; BORODINSKY et al., 2004, 2013; BORODINSKY; BELGACEM; SWAPNA, 2012).

1.3 Especificação de neurotransmissor dependente de atividade

Os mecanismos através dos quais neurônios escolhem seu tipo de neurotransmissor ainda não foram completamente elucidados. Diferentes grupos de pesquisa apontam fatores necessários no processo de especificação de neurotransmissor.

Os fatores de transcrição são reguladores diretos da expressão RNAs de neurotransmissores. Fatores de transcrição a exemplo do Lbx-1 são determinantes na escolha de fenótipo neuroquímico gabaérgico, sendo sua superexpressão suficiente para induzir fenótipo gabaérgico em células da medula de camundongo. Tlx-3 parece ter o efeito oposto e direcionar a diferenciação para o fenótipo glutamatérgico (CHENG et al., 2005). A regulação da expressão de fatores de transcrição. A combinação de expressão de fatores de transcrição, como o Nkx6.1, Nkx2.2, e Irx3 leva à diferenciação das três classes de neurônios gerados no terço ventral do tubo neural (Figura 8) (BRISCOE et al., 2000).

Durante o desenvolvimento, a expressão de muitos fatores de transcrição está sob o controle de proteínas morfogenéticas como o Sonic Hedgehog (Shh), Proteína Morfogenética derivada de Osso (BMP) e Wnt. Essas proteínas têm gradiente dorsoventral estabelecido a partir de centros estabelecidos muito precocemente no desenvolvimento, suas diferentes concentrações geram um código posicional de expressão de fatores de transcrição que segrega progenitores de modo a gerar diferentes populações celulares (ERICSON et al., 1997; ERICSON; MORTON; KAWAKAMI, 1996). O Shh, por exemplo, é fator principal na escolha entre um fenótipo de neurônio motor ou interneurônio dentre os progenitores neurais ventralizados (ERICSON; MORTON; KAWAKAMI, 1996). A ação é mediada pelo fator de transcrição Pax6, que parece interferir também no tipo de motoneurônio gerado, já que nos mutantes homozigotos para Pax6 (Sey/Sey) a geração de neurônios motores somáticos é prejudicada, sendo gerados neurônios motores viscerais (ERICSON et al., 1997). Outros fatores como neurotrofinas e citocinas são citados na literatura como importantes para a especificação neuronal, agindo também como reguladores da expressão gênica (DAADI; WEISS, 1999) (ZWEIFEL; KURUVILLA; GINTY, 2005).

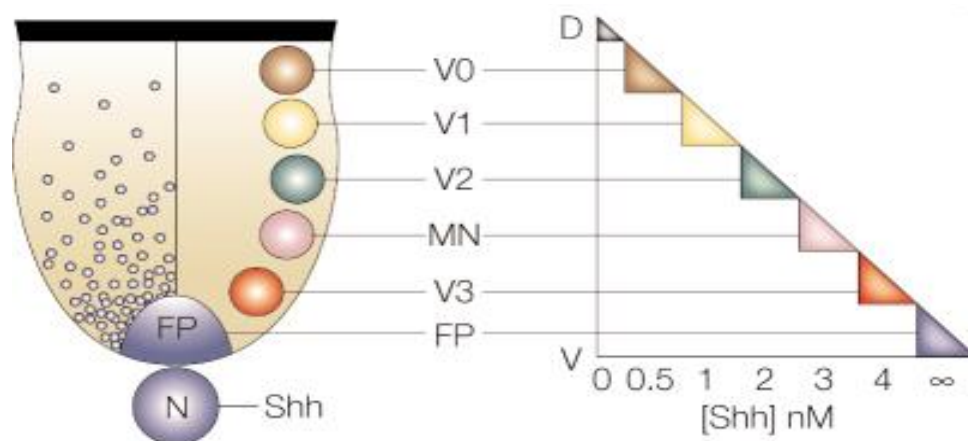


Figura 11 Padronização do tubo neural ventral. Concentração de Shh a partir da notocorda (N) gerando diferentes tipos neuronais na medula embrionária do camundongo. O mesmo efeito da concentração de Shh sobre a diferenciação pode ser reproduzido in vitro, como mostrado no gráfico (JESSEL et al., 2000).

A atividade neuronal se mostrou importante para a especificação de neurotransmissor no sistema nervoso adulto e em desenvolvimento. O fenômeno também é observado em diferentes espécies e para diferentes tipos de neurotransmissor. GABA, por exemplo, pode ser transitoriamente expresso nas células granulares do hipocampo de ratos quando um estado de hiperexcitabilidade é induzido (GUTIÉRREZ et al., 2003) em outras situações também foi verificada a coexpressão de glutamato e GABA nesse mesmo tipo celular (GUTIERREZ, 2016; GUTIÉRREZ, 2002). Os transientes espontâneos de cálcio parecem exercer papel importante na diferenciação neuronal, podendo ser divididos em dois tipos de estímulo celular por sua frequência: ondas e *spikes*. Quando ambos são suprimidos, através do bloqueio da entrada de cálcio na célula, a diferenciação neuronal é alterada (GU; SPITZER, 1995). A manipulação da atividade tipo *spike* demonstrou que a atividade é suficiente para guiar a maturação normal de canais e escolha de neurotransmissor, além de promover o crescimento de neuritos (DULCIS; SPITZER, 2012; GU; SPITZER, 1995; SPITZER, 2015). Os transientes de cálcio parecem carrear algum tipo de informação em sua frequência tal qual o potencial de ação, ainda que aqueles tenham duração 10^4 vezes maior e sejam menos frequentes (GU; SPITZER, 1995; SPITZER, 2015). Essa especificação parece obedecer um paradigma homeostático, ou seja, a escolha de neurotransmissores excitatórios tende a ocorrer quando a célula progenitora está em um ambiente que gera pouca atividade intrínseca e um progenitor neural com muita atividade tende à expressão de neurotipos inibitórios (BORODINSKY et al., 2004; BORODINSKY; SPITZER, 2006). Na medula de *Xenopus*, em especial, os transientes de cálcio regulam a expressão de GABA (BELGACEM; BORODINSKY,

2011), Glicina, Acetilcolina e glutamato. Perturbações nesses padrões espontâneos de atividade levaram a coexpressão de mais de um tipo de neurotransmissor (BORODINSKY et al., 2004; BORODINSKY; BELGACEM; SWAPNA, 2012). Mais tarde foi demonstrado que a sinalização de Shh tem seus sinais codificados em atividade transiente de cálcio pelos componentes da cascata de sua via canônica de ativação (BELGACEM; BORODINSKY, 2011; BORODINSKY et al., 2015), ligando o fenômeno embriológico a um mecanismo de ação plausível.

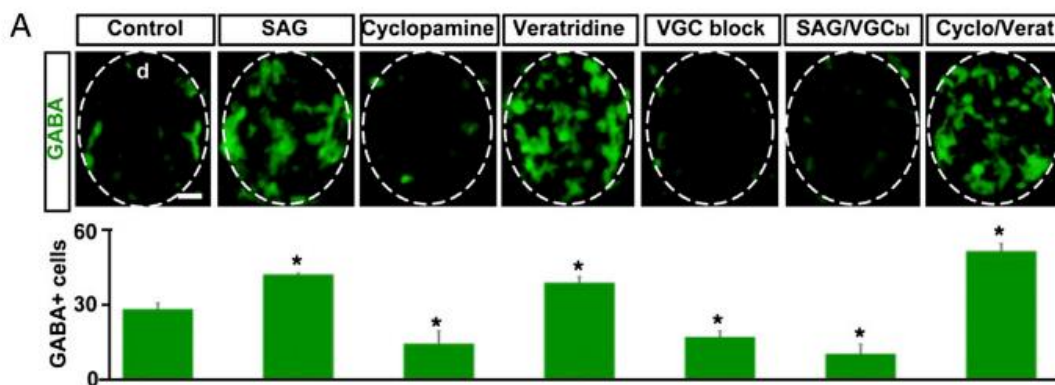


Figura 12 Hipótese homeostática da escolha de neurotransmissor inibitório. Na imagem temos sessões de medula de *Xenopus* submetidas a imunohistoquímica para GABA que sofreram diversos tratamentos para aumentar e diminuir a atividade espontânea de cálcio. Para aumentar temos SAG, Veratridine e Cyclo/Verat. Para diminuir temos Cyclopamine, VGC block e SAG/VGCbl onde os canais de cálcio dependentes de voltagem são bloqueados. Vemos um aumento da marcação de imunofluorescência nos cortes tratados com substâncias que aumentam a atividade de cálcio (BELGACEM; BORODINSKY, 2011).

Há trabalhos com outros neurotransmissores ligados a atividade como a dopamina, neurônios positivos para Tirosina Hidroxilase foram reduzidos nos bulbos olfatórios de ratos privados, quanto a contagem total de células não mudou mostrando uma possível mudança de escolha de neurotransmissor mediante a mudança no padrão de atividade do órgão (BAKER, 1990) (PUCHE; BAKER, 2007). A indução da geração de novos neurônios dopaminérgicos através da manipulação do fotoperíodo em ratos levou à reversão de comportamentos ansiosos provocados por lesão de neurônios desse mesmo sistema (DULCIS; SPITZER, 2013). Mais uma vez o padrão de atividade dos *spikes* de cálcio esteve ligado ao contexto de especificação de neurônios dopaminérgicos (VELAZQUEZ-ULLOA; SPITZER; DULCIS, 2011).

Porém ainda há controvérsias sobre como esses padrões de atividades são gerados e mantidos em lugares diversos do SNC e em outros momentos do desenvolvimento, como na neurogênese adulta. Ainda não foram completamente esclarecidos os mecanismos moleculares ligados a essa aparente regulação elétrica homeostática. Além disso o fenômeno de mudança de neurotransmissor em neurônios maduros ainda é um desafio na área.

1.4 Vetores Virais como ferramenta para alterar a atividade elétrica celular

A capacidade de introduzir e expressar genes exógenos em animais se tornou uma ferramenta indispensável para a biologia moderna (JAENISCH, 1988). Uma revolução na inserção de DNA recombinante aconteceu quando os vetores virais foram desenvolvidos. Sendo o oncoretrovírus com base no vírus Moloney da Leucemia Murina um dos primeiros vetores usados com esse fim (LOIS; BROWN; BALTIMORE, 2002). Sua capacidade de integração ao genoma da célula hospedeira faz com que este seja um vetor apropriado para marcação de células quiescentes que passarão por divisões, a integração ao genoma hospedeiro manterá a marcação estável (LENTZ; GRAY; SAMULSKI, 2012; WALTHER; STEIN, 2000a). Os retrovírus são ótimos candidatos para a marcação estável das células geradas na SVZ, uma vez que o RNA viral será reversamente transcrito a DNA e se integrará ao genoma, passando a ser replicado pela maquinaria celular. Assim, uma injeção estereotáxica é o suficiente para o acompanhamento do desenvolvimento e migração dessas células ao longo do tempo (GERAERTS et al., 2006). A marcação por vetor viral não é diluída por mitose como a marcação por BrdU e outros construtos, a taxa viral pode ainda ser manipulada para que a taxa de infecção cresça em uma determinada população celular para uma marcação bastante consistente (GERAERTS et al., 2006).

Vetores retrovirais podem portar RNAs para codificar diversas proteínas dada sua capacidade verificada entre 8kb e 12kb (CARTIER et al., 2000; GERAERTS et al., 2006; WALTHER; STEIN, 2000b). Sendo assim, é possível a inserção de genes codificadores para proteínas como o canal de sódio bacteriano NaChBac fusionado com a proteína verde fluorescente (GFP). O NaChBac difere dos canais normalmente encontrados em eucariotos por suas constantes de ativação e inativação, que correspondem respectivamente a 12.9 e 166 ms contra uma média menor que 2 e 10 ms nos eucariotos e por ser constituído de uma proteína única (Figura 13) (CHARALAMBOUS; WALLACE, 2011). Por possuir um tempo maior até sua inativação o NaChBac garante que uma maior quantidade de carga positiva de íons de sódio entre na célula durante a despolarização da membrana, garantindo maior despolarização e conseqüente maior atividade elétrica. Ao inserir este canal em uma célula tipo C, por exemplo, poderemos verificar se a atividade elétrica mudará de alguma forma o destino dessa célula. Trabalhos vêm mostrando que o aumento da atividade celular por modulação genética pode aumentar a sobrevivência neural e a integração a circuitos no cérebro adulto (LIN et al.,

2010b), bem como alterar o padrão sináptico na privação sensorial no bulbo olfatório (KELSCH et al., 2010) e no hipocampo (SIM et al., 2013).

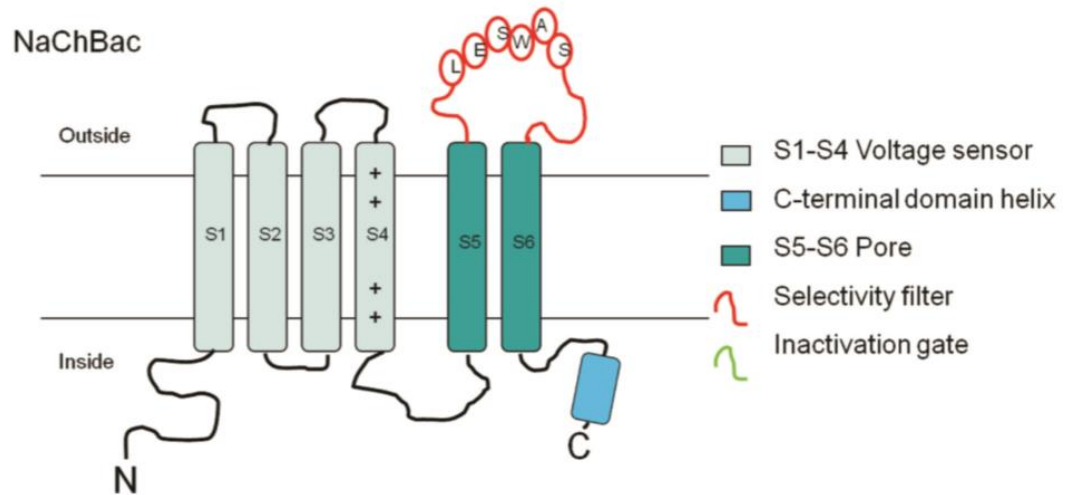


Figura 13 Estrutura molecular do canal Bacteriano NaChBac. Figura esquemática mostra que o canal de sódio bacteriano é composto de apenas uma unidade proteica, diferentemente dos canais de mamíferos.

Dessa forma, pode-se usar a inserção do gene de NaChBac para promover a alteração da atividade elétrica da célula infectada e de sua progênie, com a fusão com a proteína repórter GFP essas células podem ser avistadas em preparações histológicas para microscopia de fluorescência. E seus fenótipos estudados através da marcação por imunohistoquímica de antígenos celulares escolhidos.

2.0 justificativa

O SNC de mamíferos adultos é ineficiente em regenerar-se após lesões e aparentemente a neurogênese adulta não apresenta função regenerativa (KEMPERMANN; WISKOTT; GAGE, 2004). Nesse sentido, estabelecer estratégias terapêuticas que apresentem algum ganho de função através de regeneração de tecido neural se mantém como um grande desafio para a ciência atual. A lista de patologias que afetam o SNC é grande, indo de doenças degenerativas como o Mal de Parkinson a lesões por Acidentes Vasculares Encefálicos ou trauma trazendo grande transtorno para o desenvolvimento de uma vida normal para o indivíduo. Este quadro se agrava com o aumento da população idosa a nível mundial, pois os casos de doenças degenerativas ligadas ao SNC aumentam proporcionalmente ao crescimento dessa população gerando um alto número de indivíduos que dependem de dispendiosos cuidados. Ainda assim, os tratamentos continuam pouco efetivos. Avanços na biologia celular na área de células tronco levantam promessas de tratamentos resolutivos para doenças degenerativas (HOU; HONG, 2008).

A investigação do potencial das CTN e sua manipulação *in vivo* e *in vitro* faz parte do conhecimento a ser adquirido para que essas terapias sejam estabelecidas, sejam elas por ativação da neurogênese endógena com fins de reparação ou por terapia de transplante celular (OKANO; SAWAMOTO, 2008). Trabalhos recentes indicam que as CTN adultas mantêm um destino plástico, podendo gerar neurônios com fenótipos diferentes dos observados *in vivo* em resposta aos estímulos do meio (SEQUERRA, 2014; SEQUERRA et al., 2007, 2010), sendo um desafio atual a determinação dos mecanismos que levam a escolha do fenótipo neuroquímico e como estes se relacionam com os programas genéticos de especificação neuronal (BORODINSKY et al., 2013). As estratégias incluídas nesse trabalho visam a manipulação de neuroblastos *in vivo*, o conhecimento dos fatores que instruem seu fenótipo pode ter futuros usos terapêuticos no reestabelecimento de neurônios perdidos com progenitores endógenos, sem que seja necessário o transplante de células tronco.

3.0 Hipótese

Sinais ambientais alteram o padrão de atividade elétrica de neuroblastos do sistema SVZ-O e instruem seu fenótipo neuronal.

4.0 Objetivos

4.1) Gerais

- Determinar se a atividade elétrica celular é instrutiva na escolha do tipo neuronal gerado pela SVZ adulta

4.2) específicos

- Manipular a atividade elétrica de progenitores e neuroblastos através da injeção do vetor viral de NaChBac na SZV adulta
- Manipular a atividade elétrica de progenitores e neuroblastos através da injeção de ácido caínico
- Avaliar os fenótipos da população neuronal gerada no bulbo olfatório a partir dos progenitores infectados

5.0 Materiais e Métodos

5.1) Vetores Virais: Os vetores virais utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Dr. Carlos Lois do Instituto de Tecnologia da Califórnia – Caltech, e foram estocados em pequenas alíquotas a -80°C . O construto consiste em um retrovírus com defeito de replicação que abriga em um cassete as sequências de um canal de sódio bacteriano (NaChBac) fundido a proteína fluorescente verde (GFP) ou um canal mutado que falha em sua abertura (EtoK) também fundido a GFP, o cassete pode conter ainda apenas a sequência que codifica a proteína fluorescente vermelha endereçada à membrana plasmática (Palmcherry) ou ao núcleo celular (NLS Ruby) usadas nos experimentos como controle interno da injeção.

5.2) Ácido cáinico: O ácido cáinico 50 mg (Cayman Chemical Company) foi diluído em PBS 0.1M, a concentração usada no experimento foi de 20 mM.

5.3) Animais: São utilizados camundongos C57Bl/6 selvagens machos e fêmeas aos 3 meses de idade pesando entre 25 e 30 gramas. Além de animais duplo transgênicos resultantes do cruzamento das linhagens de DCX - CRE (DCX-CRE-ERT2 - Stem Cell Research, Helmholtz Center Munich) e do repórter GFP (CAG-CAT-GFP). Para serem utilizados a dupla transgênese dos animais foi confirmada por análise do DNA genômico por PCR. Para a expressão do repórter os animais foram tratados com Tamoxifeno (TMX) com três injeções de 10 $\mu\text{g/g}$ por três dias consecutivos. Os animais são fornecidos pelo Biotério Setorial do Instituto do Cérebro da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (BISIC/UFRN). O regime de claro/escuro obedece ao ciclo de 12 horas. Alimentação e água são providas *ad libitum*. Os animais são abrigados em grupos de no máximo 6 animais do mesmo sexo por caixa. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRN, nº012/2016)

5.4) Cirurgia Estereotáxica: Os animais são anestesiados com Isoflurano 1,5% 1L/ min administrado via inalação. Fixados em estereotáxico, é realizada tricotomia, antissepsia e anestesia local, incisão mediana no escalpo para revelação das suturas cranianas. Após isso é medido o Bregma. São injetados 300nl de solução do vetor com a titulação de 10^6 UI/ml nas coordenadas 1.70 mm anteroposterior, 0.80 mm laterolateral a partir do bregma e dorsoventral com injeções de 100 nl a 3 mm, 2,5 mm e 2 mm a partir da superfície cerebral. As injeções foram realizadas com dois sistemas injetores distintos

descritos em tópico próximo. Após as injeções são aguardados 5 minutos para a retirada da micropipeta injetora.

5.4.1) Nanoinjector: Nanoliter Injector 2010 (World Precision Instruments). As injeções são realizadas com capilar de vidro preenchido com óleo mineral para evitar compressão de ar. As injeções das soluções são realizadas a 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ após a injeção são aguardados 5 minutos para a retirada do capilar.

5.4.2) Microinjetor: Microinjetor manual (Narishige). As injeções são realizadas com capilar de vidro preenchido com óleo mineral e vedadas com vaselina para evitar compressão de ar no sistema. Os vetores virais são injetados na velocidade de aproximadamente 50 nl/ min. São aguardados mais dois minutos para a movimentação até o próximo ponto de injeção, a retirada do capilar de vidro é feita gradualmente após a 5 minutos da última injeção.

5.5) Procedimentos para Imunohistoquímica: Nos dias pós-operatório 15, 28 e 45 os animais são sedados com Tiopental intraperitoneal a 50mg/kg, e são submetidos a perfusão intracardiaca com Solução Salina 0.9% e Paraformaldeído 4% em Tampão Fostato (PB) por 15 minutos. Os cérebros são pós-fixados *overnight* em Paraformaldeído 4% em PB e crioprotégidos em solução de Sacarose a 30% em PBS. Os hemisférios são separados para congelamento. Após congelamento o material é cortado em criostato em fatias de 30 micrômetros. O material é recolhido em lâminas seriadas que contém partes representativas de todas as seções do bulbo olfatório. São recolhidas 15 fatias por lâmina, em 3 fileiras de 5 fatias representando porções mais frontais, médias e posteriores do bulbo olfatório. Os cortes permanecem em temperatura ambiente de 2 a 8 horas, sendo posteriormente estocados a - 20 °C.

Os cortes são descongelados hidratados em PBS passando por recuperação antigênica em tampão citrato pH 6,0 a 80°C por 15 minutos, bloqueados em solução de NGS a 10% em PBS Triton 0,5% por duas horas e incubados com anticorpos primários para Pax6, Gsh2, Tbr2, Calbindina, Calretinina, Tirosina Hidroxilase, GABA, GFP ou RFP *overnight* a 4°C. Após são lavados os anticorpos primários em PBS e adicionada a solução de anticorpos secundários que é incubada por 2 horas em temperatura ambiente. São lavados os anticorpos secundários e o tecido é corado com DAPI e as lâminas montadas com Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

5.6) Análise dos fenótipos gerados no bulbo olfatório: Para definir o fenótipo das células granulares, utilizamos a reconstrução da estrutura de camadas do tecido no Software Stereo Investigator (MBFmicrosystem, acoplado ao Microscópio Zeiss Imager M.2 com ApoTome.2 para fluorescência e campo claro). A reconstrução da fatia é feita através da marcação dos núcleos celulares com DAPI que permite a demarcação das camadas celulares do BO, com posterior marcação da localização dos corpos celulares GFP+ na camada. A posição do corpo celular é medida através do uso da menor distância entre a camada Mitral e RMS bulbar. A análise da distribuição celular na camada é feita através de algoritmo em MATBLAB. A diferença entre as distribuições dos dois grupos experimentais é testada através do teste de Kolmogorov – Smirnov. O fenótipo das células da camada Glomerular é determinado através da co-marcação das células GFP+ com os marcadores de tipo neuronal descritos, sendo a comarcação confirmada por microscopia confocal (Microscópio Zeiss Examiner Z.1, confocal (e multifóton) de varredura a LASER). O teste estatístico para a comparação das populações nesse caso é o teste T-Student.

6.0 Desenhos experimentais

6.1) experimento A: Estímulo farmacológico de neuroblastos da SVZ anterior com cainato

Animais cirurgiados de acordo com o descrito no item 5.4, injetados com 50 μ l de Ácido Caínico (50 nL, solução a 20 mM em PBS; Cayman Chemical) ou mesmo volume de PBS na SVZa direita com uso de Nanoliter como descrito em 5.4.1. Em seguida foram feitas 3 injeções de Tamoxifeno nos animais Dcx-CreERT2 x loxGFPllox nas concentrações descritas em 5.3 no dia da cirurgia e nos 2 dias seguintes. Estes animais expressam sob o promotor de DCX a enzima Cre conjugada ao receptor truncado de estrogênio, isso impede que a Cre adentre o núcleo celular e corte os códons de parada postos antes do gene que codifica GFP. Ao injetarmos tamoxifeno, este se liga ao receptor e a Cre adentra o núcleo fazendo as alterações necessárias no DNA para que o GFP seja expresso. Dessa forma apenas as células que expressam DCX durante a injeção de tamoxifeno expressam o repórter GFP. Aguardados 45 dpi para migração e integração das células infectadas para então ser realizada a perfusão dos animais e preparação do tecido para análises.

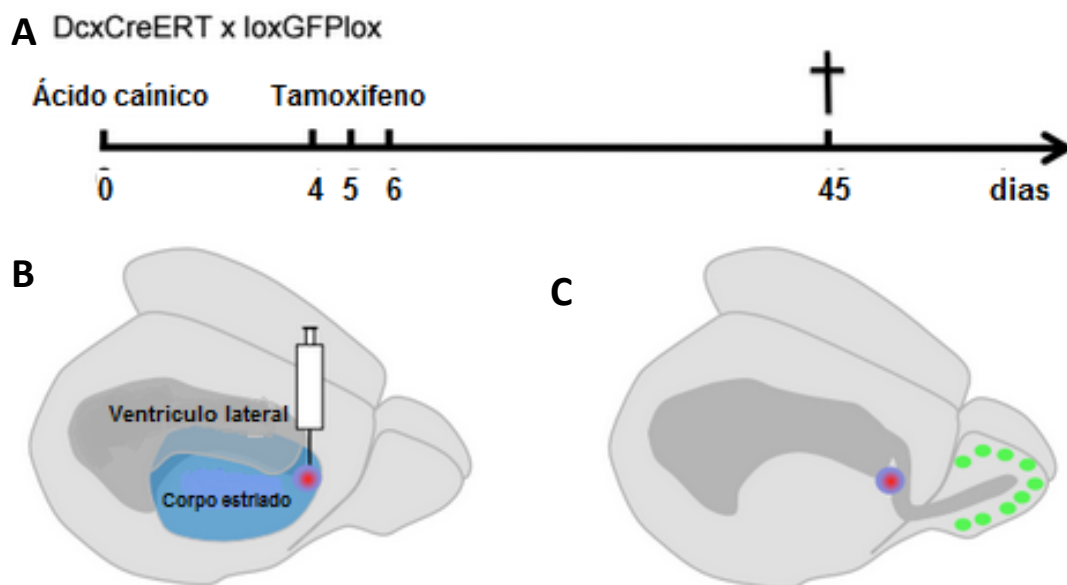


Figura 24 Linha do tempo do desenho experimental. Em A desenho experimental, onde a injeção de ácido caínico é feita no dia 0, seguida da administração intraperitoneal de tamoxifeno nos dias 4, 5 e 6 e perfusão do animal no dia pós-operatório 45. Em B, vemos o local da injeção e em C desenho representativo das células verdes, que expressavam DCX no momento da injeção de tamoxifeno.

6.2) Experimento B: Injeção lentivírus carregando o canal de sódio NaChBac ou seu mutante com perda de função, EtoK, na SVZ anterior

Os animais foram cirurgiados de acordo com o descrito no item 5.4. Os animais foram injetados na SVZa direita com 600 nl de solução do vetor viral EtoK ou NaChBac com uso de Nanoliter como descrito em 5.4.1. Aguardamos 45 dias pós-cirurgia para migração e integração das células infectadas para então ser realizada a perfusão dos animais e preparação do tecido para análises.

6.3) Experimento C: EtoK X Nachbac Microinjetor

Animais cirurgiados de acordo com o descrito e item 5.4, injetados na SVZa direita com 300 nl de solução do vetor viral EtoK ou NaChBac com uso de Microinjetor como descrito em 5.4.2. Aguardados 28 dpi para migração e integração das células infectadas para então ser realizada a perfusão dos animais e preparação do tecido para análises.

6.4) Experimento D: Nachbac x Palmcherry

Neste experimento, os animais foram cirurgiados de acordo com o descrito e item 5.4. Estes foram injetados na SVZa bilateralmente com 300 nl de solução com lentivírus com o gene de EtoK ou NaChBac em mistura com solução de lentivírus com o gene de Palmcherry. Esta mistura, foi injetada com uso de Microinjetor como descrito em 5.4.2. Aguardamos 28 dpi para migração e integração das células infectadas para então ser realizada a perfusão dos animais e preparação do tecido para análises.

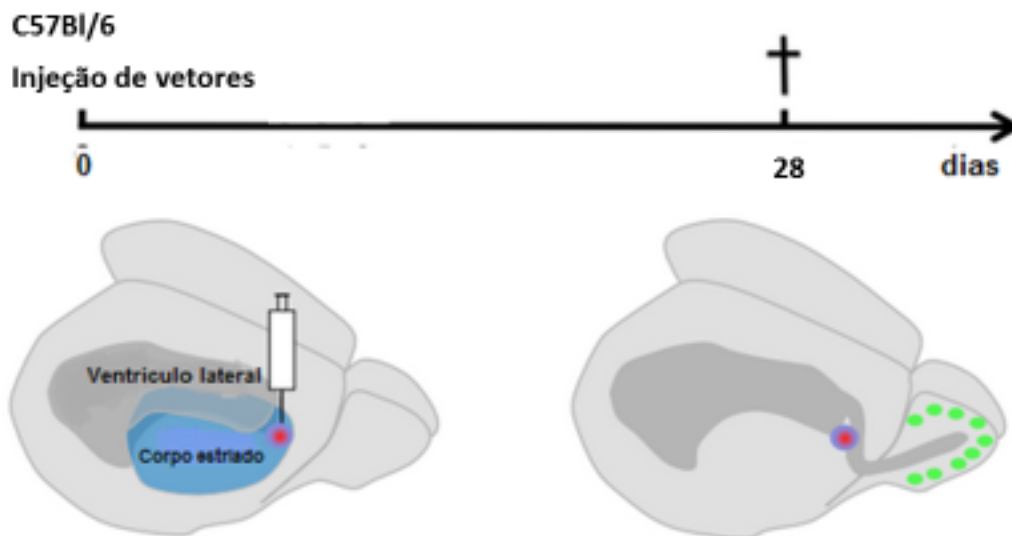


Figura 15 Linha do tempo representativa dos desenhos experimentais de B a D. Em A desenho experimental, onde a injeção de vetores é feita no dia 0 e a perfusão do animal no dia pós-operatório 28. Em B, vemos o local da injeção e em C desenho representativo das células verdes, que foram infectadas pelos vetores durante a injeção.

7.0 Resultados

Análises posicionais e de distribuição entre camadas

Neste projeto, adotamos duas estratégias de manipulação da atividade elétrica por neuroblastos da SVZ em migração para o bulbo olfatório ipsilateral. Estas estratégias são a farmacológica e a genética. Na estratégia farmacológica, foi utilizada a injeção de Ácido Caínico (KA), um agonista glutamatérgico com a finalidade de aumentar a atividade elétrica celular na área injetada como descrito no desenho experimental A. Na estratégia genética utilizamos a injeção de um lentivírus que após infecção celular leva expressão de um canal de sódio bacteriano que aumenta a atividade celular, iniciamos as cirurgias dessa estratégia com o injetor Nanoliter que nessa sessão de resultados está representado no experimento B.

Porém, devido ao baixo número de células encontrado no experimento B foi adotada uma nova técnica de injeção com menor volume e menor velocidade de injeção, como descrito no experimento C. Para tal foi utilizado um segundo injetor de sistema manual que chamamos microinjetor. Os resultados desse experimento estão descritos no experimento C.

Como os resultados de B e C foram divergentes, foi realizada uma nova contagem aumentando o número de células contadas nos experimentos B e C. Como esses dados ampliados não foram divergentes tanto em distribuição de células dentro da camada granular como entre todas as camadas do bulbo olfatório os animais das diferentes técnicas foram agrupados e os testes de distribuição celular entre camadas foram novamente aplicados. Estes dados estão representados na seção 7.4.

Para a análise posicional das células dentro das camadas do BO e para a análise de posição dentro da própria camada granular os cortes foram reconstruídos em Stereo Investigator e a posição dos corpos celulares demarcadas. A reconstrução foi plotada em XML e analisada em Matlab.

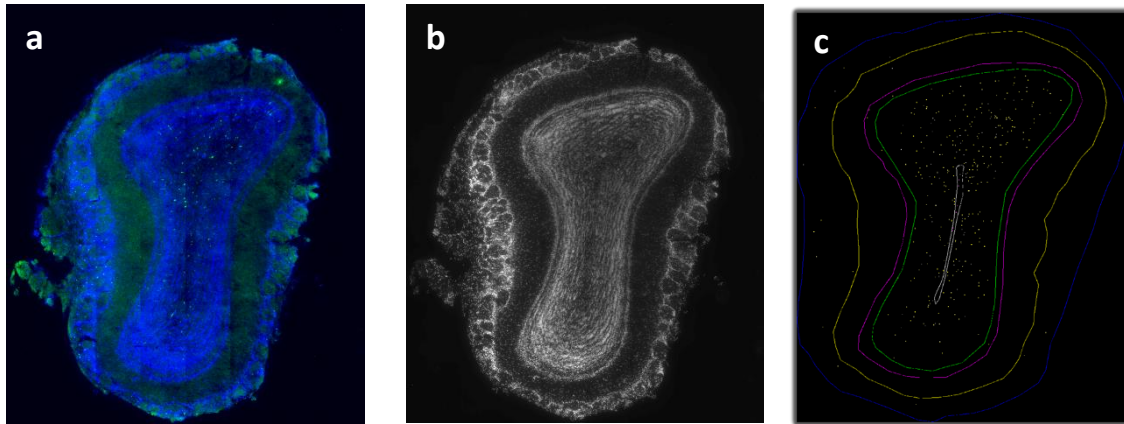


Figura 16 Sistema de reconstrução de corte em Stereo investigador. Em “a”, a reconstrução do bulbo olfatório a partir de múltiplas fotos, um mosaico, representando um corte coronal de bulbo olfatório (em azul Dapi, em Verde células GFP+). Em “b” uma foto em escala de cinza de Dapi, representando a imagem que foi usada para reconstruir as camadas do tecido em tempo real. Em “c” a reconstrução das camadas com os marcadores indicando a posição dos corpos celulares.

Análises de fenótipo neuroquímico

Quanto à análise de fenótipo neuroquímico das células periglomerulares aqui estão apresentadas as contagens relativas apenas ao experimento C, que apresenta um maior número de células. As contagens do experimento A foram realizadas de forma independente em outro trabalho do nosso grupo e serão discutidos.

As contagens foram realizadas com dois métodos distintos. Com microscopia confocal e com microscopia óptica através do uso do programa Stereo Investigator associado ao Apotome. A segunda análise foi realizada com o objetivo de aumentar o número de células contadas, ampliando assim o n amostral.

7.1 Experimento A: não há diferença na distribuição entre camadas e distribuição na GCL entre os grupos PBS e KA

Foram reconstruídos os bulbos olfatórios bilateralmente (direito e esquerdo) de 5 animais PBS e 5 animais cainato (KA) manejados de acordo com o experimento descrito como experimento “A” na sessão de desenhos experimentais. Foram analisadas 3 fatias por animal por bulbo olfatório de porções iniciais, médias e finais do órgão. Sendo analisados os cortes de número 2, 6 e 8 de cada lâmina que continha 10 cortes. A média de células total, incluindo lado direito e esquerdo foi de 2571 (SEM=460) para os animais PBS contra 2090 (SEM = 316) para os animais cainato, não havendo diferença estatística entre os grupos (p valor = 0,41, Teste T bicaudal). A média de células do lado direito foi

de 1507,3333 (SEM=225,48) para os animais PBS e 1365,75 (SEM=209,33) para o grupo KA, com $p=0,66$.

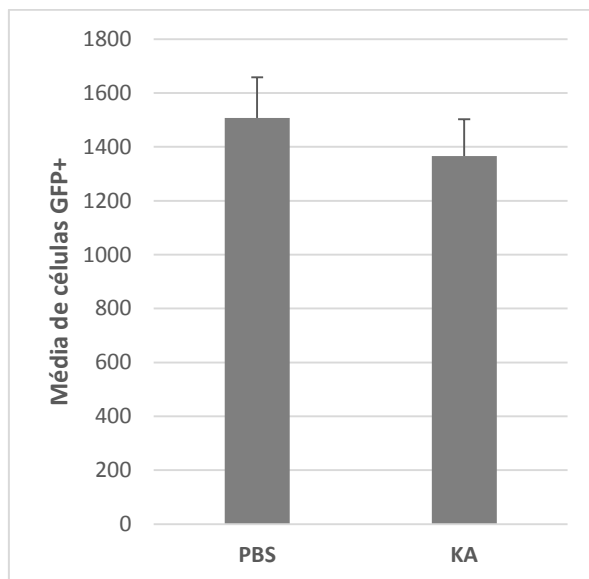


Figura 17 Média de células GFP positivas nos bulbos olfatórios direitos dos animais PBS e KA mostrando que não há redução do número de células no grupo KA.

Ao compararmos os lados direito e esquerdo dos bulbos olfatórios dos animais KA não há redução média do lado esquerdo, que não sofreu nenhum tipo de intervenção. Média KA Esquerdo = 931 (SEM = 129) Média KA direito = 1160 (SEM=196), ($p = 0,111$). Notar tendência de queda no gráfico da figura 18. Os animais PBS também mantém a diferença de lateralidade entre os bulbos olfatórios com média de no bulbo direito de 1282 (SEM= 209) e média no bulbo esquerdo de 930,5 (SEM=115), como indicado no gráfico da figura 18. Apesar da diminuição global de células nos animais KA podemos perceber a manutenção de uma proporção entre lados direitos e esquerdos e uma possível lateralização da neurogênese adulta do sistema SVZ-BO.

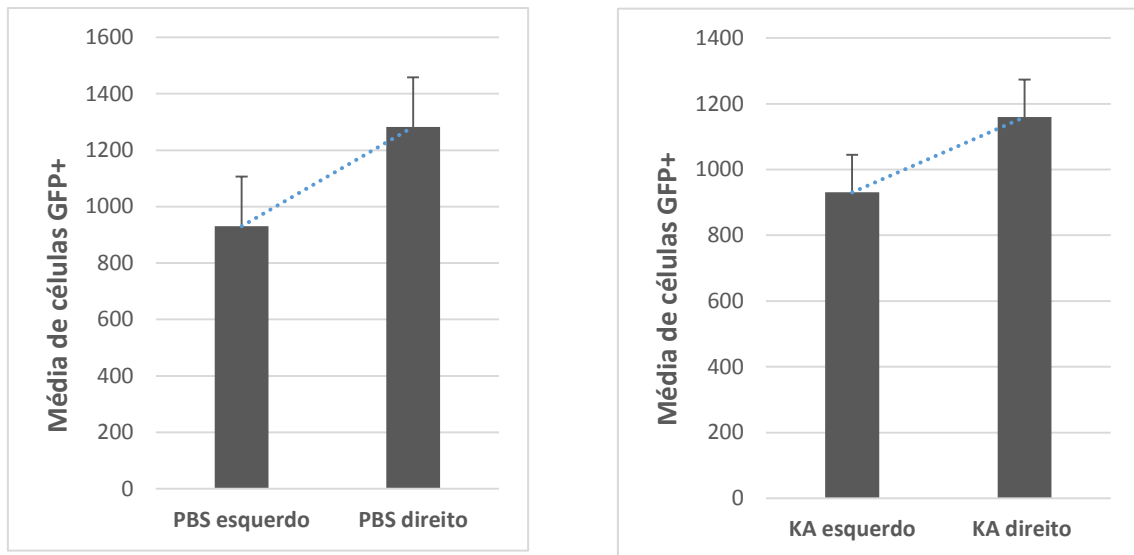


Figura 18 Possível lateralização da neurogênese olfatória. Notar diferença de números entre os lados direito e esquerdo que não sofre alteração no grupo KA.

A partição por camada no experimento A com normalização por GFP total resultou médias de GL = 13,33% (SEM= 1,67), EPL= 0,82% (SEM= 0,77), MCL= 2,49% (SEM= 0,81), GCL= 82,37% (SEM= 3,88), RMS= 1,05% (SEM= 2,91) para o grupo PBS e GL= 12,00% (SEM= 1,24), EPL= 0,74% (SEM= 0,06), MCL= 2,88% (SEM= 1,57), GCL= 84,15% (SEM= 1,84), RMS= 0,22% (SEM= 0,36) para o grupo KA. Não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas para GL ($p= 0,72$), EPL ($p= 0,64$), MCL ($p= 0,33$), GCL ($p= 0,72$) e RMS ($p= 0,39$).

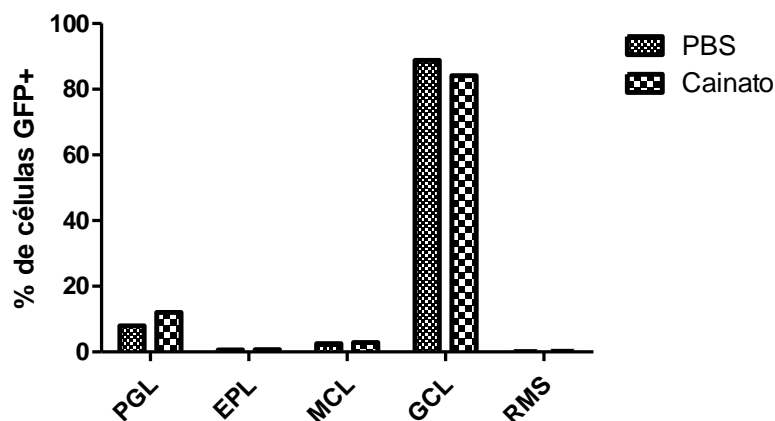


Figura 19 Não há diferença significativa entre a distribuição de camadas no experimento A. PBS n=5, KA n=5.

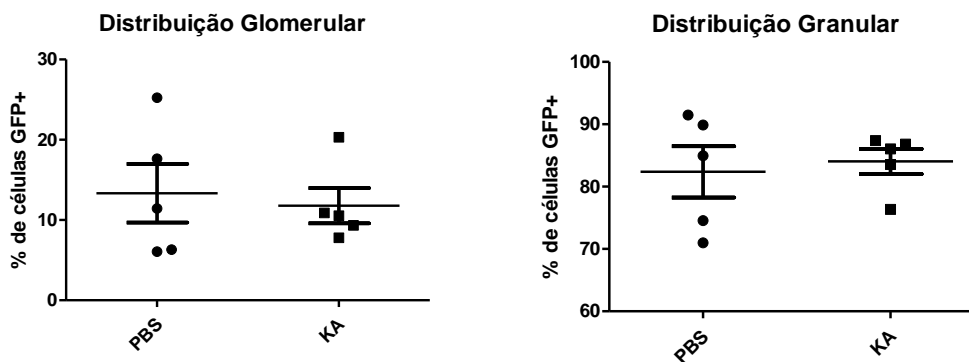


Figura 20 Porcentagens de células que se diferenciaram nas camadas Glomerular e Granular. Os gráficos mostram porcentagem de células GFP+ em todo o corte coronal que estavam nas camadas Glomerular e Granular. Estes valores são os mesmos apresentados na Figura 19, com todas as camadas.

Ao analisar a distribuição posicional das células dentro da camada granular em 10 bins posicionais a comparação das curvas de distribuição KA e PBS não rendeu diferença estatística pelo teste de Kolmogorov–Smirnov, as distribuições não apresentaram diferenças estatística. Gráfico da figura 21 representa PBS em azul e KA em vermelho.

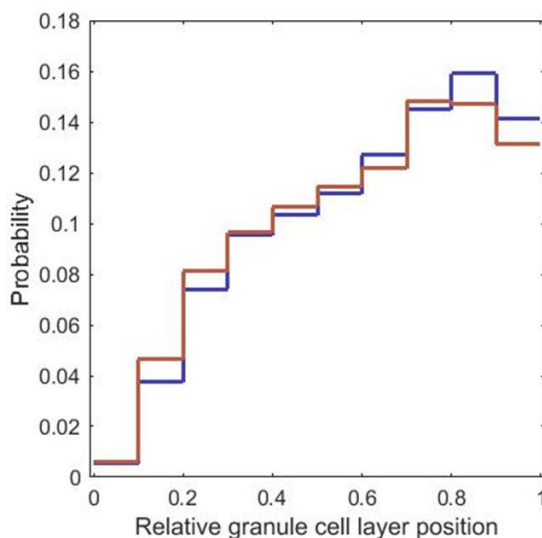


Figura 21 Distribuição de células GFP+ ao longo da profundidade da camada granular. O primeiro bin, em 0, representa o mais profunda, próximo a RMS. Gráfico representativo da distribuição relativa à menor distância da célula em relação aos dois traçados da camada mitral e da SVZ bulbar. Em azul temos o grupo PBS e em vermelho o grupo KA.

7.2 Experimento B: há aumento de células na camada GCL e diminuição na camada GL no grupo NaChBac

Para as quantificações do experimento B foram reconstruídas fatias de bulbos olfatórios direitos de 13 animais, 7 injetados com o lentivírus que carregava a sequência para o canal mutado EtoK e 6 com o lentivírus que carregava a sequência do gene para o canal bacteriano NaChBac, manejados de acordo com o experimento descrito como experimento “B” na sessão de desenhos experimentais. Foram analisadas 3 fatias por animal por bulbo olfatório de porções iniciais, médias e finais do órgão. Sendo analisados os cortes de número 4, 8 e 12 de cada lâmina que continha 15 cortes. A média de células total por animal foi de 86,83 (SEM=27,65) para os animais NaChBac contra 50,78 (SEM = 9,14) para os animais EtoK, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,11$, Teste T bicaudal) (figura 22).

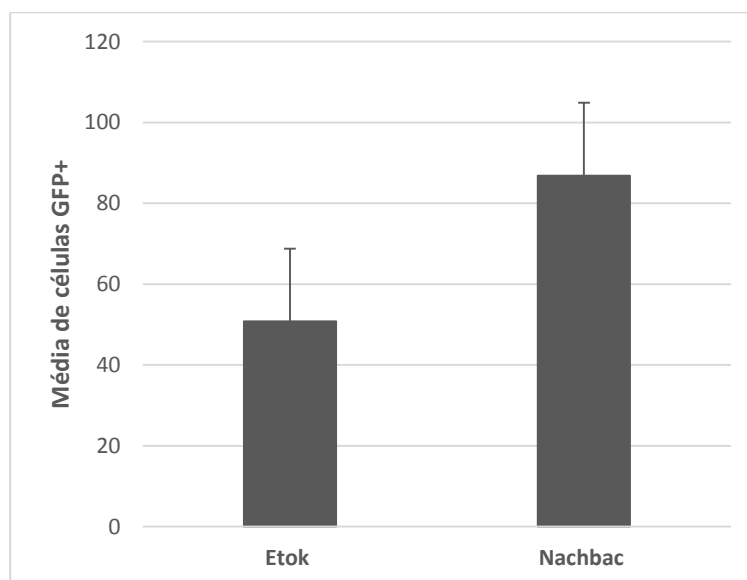


Figura 22 Média do número células GFP positivas nos bulbos olfatórios direitos dos animais EtoK e NaChBac.

7.2.1 Distribuição celular por camada experimento B

A partição por camada no experimento B com normalização por GFP total resultou médias de GL =7,92% (SEM= 1,67), EPL=2,36% (SEM= 0,77), MCL= 3,00% (SEM= 0,81), GCL=78,96% (SEM= 3,88), RMS= 7,73% (SEM= 2,91) para o grupo EtoK e GL= 2,85% (SEM= 1,24), EPL=0,09% (SEM= 0,06), MCL=3,71% (SEM= 1,57), GCL=92,54% (SEM= 1,84), RMS=0,79% (SEM= 0,36) para o grupo NaChBac. Com diferença estatisticamente significativa entre as camadas GL ($p = 0,02$) e GCL ($p=0,0037$)

confirmada pelo teste T dada a normalidade dos dados testada por KS. As demais camadas não passaram pelo teste de normalidade, sendo testadas pelo Teste U de Mann-Whitney e não apresentando diferença estatística (figura 23).

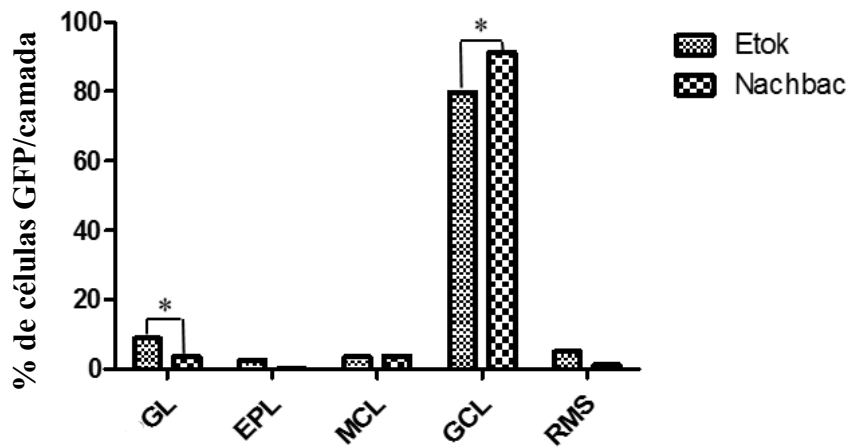


Figura 23 Diminuição das células na camada Glomerular no grupo NaChBac e aumento na camada GCL. EtoK n=7, NaChBac n=6.

Ao analisar a distribuição posicional das células dentro da camada granular em 5 bins posicionais a comparação das curvas de distribuição EtoK e NaChBac não rendeu diferença estatística pelo teste KS. Figura 24 representa EtoK em azul e NaChBac em vermelho.

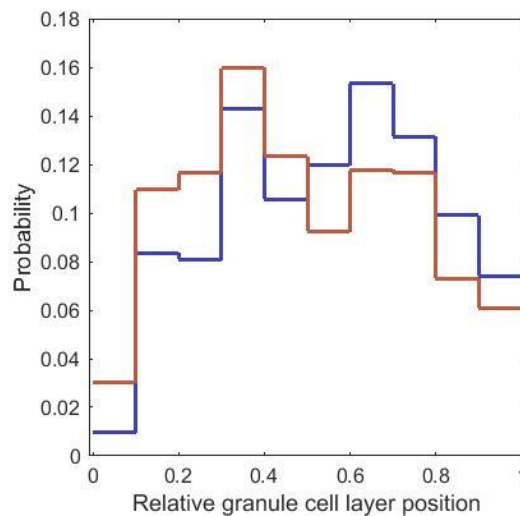


Figura 24 Distribuição de células GFP+ ao longo da profundidade da camada granular. O primeiro bin, em 0, representa o mais profunda, próximo a RMS. Gráfico representativo da distribuição relativa à menor

distância da célula em relação aos dois traçados da camada mitral e da SVZ bulbar. Em azul temos o grupo EtoK e em vermelho o grupo NaChBac.

7.3 Experimento C: não há diferença na distribuição entre camadas e distribuição na GCL entre os grupos EtoK X NaChBac

No experimento C, que usa a estratégia de manipulação genética aliada a um segundo sistema de injeção, foram reconstruídos bulbos olfatórios direitos de 6 animais, 3 injetados com o lentivírus que carregava a sequência para o canal mutado EtoK e 3 com o lentivírus que carregava a sequência gênica para o canal bacteriano NaChBac manejados de acordo com o experimento descrito como experimento “C” na sessão de desenhos experimentais. Foram analisadas 3 fatias por animal por bulbo olfatório de porções iniciais, médias e finais do órgão. Sendo analisados os cortes de número 4, 8 e 12 de cada lâmina que continha 15 cortes. A média de células total por animal foi de 324,20 (SEM= 91,00) para os animais NaChBac contra 91,78 (SEM = 20,40) para os animais EtoK, havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,025$, Teste T bicaudal). (Figura 24). O maior número de células NaChBac, nesse caso, pode se dar tanto por variação da titulação viral, variabilidade da injeção e efeito de sobrevivência do NaChBac sobre as células.

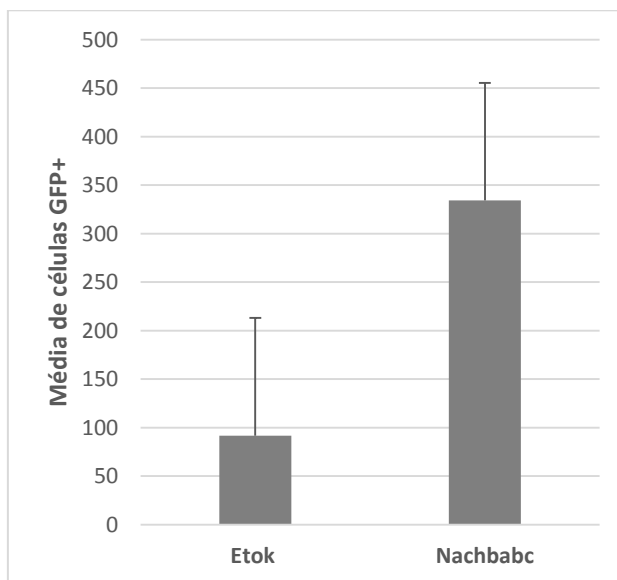


Figura 25 Média do total de células GFP positivas nos bulbos olfatórios direitos contadas em 3 cortes dos animais EtoK e NaChBac.

7.3.1 Distribuição celular por camada experimento C

A partição por camada no experimento C com normalização pelo número total de células GFP+ foi de médias de GL = 9,51% (SEM=1,65), EPL= 2,38% (SEM=0,46), MCL= 4,67% (SEM=0,77), GCL= 78,42% (SEM=3,87), RMS= 4,99% (SEM=2,18) para o grupo EtoK e GL= 6,05% (SEM=3,84), EPL=1,57% (SEM=0,93), MCL=1,78% (SEM=1,12), GCL=85,05% (SEM=6,50), RMS=5,53% (SEM=2,03) para o grupo NaChBac. Sem diferenças no teste T entre as camadas GL (p = 0,38); EPL (p=0,41); MCL (p=0,05); GCL (p=0,37) e RMS (p= 0,85), porém mantendo as tendências de aumento e queda registradas no experimento B.

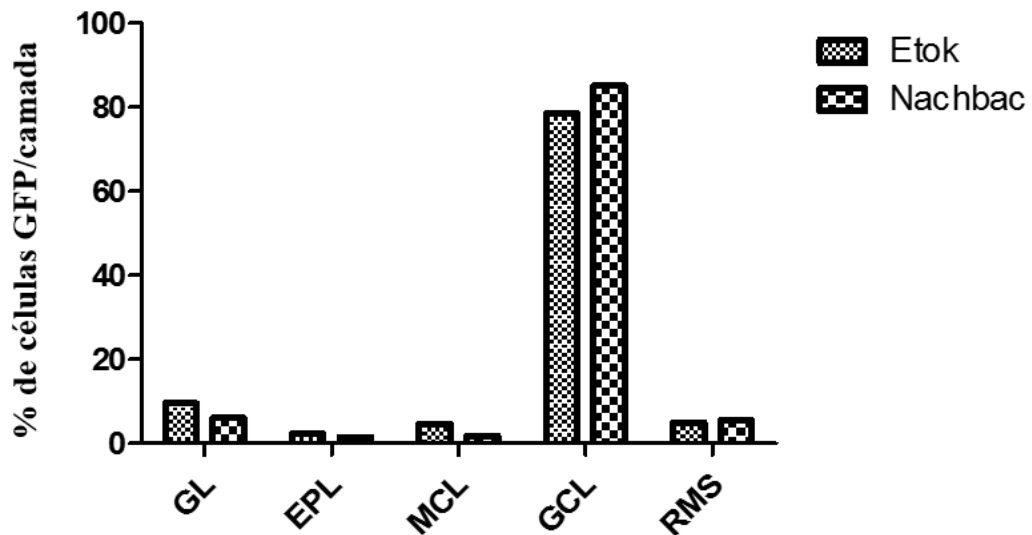


Figura 26 Não há diferença estatística entre a distribuição de células EtoK e NaChBac no experimento C GCL. EtoK n=3, NaChBac n=3.

Ao analisar a distribuição posicional das células dentro da camada granular em 5 bins posicionais a comparação das curvas de distribuição EtoK e NaChBac não rendeu diferença estatística pelo teste KS. Gráfico da figura 27 representa EtoK em azul e NaChBac em vermelho. Pode-se notar uma maior homogeneidade em os traçados em relação ao experimento B, talvez alcançado pelo maior número de células contadas por corte e por animal.

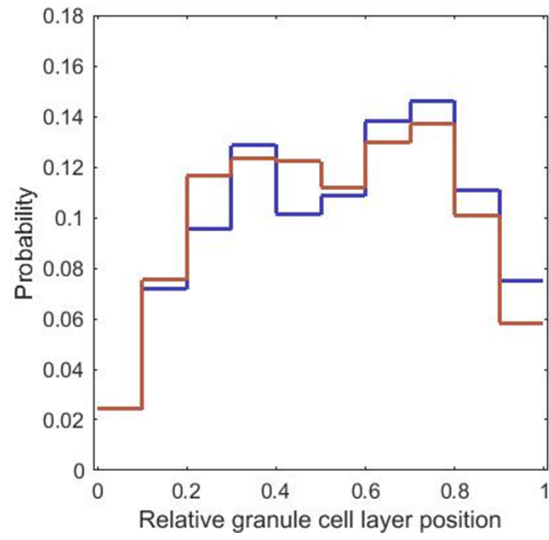


Figura 27 Distribuição posicional entre EtoK e NaChBac na camada granular não possui diferença no experimento C.

7.3.2. Não há diferença entre as células periglomerulares dos grupos neuroquímicos averiguados no experimento C

Células Tirosina Hidroxilase (TH)

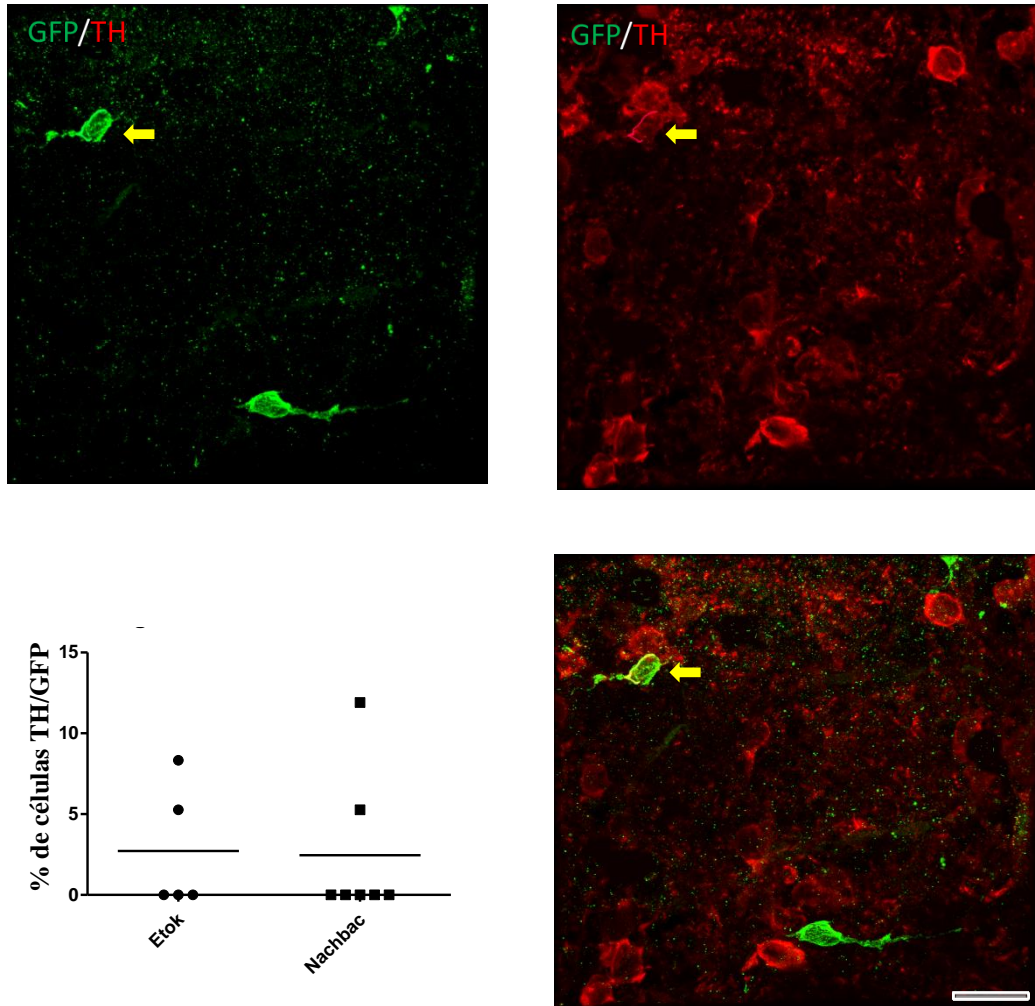


Figura 28. Células na camada glomerular do bulbo olfatório em imunohistoquímica para GFP em verde e TH em vermelho. Na seta branca uma célula negativa para TH, na seta amarela célula duplo positiva para GFP e TH. Barra de calibração 50 micrometros.

Células Calbindina GFP

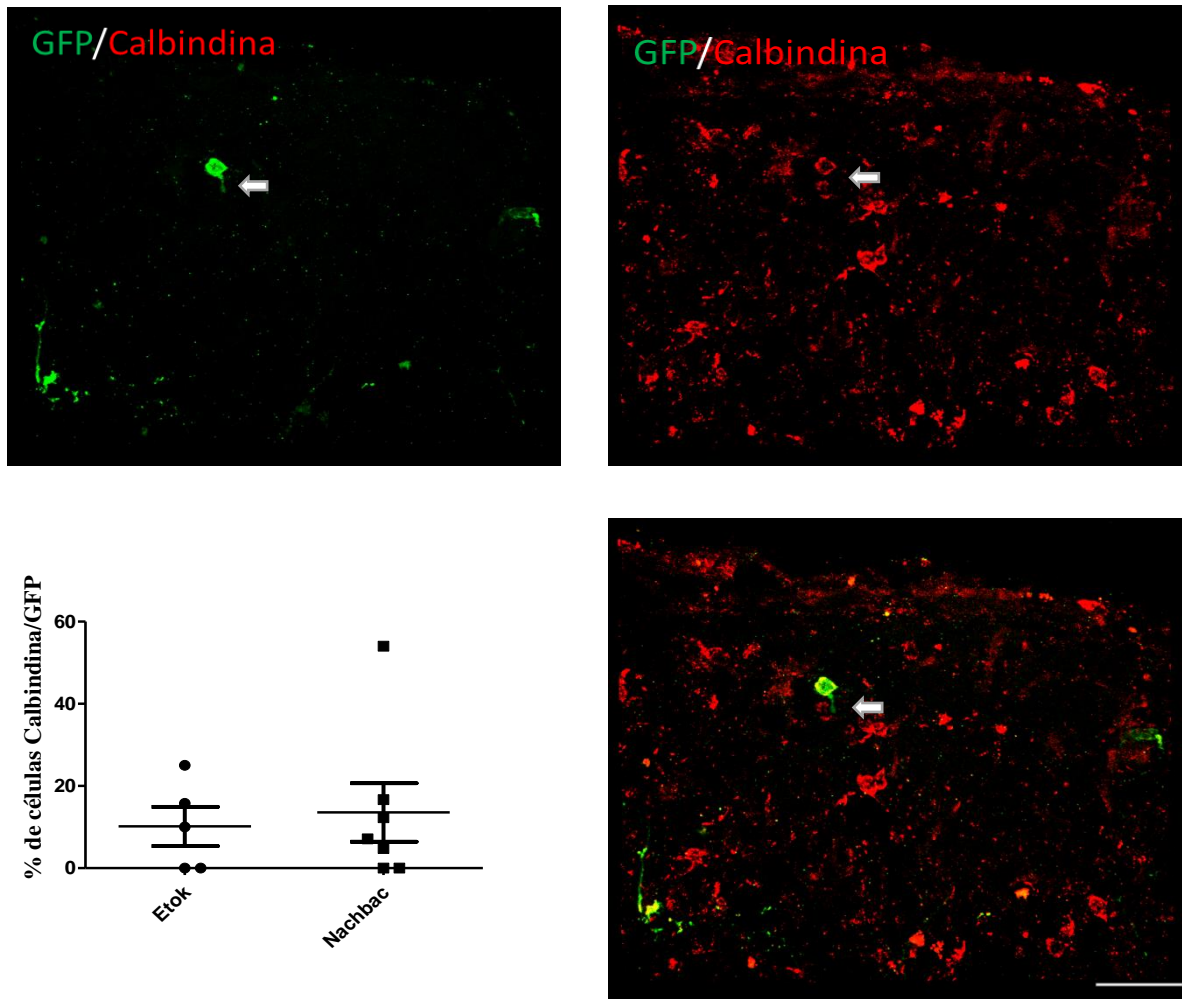


Figura 29 Células na camada glomerular do bulbo olfatório em imunohistoquímica para GFP em verde e Calbindina em vermelho. Na seta branca vê-se uma célula duplo positiva para GFP e TH. Barra de calibração 50 micrometros.

Células Calretinina GFP

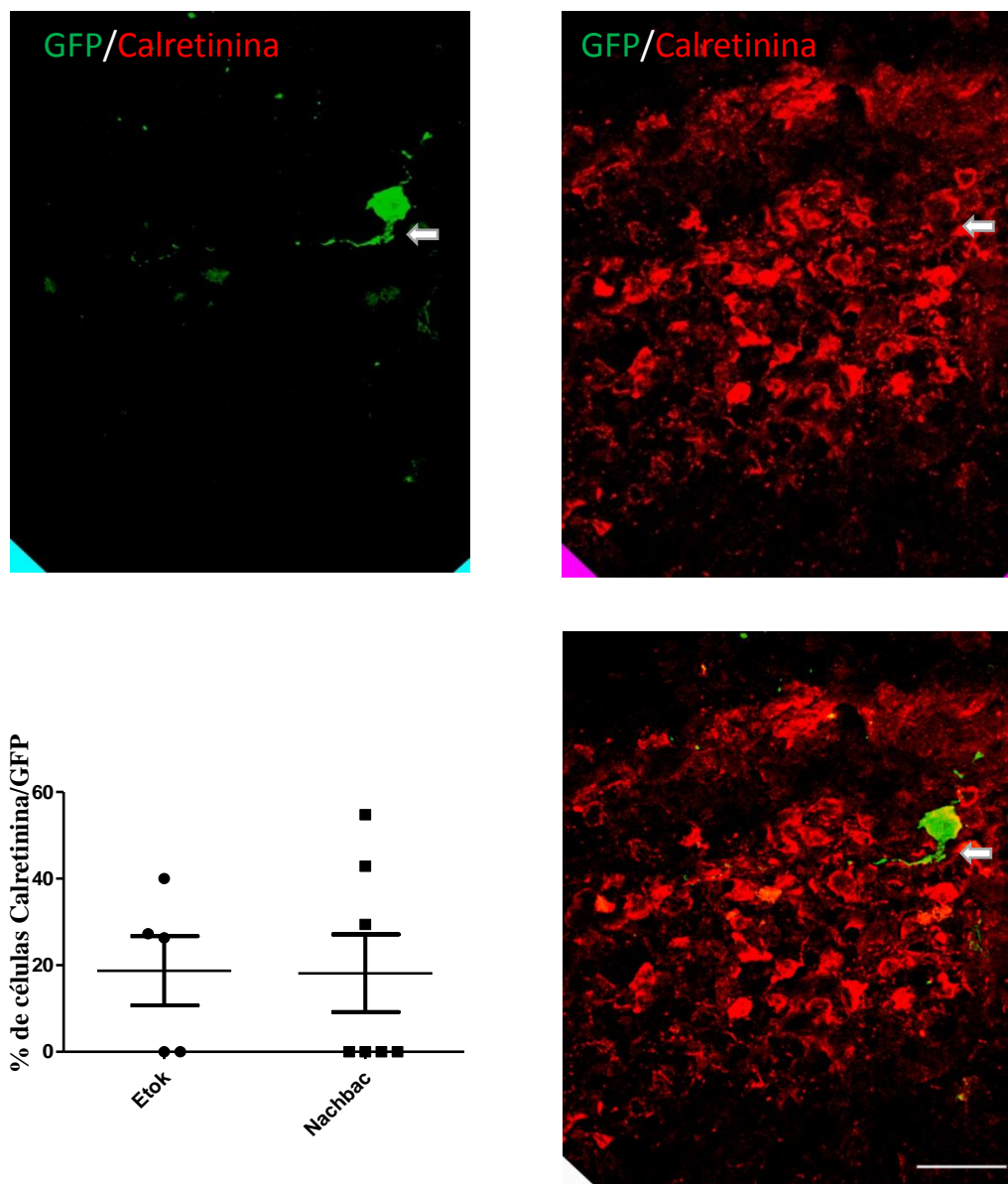


Figura 30 Células na camada glomerular do bulbo olfatório em imunohistoquímica para GFP em verde e Calretinina em vermelho. Na seta branca uma célula dupla positiva para GFP e Calretinina. Barra de calibração 50 micrometros.

Para as quantificações de populações neuroquímicas periglomerulares foi usada microscopia confocal para fotografar células dessa região para posterior contagem do fenótipo neuroquímico. As marcações se deram com 5 animais do grupo EtoK e 7 NaChBac. Grupo TH ($p=0,82$) figura 28, Calbindina ($p=0,83$) figura 29, Calretinina ($p=0,65$) figura 30.

Devido ao baixo número de células contado pensou-se em ampliar o número de células contadas média de 14 células glomerulares por animal EtoK (SEM=2,72) e 37 células glomerulares em animais NaChBac (SEM= 13,22). Optou-se por contar o número mínimo de 50 células glomerulares por animal. Levando de 3 a 15 cortes para tal, 5 animais por grupo. Grupo TH (p=0,53) média EtoK = 1,40% (SEM=0,94) média NaChBac=2,80% (SEM= 2,00), Calbindina (p=0,30) média EtoK = 15,20% (SEM=3,20) média NaChBac=24,00% (SEM= 7,43), Calretinina (p=0,23) média EtoK = 23,60% (SEM=2,56) média NaChBac=33,60% (SEM= 7,35). Apenas GFP (p=0,08) média EtoK = 79,20% (SEM=2,68) média NaChBac=68,40% (SEM= 5,34), figura 31.

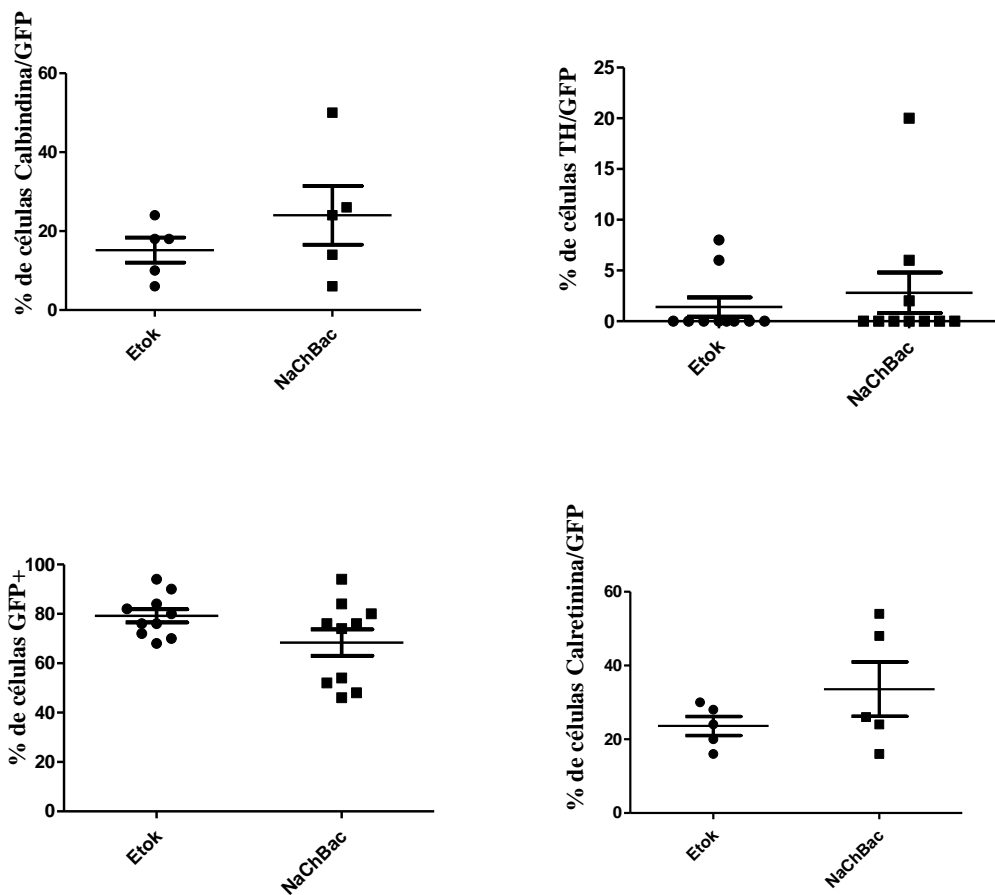


Figura 31 Não há alterações estatisticamente significativas entre os grupos de neuroquímicos pesquisados.

7.4 A diferença de distribuição entre as camadas GL e GCL desaparece após aumento do n amostral

Devido ao resultado significativo obtido no experimento B e não reproduzido no experimento C aumentamos os números de células contadas nesses grupos para verificar a veracidade dos dados, pois o achado podia se tratar de artefato devido ao baixo número de células. Passou a ser contado no mínimo 200 células por animal. O número de fatias foi expandido para até 15 para alcançar tal contagem. Dessa forma foram contados 8 animais por grupo, independentemente o tipo cirúrgico B ou C. A média de células na camada glomerular foi de EtoK = 6,64% (SEM=1,09) do total de células GFP+ e NaChBac = 5,00% (SEM= 0,79). O teste t resultou $p=0,24$ não sendo estatisticamente significativo. A média de células na camada granular foi EtoK = 89,70% (SEM=1,89) do total de células GFP+ e NaChBac = 90,09% (SEM= 2,35). O teste t resultou $p=0,90$, não sendo estatisticamente significativo. Porém observa-se ainda, como no primeiro caso, a tendência de queda na porcentagem total de células glomerulares e o ano grupo NaChBac. As células granulares parecem se igualar nos dois grupos, principalmente quando o erro é considerado (figura 32).

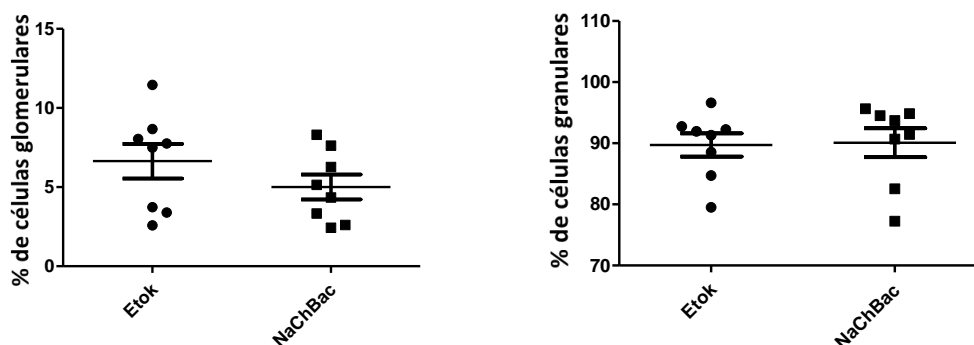


Figura 32 Não há alterações estatisticamente significativas entre a distribuição de células entre as camadas glomerular e granular como sugerido no experimento B. Os gráficos mostram porcentagem relativa ao total de células GFP+ as pertencentes às camadas Glomerular (Média EtoK = 6,64%; Nachbac = 5,00%) e Granular (Média EtoK = 89,70%; Nachbac = 90,09%).

7.5 Experimento D: Nachbac x Palmcherry insuficiente em estabelecer um controle interno

Devido a questões experimentais como a variabilidade nas cirurgias estereotáxicas, titulação e taxa de infecção viral, além do aumento de integração e sobrevivência celular promovido pelo aumento de atividade induzido pelo NaChBac (LIN et al., 2010a) se fez necessário um controle interno. Para tal, utilizamos um lentivírus de mesma constituição do anterior carregando o RNA para uma proteína fluorescente vermelha (Palmcherry). Posteriormente foi realizada imunohistoquímica com anticorpo anti-RFP que se liga às proteínas fluorescentes vermelhas no geral. Uma mistura 1:1 NaChBac/Palmcherry foi feita e injetadas nos animais como o descrito anteriormente. Foram injetados 4 animais com a mistura viral. Aos 28 dpi os bulbos foram analisados (figura 33).

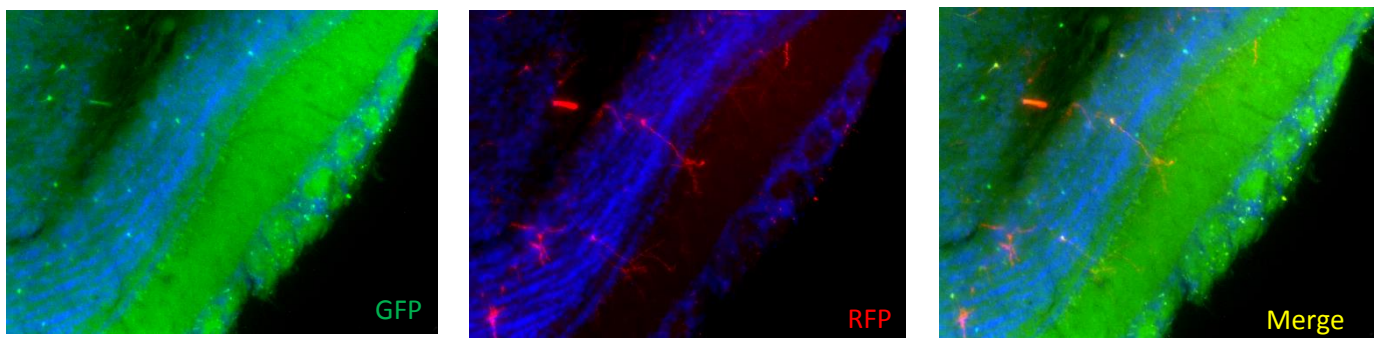


Figura 33 Células GFP e RFP positivas em um bulbo olfatório 28 dpi.

A quantificação dos 4 animais injetados mostrou cirurgias muito diversas com média total células por animal de 17,3958 (SEM= 9,0821), média de células verdes por animal de 22,3333 (SEM= 12,6299), média de células vermelhas de 12,4583 (SEM= 5,9828). Mostrando uma grande variedade nos números de células obtidos, como verificamos na figura 34.

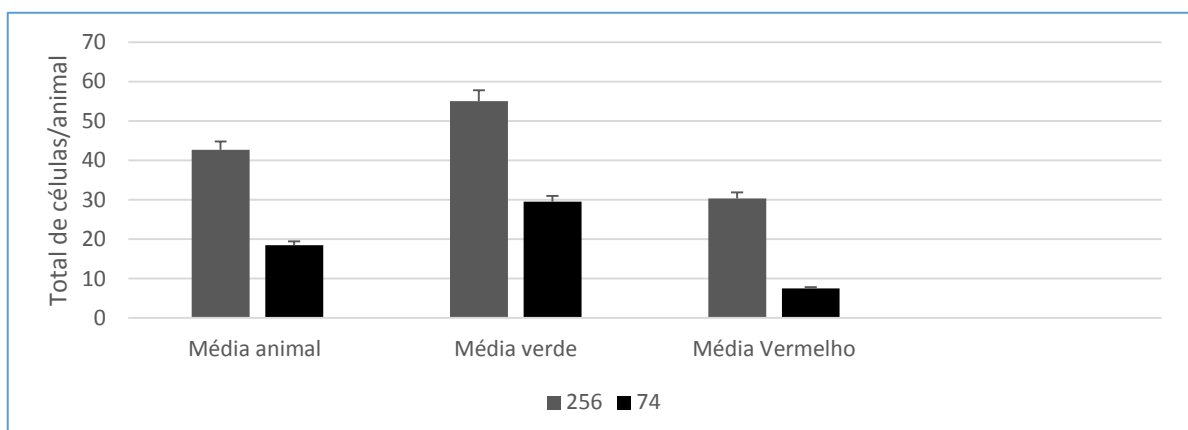


Figura 34 Células GFP e RFP positivas em um bulbo olfatório 28 dpi em números totais.

8.0 Discussão

Nesse estudo foram utilizadas duas abordagens experimentais, farmacológica e genética para manipular a atividade elétrica de neuroblastos da SVZ. Deve-se ressaltar aqui, que ao separarmos os bulbos olfatórios em direito e esquerdos percebemos uma lateralização da neurogênese. Sendo o número de células total sempre maior à direita. Essa assimetria é mostrada na literatura em Peixe-Zebra e há hipóteses de que seja influenciada por atividade (KISHIMOTO et al., 2013), ainda que em mamíferos não tenhamos encontrado trabalhos sobre o assunto.

Na abordagem farmacológica foi realizada administração de ácido caínico, droga que estimula um dos receptores para o neurotransmissor glutamato, com o objetivo de promover excitação das células da área injetada (SVZ anterior/RMS). No experimento “A” observa-se uma redução global da média de células nos animais KA, porém sem diminuição estatisticamente significativa. O número amostral de 5 animais por grupo aproximou os números e diminuiu o erro levando a crer que realmente não há diferença significativa entre os bulbos controle e os KA. Essa observação se faz importante, uma vez que há efeito tóxico do cainato já descrito na literatura (MOHD SAIRAZI et al., 2015; WANG et al., 2005; ZHANG; ZHU, 2011). Levando, inclusive, a degeneração neuronal (MOHD SAIRAZI et al., 2015). Podemos assumir, com esses números que, no volume e concentrações injetados o tratamento com cainato não foi tóxico ao neuroblastos da RMS a ponto de provocar uma diminuição no número celular quando analisamos 45dpi. Porém, esse efeito tóxico pode estar sendo mascarado pela população DCX-GFP já que foram marcadas com GFP todas as células que expressavam DCX durante as injeções de tamoxifeno. Sendo esse número, com certeza, muito maior do que o número de células atingidas no local do tratamento. Também há dúvidas sobre a extensão dessa manipulação pois o cainato pode, conhecidamente causar de patogénia, ter provocado mudanças no microambiente celular da RMS. É sabido na literatura que a ativação de receptores cainato nas células da SVZ leva a uma diminuição na velocidade de migração (PLATEL et al., 2008).

As distribuições por camada não renderam diferença estatística, mostrando que os animais KA possuem distribuição de células semelhante ao controle, o que é esperado já que a atividade elétrica vem se mostrando importante para a reespecificação de neurotransmissor e não para a mudança de alocação posicional da célula (BIRREN; MARDER, 2013; BORODINSKY et al., 2004; SPITZER, 2012). As curvas de

meses com células marcadas em GFP, a imagem b mostra o mesmo corte com células marcadas em Calbindina, a imagem c revela o mesmo corte com células marcadas em TH e a d apresentada todas as marcações sobrepostas. As cabeças de seta branca mostram a co-localização dos marcadores TH+/GFP+ e as cabeças de seta amarela mostram a co-localização Calbindina+/GFP+. Na imagem E e F vemos a projeção no eixo Z da célula marcada em Calbindina+/GFP+. Os gráficos h a quantificação dos interneurônios Calbindina+/GFP+ com o injetor Nanojector e Hamilton. O gráfico J mostra a quantificação dos TH+/GFP+. Barra de calibração 50 μ m. * $P < 0,0227$, teste T.

Na abordagem genética, procedemos com dois tipos de injeção viral (EtoK e NaChBac) por capilar de vidro devido a variação no número de células encontrado. O primeiro método que usou o injetor Nanoliter rendeu um número considerado baixo de células podendo constituir um viés importante. Para tentar controlar tal viés excluímos da quantificação amostras com menos de 50 células por fatia. Com isso em mente, observamos nos experimentos B e C um aumento de células granulares, ainda que no experimento C não tenhamos aumento estatisticamente significativo. Para tentar resolver essa inconsistência entre os experimentos aumentamos o número de cortes e células contados no experimento B para um mínimo de 200 células por animal. Ao concatenar os dados dos dois experimentos, aumentando os números tanto de células como de animais a diferença estatística deixou de existir. Ainda que tenham se mantido as tendências de redução de células na camada GL e aumento na camada GCL. Podemos estar diante de um problema de tamanho de efeito, pois a neurogênese adulta possui um número de células geradas inferior ao da neurogênese embrionária e pós natal (MARCHIS et al., 2007) e não sabemos se o número de células observadas no experimento é suficiente para demonstrar o efeito ou se realmente não há efeito.

Na quantificação de tipos neuroquímicos dos neurônios periglomerulares em positivos para TH, Calbindina e Calretinina o baixo número de células também foi um entrave. Na primeira quantificação, realizada com microscopia confocal, obtivemos uma média baixa de células por animal, tanto no grupo EtoK como no grupo Nachbac, não obtendo diferença estatística em nenhum dos grupos. Ao tentarmos aumentar o número de células contadas, em virtude do tempo disponível, mudamos de técnica para um microscópio óptico com a tecnologia Apotome que conferiria confocalidade à contagem. Contou-se o mínimo de 50 células por animal e seus fenótipos neuroquímicos foram averiguados. Surpreendentemente, a maior porcentagem de células foi de células GFP positivas que não comarcavam com os marcadores mencionados. Seria interessante verificar se essas células são apenas gabaérgicas, um grupo neuroquímico importante para

esse tipo de interneurônios. Porém uma dificuldade encontrada nessa etapa foi encontrar uma regulação precisa para o Apotome que pareceu parar de demarcar a profundidade correta dos cortes durante as contagens, esses números então se tornam fragilizados uma na quantificação onde a confocalidade das marcações é garantida há um baixo número contado e nas contagens onde há um maior número de células contadas a confocalidade é duvidosa. Podendo ter sido contadas células verdes com GFP endógeno em alturas do tecido onde a imunohistoquímica para os demais marcadores não penetrou.

Há uma segunda limitação técnica importante para esse estudo, já foi demonstrado que o Nachbac aumenta a integração e a sobrevivência das células granulares na neurogênese adulta do bulbo olfatório(LIN et al., 2010b). Então, para fazer qualquer afirmação sobre o efeito da atividade na especificação de neurotransmissor ou posição dos neurônios o fator sobrevivência deve ser controlado. A execução correta do experimento passa por um melhor controle interno, uma vez que o Nachbac pode aumentar a integração e sobrevivência média das células. Para tal, deve-se injetar conjuntamente um vírus que apenas levará a expressão de uma proteína repórter. Além disso, devido ao declínio natural do número de células ao longo da maturação dos neurônios gerados na neurogênese adulta (KELSCH et al., 2010; LIN et al., 2010b) a avaliação de sobrevivência depende da análise de mais pontos numa sequência temporal.

Com essa intenção realizamos o experimento D. O desenho original pretendia analisar animais injetados com a mistura de Nachbac e vírus controle aos dias pós injeção 7, 14 e 28. Porém, devido a contratempos conseguimos analisar apenas 4 animais 28 dpi. O resultado desapontou o esperado, mesmo usando o sistema de injeção que gerou mais células obtivemos poucas células por animal, impossibilitando uma análise mais detalhada do material. Atribuímos essa falha à uma série de variáveis mudadas durante a cirurgia desse último grupo de animais e também à diluição dos vírus sem a preocupação de aumentar o volume injetado. Na mistura 1:1 injetou-se, na verdade, metade do número de partículas do vírus Nachbac do que anteriormente já que o volume injetado foi o mesmo do grupo C. Sem os outros pontos temporais também não foi possível realizar a análise de sobrevivência.

9.0 Conclusão

Nesse estudo utilizamos duas estratégias para modular a atividade elétrica de neuroblastos em migração na SVZ com o intuito de avaliar o papel da atividade elétrica sobre a escolha do fenótipo final do interneurônios. Nossos resultados sugerem que a manipulação do perfil elétrico destes progenitores influencia o destino do neurônio diferenciado na abordagem farmacológica. Já que o cainato não parece exercer efeito tóxico sobre as células e há uma redução nas células TH+. Sem alterações posicionais na alocação das células geradas na neurogênese adulta.

Quanto à abordagem genética os dados sobre a escolha de fenótipo neuroquímico ainda são inconsistentes, necessitando de novas contagens com rigor metodológico apropriado (aumento do número de células contadas e profundidade das marcações garantida por confocal) para que alguma conclusão possa ser tomada. Além disso, devem ser realizados os experimentos com o controle interno adequado para definir se um provável aumento de população ocorre por reespecificação de neurotransmissor ou por aumento de sobrevivência de um tipo específico.

Os experimentos de controle interno também ajudarão a definir se realmente há um efeito de diminuição das células NaChBac na camada glomerular e aumento na granular, já que os dados poderão ser comparados aos do controle interno. Essa quantificação será importante pois não foi verificada por outros trabalhos que avaliaram o efeito de Nachbac sobre a integração e especificação de interneurônios da neurogênese adulta do sistema SVZ-BO(BANDO et al., 2016; KELSCH et al., 2010; LIN et al., 2010b)

10. Bibliografia

ALONSO, M. et al. Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. **Journal of Neuroscience**, 2006.

ALONSO, M. et al. Turning Astrocytes from the Rostral Migratory Stream into Neurons: A Role for the Olfactory Sensory Organ. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 43, p. 11089–11102, 2008.

ALONSO, M. et al. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. **Nature Neuroscience**, 2012.

ALTMAN, J. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. **Experimental neurology**, v. 5, p. 302–318, 1962.

ALTMAN, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. **The Anatomical record**, v. 145, p. 573–591, 1963.

ALTMAN, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. **The Journal of comparative neurology**, v. 137, p. 433–457, 1969.

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

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

AZIM, K. et al. Persistent wnt/ β -catenin signaling determines dorsalization of the postnatal subventricular zone and neural stem cell specification into oligodendrocytes and glutamatergic neurons. **Stem Cells**, v. 32, n. 5, p. 1301–1312, 2014.

BAKER, H. Unilateral, neonatal olfactory deprivation alters tyrosine hydroxylase expression but not aromatic amino acid decarboxylase or GABA immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 36, n. 3, p. 761–771, 1990.

BANDO, Y. et al. Control of Spontaneous Ca^{2+} Transients Is Critical for Neuronal Maturation in the Developing Neocortex. **Cerebral Cortex**, v. 26, n. 1, p. 106–117, 2016.

BELGACEM, Y. H.; BORODINSKY, L. N. Belgacem, Y. H., & Borodinsky, L. N. (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(11), 4482–4487. <http://doi.org/10.1073/pnas.1018217108Sonic>

- hedgehog signaling i. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, n. 11, p. 4482–4487, 2011.
- BIRREN, S. J.; MARDER, E. Neuroscience. Plasticity in the neurotransmitter repertoire. **Science**, v. 340, n. 6131, p. 436–7, 2013.
- BONZANO, S. et al. Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 10, p. 3450–3457, 2014.
- BORODINSKY, L. N. et al. Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons. **Nature**, v. 429, n. 6991, p. 523–530, 2004.
- BORODINSKY, L. N. et al. Dynamic regulation of neurotransmitter specification: Relevance to nervous system homeostasis. **Neuropharmacology**, v. 78, p. 75–80, 2013.
- BORODINSKY, L. N. et al. Spatiotemporal integration of developmental cues in neural development. **Developmental Neurobiology**, v. 75, n. 4, p. 349–359, 2015.
- BORODINSKY, L. N.; BELGACEM, Y. H.; SWAPNA, I. Electrical activity as a developmental regulator in the formation of spinal cord circuits. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 22, n. 4, p. 624–630, 2012.
- BORODINSKY, L. N.; SPITZER, N. C. Second messenger pas de deux: the coordinated dance between calcium and cAMP. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2006, n. 336, p. pe22, 2006.
- BRISCOE, J. et al. **A Homeodomain Protein Code Specifies Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in the Ventral Neural Tube The secretion of Shh by the notochord and floor plate controls the specification of ventral cell types (Marti et al Five distinct classes of ventral neurons can be generated in vitro in response to progressive 2-toCell.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2980853-3>>. Acesso em: 18 ago. 2018.
- BUCK, L.; AXEL, R. A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition. **Cell**, v. 65, p. 175–187, 1991.
- CARTIER, R. et al. In Vivo Gene Transfer by Low-Volume Jet Injection. **Analytical Biochemistry**, v. 282, n. 2, p. 262–265, 2000.
- CHARALAMBOUS, K.; WALLACE, B. A. **NaChBac: The long lost sodium channel ancestor****Biochemistry**, 2011.

CHENG, L. et al. Lbx1 and Tlx3 are opposing switches in determining GABAergic versus glutamatergic transmitter phenotypes. **Nature Neuroscience**, 2005.

COSTA, M. R. et al. Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. **Development**, v. 138, n. 6, p. 1057–1068, 15 mar. 2011.

DAADI, M. M.; WEISS, S. **Generation of Tyrosine Hydroxylase-Producing Neurons from Precursors of the Embryonic and Adult Forebrain**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/19/11/4484.full.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

DOETSCH, F. et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. **Neuron**, v. 36, n. 6, p. 1021–1034, 2002.

DOETSCH, F.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11619–24, 1999.

DULCIS, D.; SPITZER, N. C. Reserve pool neuron transmitter respecification: Novel neuroplasticity. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 4, 2012.

DULCIS, D.; SPITZER, N. C. Neurotransmitter Switching in the Adult Brain Regulates Behavior TH. v. 340, n. April, p. 1–19, 2013.

ERICSON, J. et al. **Pax6 Controls Progenitor Cell Identity and Neuronal Fate in Response to Graded Shh Signaling concentrations of Shh are required for the induction of V1 and V2 interneurons and for MNs, with the requisiteCell**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2980323-2>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

ERICSON, J.; MORTON, S.; KAWAKAMI, A. **Two Critical Periods of Sonic Hedgehog Signaling Required for the Specification of Motor Neuron IdentityCell**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2981386-0>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

FIGUERES-OÑATE, M.; LÓPEZ-MASCARAQUE, L. Adult Olfactory Bulb Interneuron Phenotypes Identified by Targeting Embryonic and Postnatal Neural Progenitors. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. May, p. 1–12, 2016.

- FUENTEALBA, L. C. et al. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1644–1655, 2015.
- GERAERTS, M. et al. Lentiviral Vectors Mediate Efficient and Stable Gene Transfer in Adult Neural Stem Cells In Vivo. v. 650, n. June 2006, p. 635–650, 2006.
- GU, X.; SPITZER, N. C. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. **Nature**, v. 375, n. 6534, p. 784–787, 29 jun. 1995.
- GUTIERREZ, R. The plastic neurotransmitter phenotype of the hippocampal granule cells and of the moss in their messy fibers. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 2016.
- GUTIÉRREZ, R. Activity-Dependent Expression of Simultaneous Glutamatergic and GABAergic Neurotransmission From the Mossy Fibers In Vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, n. 5, p. 2562–2570, maio 2002.
- GUTIÉRREZ, R. et al. Plasticity of the GABAergic phenotype of the "glutamatergic" granule cells of the rat dentate gyrus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 13, p. 5594–8, 2 jul. 2003.
- HIROTA, Y. et al. Roles of planar cell polarity signaling in maturation of neuronal precursor cells in the postnatal mouse olfactory bulb. **Stem Cells**, v. 30, n. 8, p. 1726–1733, 2012.
- HOU, L.; HONG, T. Stem cells and neurodegenerative diseases. **Science in China. Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences**, v. 51, n. 4, p. 287–94, 2008.
- IMAI, T. Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 35, p. 180–188, 2014.
- JAENISCH, R. Transgenic animals. **Science**, v. 240, n. 4858, p. 1468–1474, 1988.
- JOHNSON, M. A.; ABLES, J. L.; EISCH, A. J. **Cell-intrinsic signals that regulate adult neurogenesis in vivo: Insights from inducible approaches** **BMB Reports**, 2009.
- KAPLAN, M. S. Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. **The Journal of comparative neurology**, v. 195, n. 2, p. 323–38, 1981.
- KELSCH, W. et al. A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. v. 29, n. 38, p.

11852–11858, 2010.

KEMPERMANN, G.; WISKOTT, L.; GAGE, F. H. Functional significance of adult neurogenesis. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 2, p. 186–191, 2004.

KIRSCHENBAUM, B. et al. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 2171–2180, 1999.

KISHIMOTO, N. et al. Interhemispheric asymmetry of olfactory input-dependent neuronal specification in the adult brain. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 7, p. 884–8, 2013.

KIYOKAGE, E.; KOBAYASHI, K.; TOIDA, K. The Journal of Comparative Neurology Research in Systems Neuroscience This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting , typesetting , pagination and proofreading process which may lead. 2016.

KOSAKA, K. et al. How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. **Neuroscience Research**, v. 30, n. 2, p. 101–110, fev. 1998.

LENTZ, T. B.; GRAY, S. J.; SAMULSKI, R. J. **Viral vectors for gene delivery to the central nervous system** **Neurobiology of Disease**, 2012.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Adult neural stem cells stake their ground. p. 1–9, 2014.

LIN, C. W. et al. Genetically Increased Cell-Intrinsic Excitability Enhances Neuronal Integration into Adult Brain Circuits. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 32–39, 2010b.

LIN, C. W. et al. Genetically Increased Cell-Intrinsic Excitability Enhances Neuronal Integration into Adult Brain Circuits. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 32–39, 2010a.

LOIS, C.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science**, v. 264, n. 5162, p. 1145–1148, 1994.

LOIS, C.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. v. 868, n. 2002, 2002.

LOIS, C.; GARCÍA-VERDUGO, J. M.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Chain migration of neuronal precursors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5251, p. 978–981, 1996.

LUSKIN, M. B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. **Neuron**, v. 11, n. 1, p. 173–189, 1993.

MANDAIRON, N.; JOURDAN, F.; DIDIER, A. Deprivation of sensory inputs to the olfactory bulb up-regulates cell death and proliferation in the subventricular zone of adult mice. **Neuroscience**, 2003.

MARCHIS, S. DE et al. Generation of Distinct Types of Periglomerular Olfactory Bulb Interneurons during Development and in Adult Mice : Implication for Intrinsic Properties of the Subventricular Zone Progenitor Population. v. 27, n. 3, p. 657–664, 2007.

MERKLE, F. T. et al. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 207–214, 2014.

MING, G.; SONG, H. ADULT NEUROGENESIS IN THE MAMMALIAN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 223–250, 21 jul. 2005.

MOHD SAIRAZI, N. S. et al. Kainic Acid-Induced Excitotoxicity Experimental Model: Protective Merits of Natural Products and Plant Extracts. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2015, p. 972623, 2015.

MOMBAERTS, P. et al. Visualizing an Olfactory Sensory Map. v. 87, p. 675–686, 1996.

MOMBAERTS, P. Axonal Wiring in the Mouse Olfactory System. 2006.

MORI, K. Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. **Progress in Neurobiology**, v. 29, n. 3, p. 275–320, jan. 1987.

NAGAYAMA, S.; HOMMA, R.; IMAMURA, F. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. **Frontiers in neural circuits**, v. 8, n. September, p. 98, 2014.

NOTTEBOHM, F. A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 214, n. 4527, p. 1368–1370, 1981.

OBERNIER, K.; TONG, C. K.; ALVAREZ-BUYLLA, A. **Restricted nature of adult neural stem cells: Re-evaluation of their potential for brain repair** **Frontiers in Neuroscience**, 2014.

ORONA, E.; SCOTT, J. W.; RAINER, E. C. Different Granule Cell Populations Innervate Superficial and Deep Regions of the External n Rat

- Olfactory Bulb Plexiform Layer i. v. 237, p. 227–237, 1983.
- PATON, J. A.; NOTTEBOHM, F. N. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. **Science (New York, N.Y.)**, v. 225, n. 4666, p. 1046–1048, 1984.
- PLATEL, J. et al. Tonic activation of GLU K5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone. v. 16, p. 3783–3793, 2008.
- PUCHE, A. C.; BAKER, Æ. H. Olfactory cell derivation and migration. p. 513–515, 2007.
- SEQUERRA, E. B. et al. Putrescine as an important source of GABA in the postnatal rat subventricular zone. **Neuroscience**, v. 146, n. 2, p. 489–493, 2007.
- SEQUERRA, E. B. et al. Generation of glutamatergic neurons from postnatal and adult subventricular zone with pyramidal-like morphology. **Cerebral Cortex**, v. 20, n. 11, p. 2583–2591, 2010.
- SEQUERRA, E. B. Subventricular zone progenitors in time and space: generating neuronal diversity. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. December, p. 434, 2014.
- SHEPHERD, G. M. **The synaptic organization of the brain**. [s.l.] Oxford University Press, 2004.
- SHEPHERD, G. **The synaptic organization of the brain**. [s.l.] Oxford University Press, Inc. Published, 1976. v. 1
- SIM, S. et al. Increased Cell-Intrinsic Excitability Induces Synaptic Changes in New Neurons in the Adult Dentate Gyrus That Require Npas4. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 18, p. 7928–7940, 2013.
- SNAPYAN, M. et al. Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. **Journal of Neuroscience**, 2009.
- SPITZER, N. C. Activity-dependent neurotransmitter respecification. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 2, 2012.
- SPITZER, N. C. Neuron Review Neurotransmitter Switching? No Surprise. **Neuron**, v. 86, p. 1131–1144, 2015.
- TOIDA, K. et al. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. **The Journal of comparative neurology**, v. 392, n. 2, p. 179–98, 9 mar. 1998.

TOIDA, K. et al. Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb—IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. **Neuroscience**, v. 101, n. 1, p. 11–17, out. 2000.

TONG, C. K. et al. A dorsal SHH-dependent domain in the V-SVZ produces large numbers of oligodendroglial lineage cells in the postnatal brain. **Stem Cell Reports**, v. 5, n. 4, p. 461–470, 2015.

VELAZQUEZ-ULLOA, N. A.; SPITZER, N. C.; DULCIS, D. Contexts for Dopamine Specification by Calcium Spike Activity in the CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 78–88, 5 jan. 2011.

WALTHER, W.; STEIN, U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. **Drugs**, v. 60, n. 2, p. 249–271, 2000a.

WALTHER, W.; STEIN, U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. **Drugs**, v. 60, n. 2, p. 249–71, 2000b.

WANG, Q. et al. Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 31, n. 1–3, p. 003-016, 2005.

ZHANG, X.-M.; ZHU, J. Kainic Acid-induced neurotoxicity: targeting glial responses and glia-derived cytokines. **Current neuropharmacology**, v. 9, n. 2, p. 388–98, jun. 2011.

ZHANG, X.; FIRESTEIN, S. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. **Nature Neuroscience** 2002 5:2, v. 5, n. 2, p. 124, 22 jan. 2002.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. **Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis** Cell, 2008.

ZOU, D.; CHESLER, A.; FIRESTEIN, S. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 8, p. 611–618, 2009.

ZWEIFEL, L. S.; KURUVILLA, R.; GINTY, D. D. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 615–25, 1 ago. 2005.